

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ

Милена Д. Милошевић

ВИНИЛ И ИМИНО ДЕРИВАТИ ПИРИДИНА:  
СИНТЕЗА, ФИЗИЧКО-ХЕМИЈСКА  
КАРАКТЕРИЗАЦИЈА, БИОЛОШКА  
АКТИВНОСТ И ТЕОРИЈСКЕ СТУДИЈЕ  
ЕЛЕКТРОНСКЕ СТРУКТУРЕ

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Београд, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Milena D. Milošević

VINYL AND IMINO DERIVATIVES OF  
PYRIDINE: SYNTHESIS, PHYSICO-CHEMICAL  
CHARACTERIZATION, BIOLOGICAL ACTIVITY,  
AND THEORETICAL STUDIES OF  
ELECTRONIC STRUCTURE

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2021

МЕНТОРИ:

---

Др Невена Ж. Прлаиновић, доцент Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

---

Др Илија Н. Цвијетић, научни сарадник Универзитета у Београду, Хемијски факултет

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

---

Др Александар Д. Маринковић, ванредни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

---

Др Душан Д. Мијин, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

---

Др сц. Мед. Снежана Бјелогрић, виши научни сарадник Института за онкологију и радиологију Србије

ДАТУМ ОДБРАНЕ: \_\_\_\_\_

# Винил и имино деривати пиридина: синтеза, физичко-хемијска карактеризација, биолошка активност и теоријске студије електронске структуре

## ИЗВОД

Предмет истраживања ове докторске дисертације је синтеза, структурна карактеризација винил и имино деривата пиридина и испитивање њихове потенцијалне биолошке активности. Синтетисане су три серије једињења:

1. симетрични 1-метил-2,6-(*bis*)[2-(супституисани фенил)етенил]пиридинијум-јодиди (*bis*(винил)пиридинијум-јодиди – **БВПЈ**)

2. симетрични *N,N'*-(пиридин-2,6-диил)*bis*[1-(супституисани фенил)]метанимини (*bis*(имино)пиридини – **БИП**)

3. асиметрични дихидразони тиокарбохидразида (дТКХ):

а) [1-(1-(2-пиридинил)метилен)-5-(супституисани хинолил)]карбонтиодихидразида (дТКХ<sub>2фп</sub>(1-5))

б) [1-(1-(2-пиридил)етилиден)-5-(супституисани хинолил)]карбонтиодихидразида (дТКХ<sub>2ап</sub>(1-5))

в) [1-(1-(2-хидроксифенил)метилен)-5-(супституисани хинолил)]карбонтиодихидразида (дТКХ<sub>2сал</sub>(1-5)).

Синтетисана једињења су окарактерисана применом експерименталних метода које подразумевају употребу: инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом (FT-IR, енгл. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), нуклеарне магнетне резонанционе спектроскопије (<sup>1</sup>H NMR и <sup>13</sup>C NMR, 2D технике, енгл. *Nuclear Magnetic Resonance*), електрон спин резонантне спектроскопије (ESR, енгл. *Electron Spin Resonance Spectroscopy*), масене спектроскопије високе резолуције (HRMS, енгл. *High Resolution Mass Spectrometry*) и ултраљубичасте-видљиве спектроскопије (UV-Vis, енгл. *Ultraviolet-Visible Spectroscopy*). Корозиона испитивања су вршена на цинку и гвожђу применом методе електрохемијске импедансне спектроскопије (EIS, енгл. *Electrochemical Impedance Spectroscopy* и методе линеарне поларизационе отпорности (LPR, енгл. *Linear Polarization Resistance*).

Квантно-механичка оптимизација геометрије испитиваних једињења вршена је применом метода заснованих на теорији функционала густине (DFT, енгл. *Density Functional Theory*). Потпуна оптимизација геометрије свих синтетисаних једињења изведена је у гасној фази применом DFT методе, коришћењем: B3LYP функционала и Def2TZVP основног сета за винил деривате и комбинацију ωB97XD/6-311++g(d,p) модела за имино деривате. Теоријски апсорпциони спектри **БВПЈ** и **БИП** једињења су израчунати у имплицитном моделу растварача: диметил-сулфоксиду (DMSO, енгл. *Dimethyl sulfoxide*) и воде применом временски зависне DFT методе (TD-DFT, енгл. *Time Dependent Density Functional Theory*) користећи САМ-B3LYP функционал и Def2TZVP основни сет на оптимизованим геометријама у гасној фази. Симулација растварача у TD-DFT прорачунима је изведена стандардним моделом поларизованог континуума (PCM, енгл. *Polarizable Continuum Model*). Попуњене анти-везујуће и везујуће орбитале делимично двоструких веза су добијене квантно хемијским прорачунима на B3LYP/Def2TZVP нивоу, користећи анализу природних везивних орбитала (NBO, енгл. *Natural Bond Orbital*). Фукуијеве функције (енгл. *Fukui functions*) и Хиршфилдова наелектрисања атома (енгл. *Hirschfield atomic charges*) израчунати су ради предвиђања локалне реактивности **БИП** једињења и објашњења њиховог механизма антикорозивног дејства. Извршене су докинг студије **БИП** једињења у активно место ацетилхолинестеразе (AChE, енгл. *Acetylcholinesterase*) ради предвиђања начина везивања, као и за одређивање потенцијалне антимикуробне молекулске мете. Сви квантно-хемијски прорачуни су изведени уз коришћење Gaussian09 верзија D.01 и Gaussian16 верзија B.01 програма. Константе киселости дихидразона тиокарбохидразида предвиђене су коришћењем програма MarvinSketch 21.4 (ChemAxon).

Један део истраживања у оквиру прве и друге серије једињења представља проучавање солватохромизма. UV-Vis спектрална својства су детаљно проучавана у растварачима различите природе. Добијени резултати су анализирани применом линеарних корелација солватационих енергија (LSER, енгл. *Linear Solvation Energy Relationships*) коришћењем Камлет-Тафтове (енгл. *Kamlet-Taft*) (за **БВПЈ** и **БИП**) и Каталанове (енгл. *Catalán*) (за **БВПЈ**) једначине у циљу процене ефекта солватације услед доприноса специфичних и неспецифичних интеракција између молекула у раствору и растварача на апсорпционе максимуме. Електронска структура испитиваних **БВПЈ** једињења је такође проучавана применом принципа корелације слободних енергија (LFER, енгл. *Linear Free Energy Relationships*) на  $^{13}\text{C}$  NMR и  $^1\text{H}$  NMR хемијска померања у односу на константе присутних супституената. Резултати LFER анализе указали су на начин преношења електронских ефеката супституената (индуктивни, резонанциони и ефекат поља) у циљу њихове квантификације применом принципа корелације структуре и својстава испитиваних једињења (QSPR, енгл. *Quantitative Structure Property Relationship*).

Један од битних циљева овог рада било је испитивање биолошке активности нових деривата пиридина, одређивањем антимикробне, антиоксидативне и антиканцер активности. Овим истраживањем утврђена је веза између структуре (винил и имино) и активности ових једињења, као и утицај врсте и положаја супституената на хетероароматичним прстеновима на биолошку и антиоксидативну активност.

За одређивање антиоксидативне активности једињења коришћени су 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил радикал (DPPH $^{\bullet}$ , енгл. *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical*), 2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина (ABTS $^{2+}$ , енгл. *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*), антиоксидативни капацитет изражен преко редукције јона бакра (CUPRAC, енгл. *Cupric Reducing Antioxidant Capacity*) и укупни антиоксидативни капацитет (TAC, енгл. *Total Antioxidant Capacity*). Током испитивања спроведено је систематско тестирање антиоксидативне активности новосинтетисаних винил и имино деривата. Веза између структуре и реактивности испитиваних једињења у антиоксидативним тестовима је проучавана са становишта стабилности генерисаних радикала и израчунавањем термодинамичких параметара применом DFT методе.

Испитивање антимикробне активности спроведено је на Грам-негативним и Грам-позитивним микроорганизмима за другу и трећу серију новосинтетисаних једињења. Анализа је обухватила утврђивање минималне инхибиторне концентрације и минималне микробицидне концентрације на најмање четири типска соја патогених бактерија сертифицираних од стране Америчке колекције ћелијских култура (ATCC, енгл. *American Type Culture Collection*): Грам-позитивне (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*), и Грам-негативне (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), као и на ATCC соју опортунистичке гљивице *Candida albicans*. Такође, испитана је антимикробна активност на посебно значајан метицилин-резистентни клинички сој *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Такође, урађено је и одређивање инхибиције ацетилхолинестеразе имино деривата пиридина за серију **БИП** једињења.

За одређивања антиканцерске активности дТКХ $_{2\text{фп}}$  и дТКХ $_{2\text{ап}}$  коришћене су четири хумане ћелијске културе: аденокарцином дебелог црева (LoVo, енгл. ), аденокарцином јајника (SkOV-3), неситноћелијски аденокарцином плућа (A549), и аденокарцином дојке (MCF-7), док је на култури кератонита коже (HaCaT) тестирана њихова потенцијална токсичност. Испитивања су обухватила:

1. Одређивање способности испитиваних једињења да изазову смрт малигних ћелија.
2. Одређивање типа ћелијске смрти инициране испитиваним једињењима (апоптоза или некроза).
3. Одређивање промена по фазама ћелијске деобе малигних ћелија.
4. Одређивање активације каспазе 8 и/или 9 у третираним малигним ћелијама.
5. Одређивање способности испитиваних једињења да иницирају продукцију супероксидних радикала у митохондријама третираних малигних ћелија.

6. Одређивање способности испитиваних једињења да инхибирају миграторну активност малигних ћелија.
7. Одређивање потенцијалног токсичног деловања испитиваних једињења на здраво ткиво коришћењем модела ћелијске културе кератиноцита коже.

Део истраживања ове докторске дисертације се односио на испитивање **БВПЈ** и **БИП** једињења као потенцијалних инхибитора корозије на цинку и гвожђу при различитим рН вредностима, концентрацијама и времену третмана. **БИП** деривати су показали боље резултате инхибиције корозије, који су додатно рационализовани применом дескриптора електронске структуре израчунатих DFT методом у циљу проучавања механизма инхибиције и развоја активнијих једињења. Такође урађено је и QSAR (енгл. *Quantitative Structure Activity Relationship*) моделовање примењено на физичко-хемијска и екотоксиколошка својства **БИП** једињења у циљу одређивања њиховог потенцијалног утицаја на животну средину и могућности примене.

**Кључне речи:** Винил деривати пиридина; Имино деривати пиридина; DFT студије; LSER анализа; Антиоксидативна активност; Антимикробна активност; Антиканцер активност; Антикоровивни потенцијал.

Научна област: Хемијске науке

Ужа научна област: Органска хемија

# Vinyl and imino derivatives of pyridine: synthesis, physico-chemical characterization, biological activity and theoretical studies of electronic structure

## ABSTRACT

The main topic of this doctoral dissertation is the synthesis, structural characterization, and examination of potential biological activities of vinyl and imino derivatives of pyridine. Three series of compounds were synthesized:

1. Symmetric 1-methyl-2,6-(bis)[2-(substituted phenyl)ethenyl]pyridinium iodide (*bis*(vinyl)pyridinium-iodide – **БВИИ**)

2. Symmetric *N,N'*-(pyridine-2,6-diyl)bis[1-(substituted phenyl)]methanimines (*bis*(imino)pyridines – **БИИИ**)

3. asymmetric thiocarbohydrazide dihydrazones (ДТКХ)

a) [1-(1-(2-pyridyl)methylene)-5-(substituted quinolyl)] carbonthio dihydrazides (ДТКХ<sub>2φн</sub>(1-5))

б) [1-(1-(2-pyridyl)ethylidene)-5-(substituted quinolyl)] carbonthio dihydrazides (ДТКХ<sub>2ан</sub>(1-5))

в) [1-(1-(2-hydroxyphenyl)methylene)-5-(substituted quinolyl)] carbonthio dihydrazides (ДТКХ<sub>2сап</sub>(1-5))

The synthesized compounds are characterized using experimental methods, including Infrared Spectroscopy with Fourier Transform (FT-IR), Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (<sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR, 2D techniques), Electron Spin Resonance Spectroscopy (ESR), High-Resolution Mass Spectrometry (HRMS), and Ultraviolet-Visible Spectroscopy (UV-Vis). Corrosion tests were performed on zinc and iron using Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) and Linear Polarization Resistance (LPR) methods.

The geometry optimization of synthesized compounds was performed using Density Functional Theory (DFT) calculations, using: B3LYP functional and Def2SVP basis set for vinyl derivatives and a combination of ωB97XD/6-311++g(d, p) models for imino derivatives, in the gas phase. Theoretical absorption spectra of **БВИИ** and **БИИИ** compounds were calculated by Time-Dependent Density Functional Theory (TD-DFT) method in an implicit solvent model of dimethyl sulfoxide (DMSO) and water, respectively. For TD-DFT calculations, CAM-B3LYP functional and a Def2TZVP basis set were applied, starting from gas-phase geometries. A standard polarized continuum model (PCM) was applied in TD-DFT calculations to simulate solvent effects. Filled valence anti-bonding and bonding orbitals of partial double bonds were calculated at the B3LYP/Def2TZVP level, using natural bonding orbitals (NBO) analysis. Fukui's functions and Hirschfield's atomic charges were also calculated with the aim to predict the local reactivity of compounds. A docking study of **БИИИ** compounds into the active site of acetylcholinesterase (AChE) revealed the binding mode, and the same method was useful for the prediction of potential antimicrobial molecular targets. All quantum chemical calculations were performed using Gaussian09, revision D.01 and Gaussian16, revision B.01 programs. The acidity constants of compounds from the third series were predicted in the MarvinSketch 21.4 program developed by ChemAxon.

Solvatochromic analyses were carried out for the first and second series of compounds. UV-Vis spectral data were studied in detail using a variety of solvents. For the quantitative evaluation of the solvent effects on the absorption maxima, the principles of Linear Solvation Energy Relationships (LSER) and the models proposed by Kamlet-Taft (for **БВИИ** and **БИИИ** compounds) and Catalán (for **БВИИ** compounds) were used. The influence of the substituents on the electronic structure of the tested compounds was also studied using the principles of Linear Free Energy Relationships (LFER) applied on <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR chemical shifts. The results of LFER analysis indicated the transmission mode of electronic effects of substituents (inductive, resonance, and field-effect) thus enabling their quantification using Quantitative Structure-Property Relationship (QSPR) principles.

One of the important goals of this dissertation was the investigation of the biological activity of new pyridine derivatives, by determining antimicrobial, antioxidant, and anticancer activity. This

study established the relationship between the structure (vinyl and imino) and the activity of these compounds, as well as the influence of the type and position of substituents on heteroaromatic rings on biological and antioxidant activity.

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH<sup>•</sup>), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS<sup>•+</sup>), Cupric Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC) and Total Antioxidant Capacity (TAC) assays were used to determine the antioxidant activity of the compounds. Within the antioxidant study of newly synthesized vinyl and imino derivatives, systematic testing of the antioxidant activity was performed. The relationship between the structure and antioxidant activity was evaluated using the stability of the generated radicals and thermodynamic parameters calculated using DFT method.

The antimicrobial activity of the second and third series of newly synthesized compounds was tested against Gram-negative and Gram-positive microorganisms. The analysis included determination of the minimum inhibitory concentration and the minimum microbiocidal concentration on at least four strains of pathogenic bacteria certified by the American Type Culture Collection (ATCC): Gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*), and Gram-negative (*Escherichia coli*), as well as the ATCC strain of the opportunistic fungus *Candida albicans*. Also, antimicrobial activity against a particularly significant methicillin-resistant clinical strain of *Staphylococcus aureus* (MRSA) was examined.

Determination of acetylcholinesterase inhibition of the pyridine imino derivative for a series of **БIII** compounds was also performed.

Four human cell cultures were used to determine the anticancer activity of **дТКХ<sub>2фн</sub>** and **дТКХ<sub>2ан</sub>**: colon adenocarcinoma (LoVo), ovarian adenocarcinoma (SkOV-3), non-small cell lung adenocarcinoma (A549), breast adenocarcinoma (MCF-7), and their potential toxicity was tested on skin keratinocytes (HaCaT).

The following experiments were performed:

1. Determining the ability of test compounds to cause the death of malignant cells.
2. Determination of the type of cell death initiated by the tested compounds (apoptosis or necrosis).
3. Determination of the changes in cell cycle during the division of malignant cells.
4. Determination of caspase 8 and / or 9 activation in the treated malignant cells.
5. Determination of the ability of the tested compounds to initiate the production of superoxide radicals in the mitochondria of treated malignant cells.
6. Determination of inhibitory activity of tested compounds toward malignant cells migration.
7. Determination of potential toxic effects of test compounds on healthy tissue using skin keratinocyte cell culture model.

The part of the research describes **БIII** and **БIII** compounds as potential corrosion inhibitors. The testings were conducted on zinc and iron at different pH values, concentrations, and treatment times. **БIII** derivatives showed better properties and were further evaluated by the use of electronic structure descriptors calculated by the DFT method. Likewise, QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) modeling applied to the physico-chemical and ecotoxicological properties of **БIII** compounds was performed in order to determine their potential impact on the environment and possible application.

**Keywords:** Vinyl derivatives of pyridine; Imino derivatives of pyridine; DFT studies; LSER analysis; Antioxidant activity; Antimicrobial activity; Anticancer activity; Anticorrosion potential.

Scientific field: Chemical sciences

Narrow scientific field: Organic chemistry



## СПИСАК СКРАЋЕНИЦА И СИМБОЛА

- A549 – Хумана ћелијска култура неситноћелијски аденокарцином плућа (енгл. *Human cell culture Non-small cell lung adenocarcinoma*)
- ABTS<sup>+</sup> – 2,2'-азино-bis(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина (енгл. *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*)
- ADMET – Апсорпција, расподела, метаболизам, елиминација и токсичност (енгл. *Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity*)
- AIM – Атоми у молекулима (енгл. *Atoms In Molecules*)
- AS – Ањјонско место (енгл. *Anionic Site*)
- АТР – Аденозин-3-фосфат (енгл. *Adenosine triphosphate*)
- АТСС – Америчка колекција ћелијских култура (енгл. *American Type Culture Collection*)
- AU – Релативна јединица (енгл. *Arbitrary Units*)
- ACD – Акцидентална ћелијска смрт (енгл. *Accidental Cell Death*)
- Ацетон-*d*<sub>6</sub> – Деутерисани ацетон
- AChE – Ацетилхолинестераза (енгл. *Acetylcholinesterase*)
- AChI – Ацетилхолин јодид (енгл. *Acetylcholine iodide*)
- BAF – фактор биоконцентрације (BAF, енгл. *Bioaccumulation Factor*)
- БВИЈ – bis(винил)пиридинијум-јодиди
- BDE – Енталпија дисоцијације веза (енгл. *Bond Dissociation Enthalpy*)
- БИП – bis(имино)пиридини
- br.m.ovlp. – широк преклопљени мултиплет (енгл. *broad overlapping multiplet*)
- brd – широка трака (енгл. *Broad band*)
- BSPs – Критичне тачке веза (енгл. *Bond Critical Points*)
- w – слаба (енгл. *weak*)
- GGA – Апроксимација генерализованог градијента (енгл. *Generalized-Gradient Approximation*)
- GHS – Глобално усклађен систем класификације, паковања и обележавања хемикалија (енгл. *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*)
- 2D NMR – Дводимензионална нуклеарна магнетна резонанца (енгл. *Two-dimensional Nuclear Magnetic Resonance*)
- d – дублет (енгл. *doublet*)
- dd – дублет дублета (енгл. *double doublet*)
- ДАП – пиридин-2,6-диамин
- ДМП – 2,6-диметилпиридин
- DMSO-*d*<sub>6</sub> – Деутерисани диметил-сулфоксид (енгл. *Deuterated Dimethyl sulfoxide*)
- DMSO – диметилсулфоксид (енгл. *Dimethyl sulfoxide*)
- ДНК – Дезоксирибонуклеинска киселина
- DRPH<sup>•</sup> – 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил радикал (енгл. *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical*)
- дТКХ – Дихидразони тиокарбохидразида
- дТКХ<sub>2ап</sub> – [1-(1-(2-пиридил)етилиден)-5-(супституисани хинолил)] карбонтио дихидразиди
- дТКХ<sub>2сал</sub> – [1-(1-(2-хидроксибензил)метил)-5-(супституисани хинолил)] карбонтио дихидразиди
- дТКХ<sub>2фп</sub> – [1-(1-(2-пиридинил)метил)-5-(супституисани хинолил)] карбонтио дихидразиди
- ДТНБ – 5,5-дитио-bis-(2-нитробензова киселина)
- DFT – Теорија функционала густине (енгл. *Density Functional Theory*)
- EDTA – Етилендиаминтетрасирћетна киселина (енгл. *Ethylenediaminetetraacetic acid*)
- EIS – Електрохемијска импедансна спектроскопија (енгл. *Electrochemical Impedance Spectroscopy*).
- ESR – Електрон спин резонантна спектроскопија (енгл. *Electron Spin Resonance Spectroscopy*)
- ЕТ – Пренос електрона (енгл. *Electron Transfer*)
- ЕТЕ – Енталпија преноса електрона (енгл. *Electron Transfer Enthalpy*)
- ЕСМ – Екстраћелијски матрикс (енгл. *Extracellular matrix*)

IP – Јонизациони потенцијал (енгл. *Ionization Potentia*)  
IHB – Интрамолекуларско водонично везивање (енгл. *Intramolecular Hydrogen Bonding*)  
ICT – Интрамолекуларски пренос наелектрисања (енгл. *Intramolecular Charge Transfer*)  
YMA – Квасни сладни агар (енгл. *Yeast Malt Agar*)  
YMB – Квасни сладни бујон (енгл. *Yeast Malt Broth*)  
QSPR – Квантитативна корелација између структуре и својстава (енгл. *Quantitative Structure Property Relationship*)  
QSAR – Квантитативна корелација између структуре и биолошке активности (енгл. *Quantitative Structure Activity Relationship*)  
LDA – Апроксимација локалне густине (енгл. *Local Density Approximation*)  
LoVo – хумана ћелијска култура аденокарцинома дебелог црева (енгл. *colon adenocarcinoma Human cell culture*)  
LPR – Линеарна поларизациона отпорност (енгл. *Linear Polarization Resistance*)  
LSER – Линеарна корелација солватационих енергија (енгл. *Linear Solvation Energy Relationships*)  
LFER – Линеарна корелација слободне енергије (енгл. *Linear Free Energy Relationship*)  
LCAO – Линеарна комбинација атомских орбитала (енгл. *Linear Combination of Atomic Orbitals*)  
m – мултиплитет (енгл. *multiplitet*)  
md – средња (енгл. *medium*)  
MBC – Минимална бактерицидна концентрација (енгл. *Minimal Bactericidal Concentration*)  
MIC – Минимална инхибиторна концентрација (енгл. *Minimal Inhibitory Concentration*)  
MMPA – Модел преклопљених парова молекула (енгл. *Matched Molecular Pairs Analysis*)  
MnSOD, SOD – Митохондријална супероксид дисмутаза (енгл. *Mitochondrial superoxide dismutase*)  
MPT – Измењена премеабилност митохондрија (енгл. *Mitochondrial Permeability Transition*)  
mTKX – Монохидразони тиокарбохидразида  
mTKX<sub>2фп</sub> – (2-пиридинилметилен) дихидразид тиоугљене киселине,  
mTKX<sub>2ап</sub> – [1-(2-пиридинил)етилиден] дихидразид тиоугљене киселине  
mTKX<sub>2сал</sub> – [(2-хидроксифенил)метилен] дихидразид тиоугљене киселине  
MFI – Просечан интензитет флуоресценције (енгл. *Mean Fluorescent Intensity*)  
MFC – Минимална фунгицидна концентрација (енгл. *Minimal Fungicidal Concentration*)  
Mcf7 – хумана ћелијска култура аденокарцинома дојке (енгл. *Human cell culture breast adenocarcinoma*)  
NBO - Природне везивне орбитале (енгл. *Natural Bond Orbitals*)  
NMR – Нуклеарна магнетна резонанца (енгл. *Nuclear Magnetic Resonance*)  
NC – Неокупроин, 2,9-диметил-1,10-фенантролин (енгл. *Neocuproine*)  
NCI – Нековалентне интеракције (енгл. *Noncovalent Interactions*)  
ORAC – Реактивни антиоксидативни капацитет кисеоника (енгл. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*)  
PA – Афинитет према протону (енгл. *Proton Affinity*)  
PAS – Периферна ањонска места (енгл. *Peripheral Anionic Sites*)  
PDE – Енталпија дисоцијације протона (енгл. *Proton Dissociation Enthalpy*)  
PES – Површине потенцијалне енергије (PES, енгл. *Potential Energy Surface*)  
PI – пропиридиум јодид (енгл. *Propidium iodide*)  
PCM – Модел поларизованог континуума (енгл. *Polarizable Continuum Model*)  
RNS – Реактивне азотне врсте (енгл. *Reactive Nitrogen Species*)  
ROS – Реактивне кисеоничне врсте (енгл. *Reactive Oxygen Species*)  
RSS – Реактивне сумпорне врсте (енгл. *Reactive Sulfur Species*)  
RCD – Контролисана ћелијска смрт (енгл. *Regulated Cell Death*)  
st – јака (енгл. *strong*)  
s – синглет (енгл. *singlet*)

SD – Расподела густине спина (енгл. *Spin Density*)  
SET-PT – Пренос електрона праћен преносом протона (енгл. *Single Electron Transfer Followed by Proton Transfer*)  
Skov3 – хумана ћелијска култура аденокарцинома јајника (енгл. *Human cell culture ovarian adenocarcinoma*)  
SMD – Модел растварача заснован на густини (енгл. *Solvation Model based on Density*)  
SMILES – поједностављени систем приказа молекула (енгл. *Simplified Molecular-Input Line System*)  
SPLET – Секвенцијални пренос електрона са губитком протона (енгл. *Sequential Proton Loss Electron Transfer*)  
sshp – jako оштра (енгл. *strong sharp*)  
SCmin – Коефицијент сличности косинуса (енгл. *Minimum cosine similarity coefficient*)  
SCE – Засићена каломелова електрода (енгл. *Saturated Calomel Electrode*)  
t – триплет (енгл. *triplet*)  
ТАС – Укупни антиоксидативни капацитет (енгл. *Total Antioxidant Capacity*)  
TD-DFT – Временски зависна теорија функционала густине (енгл. *Time Dependent Density Functional Theory*)  
TEAC – Тролокс-еквивалентни антиоксидативни капацитет (енгл. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)  
Т.Е.С.Т. – Софтер за процену токсичности (енгл. *Toxicity Estimation Software Tool*)  
ТКХ – Тиокарбохидразид дериват дихидразида тиоугљене киселине  
ТМПЈ – 1,2,6-триметилпиридинијум-јодид  
TSA – Триптон соја агар плоча (енгл. *Tryptic Soy Agar*)  
TSB – Триптон соја бујон (*Tryptic Soy Broth*)  
TTC – Трифенилтетразолијум хлорид (енгл. *Triphenyltetrazolium chloride*)  
TCE – Термичке корекције за енталпију гасне фазе (енгл. *Thermal Corrections of Enthalpy*)  
UV-Vis – Ултраљубичаста-видљива спектроскопија (енгл. *Ultraviolet-Visible Spectroscopy*)  
FBS – Фетални говеђи серум (енгл. *Fetal Bovine Serum*)  
FRAP – Редукција антиоксидативног капацитета јоном гвожђа (енгл. *Ferric Reduction Antioxidant Power*)  
FT-IR – Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (енгл. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)  
НАТ – Пренос атома водоника (енгл. *Hydrogen Atom Transfer*)  
HaCaT – хумана ћелијска култура кератиноцита коже (енгл. *Human cell culture skin keratinocyte*)  
HBA – Атом или атомска група која прима протон при успостављању водоничне везе (енгл. *Hydrogen Bond Acceptor*)  
HBD – Атом или атомска група која даје протон при успостављању водоничне везе (енгл. *Hydrogen-Bonding Donor*)  
HRMS – Масена спектроскопија високе резолуције (енгл. *High Resolution Mass Spectrometry*)  
САМ – Калцеин АМ (енгл. *Calcein acetoxymethyl*)  
CDCl<sub>3</sub> – Деутерисани хлороформ  
CLP – Класификација, паковање и обележавање супстанци и смеша (енгл. *Classification, Labelling and Packaging of substances and mixtures*)  
CoMFA – Компаративна анализа молекулских поља (енгл. *Comparative Molecular Field Analysis*)  
СТ – Трансфер наелектрисуња (енгл. *Charge Transfer*)  
CUPRAC – Редукција антиоксидативног капацитета јоном бакра (енгл. *Cupric Reducing Antioxidant Capacity*)  
Cfu – Јединице које формирају колоније тј. микробе (енгл. *Colony Forming U*)

## СПИСАК СЛИКА

Слика 2.1 Структура пиридина.....	3
Слика 2.2 Структуре пиридина присутне у природним производима.....	3
Слика 2.3 Општи приказ „push-pull” система са терминалним донорским и акцепторским групама повезаним $\pi$ -електронским системом.....	4
Слика 2.4 Општа $S_N2$ реакција пиридина са алкилхалогенидом.....	5
Слика 2.5 Синтеза <i>N</i> -метил-2,6-диметилпиридинијум јодида ( <i>N</i> -метил-2,6-лутидин јодида).....	5
Слика 2.6 Синтеза <i>N</i> -метил-2,6-( <i>E</i> )дистирпиридинјум-јодида.....	6
Слика 2.7 Синтеза <i>N</i> -метил-2,6-ди[( <i>E</i> )- <i>p</i> -диметиламинофенилетенил]пиридинијум-јодид.....	6
Слика 2.8 Синтеза <i>N</i> -метилдистирил деривата.....	7
Слика 2.9 Општи механизам реакције настајања Шифових база.....	7
Слика 2.10 Структуре Шифових база које показују антимицробну, антипаразитску и антивиралну активност.....	8
Слика 2.11 Синтеза симетричних <i>bis</i> (имино) пиридина.....	9
Слика 2.12 Реакција 2,6-пиридин дикарбоксалдехида и аминоксанола.....	9
Слика 2.13 Синтеза 2,6-пиридин дикарбоксалдехида и 2-аминопиридина.....	9
Слика 2.14 Структура хидразона или хидразида.....	10
Слика 2.15 Структура тиокарбохидразида (ТКХ).....	10
Слика 2.16 Хидразинолиза тиофосгена.....	11
Слика 2.17 Хидразинолиза угљеник (IV)-сулфида.....	11
Слика 2.18 Хидразинолиза алкоситиокарбазида.....	11
Слика 2.19 Хидразинолиза алкилтиокарбохидразида.....	11
Слика 2.20 Синтеза <i>bis</i> -тиокарбохидразона реакцијом између хиолин алдехида и тиокарбохидразида.....	12
Слика 2.21 Синтеза <i>bis</i> -тиокарбохидразона реакцијом ароматичних алдехида и тиокарбохидразида.....	13
Слика 2.22 Могући електронски прелази.....	14
Слика 3.1 Синтеза 1-метил-2,6- <i>bis</i> [2-(супституисани фенил)етенил]пиридинијум-јодида ( <b>БВПЈ</b> ).....	33
Слика 3.2 Синтеза симетричних <i>N,N'</i> -(пиридин-2,6-диил) <i>bis</i> [1-(супституисаних фенил)]метанимина ( <b>БИП</b> ).....	37
Слика 3.3 Општи поступак синтезе асиметричних дихидразона тиокарбохидразида (дТКХ).....	40
Слика 3.4 Нумерација атома новосинтетисаних дТКХ.....	41
Слика 4.1 Оптимизоване енергије најстабилнијег <i>s-trans/s-trans</i> конформационог облика <b>БВПЈ</b> једињења.....	59
Слика 4.2 Апсорпциони спектри <b>БВПЈ</b> једињења у: а) EtOH, б) AcN, в) DMSO и г) FA.....	60
Слика 4.3 НОМО и LUMO орбитале и вредности $E_{gap}$ за <i>s-trans/s-trans</i> изомер у раствору DMSO.....	66
Слика 4.4 Корелација дужине везе $d(C_7=C_8)$ и коефицијента попуњености орбитала парцијалне двоструке везе у испитиваним <b>БВПЈ</b> једињењима.....	70
Слика 4.5 а) Допринос локалних диполних момената укупном диполном моменту, и б) Теоријски израчунат укупни диполни момент за једињења са најјачим електрон-донорским и електрон-акцепторским супституентом.....	70
Слика 4.6 Резонанционе структуре <b>БВПЈ</b> једињења супституисаних електрон-акцепторским групама (X) са доприносом $\pi$ -поларизације.....	73
Слика 4.7 Антиоксидативна активност <b>БВПЈ</b> једињења одређена применом DPPH(■) и ABTS (■) методе.....	74



<b>Слика 4.20</b> Најквистови дијаграми за временску зависност, за гвожђе, у 1М раствору HCl без и са присуством инхибитора а) <b>БИП-9</b> , б) <b>БИП-14</b> и в) <b>БИП-16</b> .....	106
<b>Слика 4.21</b> Најквистови дијаграми за температурну зависност: а) гвожђе (рН 3) за <b>БИП-16</b> , б) цинк (рН 3) за <b>БИП-16</b> , в) гвожђе (рН 3) за <b>БИП-16</b> + Церијум(III) ацетат.....	107
<b>Слика 4.22</b> Најквистови дијаграми за температурну зависност на гвожђу у 1М HCl: а) без инхибитора, б) са <b>БИП-9</b> ( $27,6 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) в) са <b>БИП-14</b> ( $28,8 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) и г) са <b>БИП-16</b> ( $37,2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ).....	108
<b>Слика 4.23</b> Фукуи функције <b>БИП</b> једињења одређене DFT прорачунима.....	114
<b>Слика 4.24</b> Репрезентативне слике резултата двоструког бојења анексином V и PI након 24 сата третмана LoVo ћелија на испитиваним једињењима. На основу маркирања примењеним флуорофорама ћелије се дискриминишу као виабилне (необојене ћелије, доњи леви квадрант), ћелије у раној фази апоптотичне смрти (обојене само анексином V, доњи десни квадрант), ћелије у раној фази некротичне смрти (обојене само са PI, горњи леви квадрант), и ћелије у напредним фазама ћелијске смрти (обојене са обе флуорофоре, горњи десни квадрант). Нумеричке вредности представљају средњу вредност ± стандардна девијација два независна експеримента.....	123
<b>Слика 4.25</b> Криве односа концентрације и ефекта за испитивана једињења на LoVo ћелијама након 24 сата третмана. Резултати су представљени као проценат укупне ћелијске смрти детектоване двоструким бојењем анексином V и PI очитаних из два независна експеримента (кружићи и крстићи). Кривуља је дефинисана формулом за петопараметарску асиметричну криву, јединствену за оба репликата. Уместо log10 вредности, на апсциси су уписане егзактне концентрације да би се омогућила усклађеност са описом резултата у тексту.....	124
<b>Слика 4.26</b> Заступљеност ћелија у Sub-G0/G1 пику након 24 сата третмана LoVo ћелија са испитиваним једињењима. Нумеричке вредности представљају средњу вредност ± стандардна девијација добијену из два независна експеримента, и односе се на проценат хиподиплоидних ћелија у склопу лево дефинисаног оквира.....	125
<b>Слика 4.27</b> Промене у заступљености LoVo ћелија по фазама митотске деобе након 12 сати инкубације са испитиваним једињењима у односу на нетретирану контролу. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна девијација процента ћелија у G0/G1 (црни стубићи), S (бели стубићи), и G2/M (сиви стубићи) добијених из два независна експеримента.....	126
<b>Слика 4.28</b> Проценти LoVo ћелија позитивних на активiranу каспазу 8, 9 или обе, након 6 сати третмана са испитиваним једињењима у концентрацији од 50 μМ. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна девијација процента ћелија добијених из три независна експеримента. Статистичка значајност је одређена t тестом са Welch-овом корекцијом поређењем нетретиране контроле (бели стубићи) и третираних ћелија (црни стубићи).....	127
<b>Слика 4.29</b> Проценти LoVo ћелија позитивних на продукцију супероксидних радикала у митохондријама након 6 сати третмана са испитиваним једињењима у концентрацији од 50 μМ. Нумеричке вредности представљају аритметичку средину ± стандардна девијација процента ћелија добијених из три независна експеримента.....	128
<b>Слика 4.30</b> Просечан интезитет флуоресценције (MFI) у LoVo ћелијама позитивним на продукцију супероксидних радикала у митохондријама након 6 сати третмана са испитиваним једињењима у концентрацији од 50 μМ. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна девијација релативних јединица (AU) из три независна експеримента. Статистичка значајност је утврђена анализом варијансе (ANOVA) и t тестом са Welch-овом корекцијом.....	129

<b>Слика 4.31</b> Утицај испитиваних једињења на покретљивост SkoV3 ћелија утврђеног <i>wound healing</i> есејом. (А) Репрезентативне фотографије направљене непосредно пре почетка третмана испитиваним једињењима (дан 0) и 24 сата касније (дан 1). (В) Проценти непокривене површине добијених из три независна експеримента приказаних као аритметичка средина ± стандардна девијација. Статистичка значајност је утврђена анализом варијансе (ANOVA) и t тестом са Welch-овом корекцијом.....	130
<b>Слика 4.32</b> криве односа концентрације и ефекта за испитивање једињења на LoVo (вредности представљене у Табели 4.23) и HaCaT ћелијама након 24 сата третмана. Резултати су представљени као проценат живих ћелија детектоване двоструким бојењем САМ и PI очитаних из два независна експеримента (кружићи и крстићи) кривуља је дефинисана формулом за петопараметарску асиметричну криву, јединствену за оба репликата. IC <sub>50</sub> је аритметичка средина ± стандардна девијација концентрације која изазива смрт у 50% третираних ћелија. Уместо Log <sub>10</sub> вредности, на апциси су уписане егзактне концентрације да би се омогућила усклађеност са описом резултата у тексту.....	131

## СПИСАК ТАБЕЛА

<b>Табела 4.1</b> Енергије оптимизоване структуре <b>БВПЈ</b> једињења израчунате на V3LYP/Def2TZVP нивоу теорије.....	58
<b>Табела 4.2</b> Резултати корелационе анализе за <b>БВПЈ</b> једињења добијени применом Камлет-Тафтове једначине.....	63
<b>Табела 4.3</b> Резултати корелационе анализе за <b>БВПЈ</b> једињења добијени применом Каталнове једначине.....	64
<b>Табела 4.4</b> Резултати TD-DFT прорачуна за прелазе из основног у прво побуђено стање за <i>s-trans/s-trans</i> изомер раствору (DMSO).....	68
<b>Табела 4.5.</b> Попуњеност антивезујућих π* и везујућих π орбитала, дужина двоструке C <sub>7</sub> =C <sub>8</sub> везе и диполни момент μ испитиваних једињења.....	69
<b>Табела 4.6</b> Корелације изабраних дужина веза и π*/π, Δδ <sub>C7=C8</sub> и σ.....	71
<b>Табела 4.7</b> Резултати корелације <sup>13</sup> C NMR података испитиваних једињења са σ константама добијених применом Хаметове једначине.....	72
<b>Табела 4.8</b> Резултати корелационе анализе за <b>БИП</b> једињења добијени применом Камлет-Тафтове једначине.....	79
<b>Табела 4.9</b> Резултати TD-DFT прорачуна за електронске прелазе из основног у побуђено стање.....	82
<b>Табела 4.10</b> IC <sub>50</sub> вредности <b>БИП</b> једињења одређене применом DPPH и ABTS теста...	85
<b>Табела 4.11</b> Резултати CUPRAC теста, дати у односу на тролокс и резултати теста укупног антиоксидативног капацитета (TAC) применом фосфомолибденске методе, изражени као еквивалентна маса аскорбинске киселине.....	86
<b>Табела 4.12.</b> BDE, IP и PA вредности <b>БИП</b> -а израчунати на ωB97XD/6-311++g(d,p) нивоу теорије у гасној фази и коришћењем SMD солватационог модела воде, бензена иметанола.....	87
<b>Табела 4.13</b> Електронска густина, Лапласијан електронске густине, потенцијална енергија, енергија Н-везе, растојање донор-акцептор за О-Н...N интрамолекуларске водоничне везе једињења <b>БИП-6</b> и <b>БИП-10</b> .....	88
<b>Табела 4.14.</b> Процентуални допринос НАТ и SET механизма у DPPH и ABTS тестовима <b>БИП</b> .....	92
<b>Табела 4.15</b> Инхибиторна активност једињења <b>БИП</b> према ензиму АСhЕ.....	93
<b>Табела 4.16</b> Антимикробна активност <b>БИП</b> једињења, амоксицилина (позитивне контроле за сојеве бактерија) и флуконазол (позитивне контроле за гљивичне сојеве),	

изражена као MIC (mmol/L) и MBC/MFC (mmol/L), одређена микродилуционом методом.....	96
<b>Табела 4.17</b> Три најбоље рангиране молекуларне мете по критеријуму сличности за једињења <b>БИП-6</b> , <b>БИП-10</b> и <b>БИП-16</b> . Укупни ранг је комбинација неколико параметара као што су удаљеност од средње вредности ( <i>Z</i> -skor) и Танимотов индекс сличности (Max TC).....	97
<b>Табела 4.18</b> Параметри корозије добијени електрохемијским мерењем (LPR методом) на гвожђу или цинку у 0,5М NaCl (на pH = 3 или pH = 7) при промени концентрације <b>БИП-9</b> , <b>БИП-14</b> и <b>БИП-16</b> .....	100
<b>Табела 4.19</b> Параметри корозије добијени електрохемијским мерењем (LPR методом) на гвожђу у 1М HCl при промени концентрације <b>БИП-9</b> , <b>БИП-14</b> и <b>БИП-16</b> .....	101
<b>Табела 4.20</b> Параметри корозије добијени EIS методом на гвожђу и цинку у 0,5М NaCl без и у присуству инхибитора.....	105
<b>Табела 4.21</b> Параметри корозије добијени LPR и EIS методом на гвожђу у 1М HCl без и у присуству инхибитора.....	105
<b>Табела 4.22</b> Кинетички параметри $E_a$ , $\Delta H$ и $\Delta S$ за гвожђе и цинк у 0,5М NaCl без и у присуству инхибитора једињења <b>БИП-16</b> и синергије <b>БИП-16</b> са церијум(III) ацетатом.....	109
<b>Табела 4.23</b> Кинетички параметри $\Delta H$ и $\Delta S$ за гвожђе у 1 М HCl без и у присуству инхибитора једињења <b>БИП-9</b> , <b>БИП-14</b> и <b>БИП-16</b> .....	109
<b>Табела 4.24</b> Термодинамички параметри за гвожђе у 0,5М NaCl и у 1М HCl са различитим концентрацијама једињења <b>БИП-9</b> , <b>БИП-14</b> и <b>БИП-16</b> .....	111
<b>Табела 4.25</b> Термодинамички параметри $K_{ads}$ , $\Delta H_{ads}$ , $\Delta S_{ads}$ за гвожђе и цинк у 0,5М NaCl за <b>БИП-16</b> и са синергијом <b>БИП-16</b> и церијум(III)ацетатом на оптималној концентрацији.....	111
<b>Табела 4.26</b> Термодинамички параметри $K_{ads}$ , $\Delta H_{ads}$ , $\Delta S_{ads}$ за гвожђе и цинк у 1 М HCl за <b>БИП-9</b> , <b>БИП-14</b> и <b>БИП-16</b> на оптималној концентрацији.....	111
<b>Табела 4.27</b> Вредности $\chi$ , $\eta$ и $\Delta N$ испитиваних једињења.....	112
<b>Табела 4.28</b> QSAR процена физичко-хемијских и еко-токсиколошких својстава <b>БИП</b> једињења.....	115
<b>Табела 4.29.</b> Предвиђене $pK_a$ вредности дТКХ једињења.....	116
<b>Табела 4.30.</b> IC <sub>50</sub> вредности дТКХ одређене применом DPPH и ABTS теста.....	117
<b>Табела 4.31</b> Резултати CUPRAC теста, дати у односу на тролокс и резултати теста укупног антиоксидативног капацитета (TAC) применом фосфомолибденске методе, изражени као еквивалентна маса аскорбинске киселине.....	118
<b>Табела 4.32</b> Антимикробна активност дТКХ <sub>2фп</sub> и дТКХ <sub>2ап</sub> , амоксицилина (контрола само за сојеве бактерија) и флуконазол (контрола само за гљивичне сојеве), изражена као MIC (mmol/L) и MBC/MFC (mmol/L), одређена микродилуционом методом.....	120
<b>Табела 4.33</b> Утицај испитиваних једињења на преживљавање ћелија након 24 сата третмана. Резултати су представљени као средња вредност процента преживљавања ± стандарда девијација добијених из три независна експеримента. У табели су наведени резултати за једињења која су редуковала проценат живих ћелија за више од 15%. Осенчени су резултати у којима је преживљавање ћелија мање од 50% што се сматра пожељном ефикасношћу.....	122



## САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО.....	3
2.1. ПИРИДИН И ЊЕГОВИ ДЕРИВАТИ- СИНТЕЗА, СТРУКТУРА И КЛАСИФИКАЦИЈА.....	3
2.1.1. Пиридин – структура и основна својства.....	3
2.1.2. Винил деривати пиридина.....	4
2.1.2.1. Синтеза N-метил-2,6-bis(стирил)пиридинујум-јодид соли деривата винил пиридина.....	5
2.1.3. Имино деривати пиридина.....	7
2.1.3.1. Синтеза имино пиридина.....	8
2.2. ХИДРАЗИН И ДЕРИВАТИ ХИДРАЗИНА.....	9
2.2.1 Тиокарбохидразиди – структура и основна својства.....	10
2.2.1.1. Синтеза тиокарбохидразида.....	10
2.2.2 Дитиокарбохидразиди – структура и основна својства.....	11
2.2.2.1. Синтеза хидразона дитиокарбохидразида.....	12
2.3. УТИЦАЈИ РАСТВОРАЧА И КОРЕЛАЦИОНА АНАЛИЗА У UV-VIS СПЕКТРОСКОПИЈИ.....	13
2.3.1. Солватохромизам.....	13
2.3.2. Линеарна корелација солватохромних енергија.....	14
2.3.3. Линеаране корелација слободне енергије.....	15
2.4. ТЕОРИЈА ФУНКЦИОНАЛА ГУСТИНЕ (DFT).....	16
2.4.1. Апроксимативни функционали.....	17
2.4.2 Основни сетови.....	18
2.4.3 Молекулски дескриптори.....	18
2.4.4. Оптимизација геометрије.....	19
2.4.5 Проучавање односа структуре и активности једињења.....	19
2.5. БИОЛОШКА АКТИВНОСТ.....	19
2.5.1. Антиоксидативна активност.....	19
2.5.1.1. Одређивање антиоксидативног механизма.....	21
2.5.1.2. Методе одређивања антиоксидативне активности.....	22
2.5.2. Антимикробна активност.....	23
2.5.2.1. Методе одређивања антимикробне активности.....	24
2.5.3. Антиканцер активност.....	24
2.5.3.1. Карактеристике ћелијских култура коришћених током испитивања.....	24
2.5.3.2. Принципи примене виталних боја за одређивање броја живих ћелија.....	25
2.5.3.3. Трипан плаво.....	25
2.5.3.4. Калцеин АМ.....	25
2.5.3.5. Пропидијум јодид.....	25
2.5.3.6. Анексин V.....	26
2.5.3.7. Основне разлике између типова ћелијске смрти.....	26
2.5.3.8. Одређивање заступљености ћелија по фазама митотске деобе.....	27
2.5.3.9 Утврђивање активације каспазних путева испитиваним једињењима.....	28
2.5.3.10. Одређивање способности испитиваних једињења да иницирају генерисање супероксидних радикала у митохондријама.....	28
2.5.3.11. Тестирање утицаја испитиваних једињења на миграторну активност малигних ћелија.....	29
2.5.3.12. Испитивање потенцијалне токсичне активности на моделу хуманих кератиноцита.....	29
2.6. КОРОЗИЈА МЕТАЛА.....	29
2.6.1. Инхибитори корозије.....	30

2.7. ЕКОТОКСИКОЛОШКА ПРОЦЕНА УТИЦАЈА ЈЕДИЊЕЊА НА ЖИВОТНУ СРЕДИНУ.....	31
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО.....	32
3.1. ОПШТЕ НАПОМЕНЕ О СИНТЕЗИ И КАРАКТЕРИЗАЦИЈИ ЈЕДИЊЕЊА.....	32
3.2. СИНТЕЗА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ВИНИЛ ДЕРИВАТА ПИРИДИНА.....	33
3.2.1. Синтеза и карактеризација симетричних 1-метил-2,6- <i>bis</i> [2-(супституисаних фенил)етенил]пиридинијум-јодида ( <b>БВПЈ</b> ).....	33
3.3. СИНТЕЗА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ИМИНО ДЕРИВАТА ПИРИДИНА.....	37
3.3.1. Синтеза и карактеризација симетричних <i>N,N'</i> -(пиридин-2,6-диил) <i>bis</i> [1-(супституисаних фенил)]метанимина.....	37
3.3.2. Општи поступак синтезе асиметричних дихидразона тиокарбохидразида.....	40
3.3.2.1. Синтеза и карактеризација асиметричних [1-(1-(2-пиридил)метилен)-5-(супституисани хинолил)]карбонтиодихидразида (дТКХ <sub>2фп</sub> ( <b>1-5</b> )).....	41
3.3.2.2. Синтеза и карактеризација асиметричних [1-(1-(2-пиридил)етилиден)-5-(супституисани хинолил)]карбонтиодихидразида (дТКХ <sub>2ап</sub> ( <b>1-5</b> )).....	43
3.3.2.3. Синтеза и карактеризација асиметричних [1-(1-(2-хидроксифенил)метилен)-5-(супституисани хинолил)]карбонтиодихидразида (дТКХ <sub>2сал</sub> ( <b>1-5</b> )).....	44
3.4. КОРЕЛАЦИОНА АНАЛИЗА.....	45
3.5. КОНСТАНТЕ КИСЕЛОСТИ ДИХИДРАЗОНА ТИОКАРБОХИДРАЗИДА.....	45
3.5.1. Одређивање константе киселости дихидразона тиокарбохидразида.....	45
3.6. МОЛЕКУЛСКО МОДЕЛОВАЊЕ.....	46
3.6.1. Квантно-хемијски прорачуни винил и имино деривата пиридина.....	46
3.6.2. QSAR моделовање примењено на антиоксидативну и антимикуробну активност <b>БВП</b> једињења.....	46
3.6.3. Докинг <b>БВП</b> имино деривата пиридина.....	47
3.6.4. QSAR моделовање примењено на физичко-хемијске и екотоксиколошке особине <b>БВП</b> једињења.....	47
3.7. МЕТОДЕ ОДРЕЂИВАЊА БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ.....	48
3.7.1. Одређивање антиоксидативне активности.....	48
3.7.1.1. DPPH антирадикалска активност винил и имино деривата пиридина.....	48
3.7.1.2. ABTS антирадикалска активност винил и имино деривата пиридина.....	49
3.7.1.3. CUPRAC редукциона моћ имино деривата пиридина.....	49
3.7.1.4. Укупан антиоксидативни капацитет имино деривата пиридина.....	50
3.7.2. Одређивање инхибиције ацетилхолинестеразе <i>bis</i> (имино) пиридина.....	50
3.7.3. Одређивање антимикуробне активности имино деривата пиридина.....	50
3.7.3.1. Микродилуциона метода.....	51
3.7.4. Одређивање антиканцер активности дТКХ <sub>2фп</sub> и дТКХ <sub>2ап</sub> .....	51
3.7.4.1. Ћелијске културе.....	51
3.7.4.2. Припрема испитиваних једињења.....	52
3.7.4.3. Трипсинизација ћелија у култури.....	52
3.7.4.4. Бојење ћелија Калцеином АМ и пропиридијум јодидом.....	53
3.7.4.5. Бојење Анексином V и PI.....	53
3.7.4.6. Одређивање промена по фазама ћелијске деобе.....	54
3.7.4.7. Одређивање активације каспазе 8 и/или 9 у третираним ћелијама.....	54
3.7.4.8. Одређивање присуства супероксидних радикала у митохондријама.....	54
3.7.4.9. Испитивање антимигранторне активности.....	55
3.8. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИКОРОЗИВНЕ АКТИВНОСТИ.....	56
3.8.1. Припрема узорка и раствора електролита.....	56
3.8.2. Одређивање инхибиције корозије електрохемијским мерењима.....	56
3.8.2.1. Одређивање инхибиције корозије методом линеарне поларизационе отпорности.....	56

3.8.2.2. Одређивање инхибиције корозије методом електрохемијске импедансне спектроскопије.....	56
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	57
4.1. <i>Bis</i> (ВИНИЛ)ПИРИДИНИЈУМ-ЈОДИДИ – <b>БВПЈ</b> .....	57
4.1.1. Структурна и спектрална анализа <b>БВПЈ</b> .....	57
4.1.2. Оптимизација геометрије и TD-DFT прорачуни <b>БВПЈ</b> једињења.....	57
4.1.3. UV-Vis спектрална анализа.....	60
4.1.3.1. Солватохромизам испитиваних <b>БВПЈ</b> – вишепараметарска корелација...	60
4.1.3.2. Проучавање солватохромизма <b>БВПЈ</b> једињења методом линеарне корелације енергије солватације – LSER анализа.....	61
4.1.3.3. Природа молекулских орбитала – TD-DFT студија.....	65
4.1.4. Дужина везе и коефицијент попуњености орбитала за квантификацију „ <i>push-pull</i> ” ефекта у испитиваним једињењима.....	69
4.1.4.1. Разлике у хемијским померањима ( $\Delta\delta$ ) као мера „ <i>push-pull</i> ” ефекта.....	71
4.1.5. Анализа линеарних односа слободне енергије (LFER) примењена на вредности NMR хемијских померања <b>БВПЈ</b> .....	72
4.1.6. Антиоксидативна активност <b>БВПЈ</b> једињења.....	74
4.2. <i>Bis</i> (ИМИНО)ПИРИДИНИ – <b>БИП</b> .....	75
4.2.1. Спектрална и структурна карактеризација <b>БИП</b> једињења.....	75
4.2.2. Оптимизација геометрије <b>БИП</b> једињења.....	75
4.2.3. Солватохромна својства <i>bis</i> (имино)пиридина.....	77
4.2.3.1. Корелациона анализа Камлет-Тфтовим солватохромним моделом – LSER анализа.....	78
4.2.3.2 TD-DFT теоријско израчунавање апсорпционих спектра.....	80
4.2.4 Антиоксидативни капацитет <b>БИП</b> једињења.....	84
4.2.4.1. Методе хватања слободних радикала.....	84
4.2.4.2. Тест редукције антиоксидативног капацитета и укупни антиоксидативни капацитет једињења <b>БИП</b> .....	85
4.2.5. DFT студије проучавања односа структуре и антиоксидативног капацитета...	86
4.2.6. Однос структуре и антиоксидативног капацитета – Тумачење механизма корелационим методама.....	91
4.2.7. Инхибиторна активност <b>БИП</b> према ацетилхолинестерази (AChE).....	93
4.2.8. Антимикробна активност <b>БИП</b> једињења.....	95
4.2.8.1. Одређивање могућих молекулских мета које интерагују са <b>БИП</b> и молекулски докинг у предвиђене мете релевантне за антимикробну активност једињења.....	97
4.3. ИСПИТИВАЊЕ ВИНИЛ ( <b>БВПЈ</b> ) И ИМИНО ( <b>БИП</b> ) ДЕРИВАТА ПИРИДИНА КАО ПОТЕНЦИЈАЛНИХ ИНХИБИТОРА КОРОЗИЈЕ.....	99
4.3.1 Испитивање ефикасности инхибиције <b>БИП</b> .....	99
4.3.1.1. Линеарна поларизациона отпорност (LPR).....	99
4.3.1.2. Електрохемијска импедансна спектроскопија (EIS).....	101
4.3.2. Временска зависност.....	104
4.3.3. Кинетички параметри.....	106
4.3.4. Адсорпциона изотерма и термодинамички параметри процеса.....	110
4.3.5. DFT студије проучавања инхибиторне активности.....	111
4.3.6. Еко-токсиколошка процена ризика <b>БИП</b> коришћењем QSAR модела за предвиђање њихових физичко-хемијских и еко-токсиколошких својстава.....	114
4.4. АСИМЕТРИЧНИ ДИХИДРАЗОНИ ТИОКАРБОХИДРАЗИДА – дТКХ.....	115
4.4.1. Структурна и спектрална карактеризација.....	115
4.4.2. Одређивање константи киселости.....	116
4.4.3 Одређивање антиоксидативне активности.....	116

4.4.3.1 DPPH и ABTS антиоксидативна анализа.....	117
4.4.3.2 CUPRAC антиоксидативна анализа.....	118
4.4.3.3. TAC антиоксидативна анализа.....	118
4.4.4 Одређивање антибактеријске и антифунгалне активности.....	119
4.4.5. Антиканцер активност дТКХ <sub>2</sub> фп и дТКХ <sub>2</sub> ап.....	121
5. ЗАКЉУЧАК.....	132
6. ЛИТЕРАТУРА.....	136
7. ПРИЛОГ.....	143
8. БИОГРАФИЈА АУТОРА.....	197
9. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА И САОПШТЕЊА.....	199
10. ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ.....	200
11. ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКОГ РАДА.....	201
12. ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ.....	202

## УВОД

Пиридин и његови деривати су хетероароматичне структуре, које због своје диполарности и својстава базности и киселости услед присуства атома азота показују значајан спектар различитих активности. Удео ових структура у биолошки активним једињењима било природног или синтетског порекла је велики, па су ова једињења област интересовања све већег броја истраживача. Хетероароматична једињења која садрже пиридин показују антиканцерогено, антиоксидативно и антимикуробно дејство<sup>1-5</sup>. Ове хетероароматичне структуре су веома значајне и као интермедијерни производи у органским синтезама, синтезама полимерних и оптичких материјала, координационој хемији, нанотехнологији и др<sup>6-10</sup>.

Циљ ове докторске дисертације је синтеза нових винил и имино деривата пиридина, проучавање њихове структуре и својстава као и одређивање биолошке активности. Стога су синтетисане три серије једињења:

1. *bis*(винил)пиридинијум јодиди (**БВПЈ**)
2. *bis*(имино)пиридини (**БИП**)
3. дихидразони тиокарбохидразида (дТКХ)

Серије се међусобно разликују према винилном и иминском структурном фрагменту који повезује пиридин са ароматичним језгрима у прве две серије, као и по положају иминске групе у односу на пиридински и хинолински атом азота и типу супституената на иминској вези (Н или СН<sub>3</sub>) у трећој серији.

Синтетисана једињења су окарактерисана експерименталним техникама и квантно-хемијским прорачунима, испитана су њихова физичко-хемијска својства и одређена антиоксидативна, антимикуробна и антиканцер активност као и антикорозивни потенцијал.

У првом делу дисертације проучавана су солватохромна својства винил (**БВПЈ**) и имино (**БИП**) деривата пиридина, у циљу испитивања утицаја растварача на померања UV-Vis апсорпционих максимума ових једињења. Резултати су анализирани корелационим анализама применом LSER модела коришћењем Камлет-Тафтове солватохромне једначине за обе серије једињења и моделом који је предложио Каталан за прву серију, као и применом теоријских прорачуна. Помоћу ова два модела одређени су утицаји специфичних и неспецифичних интеракција између молекула у раствору и растварача на апсорпционе максимуме. Интермолекулско водонично везивање, до ког долази приликом интеракције растварача и растворене супстанце, је значајно за хемијско понашање синтетисаних једињења са потенцијалном биолошком активношћу.

Применом квантно-хемијских прорачуна DFT методом извршена је оптимизација геометрије винил и имино деривата пиридина, као и израчунавање теоријских NMR и апсорпционих (UV-Vis) спектра. Резултати квантно-хемијских прорачуна (енергије НОМО/ЛУМО орбитала, разлика у њиховој енергији,  $E_{gap}$ ) добијени DFT методом пружили су додатни увид у структуру молекула и електронске прелазе. Електронска структура испитиваних једињења прве серије проучавана је применом модела линеарних корелација слободних енергија на <sup>13</sup>C NMR хемијска померања, коришћењем Хаметове (енгл. *Hammett*) једначине. Корелациона анализа је дала нова сазнања о преношењу ефеката супституената (резонанциони, индуктивни, стерни) на <sup>13</sup>C NMR хемијска померања ових једињења. Теоријски предвиђена  $pK_a$  вредност као важан физичко-хемијски параметар дала је сазнања о блискости  $pK_a$  вредности тиокарбохидразинских NH атома, при чему није било могуће експериментално одређивање  $pK_a$  вредности свих јонизабилних група.

*In vitro* антиоксидативна активност је одређивана за све винил и имино деривате. Серија имино деривата испољила је бољу антиоксидативну активност у поређењу са винил дериватима пиридина, што је и очекивано, с обзиром да имино група у поређењу са винил групом боље стабилизује слободне радикале настале одузимањем једног електрона или атома водоника. Такође за серију *bis*(имино) пиридина анализиран је антиоксидативни механизам по коме ова једињења показују антиоксидативно дејство коришћењем DFT методе, као и

коришћењем линеарне регресије једнопараметарске и двопараметарске Хаметове једначине, тј. LFER анализе. Резултати анализе механизма показали су да једињења стабилизују радикалске врсте доприносом процеса трансфера електрона или трансфера атома водоника са молекула антиоксиданса на реактивну радикалску врсту. Поред испитивања антиоксидативне активности испитана је и антимикробна активност једињења друге и треће (дТКХ<sub>2фп</sub> и дТКХ<sub>2ап</sub>) серије према бактеријама (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и резистентном соју *Staphylococcus aureus* (MRSA)) и гљивици (*Candida albicans*). Једињења су показала антимикробно деловање према свим испитиваним микроорганизмима. При том докинг студије једињења друге серије показале су да је бактеријска леуцил аминокептидаза препозната као најбоље рангирана мета за испитивана једињења.

С обзиром да позната структурно слична једињења са тион, пиридил, хинолил и имино групом испољавају добру антиканцер активност<sup>11</sup>, једињења треће серије (дТКХ<sub>2фп</sub> и дТКХ<sub>2ап</sub>) су додатно испитивана на малигним културама насталих спонтаном малигном трансформацијом различитих ткива: аденокарцином дебелог црева (LoVo), аденокарцином јајника (SkOV-3), неситноћелијски аденокарцином плућа (A549), аденокарцином дојке (MCF-7). Њихоова потенцијална токсичност испитивана је на моделу здраве културе кератиноцита коже (HaCaT).

У оквиру испитивања инхибиторне активности једињења друге серије према ензиму АСhЕ, **БИП** једињења су показала умерену активност.

Имајући у виду да су физичко-хемијска својства и биолошка активност у корелацији са структуром испитиваних једињења, један део дисертације се односи на кванто-хемијске прорачуне који су помогли разумевању овог односа. За успостављање везе између структуре и антиоксидативне, као и антимикробне активности примењена је QSAR метода. Ова метода је заснована на молекулским дескрипторима добијеним теоријским прорачунима који су доведени у везу са експериментално добијеним резултатима биолошких активности применом одређеног математичког модела.

Такође, познато је да су једињења са хетероцикличним структурама добри инхибитори корозије метала<sup>12</sup>. Стога је један од циљева био и испитивање антикорозивног потенцијала винил и имино деривата. Испитивања су рађена на гвожђу и цинку на рН вредностима 3 и 7 применом електрохемијских метода. Приликом испитивања **БИП**, имино деривати су показали боља инхибиторна својства од винил деривата. У циљу бољег разумевања односа структуре и добијене антикорозивне ефикасности као и проучавања механизма инхибиције корозије испитиваних једињења коришћено је молекулско моделовање применом дескриптора електронске структуре добијених квантно-хемијским прорачунима.

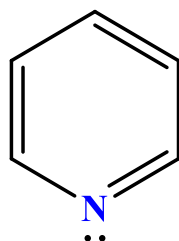
## 2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО

### 2.1. ПИРИДИН И ЊЕГОВИ ДЕРИВАТИ: СИНТЕЗА, СТРУКТУРА И КЛАСИФИКАЦИЈА

#### 2.1.1. Пиридин – структура и основна својства

Познато је да молекули који у основи садрже хетероциклични прстен поседују значајну биолошку и фармаколошку активност<sup>13,14</sup>. Међу хетероцикличним једињењима која садрже азот, пиридин и његови деривати су веома интересантни и показују велики потенцијал за клиничку примену.

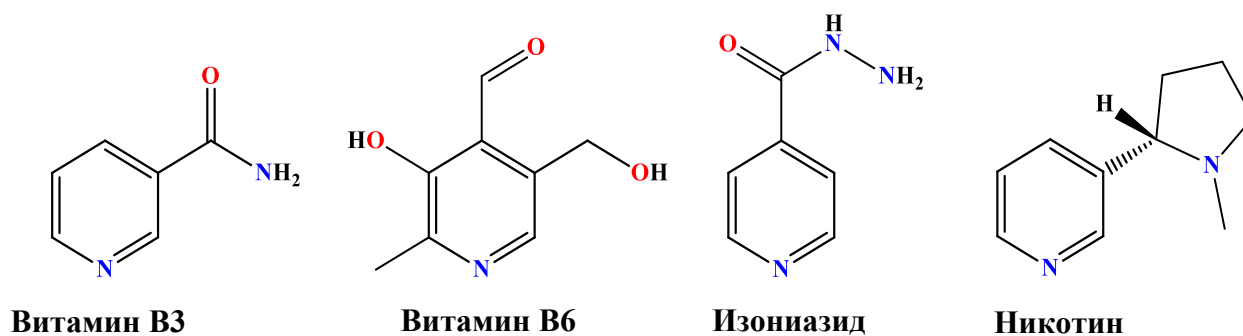
Пиридин је дериват бензена молекулске формуле  $C_5H_5N$ , где је C-H група бензена замењена атомом азота (Слика 2.1).



Слика 2.1 Структура пиридина

Молекул пиридина је планаран и садржи шест  $\pi$ -електрона који су делокализовани кроз молекулске орбитале планарног прстена као код бензена. Због своје ароматичне структуре, може да ступа у реакције електрофилне ароматичне супституције. Са друге стране, присуство електронегативног атома азота у прстену узрокује померање  $\pi$ -електрона ка атому азота и смањење електронске густине у прстену. Услед таквог распореда електронске густине пиридин је подложен и реакцијама нуклеофилне ароматичне супституције. Због слободног електронског пара на атому азота пиридин је база, која има хемијска својства слична хемијским својствима терцијарних амина. Слично као и терцијарни амини у органским реакцијама подлеже протоновању, реакцијама алкиловања и ациловања, као и оксидацији на атому азота<sup>15-17</sup>.

Узимајући у обзир наведена структурна својства, понашање и реактивност, пиридин и његови аналози могу да дају супституисане деривате са различитим својствима и применама. Такође, могу лако да се функционализују различитим фармакофорним групама, што доприноси разноврсној биолошкој активности, чинећи ове деривате интересантним полазним структурама у развоју и синтези различитих лекова. Молекул пиридина присутан је у структурама природних производа: витамина (Б3 и Б6), алкалоида (никотин) као и у многим лековима (нпр. антитуберкулозни лек изониазид) (Слика 2.2).



Витамин В3

Витамин В6

Изониазид

Никотин

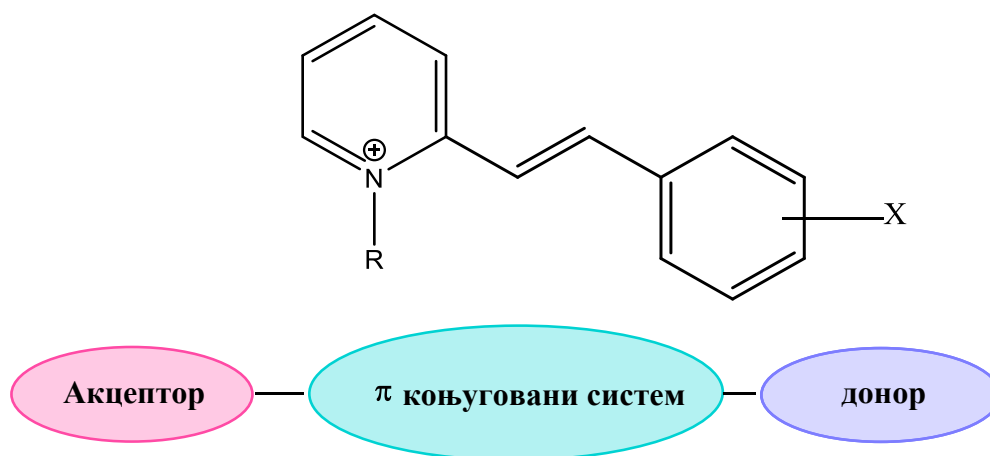
Слика 2.2 Структуре пиридина присутне у природним производима

Последњих година се такође активно проучавају структура и механизми биолошког дејства деривата пиридина, како имино, тако и винил типа, јер је утврђено да ова врста једињења поседује добру антимикуробну, антиканцер и антиоксидативну активност<sup>3,4,11,18</sup>.

Поред биолошких својстава и примене у медицини многа једињења која у свом саставу садрже пиридинску структуру имају значајну улогу у органској хемији и хемијској технологији као растварачи, лиганди и катализатори за синтезе. Различити моно- и ди-деривати пиридина су важна једињења за синтезу нових молекула са разним физичким и хемијским својствима, а позната је и њихова примена у координационој хемији<sup>17,19</sup>.

### 2.1.2. Винил деривати пиридина

Једињења која садрже стиренску јединицу везану са пиридинским прстеном преко винилне везе представљају органске молекуле са високо поларизабилним  $\pi$ -електронским системом и припадају класи такозваних „*push-pull*” система (донор-акцепторске групе повезане  $\pi$  коњугованим системом, D- $\pi$ -A). Ова једињења осим арил могу да садрже и пиридил групу везану за винилни део (арил/пиридил)-винил). (Слика 2.3)



**Слика 2.3** Општи приказ „*push-pull*” система са терминалним донорским и акцепторским групама повезаним  $\pi$ -електронским системом

Због њиховог занимљивог биолошког дејства, спектроскопских, фотофизичких и фотохемијских својстава истражено је на хиљаде различитих стирилних деривата<sup>20-24</sup>. Да би се проучила њихова специфична својства потребно је у потпуности окарактерисати молекулску структуру<sup>25</sup>. Међу бројним једињењима из групе стирил деривата, пиридинијумове соли су познати структурни фрагменти у многим природним и биоактивним фармацеутским производима<sup>26</sup>. Стирил пиридинијум јодид соли представљају интермедијере добијене из пиридина и служе за синтезу нових хетероцикличних једињења са побољшаним својствима. Модификацијом ових соли добијена су једињења са значајним *in vitro* активностима. Неке модификоване структуре као што су хинолинијум, пиридинијум и имидазијум соли са различитим хетероароматичним супституентима показала су активност према ћелијама карцинома плућа типа А549 и Н226<sup>27</sup>. Ове структуре су сличне антитуморским лековима као што су: бернил, дистимицин и пентамидин. Истраживање које је спроведено показује да метил-2,6-дистирилпиридин-јодид соли због своје хемијске структуре („*push-pull*” система молекула), поред биолошких својства, имају примену и у другим областима науке и технологије (нано технологија, оптика и оптоелектроника, аналитика)<sup>6,7</sup>. Показано је да



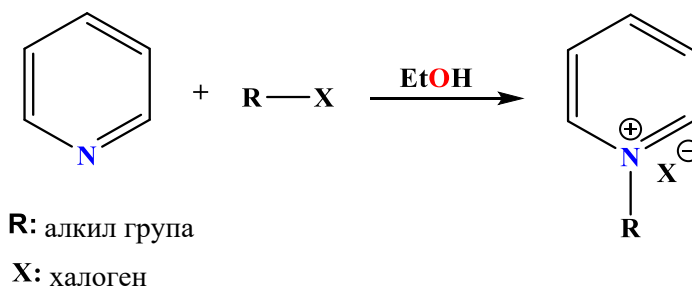
активација атома азота из пиридина алкилном групом омогућава добијање молекула са побољшаним својствима за употребу као нелинеарних оптичких материјала<sup>28</sup>.

У зависности од присуства супституената на атому азота пиридина и нуклеофила, ове соли се синтетишу на различите начине, показују другачију реактивност и имају различиту примену. У поређењу са неутралним молекулом пиридина, пиридинијумове соли су високо реактивне врсте. Подлежу реакцијама нуклеофилне адиције, дајући биолошки активне молекуле и алкалоиде<sup>26</sup>. Реактивност *N*-метил-2,6-дистирилпиридинијум (*N*-метил-2,6-диарилпиридинијум) соли деривата винил пиридина може се посматрати у типичној реакцији кондензације метилпиридина у којој би лак губитак протона из метил групе могао омогућити реакцију са ароматичним алдехидима, користећи различите врсте катализатора (пиперидин, натријум хидроксид, анхидрид сирћетне киселине)<sup>25,29</sup>. Физичко-хемијска својства ових једињења одређена су постојањем динамичке равнотеже између конформационих изомера, која настаје услед недостатка слободне ротације арилвинилних делова око централног пиридинског прстена<sup>30</sup>.

### 2.1.2.1. Синтеза *N*-метил-2,6-bis(стирил)пиридинујум-јодид соли деривата винил пиридина

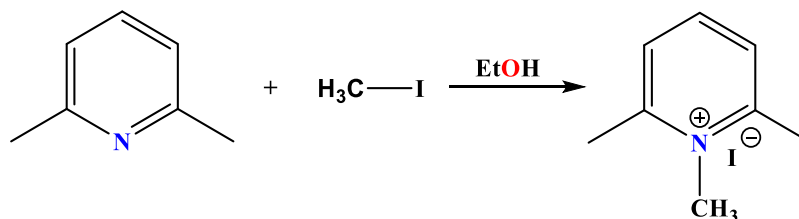
Синтеза *N*-метил-2,6-bis(стирил)пиридинујум-јодид соли је позната у литератури и представља реакцију кондензације једињења пиридина и алдехида. Реакција кондензације соли  $\alpha$ -метилпиридинијума са бензалдехидом у присуству пиперидина даје 2-стирилпиридинијумову со са 72% приноса<sup>26</sup>. Пиридинијум соли повезане винилним везама са ароматичним алдехидима добијене су у приносу 82–90%<sup>31</sup>.

Реакција добијања несимтеричних и симетричних *N*-метил-2,6-bis(стирил)пиридинујум јодида је описана у ранијим истраживањима<sup>7,24,27,32,33</sup>. Најпре се алкил/алкилхалогенидним етром, у  $S_N2$  реакцији, активира азот на пиридинском прстену. (Слика 2.4)<sup>26</sup>.



Слика 2.4 Општа  $S_N2$  реакција пиридина са алкилхалогенидом

У складу са предходно описаном синтезом приказаној на слици 2.4, метилација атома азота из 2,6-диметил пиридина је класични поступак синтезе који укључује  $S_N2$  реакцију 2,6-диметил пиридина са метилјодидом (Слика 2.5).



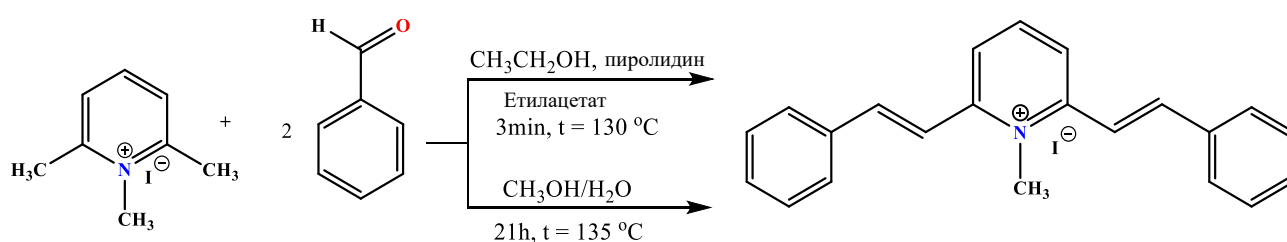
Слика 2.5 Синтеза *N*-метил-2,6-диметилпиридинијум јодида (*N*-метил-2,6-лутидин јодида)

Код свих до сада познатих синтеза, реакција добијања *N*-метил-2,6-*bis*(стирил)пиридинујум-јодид соли је реакција кондензације и може се изводити у присуству катализатора или без катализатора. Као растварач се обично користи етанол или метанол, мада се користе и смеше ових растварача са хлороформом, етил-ацетатом или водом. Избор различитих растварача и реакционих услова синтезе (температура, време, молски однос реактаната) олакшава пречишћавање производа реакције и омогућава добијање производа у задовољавајућим приносима. Квантно-молекулским прорачунима показана је могућност настајања два изомерна облика (*-cis* и *-trans*), са већом заступљеношћу *-trans* облика, што је и потврђено одређивањем кристалне структуре помоћу дифракције X-зрака<sup>29,32</sup>.

У наставку су приказане до сада познате реакције синтезе деривата *N*-метил-2,6-*bis*(стирил)пиридинујум-јодид соли.

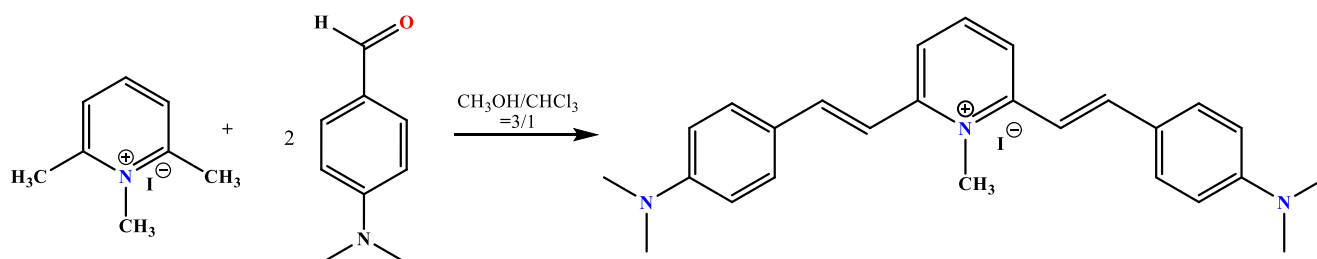
Пентала (енгл. *Penthala*) и сарадници описали су синтезу *N*-метил-2,6-(*E*)дистирилпиридинујум-јодида (Слика 2.6)<sup>32</sup>. У првом кораку синтезе, смеша *N*-метил-2,6-лутидин јодида и бензалдехида у молском односу 1:2,5 загревана је 3 минута на 130 °C и притиску 25-29 bar у посуди под притиском уз мешање. Као растварач је коришћен етанол а као катализатор пиридин. Након тога, смеша је охлађена и разблажена етил-ацетатом, након чега је реакциона смеша филтрирана и једињење пречишћено кристаллизацијом из етанола.

2,6-Дистирилпиридинујум јодид се може добити и кондензацијом смеше 2,6-лутидина и бензалдехида у молском односу 1,03:2,72, без присутва катализатора и при другачијим условима синтезе<sup>29</sup>. Смеша се загрева на 135 °C уз рефлукс 21 h. Као растварач се користи смеша метанол/вода у запреминском односу 50:50. Синтеза дистирил деривата је приказана на слици 2.6.



Слика 2.6 Синтеза *N*-метил-2,6-(*E*)дистирпиридинујум-јодида

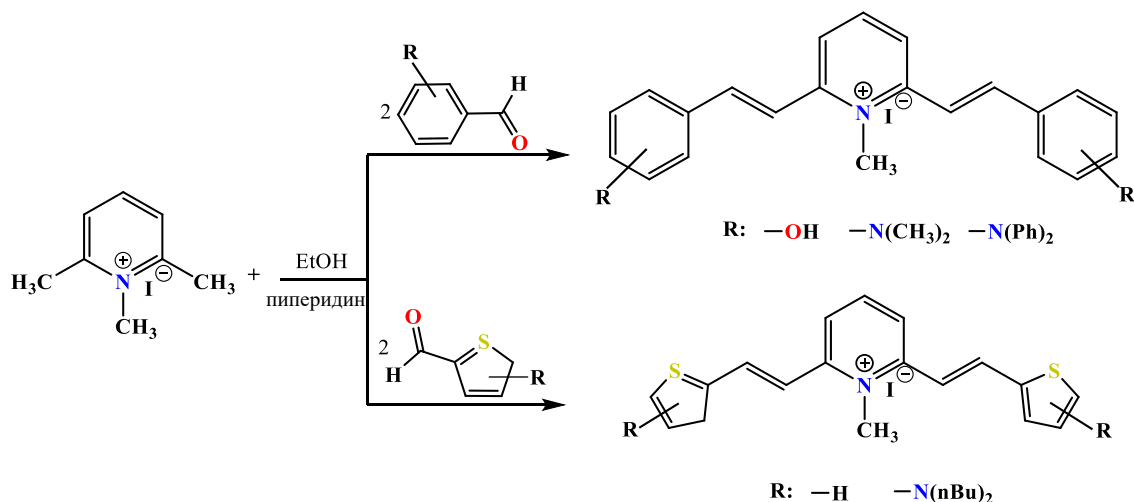
Кондензацијом *p*-диметиламинобензалдехида са *N*-метил-2,6-диметилпиридинујум-јодидом у смеси растварача метанол/хлороформ ( $v/v = 3:1$ ) добија се *N*-метил-2,6-ди[(*E*)-*p*-диметиламинофенилетенил]пиридинујум-јодид у приносу од 96%<sup>33</sup>. Реакција се изводи без присутва катализатора и приказана је на Слици 2.7.



Слика 2.7 Синтеза *N*-метил-2,6-ди[(*E*)-*p*-диметиламинофенилетенил]пиридинујум-јодида

Позната је и реакција кондензације *N*-метил-2,6-диметилпиридинујум-јодида са различитим алдехидима (4-диметиламинобензалдехид, 4-дифениламинобензалдехид, 5-

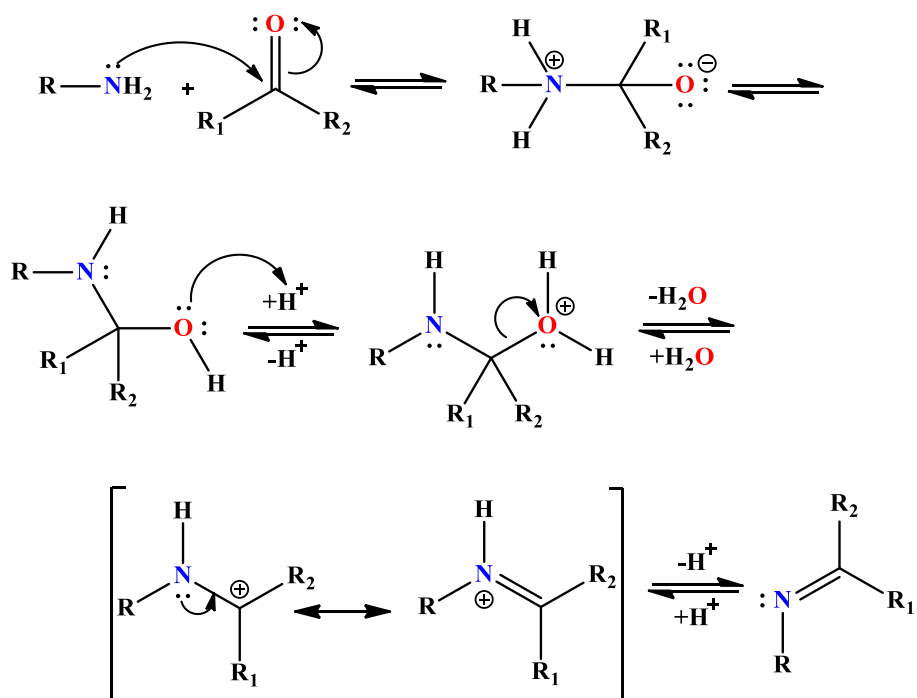
тиофен-2-ил-тиофен-2-карбалдеhid, 5-(дибутиламино)-2,2-бифиофен-5-карбалдеhid) која је приказана на Слици 2.8. У етанолу као растварачу уз присуство каталитичке количине пиперидина, у овој реакцији се добијају дистирил пиридин једињења са приносом 21-79 %<sup>24,27</sup>.



Слика 2.8 Синтеза *N*-метилдистирил деривата

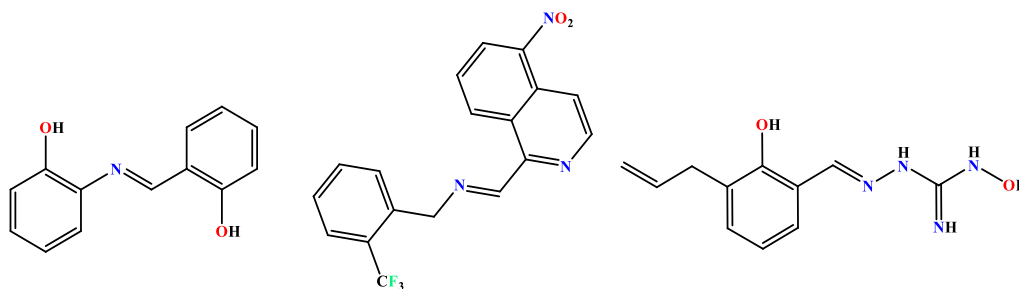
### 2.1.3. Имино деривати пиридина

Једињења која у основи садрже азотетинску (имино) групу ( $\text{R}_1\text{R}_2\text{-C=N-R}$ ) позната су као Шифове (енгл. *Schiff*) базе.  $\text{R}$ ,  $\text{R}_1$  и  $\text{R}_2$  су различите функционалне групе везане за угљеник и азот и могу бити -алкил, -арил, -хетероарил или  $\text{H}$ . Име су добила по научнику Хуго Шифу (енгл. *Hugo Schiff*) који је открио и први описао до сада највише коришћени метод њихове синтезе<sup>34</sup>. Ова синтеза представља реакцију нуклеофилне адиције атома азота алифатичних или ароматичних амина и угљениковог атома у карбонилним једињењима (алдехиди и кетони). На Слици 2.9. приказан је општи механизам реакције.



Слика 2.9 Општи механизам реакције настајања Шифових база

Шифове базе су део структуре разних природних и синтетских једињења и захваљујући активности коју испољавају, њихова примена као и примена њихових комплекса је широка<sup>34,35</sup>. Заступљене су у многобројним областима, како у органској и аналитичкој, тако и у фармацеутској и прехранбеној хемији, у бојама, као и у многобројним биолошким процесима. Велики број истраживања која постоје показује да ова једињења поседују антиканцер, антибактеријска, антифунгална и антивирална својства<sup>34</sup>. На Слици 2.10 приказане су структуре неких Шифових база које показују антимикуробна, антипаразитска и антивирална својства.<sup>34</sup>



**Слика 2.10** Структуре Шифових база које показују антимикуробну, антипаразитску и антивиралну активност

Структуре једињења са два ароматична прстена и пиридином као централним прстеном повезана имином групом представљају посебно разноврсну класу једињења са антиоксидативним, антимикуробним и антипролиферативним деловањем<sup>19,36</sup>.

Присуство имино групе, вероватно је пресудно за комплексирање са металима и биолошку активност оваквих једињења. Комплекси Шифових база добијени из 4-хидроксибензалдехида и амина имају снажну антиканцер активност према карциному Ерлихових ћелија (енгл. *Ehrlich ascites carcinoma*)<sup>34</sup>.

Поред широког спектра биолошких активности, симетрични *bis*-деривати су важна једињења и за многе технолошке примене. Користе се као полимерни материјали за имобилизацију ензима глукозооксидазе, као инхибитори корозије, аналитички реагенси и флуоресцентни сензори<sup>8,12,37,38</sup>. На пример, *N,N'*-(пиридин-2,6-диил)*bis*[1-(2-хидроксифенил)] метанимин уграђен у полимерну мембрану делује као сензор за селективно одређивање  $Pb^{2+}$  јона, а такође се користи као материјал за екстракцију и аналитичко одређивање  $Cu^{2+}$  јона у раствору<sup>37</sup>.

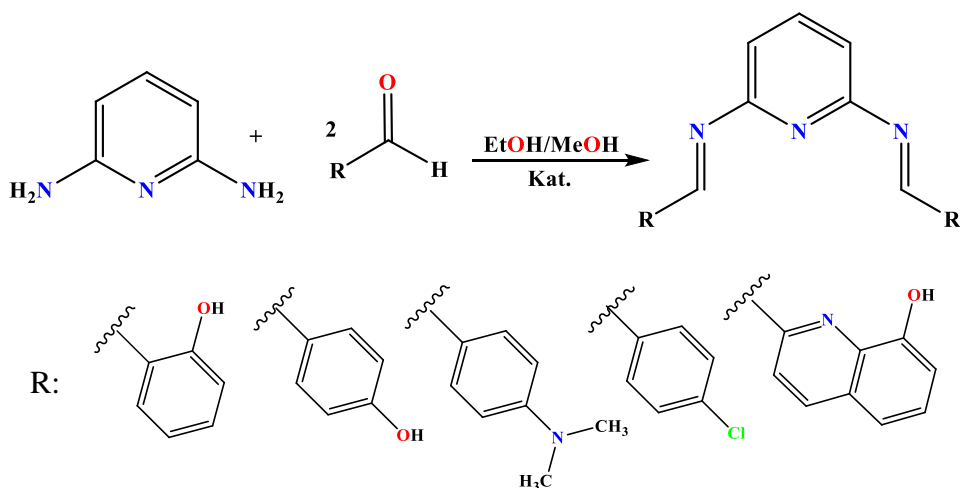
Лионс и Мартин (енгл. *Lions* и *Martin*) су синтетисали Шифове базе из 2,6-пиридинкарбалдехида са анилином и ова једињења су коришћена за синтезу различитих полидентатних лиганда укључујући и разне макроцикличне лиганде<sup>39</sup>.

### 2.1.3.1. Синтеза имино пиридина

Најзначајнији примери једињења ароматичних пиридина и ароматичних амина са симетричном структуром, а која показују значајне биолошке, корозивне и друге примене приказани су у наставку.

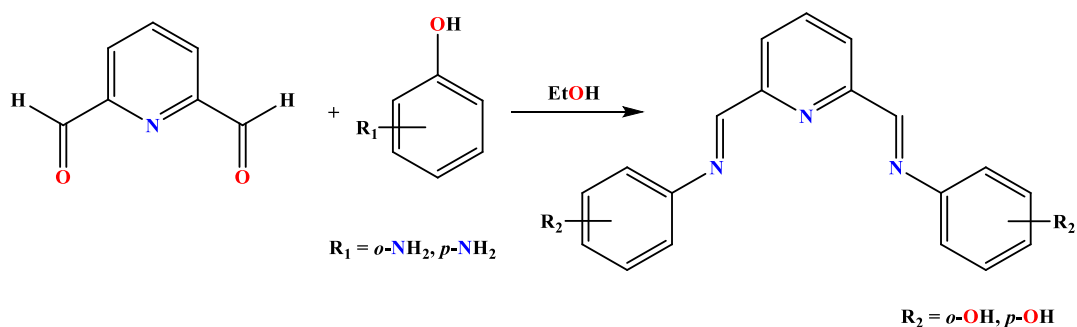
Синтеза ових једињења представља кондензацију алдехида/кетона и амина где је карбонилна група замењена амино групом. Најчешће се изводе у присуству катализатора (пиперидин, сирћетна или хлороводонична киселина) и алкохола (метанол и етанол) као растварача. У зависности од услова реакције добијају се производи са различитим приносима.

На слици 2.11 приказана је синтеза неколико различитих симетричних иминова добијених кондензацијом пиридин-2,6-диамина и различитих ароматичних алдехида (2-хидроксибензалдехид, 4-хидроксибензалдехид, 4-диметиламинобензалдехид, 4-хлорбензалдехид, 8-хидрокси-2-хинолин бензалдехид)<sup>8,40-43</sup>.



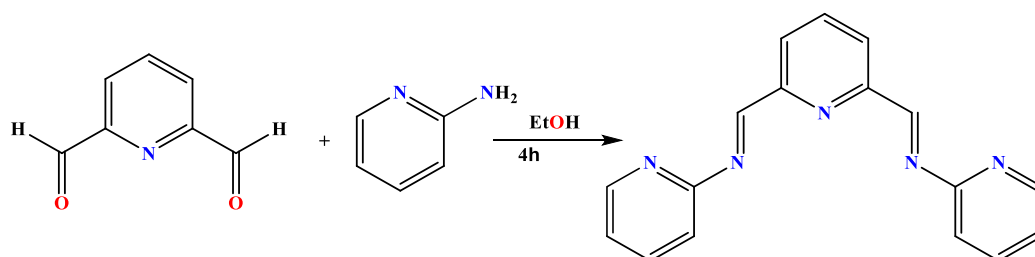
Слика 2.11 Синтеза симетричних *bis*(имино) пиридина

Симетрични имино пиридини могу се добити и реакцијом између 2,6-пиридин дикарбоксалдехида и аминофенола у приносу од 85% (Слика 2.12)<sup>3,19</sup>.



Слика 2.12 Реакција 2,6-пиридин дикарбоксалдехида и аминофенола

Уколико се синтеза изводи између 2,6-пиридин дикарбоксалдехида и 2-аминопиридина при истим реакционим условима добија се симетрични имин у приносу од 94% (Слика 2.13)<sup>19</sup>.

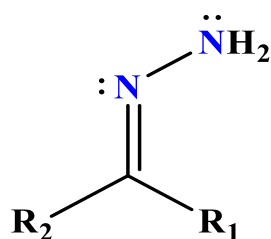


Слика 2.13 Синтеза 2,6-пиридин дикарбоксалдехида и 2-аминопиридина

Ови имини граде комплексе са металима чија је активност одређена у *in vitro* тестовима<sup>3,19</sup>.

## 2.2. ХИДРАЗИН И ДЕРИВАТИ ХИДРАЗИНА

Хидразин ( $\text{NH}_2\text{-NH}_2$ ) и његови деривати подлежу реакцији кондензације са алдехидима у киселој средини и при том настају различити хидразони (Слика 2.14).



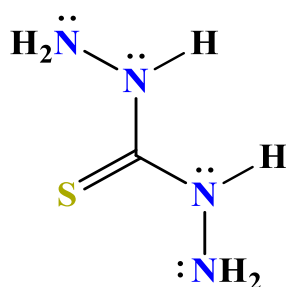
Слика 2.14 Структура хидразона или хидразида

Уколико је за атом азота хидразина везана алил или арил група добијају се хидразони, док присуство ацил групе даје деривате који се називају хидразида. Због својих физичко-хемијских својстава условљених понашањем атома угљеника и као електрофила и као нуклеофила и присуства два нуклеофилна атома азота, деривати хидразина представљају важну класу једињења са широком применом у органској хемији<sup>44</sup>. Формирање моно-, ди-, три- и тетрахидразона може се постићи контролисањем молског односа између хидразина или дихидразина са монокарбонилним једињењима.

У великом броју научних радова последњих година фокус истраживања представљају једињења тиокарбохидразона и тиокарбохидразида због њихове заступљености у биолошким системима и хемијским процесима.

### 2.2.1. Тиокарбохидразида – структура и основна својства

Тиокарбохидразида (ТКХ) представљају деривате тиокарбонске киселине и поседују један атом сумпора повезан са два атома азота хидразона. (Слика 2.15)



Слика 2.15 Структура тиокарбохидразида (ТКХ)

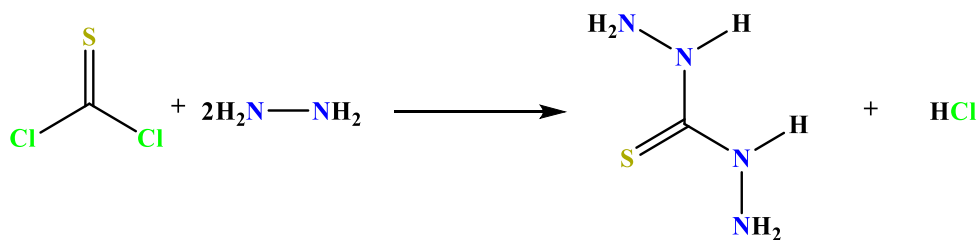
Последњих година се интензивно проучавају, јер као прекурсори могу да се користе у синтези многих органских, биолошки и фармаколошки активних супстанци, у одигравању ензимских и биохемијских реакција, као и синтези полимерних материјала применљивих у фотохемији<sup>9,10</sup>.

Неке структуре деривата тиокарбохидразида, као нпр. 1,3,4-тијадиазолини су саставни део хормона, витамина, антибиотика и алкалоида. Имају јаче антимикуробно дејство од амоксицилина према Грам-позитивним и Грам-негативним бактеријама<sup>45</sup>.

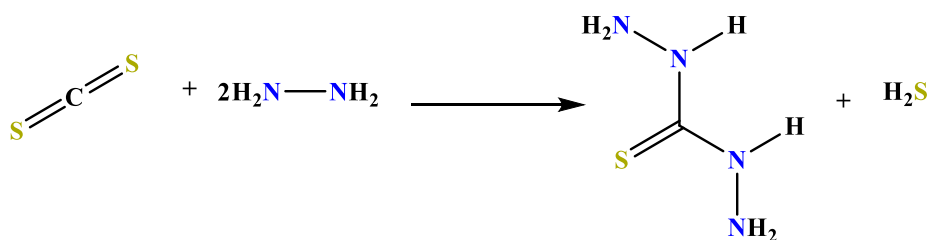
Тиокарбохидразида реакцијама кондензације са карбонилним једињењима формирају одговарајуће моно- и ди-тиокарбохидразида са различитим својствима и применама.

#### 2.2.1.1. Синтеза тиокарбохидразида

Синтеза тиокарбохидразида, деривата тиокарбонске киселине је позната у литератури и представља реакцију хидразинолизе тиокарбонилне киселине и њених деривата<sup>9</sup>.

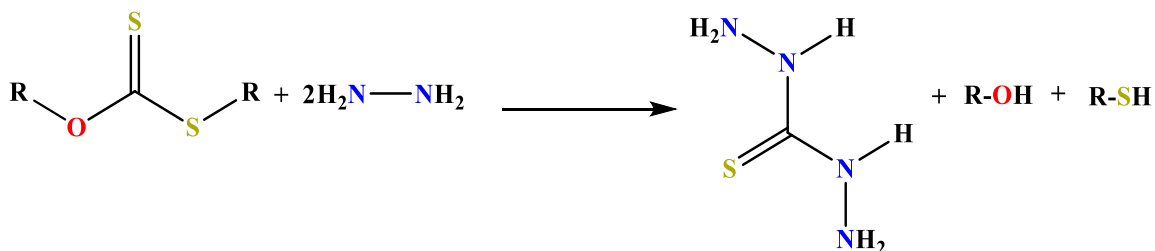


Слика 2.16 Хидразинолиза тиофосгена

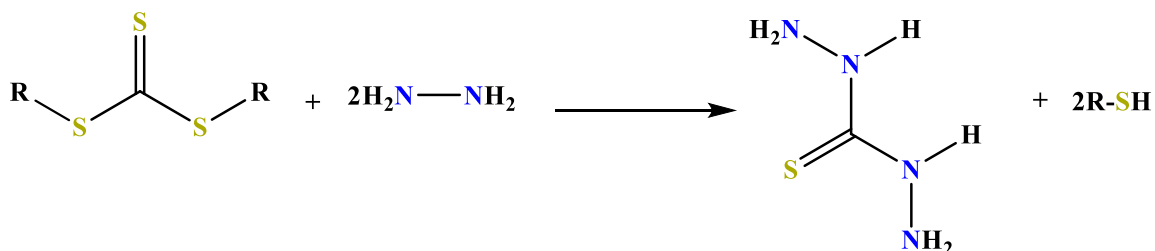


Слика 2.17 Хидразинолиза угљеик (IV)-сулфида

У литератури је такође познато да се оптимизацијом реакционих услова синтезе може утицати на принос производа, па се тако при молском односу  $\text{CS}_2$  и хидразина 1:1,3, уз загревање и мешањем може добити тиокарбохидразид у приносиу већем од 90%<sup>10</sup>.



Слика 2.18 Хидразинолиза алкоситиокарбазида



Слика 2.19 Хидразинолиза алкилтиокарбохидразида

### 2.2.2. Дитиокарбохидразиди – структура и основна својства

Дитиокарбохидразид као и његови деривати поседују велику активност због постојања тион групе, а самим тим и повећану липофилност због присуства атома сумпора у једињењима. Стога, реакција кондензације хетероцикличких једињења и дитиокарбохидразида представља логичан след у дизајну молекула који ће се користити за различита биолошка испитивања<sup>46</sup>. Дитиокарбохидразиди су једињења која у основи садрже молекул тиокарбохидразида повезан преко имино везе са карбонилним једињењима (алдехид, кетон). Једињења са оваквом

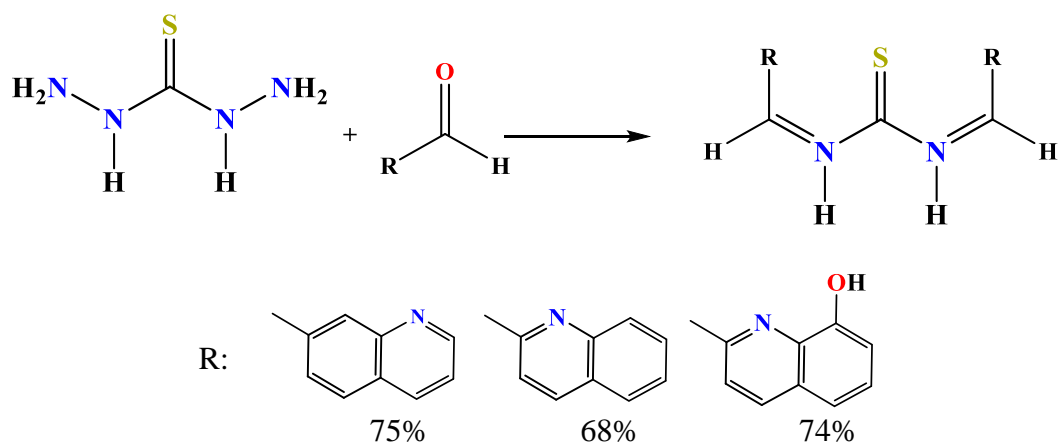
структуром поседују разноврсне биолошке и фармаколошке активности, па је њихова антиканцер, антиоксидативна, антимиорбна и антимулагена активност већ проучавана<sup>2,11</sup>. Постојање тион групе у структури молекула и таутомерних облика као и могућност изомеризације око иминске везе доводи до формирања нових активнијих молекула, што и додатно доприноси биолошкој активности ових једињења<sup>47</sup>. Осим тога користе се као кардиопротективи, а познати су и по антихелминтичком и антиканцер дејству<sup>46,48</sup>. Њихови комплекси бакра показују јачу биолошку активност и испитани су и као антиканцер реагенси на ћелијским линијама рака дојке<sup>1</sup>. Цисплатин се сматра једним од најефикаснијих лекова против рака мада његова токсичност и појава резистенције на лек ограничавају његову клиничку употребу. Последњих година дошло је до брзог ширења истраживања и развоја нових лекова против рака на бази метала како би се побољшала клиничка ефикасност, смањила токсичност и проширио спектар деловања. Комплекси бакра и ацил тиосемикарбазида показали су бољу антинеопластичну активност на про-мијелолеукемијске ћелије<sup>49</sup>.

### 2.2.2.1. Синтеза хидразона дитиокарбохидразида

Хидразони дитиокарбохидразида деривата тиоугљене киселине се добијају у једноставној реакцији кондензације тиокарбохидразида са алдехидима и кетонима. Контролисањем молских односа реактаната, односно ТКХ у односу на карбонилна једињења, као и температуре и времена вођења реакције може се утицати на ток синтезе и добијање производа са задовољавајућим приносима. У већини случајева синтеза подразумева прво реакцију настајања моно-деривата, а затим кондензацију добијеног моно-деривата са алдехидима или кетонима. И тада је однос броја молекула моно-тиокарбохидразона у односу на карбонилна једињења при синтези у већини случајева 1:1. Растварачи који се користе у синтези су метанол, етанол или смеша растварача етанола и воде и реакција се одвија загревањем уз рефлукс.

Синтеза ди-тиокарбохидразида који показују антиканцер, антиоксидативне, аналгетске, противупалне и друге биолошке и фармаколошке активности приказана је у наставку.

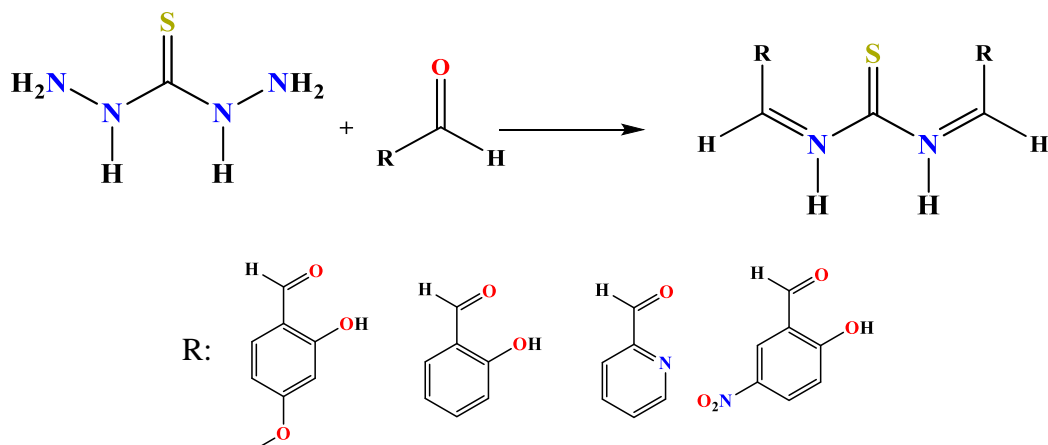
Једна од синтеза је реакција приказана на Слици 2.20. У реакцији између различитих хинолин алдехида и тиокарбазида у молском односу 2:1 добијају се *bis*-тиокарбохидразони у приносу 68-75%. Реакција се изводи 3 сата уз рефлукс у етанолу као растварачу, и у присуству каталитичке количине хлороводоничне киселине<sup>11</sup>. Добијена једињења су испитивана на антиканцер и антиоксидативну активност.



Слика 2.20 Синтеза *bis*-тиокарбохидразона реакцијом између хинолин алдехида и тиокарбохидразида



*Bis*-тиокарбохидразони могу да се добију и реакцијом кондензације 2 мола различитих ароматичних алдехида (2-ацетилпиридин алдехид, 2-хидроксифенилбензалдехид, 2-хидрокси-4-метоксибензалдехид и 2-хидрокси-5-нитробензалдехид) и 1 мола тиокарбазида (Слика 2.21)<sup>50</sup>.



Слика 2.21 Синтеза *bis*-тиокарбохидразона реакцијом ароматичних алдехида и тиокарбохидразида

## 2.3. УТИЦАЈ РАСТВОРАЧА И КОРЕЛАЦИОНА АНАЛИЗА У UV-VIS СПЕКТРОСКОПИЈИ

### 2.3.1. Солватохромизам

Солватохромизам описује промене положаја и интензитета UV апсорпционих спектра услед промене поларности растварача. Снимањем апсорпционих спектра у растварачима различите поларности, утврђено је да, не само положај већ, и интензитет и облик апсорпционих трака могу да се мењају у зависности од природе растварача<sup>51</sup>. Утицај растварача на UV апсорпционе траке је последица интермолекулских интеракција између растварача и растворене супстанце. Ове интеркције могу бити неспецифичне као што су дипол-дипол, јон-дипол, јон-јон, јон-индуковани дипол, дисперзионе силе и дипол-индуковани дипол и специфичне као што су водоничне везе. Приликом интермолекулских интеракција растварача и растворене супстанце долази до стабилизације или дестабилизације молекулских орбитала које су укључене у електронски пренос условљавајући померање апсорпционих максимума<sup>52</sup>. Ово померање зависи од својстава растварача и утолико је веће, уколико је већа способност растварача да формира водоничне везе. Може бити хипсохромно и батохромно. Хипсохромно померање, означава померање апсорпционих максимума ка мањим таласним дужинама са повећањем поларности растварача и назива се још и негативни солватохромизам, а батохромно означава померање апсорпционих максимума ка већим таласним дужинама са повећањем поларности растварача тзв. позитивни солватохромизам.

Електронски прелази (Слика 2.22) из везивних и неvezивних орбитала основног стања у неvezивне или антивезивне молекулске орбитале побуђеног стања на којима се заснива апсорпција у UV-Vis спектрима могу да буду:  $\pi \rightarrow \pi^*$ ,  $n \rightarrow \pi^*$ ,  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ,  $n \rightarrow \sigma^*$ , и трансфер наелектрисања (CT, енгл. *Charge Transfer*).

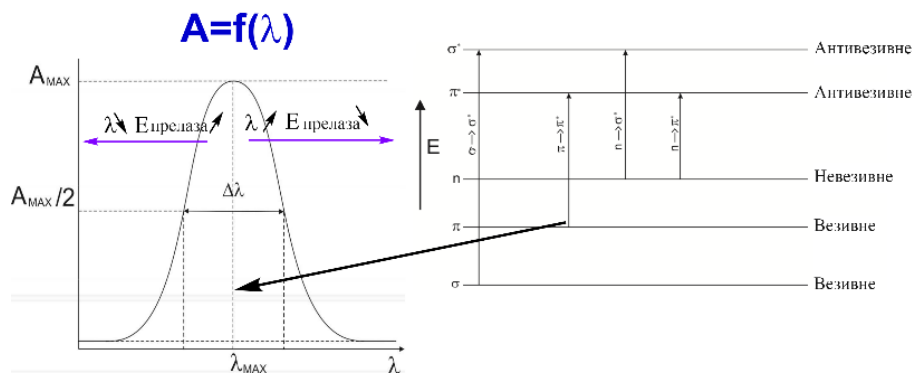
$n \rightarrow \pi^*$  прелази се јављају када електрони слободног електронског пара из неvezујуће орбитале (електрони на O, N, S) прелазе у мање стабилну антивезивну  $\pi^*$  орбиталу.

$\pi \rightarrow \pi^*$  прелази се јављају када електрони везивне  $\pi$  орбитале прелазе у антивезивну  $\pi^*$  орбиталу. Присутни су код једињења која у својој структури садрже двоструке, троструке везе, или ароматични прстен.

$\sigma \rightarrow \sigma^*$  прелази јављају се када електрони везивне  $\sigma$  орбитале прелазе у антивезивну  $\sigma^*$  орбиталу.

$n \rightarrow \sigma^*$  прелази се јављају када електрони из неvezивних орбитала прелазе у антивезивне  $\sigma^*$  орбитале.

Код  $\pi \rightarrow \pi^*$  прелаза побуђено стање је често поларизованије од основног стања, при чему поларни растварач помаже стабилизацији побуђеног стања. Последица овог прелаза је батохромно померање апсорпционих максимума у поларним растварачима као што је етанол у односу на неполарни као што је хексан. Супротно томе код  $n \rightarrow \pi^*$  прелаза основно стање је више поларизовано од побуђеног и поларни растварачи дестабилизују побуђено стање, а као резултат јавља се хипсохромно померање<sup>52</sup>.



Слика 2.22 Могући електронски прелази

### 2.3.2. Линеарна корелација солватохромних енергија

Утицаји растварача на апсорпционе спектре су сложени и специфични и не могу се сагледати квантитативно. Стога, да би се детаљније одредили примењује се вишепараметарски приступ. Мултипараметарске једначине које се користе у солватохромизму састоје се од четири појединачна емпиријска параметра, од којих сваки мери одређени аспект укупне способности солватације датог растварача, као што су диполарност и поларизабилност, киселост и базност. Линеарна корелација солватохромних енергија (LSER) је мултипараметарски приступ који се највише примењује за ефекте солватације коришћењем Камлет-Тафтове и Каталанове једначине.

Специфичне и неспецифичне интеракције растварача и растворене супстанце процењене су Камлет-Тафтовом једначином. Примењена на UV спектре ова једначина има облик<sup>53</sup>.

$$\nu_{max} = \nu_0 + s\pi^* + b\beta_1 + a\alpha_1 \quad (2.1)$$

где је

$\nu_{max}$  фреквенција апсорпционог максимума растворене супстанце чија се зависност од растварача испитује,

$\nu_0$  вредност фреквенције својства растворене супстанце у циклохексану као референтном растварачу,

$\pi^*$  индекс диполарности/поларизабилности растварача и његова вредност се креће од 0 за циклохексан до 1 за диметилсулфоксид (DMSO),

$\beta_1$  мера базности и представља способност растварача да прими протон у водоничној вези (HBA својство, енгл. *Hydrogen Bond Acceptor ability*)<sup>54</sup>. Вредности  $\beta_1$  су 0,00 за хексан до 1,00 за триамид хексаметилфосфорну киселину.

$\alpha_1$  мера киселости растварача односно представља способност растварача да буде донор у водоничној вези (HBD својство, енгл. *Hydrogen Bond Donating ability*)<sup>55</sup>. Вредност  $\alpha_1$  је од 0,00 за хексан до 1,00 за метанол.

Коефицијенти регресије  $s$ ,  $b$  и  $a$  у једначини 2.1 представљају доприносе ефеката растварача на UV апсорпционе фреквенце.

Ефекти растварача диполарност/поларизабилност у Камлет-Тафтовој једначини су изражени као средња вредност различитих мерења референтних једињења, а не као вредност добијена дефинисаним референтним системом. Такође, ови ефекти су приказани само једним параметром  $\pi^{*56,57}$ . Из тих разлога у анализи солватохромних ефеката растварача на апсорпционе спектре, примењује се Каталанова једначина<sup>58</sup>. Каталанова једначина је вишепараметарска једначина која обухвата по два параметра за специфичне (SA и SB) и неспецифичне (SP и SdP) интеракције, у којој су солватохромни параметри растварача засновани на пару добро дефинисаних хромофорних референтних једињења.

$$v_{max} = v_o + cSP + dSdP + bSB + aSA \quad (2.2)$$

Вредности SP, SdP, SA и SB карактеришу поларизабилност растварача, диполарност, базност и киселост;  $a$ ,  $b$ ,  $c$  и  $d$  су коефицијенти регресије који описују осетљивост максимума апсорпције на различите типове интеракција растварач – растворена супстанца.

Раздвајањем неспецифичних ефеката растварача (израз  $\pi^*$  у једначини (2.1)) на диполарност и поларизабилност (SP и SdP у једначини (2.2)) постиже се потпунија анализа солватохромизма испитиваних једињења.

### 2.3.3. Линеарне корелације слободне енергије

Линеарне корелације слободне енергије (LFER) се примењују за проучавање структуре и реактивности молекула. Присуство супституената различитих електронских својства може утицати на киселост, базност, солватацију и друга хемијска својства. Проучавање ефеката супституената је битно у погледу структуре и реактивности и јавља се као последица деловања три ефекта: индуктивног, резонанционог и стерног.

LFER корелација се може описати Хаметовом (енгл. *Hammett*) једначином<sup>59</sup> која представља основу за успостављање квантитативне везе између структуре и реактивности молекула. Користи се за израчунавање непознате константе равнотеже, брзине хемијске реакције и механизма хемијских реакција.

$$\log \frac{K}{K_0} = \rho\sigma \quad (2.3)$$

$$\log \frac{k}{k_0} = \rho\sigma \quad (2.4)$$

У једначинама 2.3 и 2.4  $K$  и  $k$  су константа равнотеже и константа брзине хемијске реакције – *meta*- и *para*- супституисаних деривата бензена, а  $K_0$  и  $k_0$  су константа равнотеже и константа брзине хемијске реакције несупституисаних деривата бензена. Реакциона константа,  $\rho$ , је константа пропорционалности и мерило је осетљивости хемијских померања на ефекте супституента. Велика вредност  $\rho$  (позитивна или негативна) указује на велики утицај функционалних група присутних у *meta*- и *para*- положајима бензеновог прстена.  $\sigma$  је одговарајућа Хаметова константа<sup>60</sup> супституента ( $\sigma_m$  и  $\sigma_p$ ) у *meta*- и *para*- положају. Ова константа показује укупан електронски ефекат функционалних група, који се манифестује кроз резонанциони ефекат супституената.

Посебна пажња је усмерена на њену примену у корелацији са експериментално добијеним  $pK_a$  вредностима<sup>61</sup>, UV, FTIR и NMR спектроскопским подацима<sup>62,63</sup>. Када се примењује у корелацији са апсорпционим фреквенцама Хаметова једначина има облик:

$$v_{max} = v_o + \rho\sigma \quad (2.5)$$

где је  $v_{\max}$  максимум фреквенције супституисаних деривата, а  $v_0$  фреквенција несупституисаног деривата.

За проучавање електронских ефеката супституената на NMR хемијска померања користи се једнопараметраска Хаметова једначина<sup>62</sup>.

$$S = \rho\sigma + h \quad (2.6)$$

У овој једначини вредност  $S$  представља хемијско померање атома угљеника изазавано супституентом, док је вредност  $h$  одесчак (тј. описује несупституисани члан низа).

## 2.4. ТЕОРИЈА ФУНКЦИОНАЛА ГУСТИНЕ (DFT)

Дуги низ година се развијао модел који би пружио основу за разумевање и рационализацију геометрије молекула. Средином 60-тих година XX века, Кон (енгл. *Kohn*) и Шам (енгл. *Sham*)<sup>64</sup> су публиковали рад у коме је представљена DFT као најуспешнија метода за рачунање електронске структуре материје. Данас се DFT метода успешно примењује за проучавање атома, молекула, чврстих тела, течности, комплексних материјала, међумолекулских интеракција, побуђених и прелазних стања, механизма хемијских реакција, NMR спектра, итд. DFT метода нуди задовољавајућу тачност добијених резултата, а да при том не захтева значајно компјутерско време. Развој квантне хемије указује да таласна функција, која је сматрана као незаменљива за правилан опис динамике микрочестица, садржи много више информација него што заправо треба. DFT метода се не заснива на таласној функцији већ на функцији густине електрона,  $(\rho(x,y,z))$ <sup>65,66</sup>. Помоћу DFT методе се могу веома тачно одредити различита својства молекула, као што су геометрија, електрична и магнетна својства, јонизациона енергија, вибрационе фреквенције итд. Електронска густина се може експериментално одредити дифракцијом X-зрака или дифракцијом електрона, и она се представља са само три променљиве ( $x,y,z$  осе у координатном систему) без обзира на димензије и број електрона у молекулу, за разлику од таласне функције која зависи од броја електрона и функција је  $4n$ -променљивих, где је  $n$  број електрона. Функција густине електрона има предност над таласном функцијом јер је мерљива (није апстрактна) и математички прорачуни су далеко бољи и јаснији<sup>65,66</sup>.

Један од циљева рачунарске хемије је пружање тачног описа електронске структуре, физичко-хемијских својстава молекула као и формирање рачунарског модела за генерисање потребних резултата. На рачунање знатно утичу величина молекула и методолошка ограничења. Да би се постигла већа тачност за рачунање је потребно више времена, па неки прорачуни могу трајати данима или недељама, чак и за системе средње величине. У зависности од избора функције, прорачуни се могу даље побољшати помоћу ефекта солватације, подешавањем основног (базис) сета и функционала, или применом додатне корекције за енергију нулте тачке итд. DFT метода има и својих недостатака<sup>66,67</sup> као што је грешка самоинтеракције<sup>68</sup>, грешке корелације средњег до дугог домета<sup>69</sup> и тенденција занемаривања ефеката дисперзионих сила<sup>70</sup>.

Густина електрона је повезана са таласном функцијом преко једначине:

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_{i=1}^n n |\Psi_i|^2 \quad (2.7)$$

DFT метода се заснива на две теореме Хенберга (енгл. *Hohenberg*) и Кона<sup>71</sup> као и на сету једначина које су извели Кон и Шам<sup>72</sup>. Кон и Шамове (KS) једначине представљају поједностаљене једначине засноване на Хенберг-Коновој теорему и могу се применити на стварним системима као и у стварним хемијским реакцијама. Кон и Шам су показали да се проблем проналажења праве електронске густине може решити увођењем сета

једноелектронских једначина.

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_i |\Psi_i(\mathbf{r})|^2 \quad (2.8)$$

$\Psi_i$  представља попуњене атомске/молекулске орбитале, назване Конове и Шамове орбитале. Кон и Шам предлажу да се тачна кинетичка енергија електрона неинтерагујућег система рачуна помоћу исте електронске густине као и реалног, интерагујућег, система, при чему се електрони који не интерагују крећу у пољу ефективног потенцијала осталих електрона.

$$E[\mathbf{r}] = T_{\text{Hartree}}[\mathbf{r}] + E_{\text{ext}}[\mathbf{r}] + E_{\text{Coul}}[\mathbf{r}] + E_{\text{XC}}[\mathbf{r}] \quad (2.9)$$

Једначина 2.9 се састоји од доприноса потенцијала који генеришу језгра (Hartree, Кулонов потенцијал), привлачења између електрона и језгра ( $E_{\text{ext}}$ ), електрон-електрон одбијање ( $E_{\text{Coul}}$ ), енергија електронске измене и корелације ( $E_{\text{xc}}$ ). Минимизацијом функционала енергије се добијају KS једначине:

$$\left[ -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V_{\text{eff}}(\mathbf{r}) \right] \Psi_i(\mathbf{r}) = \varepsilon_i \Psi_i(\mathbf{r}) \quad (2.10)$$

$$V_{\text{eff}}(\mathbf{r}) = V_{\text{ext}}(\mathbf{r}) + V_{\text{H}}(\mathbf{r}) + V_{\text{XC}}(\mathbf{r}) \quad (2.11)$$

$$n(\mathbf{r}) = \sum_i |\Psi_i(\mathbf{r})|^2 \quad (2.12)$$

$$V_{\text{xc}} = \frac{\delta E_{\text{xc}}}{\delta \rho(\mathbf{r})} \quad (2.13)$$

KS једначине се могу решавати итеративно помоћу методе самоусаглашеног поља јер ефективни потенцијал  $V_{\text{eff}}$  зависи од  $n(\mathbf{r})$ , односно  $\Psi(\mathbf{r})$ , које су решење једначина. Из израчунатих енергија и функција могуће је добити остале карактеристике основног стања као што су: укупна енергија основног стања, густина наелектрисања, вибрационе особине молекула итд.

#### 2.4.1 Апроксимативни функционали

Даљи развој DFT-а фокусиран је на испитивање перформанси постојећих функција која има за циљ побољшање дела измене/корелације  $E_{\text{xc}}$  у оквиру Кон-Шамове методе. На основу теоријских поставки на којима се заснивају, апроксимативни функционали се могу поделити на: апроксимацију локалне густине (LDA, енгл. *Local Density Approximation*), апроксимацију генерализованог градијента (GGA, енгл. *Generalized-Gradient Approximation*), мета-GGA хибридни функционал, хибридне функционале (енгл. *Hybrid Functional*) и двострукохибридне функционале.

LDA се најмање примењују у рачунској хемији.  $E_{\text{xc}}$  се рачуна под претпоставком да се систем локално понаша као униформни електронски гас, односно:

$$E_{\text{xc}} = \int \rho(\mathbf{r}) \varepsilon_{\text{xc}}^{\text{LDA}}(\rho(\mathbf{r})) \quad (2.14)$$

где је  $\varepsilon_{\text{xc}}^{\text{LDA}}(\rho)$  енергија измене-корелације једног електрона хомогеног гаса са густином  $\rho$ .

Другу класу функционала, који имају знатно већу примену у рачунарској хемији и дају боље резултате у односу на LDA функционале, чине функционали који се заснивају на

апроксимацији генерализованог градијента. У овој апроксимацији функционал измене-корелације зависи и од вредности електронских густина и од њеног градијента:

$$E_{xc} = \int \rho(\mathbf{r}) \varepsilon_{xc}^{GGA}(\rho(\mathbf{r}), \nabla \rho(\mathbf{r})) d\mathbf{r} \quad (2.15)$$

Израз  $\varepsilon_{xc}^{GGA}$  код GGA није јединствен, тако да постоје бројни функционали који се заснивају на апроксимацији генерализованог градијента. Примењују се при рачунању молекула у чврстом стању јер дају прецизне геометрије.

Мета-GGA функционали повећавају флексибилност додајући KS густину кинетичке енергије ( $\tau_{KS}$ ) електронској густини која се добија сумирањем градијената. Најпознатији и најчешће коришћени GGA функционали су PW91<sup>73</sup>, PBE<sup>74</sup> и BLYP<sup>75</sup>.

$$E_{xc} = \int \rho(\mathbf{r}) \varepsilon_{xc}^{GGA}(\rho(\mathbf{r}), \nabla \rho(\mathbf{r}), \nabla^2 \rho(\mathbf{r}), \tau_{KS}(\mathbf{r})) d\mathbf{r} \quad (2.16)$$

$$\tau_{KS}(\mathbf{r}) = -\frac{1}{2} \sum_i |\nabla_i(\mathbf{r})| \quad (2.17)$$

Због повећане флексибилности, мета-GGA функционали су тачнији приликом израчунавања својстава молекула у односу на GGA и LDA функционале.

Хибридни функционали користе Хартри-Фок (енгл. *Hartree-Fock*) измене и захтевају више времена за рачунање. Хартри-Фок измене дела енергије на KS орбиталама је увео Беке (енгл. *Becke*)<sup>76</sup> како би се побољшала термохемијска својства молекула. Хартри-Фок измене се приказују формулом:

$$E_{xc}[\rho] = \int_0^1 \left( \left\langle \sum_{i>j} r_{ij}^{-1} \right\rangle_{\lambda} - J[\rho^{\lambda}] \right) d\lambda = \int_0^1 U_{xc}^{\lambda} d\lambda \quad (2.18)$$

Вредност параметра  $\lambda = 0$  представља неинтерагујући KS систем, док  $\lambda = 1$  представља реалан систем. Хибридни функционали користе KS орбитале које се представљају основним функцијама Гаусовог (енгл. *Gauss*) типа. Поред Гаусове функције користи се и нумеричка базна функција која је у ствари табела вредности, које орбитална таласна функција има у много тачака око језгра. Најпознатији хибридни функционали су B3LYP<sup>77</sup>, TPSSh, PBE1PBE и M06<sup>77</sup>.

## 2.4.2 Основни сетови

Основни сетови<sup>65</sup> представљају скуп вектора који дефинишу простор у коме се посматра и решава неки проблем. Веома је важно одабрати прави основ у односу на жељену тачност јер ово доста утиче на дужину прорачуна. Са становишта молекулских орбитала то су математичке функције. Метода линеарне комбинације атомских орбитала (LCAO, енгл. *Linear Combination of Atomic Orbitals*) представља метод по коме се молекулске орбитале представљају као линеарна комбинација основних функција.

## 2.4.3 Молекулски дескриптори

Молекулски дескриптори представљају величину чије нумеричке вредности описују одређено физичко-хемијско својство. Постоји велики број молекулских дескриптора, а неки од њих су енергије НОМО и LUMO орбитале, разлика њихових енергија  $E_{gap}$ , термодинамички параметри молекула и др.

#### 2.4.4. Оптимизација геометрије

Оптимизација геометрије основног стања одређене молекулске структуре може се лако извести јер постоје добро развијени и пажљиво подешени алгоритми за проналажење минимума на површини потенцијалне енергије. Ови минимуми се карактеришу одсуством имагинарних (негативних) вибрационих фреквенција.<sup>78</sup> Геометрије оптимизоване DFT методом у већини случајева се добро слажу са експерименталним подацима,<sup>79</sup> иако тачност резултата зависи од почетне геометрије. У случајевима када постоји могућност оптимизације геометрије полазећи од кристалографских података, може се бити сигуран да је оптимизација дала врло тачну геометрију.

#### 2.4.5 Проучавање односа структуре и активности једињења

Истраживања која се односе на проучавање односа структуре и активности једињења (QSAR) започета су у XX веку од стране Ханша (енгл. *Hansch*) и Фуита (енгл. *Fujita*)<sup>80</sup>. Како би се добиле задовољавајуће корелације, веома је важан избор молекулских дескриптора који ће се користити у формирању модела. Највише коришћени физичко-хемијски параметри у QSAR анализи су Хаметова константа ( $\sigma$ ) за квантификацију електронских ефеката супституента, Тафтова константа ( $E_s$ ) као мера стерних својстава супституента, константе  $\log P$  и Ханш-Фуитова константа ( $\pi$ ) као мере липофилно-хидрофобних својстава супституента и молекула. Даљем развоју QSAR методе допринели су Фри (енгл. *Free*) и Вилсон (енгл. *Wilson*)<sup>81</sup> развојем модела који укључује утицај супституената на биолошку активност. Испитивањем биолошке активности једињења може се доћи до закључака који супституенти су одговорни за биолошко дејство молекула, а такође и проуче апсорпција, расподела, метаболизам, елиминација и токсичност (ADMET, енгл. *Adsorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity*) једињења који је кандидат за лек. Данас постоје базе података ADMET својстава лекова које се могу претражити. Комбиновањем информација из базе података могу се унапредити истраживања у дизајну нових лекова. Поред класичног QSAR модела, све више за *in vitro* и *in vivo* студије у фармацеутској индустрији примењује и модел преклопљених парова молекула (ММРА, енгл. *Matched Molecular Pairs Analysis*) који се заснива на замени једне групе у молекулу другом<sup>82</sup>.

У новије време развијен је 3D QSAR модел који за рачунање узима у обзир својства целог молекула а не само његових делова. До сада је развијено много 3D QSAR модела, а највише применљив је модел компаративне анализе молекулских поља (CoMFA, енгл. *Comparative Molecular Field Analysis*)<sup>83</sup>. Ова анализа се примењује на једињења која су сврстана на основу одређених критеријума у конфигурацијском простору. Одабир овог простора може да буде кључни проблем за успешну CoMFA анализу. Још један од проблема који могу да се јаве приликом примене CoMFA анализе је низак однос шума и сигнала када се користи за квантитативну корелацију дескриптора изведених из молекулских поља и биолошке активности испитиваних једињења. Уколико су познате структуре биолошких мета као на пример ензима тада се користе методе које обухватају докинг (рачунарско уклапање) молекула у везивно место биолошке мете или се врши сврставање у односу на молекул (лиганд). Када структурни подаци нису доступни молекули се међусобно сврставају на основу могућих доступних информација као што је на пример сличност између молекулских фрагмената.

### 2.5. БИОЛОШКА АКТИВНОСТ

#### 2.5.1. Антиоксидативна активност

Познато је да слободни радикали представљају изузетно реактивне хемијске врсте који се формирају у људском организму чак и при нормалним физиолошким процесима. Слободни

радикали се неутралишу у природним ћелијским процесима или уношењем хране. Међутим, уколико сам организам не успе да се одбрани од штетног дејства ових реактивних врста може доћи до оксидативног стреса<sup>84</sup>. Проналажење нових антиоксиданата представља изазов савремене медицине. Хемијска реактивност слободних радикала потиче од њихове тежње за спаривањем неспарених електрона на последњем енергетском нивоу атома. У већини случајева овај процес је праћен нарушавањем стабилности других молекула а понекад и покретањем ланчаних реакција које се не могу контролисати<sup>84</sup> и које доводе до изbacивања организма из равнотеже, појаве различитих болести, како акутних тако и хроничних. Највећа штетност се огледа у томе што слободни радикали при нападу на ћелије оштећују њихов генетски материјал<sup>85</sup> и узрокују болести као што су: запаљењски процеси (реуматоидни артритис, васкулитис), неуролошки поремећаји (Алцхајмерова болест, Паркинсонова болест, цереброваскуларна оштећења, мишићна дистрофија), кардиоваскуларни поремећаји (хипертензија и болест срца, атеросклероза), фиброза плућа, катаракта и малигне болести. У зависности од елемената који улазе у њихов састав извршена је основна подела радикала на:

Реактивне кисеоничне врсте, (ROS, енгл. *Reactive Oxygen Species*) које чине кисеонични радикали (супероксидни анјон ( $O_2^{\cdot-}$ ), хидроксидни радикал ( $HO^{\cdot}$ ) хидропероксидни радикал ( $HO_2^{\cdot}$ ), пероксил радикал ( $RO_2^{\cdot}$ ), алкоксил радикал ( $RO^{\cdot}$ ), азот(II)-оксид радикал ( $NO^{\cdot}$ ), азот(IV)-оксид радикал ( $NO_2^{\cdot}$ )) али и нерадикалска једињења (водоник-пероксид ( $H_2O_2$ ), хипохлораста киселина ( $HOCl$ ) као и молекул озона ( $O_3$ ) итд.) која се могу лако конвертовати у радикале помоћу оксидујућих агенаса.

Реактивне азотне врсте (RNS, енгл. *Reactive Nitrogen Species*) обухватају различите врсте једињења са различитим особинама. Једини критеријум за припадање овој групи радикала представља то да су добијени од азот(II)-оксида. Најпознатији RNS радикал (перокси-нитрит,  $ONOO^{\cdot}$ ) настаје реакцијом  $NO^{\cdot}$  радикала са супероксидом  $O_2^{\cdot-}$  и доводи до оксидације, настанка нитрозо једињења или нитровања<sup>86</sup>.

Реактивне сумпорне врсте (RSS, енгл. *Reactive Sulfur Species*) се врло лако формирају у реакцији ROS са тиолима.<sup>87</sup> Најзаступљенија врста ROS-а је супероксидни радикал који настаје у процесу дисања у митохондријама при преношењу електрона са супстрата на кисеоник. Други веома важан радикал је хидроксил радикал чији је настанак у биолошким системима проузрокован јонским зрачењем које узрокује распадање молекула воде или фотолитичким разлагањем алкил хидропероксида<sup>85</sup>.

Антиоксиданти у биолошким системима служе за неутрализацију слободних радикала тако што стабилизују равнотежу неспарених електрона и неутралишу потенцијално штетно деловање слободних радикала, при чему остају стабилније радикалске/радикал катјонске врсте антиоксиданата. Њихова основна антирадикалска активност се огледа у отпуштању електрона и њиховом преласку на радикалску врсту.<sup>85</sup> Могу да делују као инхибитори оксидативних реакција у којима учествују слободни радикали, прекидањем ланчаних реакција ауто-оксидације супстрата, преко синергије са другим антиоксидантима, као хелатори металних јона и/или преводећи редокс активне про-оксиданте (деривати гвожђа и бабра) у стабилне продукте, као инхибитори про-оксидативних ензима (нпр. липооксигеназе)<sup>87</sup>. Уколико је у организму низак ниво антиоксиданата или низак ниво антиоксидативних ензима, долази до оксидативног стреса који може оштетити ћелије. Ово се доводи у везу са старењем, као и многим патолошким стањима попут артеросклерозе, дијабетеса и канцера<sup>88</sup>.

На основу начина деловања антиоксиданти се примарно деле на ензимске и неензимске. Најзначајнији ензимски антиоксиданти су супероксид-дисмутаза, глутатион пероксидаза, каталаза и ацетилхолинестераза. Ова група ензима, између осталих, катализује реакције преводјења супероксидног радикала преко водоник-пероксида до воде. У неензимске антиоксиданте убрајају се аскорбинска киселина (витамин Ц), витамин Е, глутатион, каротеноиди, полифеноли и други<sup>85</sup>. У оквиру ове групе антиоксиданата извршена је подела по пореклу на природне и синтетске. Иако се стално намеће питање сигурности синтетских антиоксиданата по здравље човека у односу на природне, да би се повећала њихова делотворност врши се модификација структуре природних антиоксиданата при чему се



добијају активнија једињења. Најчешће се додају храни да би продужили њен век трајања, а њихова главна улога је спречавање оксидације масних киселина у храни<sup>85</sup>.

Многи фактори могу да утичу на антиоксидативну активност различитих синтетских једињења. Присуство електрон донорских и електрон акцепторских група у *ortho*-, *meta*- или *para*- положајима ароматичног/хетероароматичног прстена, присуство хетероатома (сумпор, кисеоник и азот), као и број група у структури молекула и природа растварача доприносе значајно антиоксидативној активности. У ранијим истраживањима описано је антиоксидативно дејство хетероцикличних Шифових база, у којима је хидроксилна група као електрон донорска повећала њихову активност<sup>89</sup>. Такође, пирол и тиофен супституисане хетероцикличне Шифове базе су показале као високо нетоксични антиоксиданти<sup>89</sup>. Деривати *bis*(имино) пиридина представљају нарочито разноврсну класу једињења са антиоксидативним деловањем<sup>36</sup>. Међу великим бројем синтетисаних једињења ове групе, једињења са хидроксилном групом у *para*- положају су показала јачи антиоксидативни потенцијал од једињења са *ortho*- и *meta*- супституисаним хидроксилним групама<sup>36</sup>. Након испитивања антиоксидативне активности серије супституисаних ароматичних хидразона тиокарбохидразида показано је да ова једињења у антирадикалском DPPH тесту показују одличну активност<sup>11</sup>. Такође, доказано је да присуство језгра фурана као електрон донорске групе у структури тиокарбохидразида значајно повећава антиоксидативну активност<sup>90</sup>. Поред електронске природе супституената антиоксидативни потенцијал деривата пиридина је повезан и са механизмом њиховог деловања. За разјашњавање механизма деловања користи се комбинација експерименталног и теоријског приступа. С тим у вези многе спроведене студије показале су да деривати пиридина у зависности од електронске структуре супституената могу испољавати антиоксидативну активност различитим механизмима<sup>36,91</sup>.

### 2.5.1.1. Одређивање антиоксидативног механизма

Знање о механизму деловања антиоксиданата је предуслов за дизајн биолошки активнијих једињења<sup>92</sup>. Хватање слободних радикала је један од најзначајнијих механизма антиоксидативне активности једињења. Реактивни слободни радикали прихватају атоме водоника из антиоксиданта кроз три механизма: пренос атома водоника (НАТ, енгл. *Hydrogen Atom Transfer*), пренос електрона праћен преносом протона (SET-PT, енгл. *Single Electron Transfer followed by Proton Transfer*) и секвенцијални пренос електрона са губитком протона (SPLET, енгл. *Sequential Proton Loss Electron Transfer*). Инхибиција Фентонове реакције кроз хелирање Fe<sup>2+</sup> јона још је један важан антиоксидативни механизам<sup>93</sup>.

У НАТ механизму, атом водоника (који се може посматрати као протон који садржи и један електрон) се преноси са антиоксиданта (Mol-H) на слободни радикал:



НАТ механизам се може квантификовати кроз енталпију дисоцијације везе (BDE, енгл. *Bond Dissociation Enthalpy*)

$$\text{BDE} = H(\text{Mol}^{\cdot}) + H(\text{H}^{\cdot}) - H(\text{Mol-H}) \quad (2.20)$$

Стабилизација насталог радикала (Mol<sup>·</sup>) кроз електронске и резонанционе ефекте смањује BDE вредности и доприноси повећаној антиоксидативној активности молекула.

SET-PT механизам инициран је преносом електрона (ЕТ, енгл. *Electron Transfer*) са антиоксиданта на слободни радикал, праћен депротоновањем насталог радикал катјона:



Први корак овог механизма, SET-PT, одређује укупну термодинамику овог процеса и може бити квантификован преко јонизационог потенцијала (IP, енгл. *Ionization Potential*).

$$IP = H(\text{Mol-H}^+) + H(e^-) - H(\text{Mol-H}) \quad (2.23)$$

Што је већа стабилност радикал катјона, ниже су вредности IP и SET-PT је фаворизованији процес. Други корак, корак преноса протона, карактерише енталпија дисоцијације протона (PDE, енгл. *Proton Dissociation Enthalpy*)

$$PDE = H(\text{Mol}^{\cdot}) + H(\text{H}^+) - H(\text{Mol-H}^+) \quad (2.24)$$

SPLET механизам започиње депротоновањем групе одговорне за антиоксидативну активност, након чега следи ЕТ из анјона:



Први корак овог механизма карактерише се афинитетом према протону (РА, енгл. *Proton Affinity*).

$$PA = H(\text{Mol}^-) + H(\text{H}^+) - H(\text{Mol-H}) \quad (2.27)$$

ЕТ корак овог процеса је квантификован енталпијом преноса електрона (ЕТЕ, енгл. *Electron Transfer Enthalpy*)

$$ETE = H(\text{Mol}^{\cdot}) + H(e^-) - H(\text{Mol}^-) \quad (2.28)$$

У једначинама 2.19-2.28 енталпије ( $H$ ) молекула, радикала,  $H$  атома, радикал катјона, анјона, протона и електрона означене су као  $\text{Mol-H}$ ,  $\text{Mol}^{\cdot}$ ,  $H^{\cdot}$ ,  $\text{Mol-H}^+$ ,  $\text{Mol}^-$ ,  $H^+$ , и  $e^-$ , редом.

Треба напоменути да је укупан резултат сва три процеса исти, пренос атома  $H$  из антиоксиданта у слободан радикал. SET-PT и SPLET механизми укључују наелектрисане интермедијере који су боље стабилизовани у поларним растварачима, стога су енергетски повољнији механизми за уклањање радикала у поларним срединама.

### 2.5.1.2. Методе одређивања антиоксидативне активности

Методе за одређивање антиоксидативне активности које се најчешће користе заснивају се претежно на колориметријским мерењима, док се механизам деловања заснива на капацитетима неутралисања различитих врста слободних радикала. Време одигравања реакције разликује се од методе до методе, при чему се по потреби уводе модификације у зависности од типа и комплексности узорка за анализу антиоксидативног потенцијала<sup>87</sup>. *In vitro* методе које се највише користе су слободно радикалске методе: DPPH, ABTS и реактивни антиоксидативни капацитет кисеоника (ORAC, енгл. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) и редукционе методе: CUPRAC, редукција антиоксидативног капацитета јоном гвожђа (FRAP, енгл. *Ferric Reduction Antioxidant Power*) и укупни антиоксидативни капацитет (TAC, енгл. *Total Antioxidant Capacity*). У овој дисертацији, за мерење антиоксидативног капацитета испитиваних једињења коришћене су неензимске DPPH, ABTS, CUPRAC и TAC методе, и ензимска метода инхибиције ензима ацетилхолинестеразе.

DPPH метода за одређивање антиоксидативне активности омогућава мерење способности чистих супстанци или екстраката природних производа да неутралишу неспарени електрон на атому водоника ( $\text{DPPH}^{\cdot}$ ) формирањем мање реактивних врста.  $\text{DPPH}^{\cdot}$  је комерцијално доступан, дугоживећи органски азотни радикал тамнољубичасте боје. Када се испитивани антиоксидант помеша са раствором  $\text{DPPH}^{\cdot}$  радикала, прихватањем протона од

испитиваног антиоксиданта боја љубичастог раствора DPPH<sup>\*</sup> радикала се мења у жуту боју. Ова промена се прати спектрофотометријски као смањење максимума апсорпције на таласној дужини од 517 nm, које је пропорционално антиоксидативном капацитету испитиване супстанце. Квантитативна мера антиоксидативне активности која проистиче као резултат из DPPH методе јесте инхибиторна концентрација изражена у % или IC<sub>50</sub> вредност у mM<sup>94</sup>. DPPH<sup>\*</sup> радикал је осетљив на светлост и раствара се у органским растварачима, што ограничава употребу реагенса за одређивање антиоксидативне активности хидрофилних антиоксиданата.

ABTS метода се базира на оксидацији радикал катјона (ABTS<sup>•+</sup>) калијум персулфатом. Након стајања 12-16 сати у мраку формира се комплекс-хромофора плаво-зелене боје који показује максимум апсорпције на 734 nm. Формирани ABTS<sup>•+</sup> радикал у интеракцији са испитиваним антиоксидантом прихвата протон и/или електрон са антиоксиданта, при чему долази до промене боје раствора из плаво-зелене у безбојну, што за последицу има смањену апсорбанцу. Као и код DPPH, ово смањење је пропорционално антиоксидативном капацитету испитиваног антиоксиданта и одређује се као инхибиторна концентрација изражена у % или IC<sub>50</sub> вредност изражена у mM<sup>94</sup>.

CUPRAC метода заснива се на употреби бакар(II) јона који са 2,9-диметил-1,10-фенантролином (неокупроин, NC, енгл. *Neocuproine*) гради безбојан комплекс бакар(II) неокупроин (Cu (II)-Nc) катјона, који представља оксидациони реагенс. Комплекс Cu(II)-Nc у реакцији оксидо-редукције са испитиваним једињењима редукује се до бакар(I) неокупроина (Cu (I)-Nc), који показује апсорпциони максимум на 450 nm. Реакција се изводи на pH 7. Као резултат долази до промене боје из светло плаве (Cu(II)-Nc катјон) у наранџасто-жуту (Cu(I)-Nc катјон). У овој методи, повећана апсорбанција реакционих смеша указује на повећање антиоксидативне активности<sup>95</sup>.

TAC метода је спектроскопска метода за квантитативно одређивање антиоксидативног капацитета. Анализа се заснива на редукцији Mo(VI) до Mo(V) и накнадним формирањем зеленог фосфомолибденског комплекса у киселој средини<sup>96</sup>.

## 2.5.2. Антимикробна активност

Хетероциклична једињења са атомима азота веома су значајна у медицинској хемији и користе се као основа за дизајн различитих лекова<sup>97,98</sup>. Велики број бактеријских сојева постао је резистентан на познате антибиотике што, последњих неколико деценија, представља велики проблем. Да би се превазишли ови проблеми научници покушавају да код постојећих антибиотика изврше промене у молекулској структури и на тај начин повећају антимикробно дејство. Бактеријске ћелије имају веома специфичну грађу, и молекули могу на неколико начина да испољавају антимикробну активност. Најактивнији агенси делују на изградњу бактеријског ћелијског зида, синтезу протеина или репликацију дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК) молекула као и на транскрипцију молекула ДНК<sup>97</sup>. Параметри на основу којих се одређује осетљивост бактерија и гљивица на одговарајуће антимикробне агенсе су: минимална инхибиторна концентрација (МИС, енгл. *Minimal Inhibitory Concentration*) и минимална бактерицидна концентрација (МВС, енгл. *Minimal Bactericidal Concentration*).

МИС представља најмању концентрацију антимикробног агенса која инхибира видљиви раст микроорганизама, док је МВС најмања концентрација која спречава раст  $\geq 99,9\%$  микроорганизама након субкултивације иницијалне инфективне дозе у медијуму без испитиваног агенса. Антимикробна активност једињења може бити процењивана и на основу пречника зоне инхибиције уколико се испитивање врши дифузионим методама. Уколико је бујон након испитивања замућен, дејство супстанце је микробиостатско, а ако је бујон бистар супстанца има микробиоцидно дејство.

Зависност структуре и антимикробне активности једињења из серије имино деривата пиридина указује на велику заступљеност ових једињења у многим антимикробним агенсима. Као и код антиоксидативне активности присуство електрон донорских и/или електрон акцепторских група и хетероатома у структури показује значајан утицај на антимикробну

активност као и присуство сумпора и азота у структури молекула. Структурно слична једињења симетричних *bis*-деривата пиридина и посебно њихових комплекса са јонима прелазних метала често су проучавана као антимикуробни агенси<sup>3,19</sup>. Ел-Халим (енгл. *El-Halim*) и сарадници су показали да једињења са електрон донорским групама на арилном делу симетричних *bis*-деривата пиридина имају умерену антимикуробну активност, док је комплексирање са металима значајно побољшало активност ових једињења<sup>19</sup>. Претпоставља се да једињења која садрже сумпор инхибирају синтезу ензима, тако што врше деактивацију супстанци есенцијалних за ензимску активност. На разградњу липидног слоја ћелијског зида бактерије утиче присуство атома сумпора и азота у структури активних једињења и на тај начин долази до везивања активног једињења са есенцијалним групама специфичних ћелијских ензима, што доводи до смрти ћелије<sup>99</sup>. Према Бахи (енгл. *Bacchi*) и сарадницима, *bis*(пиридинил) алкилидени дихидразида тиоугљене киселине показују значајну антимикуробну активност према бактеријама *Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus*<sup>2</sup>, док су Ши (енгл. *Shi*) и сарадници указали да деривати хенодезоксихолне киселине испољавају антимикуробно дејство према бактеријским сојевима *Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus* упоредиво са амоксицилином<sup>100</sup>. Такође, позната је активност једињења сличних дитиокадрбохидразида према *Mycobacterium bovis*, чије дејство може да се пореди са триацетазоном, комерцијалним леком за туберкулозу<sup>101,102</sup>. Недавне експерименталне и структурне (QSAR) студије активности деривата пиридина са тиосемикарбазонском јединицом у молекулу су показале да положај атома азота у пиридинском прстену утиче на антимикуробну активност ове врсте једињења. У овој студији сви синтетисани деривати хидразона дихидразида тиоугљене киселине који су испољили добру антимикуробну активност у својој структури имали су 2-пиридил супституент<sup>4</sup>.

### 2.5.2.1 Методе одређивања антимикуробне активности

Да би се одредила антимикуробна активност користе се стандардизоване квалитативне и квантитативне методе: дифузионе<sup>98</sup>, дилуционе<sup>103</sup> и комбиноване<sup>104</sup>, као и високоосетљиви аутоматизовани системи (нпр. VITEK 2 систем) који се базирају на реакцијама микроорганизама са супстратима за биохемијску детекцију њихових карактеристика уз одређивање кинетике раста микроорганизама која се врши мерењем флуоресценције у кратким интервалима током инкубације са специфичним реагенсима<sup>105</sup>.

Дифузионим методама је могуће испитати осетљивост бактерија према одређеној супстанци, али је метода квалитативна. За разлику од дифузионих, дилуционе методе су и квантитативне, јер је њима могуће утврдити МИС вредности испитиваних узорака.

### 2.5.3 Антиканцер активност

#### 2.5.3.1 Карактеристике ћелијских култура коришћених током испитивања

Током овог истраживања биолошка активност испитиваних једињења иницијално је тестирана на четири комерцијалне ћелијске линије које су изоловане од пацијената са различитим типовима малигнитета: хуманом немикроцелуларном аденокарциному плућа (A549), хуманом аденокарциному дојке (Mcf7), хуманом аденокарциному дебелог црева (LoVo), и хуманом аденокарциному јајника (Skov3). Потенцијална токсичност утврђена је на здравој култури хуманих кератиноцита епидермиса коже (HaCaT). Свих пет ћелијских култура су порекла средње до високо диференцираних епитела, и у лабораторијским условима имају заједничку карактеристику да се лепе за подлогу суда у коме се узгајају, односно у коме се третирају. Осим карактеристике да се лепе за подлогу, исте имају и својство да се међусобно организују у једном слоју на површини суда, формирајући такозвани једноћелијски слој (енгл. *monolayer*). LoVo ћелије се делимично издвајају од осталих овде наведених јер се осим у формираном једноћелијском слоју мањи проценат њих налази у суспензији.

Ове малигне културе, осим што су порекла епитела различитих ткива, свака од њих потиче од друге индивидуе (садрже сет различитих генотипова), сваки од тумора из којих су изоловане настао је услед другачијих мутација (односно носилац је различитих биомолекуларних дисфункционалности у односу на здрава ткива). Такође, свака од њих има различиту дужину митотског циклуса (доублинг тиме, време потребно да се иницијални број ћелија дуплира), што само по себи није непосредно повезано са њиховим малигним потенцијалом. Најкраћи митотски циклус од 20 сати имају А549 ћелије<sup>106</sup>, док време потребно за умножавање Мсf7, Skov3и LoVo ћелија износи 24, 36 и 37 сати<sup>107-109</sup>.

### **2.5.3.2 Принципи примене виталних боја за одређивање броја живих ћелија**

Током овог истраживања коришћено је неколико метода за дискриминацију живих ћелија у посматраној популацији. Дискриминација се постиже применом такозваних виталних боја, које из различитих разлога специфично боје или виталне ћелије, или ћелије у неком од облика ћелијске смрти. Сва бојења примењују се само на ћелијама које нису претходно фиксиране, односно на ћелијама којима селективна пропустљивост мембране није измењена (повећана) неким хемијским фактором (на пример 70 % алкохол, тритон X100, и други)

### **2.5.3.3. Трипан плаво**

Трипан плаво (енгл. *Trypanblue*) је диазо боја, чији негативно наелектрисан молекул не може да уђе у ћелију којој плазма мембрану која није оштећена.<sup>110</sup> Ћелије са оштећеном мембраном (ћелије у некрози) се под микроскопом виде као интензивно плаво пребојене. Трипан плаво неће обојити ћелије у апоптози, независно да ли је у питању апоптозна смрт у раној или напредним фазама, јер је интегритет плазма мембране у апоптозним ћелијама потпуно очуван. Из тих разлога се ћелије у напредним фазама апоптозе могу разазнати под микроскопом једино на основу њихове специфичне морфологије, док оне у раној фази апоптозне смрти није могуће дискриминисати у односу на виталне ћелије.

### **2.5.3.4. Калцеин АМ**

Калцеин АМ (САМ, енгл. *Calcein acetoxymethyl*) је боја која веома лако улази у ћелије. У својој изворној структури САМ не флуоресцира, али након ензимске трансформације унутар ћелије емитује флуоресцију у зеленом спектру (ексцитација/емисија 322/435 nm). Ензимска трансформација подразумева одвајање липофилних блокирајућих група неспецифичним естеразама у цитоплазми<sup>111</sup>. Ћелије у којима су естеразе активне биће пребојене са САМ, што подразумева живе ћелије, ћелије у раној фази апоптозе, и ћелије у раној фази некрозе. Са друге стране, пропидијум јодид (PI, енгл. *Propidium iodide*) је катјонска боја, за коју се дуго сматрало да, попут трипан плавог, не може да уђе у ћелију са функционалном плазма мембраном.

### **2.5.3.5 Пропидијум јодид**

Попут САМ, пропидијум јодид (PI) веома слабо флуоресцира, али се по везивању за нуклеинске киселине, нарочито интеркалацијом у двоструки хеликс дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК), његова флуоресценца појачава више од 30 пута<sup>97</sup>. Максимална ексцитациона и емисиона таласна дужина за PI је 535 nm и 617 nm. Недавно је доказано да PI ипак може да уђе у виталне ћелије процесом ендоцитозе, при чему се формирају грануле (везикуле) лоциране уз унутрашњу страну плазма мембране<sup>112</sup>. У овим везикулама PI је измештен и спречен да интерагује са нуклеинским киселинама, и обзиром да у таквој форми има веома слабу флуоресценцу, остаје недетектован.

Истовремено бојење са САМ и PI омогућује визуелну дискриминацију апоптозне и некротичне смрти у посматраним узорцима. Ћелије које умиру некрозом се због оштећеног

интегритета ћелијске мембране маркирају са обе флуоресцентне боје и добијају црвено-жут одсјај нејасних ивица. За разлику од њих, виталне ћелије и ћелије у раној апоптози се боје само са САМ и флуоресцирају интензивно зелено, а апоптозна тела ћелија у напредним фазама апоптозне смрти пребојавају се само са PI и у видном пољу се уочавају као јасно ограничена сфероидна тела интензивно црвене боје<sup>113</sup>.

### 2.5.3.6 Анексин V

Анексин V (енгл. *Annexin V*) је по структури фосфолипид који се са високим афинитетом везује за фосфатидил-серин. Фосфатидил-серин се у виталним ћелијама налази на унутрашњој страни мембране, али се са уласком ћелије у апоптозу он релоцира на њену спољашњу страну и дату ћелију чини „видљивом“ за макрофаге. Овакав след догађаја омогућава да се ћелија која је донела „самоубилачку“ одлуку и ушла у процес апоптозне смрти у ткиву живог организма елиминише од стране имуног система без изазивања последица по околне ћелије. Бојење испитиваног узорка са анексином V и PI омогућава јасну дискриминацију између живих ћелија (необојене) и оних које су у раној фази апоптозе (маркиране само анексином V) или у раној фази некрозе (маркиране само са PI)<sup>114</sup>. Ћелије које су се обојиле са оба флуоресцентна маркера налазе се у каснијим фазама ћелијске смрти, при чему се дискриминација између позне апоптозе и некрозе може постићи накнадно утврђивањем присуства ћелија у sub-G1 зони.

### 2.5.3.7 Основне разлике између типова ћелијске смрти

Ћелије сисара које су изложене непоправљивим оштећењима у својој микросредини, или пак унутар сопствене структуре, могу да активирају један од многобројних каскадних путева који ће недвосмислено водити до њихове смрти.<sup>115</sup> След догађаја у којем се ћелија уништава иницијалним сигналом који се потом пропагира међусобно добро координисаним молекуларним механизмима назива се контролисана ћелијска смрт (RCD, енгл. *Regulated Cell Death*). За разлику од RCD, постоји акцидентална ћелијска смрт (ACD, енгл. *Accidental Cell Death*), која настаје услед тешког оштећења интегритета ћелије проузрокованог физичким, хемијским или механичким стимулансима. Док је одвијање ACD потпуно неконтролисано, RCD може до неког степена бити модулисана, и то не само инхибицијом преношења сигнала који воде окончању процеса, већ и повећањем адаптивног капацитета ћелије за одговор на стрес. Док је некроза исход сваке ACD, независно од њеног узрока, RCD се дели у три основне групе: (1) апоптоза; (2) аутофагија; (3) некроза, односно ћелијска смрт услед измењене премеабилности митохондрија (MPT, енгл. *Mitochondrial Permeability Transition -driven necrosis*) - MPT некроза.

Некроза, независно да ли је настала као ACD или RCD, јесте облик ћелијске смрти, подразумева губитак интегритета ћелијске мембране са последичним неконтролисаним ослобађањем унутарћелијског садржаја. У живом организму некроза може имати различите последице зависно од тога у ком ткиву/органу ћелије умиру некротичном смрћу, као и од тога да ли се ради само о малом, добро локализованом огњишту или је у питању процес који доводи до масовног ослобађања унутарћелијског садржаја у системску циркулацију. Стога у случају малог локализованог огњишта, некроза може да доведе само до оштећења околног ткива са последичним формирањем ожилка, док у случајевима када је некроза великог обима долази до озбиљног оштећења удаљених органа, на првом месту до акутног отказивања бубрежне функције<sup>116</sup>. Апоптоза је пак облик ћелијске смрти при коме се ћелија организовано дезинтегрише формирајући такозвана апоптозна тела. Апоптозна тела у организму одстрањују беле крвне ћелије процесом фагоцитозе, тако да апоптозна ћелијска смрт не доводи до локалних нити системских последица. Ћелије здравих ткива увек умиру апоптозом изузев ако су озбиљно оштећења физичким или хемијским факторима. Лекови који се користе у терапији малигних обољења стимулишу апоптозну смрт када се примене на ћелијама у лабораторијским

условима, док исти лекови на нивоу малигног ткива доводе углавном до некрозе. Овако различит ефекат условљен је првенствено нижим парцијалним притиском кисеоника у туморској маси у поређењу са условима у којима се налазе ћелије у култури, тако да ћелије у туморској маси стварају енергију мање ефикасним процесом гликолизе уместо оксидативном фосфорилацијом. Из ових разлога, малигне ћелије у склопу ткивне масе нису у могућности да спроведу апоптозу до краја обзиром да је она енергетски зависан процес. Након што је примењени терапеутик иницирао апоптозну смрт, већина ћелија ће у напреднијим фазама апоптозе принудно завршити у некрози. Из ових разлога се током преклиничких тестирања за даља испитивања бирају искључиво једињења која у култури изазивају апоптозу у доминантном проценту.

#### **2.5.3.8 Одређивање заступљености ћелија по фазама митотске деобе**

Деоба ћелија, и еукариотских и прокариотских организама, јесте високо организован и контролисан процес којим се омогућава дуплирање генетичког материјала и потоња деоба мајке ћелије на две ћерке ћелије. Контрола овог процеса укључује регулацију сигнала раста ћелије као и очување генетичког интегритета ради спречавања настанка оштећења наследног материјала у ћеркама ћелијама<sup>117</sup>. Ћелија током деобе пролази кроз четири фазе ћелијског циклуса: G0/G1, S, G2 и M. Свака од ових фаза је контролисана од стране комплекса циклинских протеина и циклин-зависних киназа. Културе малигнућ ћелија спадају у такозване имортализоване моделе, односно популације са готово неограниченом способношћу за деобу.

Анализа распореда третираних ћелија током митотског циклуса може да пружи информацију у којој фази ћелијске деобе се заустављају третиране ћелије, односно да укаже у којој фази деобе процес таргетиран од стране тестираног једињења има виталну улогу. Уколико су ћелије акумулиране у G2/M фази уз истовремено изразито смањен проценат у S и G0/G1 фазама, постоји јасна индиција да испитивано једињење интерферира неки од процеса у завршној фази у којој се формира деобно вретено и раздвајају хромозоми. Акумулација ћелија у S фази указује да једињење највероватније омета процес деобе хромозома, док је њихово накупљање у G0/G1 фази најмање информативно у контексту потенцијалне интрацелуларне мете. Додатно, у склопу митотске деобе постоје две главне контролне тачке на којима се јасно прецизираним интрацелуларним механизмима контролише интегритет ћелије пре него она настави деобу<sup>117</sup>. Прва контролна тачка је на крају G1 фазе и пред улазак ћелија у S фазу (енгл. *G1-to-S check point*), а друга је на крају S фазе пред улазак ћелије у финалну фазу деобе (енгл. *S-to-G2 check point*). У ћелији постоје различите мреже повратне спреге које међусобно размењују информације о функционалном статусу сваког сегмента који игра одређену улогу у процесу митотске деобе и ћелијске хомеостазе. У случају да је на пример дошло до озбиљног оштећења ДНК, или је од стране спољног агенса супримирана активност неког од ензима са важном улогом у репликацији хромозомског материјала, механизми повратне спреге ће се активирати и ћелија ће у нивоу G1-to-S контролне тачке бити спречена да настави деобу. Ћелије ће на овој контролној тачки бити задржане онолико дуго колико ће механизмима репарације бити потребно да поправе настало оштећење, а уколико поправка оштећења није могућа, ћелија ће бити уведена у апоптозу. Овакав сценарио ће се осликати као повећање процента ћелија у G0/G1 и S фази са изразитим смањењем процента ћелија у G2/M фази. Уколико је спољни агенс изазвао оштећење које контролни механизми нису могли да препознају пре него је ћелија ушла у деобу, доћи ће до акумулације ћелија током S фазе, са значајно мањим процентом ћелија у G0/G1 и G2/M фазама у односу на нетретирану контролу. У оквиру S-to-G2 контролне тачке задржавају се ћелије које су успеле да прођу кроз фазу деобе хромозома, али су при томе настала оштећења која је неопходно репарирати да би ћелија могла да се подели на две потпуно функционалне ћерке ћелије. Као и у случају G1-to-S контролне тачке, уколико настала оштећења ћелија није у могућности да поправи, ћелија ће ући у апоптозну смрт.

Механизми контроле и репарације беспрекорно функционишу само у здравим ћелијама, док у малигно трансформисаним неки од њих постају неефикасни<sup>118</sup>. Лекови са добро дефинисаним механизмом дејства, попут цисплатине, у различитим малигним ћелијским линијама изазивају другачије застоје по фазама митотске деобе због тога што је свака од њих јединствена по питању губитка функције неких од контролних механизма. Из тих разлога, распоред малигних ћелија по фазама деобе требало би преваходно тумачити као илустрацију о реакцији посматраних ћелија на испитивано једињење, него ли је користити као поуздану информацију о његовом потенцијалном механизму дејства Sub G0/G<sup>119</sup>.

#### **2.5.3.9 Утврђивање активације каспазних путева испитиваним једињењима**

Апоптоза може бити иницирана на велики број различитих начина, али је од момента њене иницијације остатак процеса високо организован и заснива се на пропагацији сигнала добро установљеним низом интеракција (каскадом).<sup>120</sup> Највећу улогу у пропагацији имају каспазни путеви, који су подељени у две основне групе: спољашњи и унутрашњи.<sup>121,122</sup> Сваки од ова два каспадна пута има одређени начин иницијације, али су обома митохондрије крајња одредница. Први корак у каскади спољашњег каспазног пута јесте активација каспазе 8, а окидачи могу бити стимулација рецептора у ћелијској мембрани од стране различитих цитокина, или поремећај активности ендоплазматског ретикулума. Каскада унутрашњег каспазног пута започиње активацијом каспазе 9 услед значајно оштећене биоенергетске или структурне хомеостазе ћелије. Такође, унутрашњи и спољашњи пут могу да се активирају узајамно. По структури, каспазе припадају фамилији ендопротеаза, и у ћелији се синтетишу као неактивно мономерни молекули. За њихову активацију неопходно је повезивање (димеризација) са још једним идентичним молекулом (хомодимеризација), што за последицу има одстрањивање дела њиховог протеинског ланца и ослобађање активног места за интеракцију са субстратом.

#### **2.5.3.10. Одређивање способности испитиваних једињења да иницирају генерисање супероксидних радикала у митохондријама**

Механизам дејства великог броја лекова у терапији карцинома заснива се на стимулацији генерисања слободних кисеоничних радикала (ROS) и последичном оштећењу хромозома малигних ћелија<sup>123,124</sup>. Митохондрије су главни извор ROS у ћелији, при чему је супероксидни анјон ( $O_2^{\cdot-}$ ) први у низу насталих ROS продуката<sup>125,126</sup>. Митохондријална супероксид дисмутаза (MnSOD, SOD1, енгл. *Mitochondrial Superoxide Dismutase*) је прва линија одбране ћелије од последица повећане продукције  $O_2^{\cdot-}$ , и задужена је за његову брзу конверзију у мање агресивни водоник пероксид. Улога MnSOD је утолико значајнија што конверзијом  $O_2^{\cdot-}$  у пероксид, који потом дифундује у цитоплазму, непосредно штити интегритет оксидативног ланца и синтезу аденозин-3-фосфата (ATP, енгл. *Adenosine triphosphate*). У случају да је продукција  $O_2^{\cdot-}$  великог интензитета тако да MnSOD није у могућности да га ефикасно неутралише, анјон се преко волтажно-зависних канала митохондрија експортује у цитоплазму, где се накнадно конвертује делом у водоник пероксид, а делом у високо реактивни хидроксилни радикал ( $\cdot OH$ )<sup>127</sup>. За разлику од пероксида који учествује у регулацији бројних физиолошких процеса,  $\cdot OH$  оксидује липидне структуре ћелије, а настали међупроизводи оштећују ДНК ћелије<sup>128</sup>. Доказано је да малигни тумори имају ослабљену способност одбране од слободних радикала у односу на здрава ткива<sup>129</sup>. Исти феномен је утврђен и у ћелијама бројних малигних култура, при чему LoVo ћелије имају веома ниску експресију MnSOD ензима, што их чини посебно осетљивим на једињења са способношћу генерисања  $O_2^{\cdot-}$ <sup>130</sup>.



### **2.5.3.11. Тестирање утицаја испитиваних једињења на миграторну активност малигну хелија**

Основне карактеристике малигну тумора јесу генска нестабилност удружена са мутацијама различитих гена, и способност хелија малигну тумора да метастазирају из примарне туморске масе и насељавају удаљена ткива и органе<sup>131</sup>. Метастазирање јесте главни разлог леталног исхода малигну болести, и у основи је комплексан процес који подразумева ангажовање широког спектра хелијских механизма који укључују цитоскелетну динамику и експресију адхезионих и протеолитичких ензима. Први корак током овог процеса јесте инвазија, када хелије пробијају базалну мембрану примарне туморске масе и мигрирају кроз екстрахелијски матрикс (ЕСМ, енгл. *Extracellular matrix*) у околна ткива. Постоји више различитих лабораторијских тестова који се користе за утврђивање миграторног потенцијала малигну хелија, као и за испитивање утицаја потенцијалних терапеутика на овај процес. Међутим, нити једна од ових лабораторијских метода није довољно свеобухватна да би могла у потпуности да имитира тако комплексан процес<sup>132</sup>. Стога, ови тестови могу првенствено да детектују цитоскелетну динамику и утицај испитиваних једињења на исту, док је реалан отпор ЕСМ-а кретању хелије, хипоксију ткива и утицај хемоатрактаната као подстицајне силе, практично немогуће истовремено уклопити у јединствен лабораторијски модел.

### **2.5.3.12 Испитивање потенцијалне токсичне активности на моделу хуманих кератиноцита**

Највећи проблем током третмана малигну болести представља токсичност примењених лекова, односно неселективно дејство на туморску масу уз оштећење здравих ткива и органа. Прави обим и тежина нежељених дејстава нових лекова могуће је утврдити једино током клиничких испитивања. У склопу предклиничких тестирања могу се користити различити хелијски модели за процену потенцијалне токсичности, али нити један од њих не може да обезбеди поуздану процену очекиваних споредних ефеката. Имајући ове податке у виду, а у циљу да стекнемо барем прелиминарну представу о томе да ли би од овде испитиваних једињења могло да се очекује да циљано делују на малигну трансформисане хелије уз поштеду здравих, одабрали смо културу здравих кератиноцита епидермиса коже као модел за тестирање. Разлог за избор НаСаТ културе кератиноцита јесте у чињеници да ове хелије учествују у изградњи коже која је највећи орган у људском организму, као и да је кожа један од најчешће оштећених ткива током примене хемиотерапије.<sup>133</sup>

## **2.6. КОРОЗИЈА МЕТАЛА**

Спонтан процес деградације метала услед хемијске, електрохемијске или биохемијске интеракције са околином назива се процес корозије. У току овог процеса метали прелазе из елементарног стања у једињења у којима се најчешће налазе у природи (оксиде, карбонате, сулфате), из којих су и добијени. Сматра се да је више од 95% штета од корозије последица деловања електрохемијске корозије. Електрохемијска корозија је резултат одигравања електрохемијских реакција при контакту метала са електролитом. Представља редокс процес при којем долази до оксидације атома метала уз истовремену редукцију неког оксиданса (деполаризатора) присутног у електролиту. Електрохемијска корозија може да се појави у природној и техничкој води, у воденим растворима: киселина, база, соли и других супстанци, у влажном земљишту и у влажној атмосфери. Дефинисани су различити облици корозије, међутим класификација са осам облика корозије дата од Фонтане и сарадника<sup>134</sup> је опште прихваћена:

1. Униформна или општа корозија
2. Галванска (контактна) или биметална корозија
3. Корозија у зазорима (пукотинама)

4. Тачкаста (питинг) корозија
5. Међукристална (интергрануларна) корозија
6. Селективна (структурна) корозија
7. Импакт корозија (ерозиона корозија, корозија ударом, кавитациона корозија и абразиона корозија)
8. Прскање услед напонске корозије или напонска корозија са прелинама и корозиони замор

Најчешћи облик корозије је општа корозија, која може бити равномерна или неравномерна. Настаје када је цела површина метала у контакту са агресивном средином под приближно једнаким условима. Карактерише се смањењем дебљине метала. Брзина кородирања одређена је дубином продирања процеса корозије у метал у одређеном временском периоду. На основу тонаже, узрок је највећих губитака метала.

Општа корозија не представља велику опасност са техничке тачке гледишта пошто је могуће проценити век трајања конструкције. Као конструкциони материјали, после гвожђа и његових легура, бакар и легуре бакра су једни од најзаступљенијих. Последњих година се све више проучавају супстанце које могу у великој мери да смање брзину корозије на површини метала када се примене у малим концетрацијама.

### 2.6.1. Инхибитори корозије

Инхибитори корозије најчешће се примењују у четири средине: природна вода, вода за снабдевање, индустријска расхладна вода у приближно неутралној рН области (рН 5–9), као и у воденом раствору киселина који се пре свега користе у процесима чишћења металних површина, примарној и секундарној производњи и преради нафте и гасној индустрији. Инхибитор мора бити компатибилан са корозионом средином, хемијски и термички стабилан, а у неким случајевима и физички. Генерално, инхибитори корозије су специфични у деловању према металима. Два или више инхибитора корозије могу повећати степен заштите метала. Заштитни филм настао као резултат удруженог дејства два инхибитора, обезбеђује бакарној површини бољу заштиту у раствору калијум-сулфата него при индивидуалном дејству инхибитора<sup>135</sup>.

Инхибитор осим што мора бити ефикасан у заштити метала од корозије мора бити и еколошки прихватљив. Све је већа потражња за инхибиторима који су мање токсични и биоразградиви. Биљни екстракти као еколошки прихватљиви, лако доступни и обновљиви извори, постали су важни инхибитори корозије са широким опсегом дејства. Представљају богате изворе састојака који имају високу ефикасност инхибиције.<sup>136</sup>

Инхибитор корозије може смањити брзину корозије у зависности од интеракције инхибитора са површином метала. Стога, на основу типа интеракције, постоје две широке класе инхибитора: модификатори средине и адсорпциони инхибитори. Према свом хемијском саставу инхибитори корозије деле се на неорганске и органске инхибиторе, док се према механизму дејства деле на анодне, катодне и мешовите.

Органска једињења која у структури имају хетероатоме су се показала као добри добри инхибитори корозије са високом активношћу чији се механизам инхибиције објашњава стварањем филма на површини метала адсорпцијом<sup>137</sup>. Међу њима, деривати пиридина су једињења која имају широку примену као инхибитори корозије<sup>138–140</sup>. У том смислу три деривата симетричних *bis*(имино) пиридина у 1 М НСl су се показала као добри инхибитори корозије за благи челик, од којих је дериват *N*<sup>2</sup>,*N*<sup>6</sup>-*bis*(4-метилбензилидене)пиридин-2,6-диамин супституисан са метил групом показао највећу ефикасност инхибиције од 98,6%. Такође, утврђено је да ови деривати инхибирају корозију адсорпционим механизмом који следи Ленгмирову адсорпциону изотерму<sup>138</sup>. Деривати тиадиазола, тиофена као и дериват 2,6-*bis*-[1-(2-фенилхидразон)етил]пиридин показали су се као ефикасни инхибитори корозије цинка у киселој средини<sup>140–142</sup>. Поред тога, већина студија о инхибиторима корозије заснива

се на експерименталним резултатима у вези са синергетским механизмом различитих врста инхибитора корозије који је у корелацији са структуром органских једињења<sup>143</sup>.

## 2.7. ЕКОТОКСИКОЛОШКА ПРОЦЕНА УТИЦАЈА ЈЕДИЊЕЊА НА ЖИВОТНУ СРЕДИНУ

Екотоксичност представља особину једињења да испољава штетне ефекте њеним присуством у екосистему. Екотоксичност се везује за присуство супстанци које су класификоване као опасне по животну средину односно, које испољавају токсичне ефекте по организме у екосистему или које имају потенцијал да изазову дугорочне штетне ефекте по животну средину<sup>144</sup>.

У регулаторном смислу, супстанце се класификују према опасности по животну средину пре свега на основу доступних података о њиховим физичко-хемијским и екотоксиколошким својствима, а у складу са критеријумима дефинисаним прописима којима се уређује класификација, паковање и обележавање хемикалија. С тим у вези, Република Србија је усагласила систем класификације хемикалија са глобално усклађеним УН системом класификације, паковања и обележавања хемикалија (GHS, енгл. *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*), и то кроз усклађивање националних прописа Републике Србије са Уредбом ЕУ о класификацији, паковању и обележавању супстанци и смеша (CLP, енгл. *Classification, Labelling and Packaging of substances and mixtures, Regulation (EC) No. 1272/2008*<sup>145</sup> а који је обавезујући за примену у ЕУ и Републици Србији од 2015. год.). Узимајући у обзир да за деривате као новосинтетисана једињења не постоје експериментални подаци у вези њихових екотоксиколошких својстава, коришћени су одговарајући QSAR<sup>144</sup> модели за процену: растворљивости деривата у води на 25 °C и еко-токсиколошких својстава ових једињења и то за различите трофичке нивое односно за рибе и дагње (96-часовни *Fathead Minnow* LC50 и 48-часовни *D. magna* LC50). За процену фактора биоакумулације је примењена QSAR метода најближег суседа у одсуству кластера експерименталних података за једињења сличне молекулске структуре из других QSAR модела.

### 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

#### 3.1. ОПШТЕ НАПОМЕНЕ О СИНТЕЗИ И КАРАКТЕРИЗАЦИЈИ ЈЕДИЊЕЊА

У оквиру ове докторске дисертације синтетисане су три серије једињења винил и имино деривата пиридина у циљу добијања биолошки активних једињења, као и једињења која могу представљати потенцијалне инхибиторе корозије. Синтетисано је четрдесет једињења, тридесет и три нових и седам једињења претходно описаних у литератури. За синтезу су коришћене хемикалије *p.a.* чистоће (Sigma-Aldrich и Acros Organic). Структура, састав и чистоћа једињења потврђена је елементалном анализом, одређивањем тачке топљења, FT-IR, NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и 2D NMR технике) и UV-Vis спектроскопијом. За поједине деривате коришћена је и HRMS и ESR спектроскопија. За једињења која су претходно објављена такође је урађена потпуна карактеризација и добијене вредности биле су у складу са подацима датим у литератури.

Елементалне анализе (C, H, N, S) изведене су стандардним микрометодама коришћењем ELEMENTAR Vario EL III CHNS/O анализатора.

Некориговане тачке топљења су одређене на STUART *melting point SMP30* апарату.

FT-IR спектри једињења су снимани на апаратима FT-IR BOMEM MB series (Hartmann & Braun) или ATR-FT-IR Nicolet iS10 (Thermo Scientific) у области  $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$  са резолуцијом  $4\text{ cm}^{-1}$ , на собној температури. Скраћенице коришћене за опис апсорпционих трака спектра су: јака (st, енгл. *strong*), средња (md, енгл. *medium*), слаба (w, енгл. *weak*), широка (brd, енгл. *broad*), јако оштра (sshp, енгл. *strong sharp*).

NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , 2D) спектри су снимани на собној температури у деутерисаним раставарачима диметил-сулфоксиду (DMSO- $d_6$ ), хлороформу ( $\text{CDCl}_3$ ), или ацетону- $d_6$  на апаратима Varian Gemini 200/50 MHz или Bruker Avance III 500/125 MHz. Вредности хемијских померања,  $\delta$ , изражене су у *ppm* јединицама у односу на тетраметилсилан (TMS) као стандард. За опис мултиплитета сигнала коришћене су следеће скраћенице: s – синглет (енгл. *singlet*), d – дублет (енгл. *doublet*), t – триплет (енгл. *triplet*), m – мултиплет (енгл. *multipliset*), dd – дублет дублета (енгл. *double doublet*) и br.m.ovlp. – широк преклопљени мултиплет (енгл. *broad overlapping multipliset*). Константе купловања *J* су изражене у Hz.

Снимање UV-Vis спектра у опсегу од 200-800 nm у различитим растварачима извршено је на апарату Shimadzu 1700. Апсорпциони максимуми једињења су забележени при концентрацији  $5 \times 10^{-5}\text{ mol dm}^{-3}$ .

За танкослојну хроматографију је коришћен силика гел (63-100, 60 Å), са флуоресцентним индикатором (254 nm), од произвођача Merck.

HRMS спектри снимани су у ацетонитрилу на апарату LTQ Orbitrap XL куплованог са Acella UHPLC и easyLC II nanoLC систему, у позитивном моду.

ESR спектри снимани су на собној температури на апарату X-band Bruker EMXmicro спектрометру употребом кварцне ћелије са равном цевчицом за чврсте узорке. Главна подешавања ESR спектра су следећа: микроталасна фреквенција – 9,85 GHz, микроталасна снага – 2,0 mW, фреквенција модулације – 100 kHz, амплитуда модулације – 5 G и временска константа – 327 msec. Манипулација ESR спектра изведена је коришћењем ерг.ехе и simerg.ехе DOS програма преузетих са веб локације Националног института за науку о утицају животне средине на здравље (eng. *National Institute of Environmental Health Sciences, USA*) (<https://www.niehs.nih.gov/research/resources/software/>).

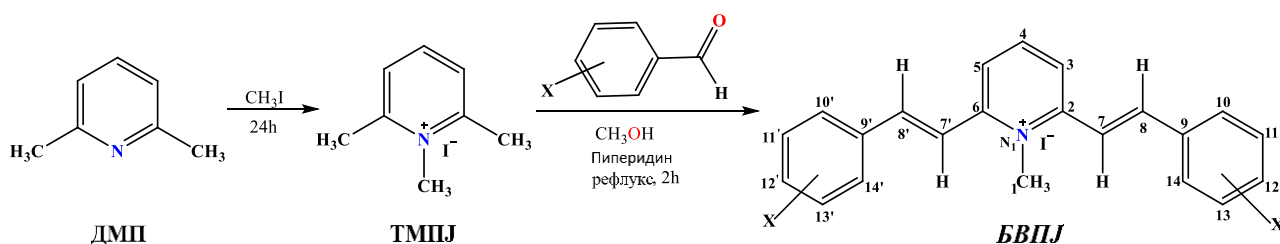
Биолошка активност деривата пиридина је испитана одређивањем антимицробне, антиоксидативне и антиканцер активности.

Испитивање деривата као потенцијалних инхибитора корозије је вршено применом електрохемијских метода.

## 3.2. СИНТЕЗА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ВИНИЛ ДЕРИВАТА ПИРИДИНА

### 3.2.1. Синтеза и карактеризација симетричних 1-метил-2,6-bis[2-(супституисаних фенил)етенил]пиридијум-јодида

Синтеза 1-метил-2,6-bis[2-(супституисани фенил)етенил]пиридијум-јодида (*bis*(винил)пиридијум-јодида – **БВПЈ**) се врши реакцијом кондензације 1,2,6-триметилпиридијум-јодида (ТМПЈ) и одговарајућих алдехида (Слика 3.1) према модификованом поступку датом у литератури<sup>24</sup>. У првом кораку синтетисан је 1,2,6-триметилпиридијум-јодид (ТМПЈ). Смеша 2,6-диметилпиридина (ДМП) (0,025 mol) и метил јодида (0,125 mol) се меша на собној температури 24 сата према процедури описаној у литератури<sup>24</sup>. Настали талог се филтрира и пречисти кристаллизацијом из етанола.



Једињење	X <sup>[a]</sup>	Једињење	X <sup>[a]</sup>	Једињење	X <sup>[a]</sup>
<b>БВПЈ-1</b>	H	<b>БВПЈ-6</b>	3-OH	<b>БВПЈ-11</b>	4-N,N-di-CH <sub>3</sub>
<b>БВПЈ-2</b>	2-нафтил <sup>[6]</sup>	<b>БВПЈ-7</b>	4-F	<b>БВПЈ-12</b>	4-NO <sub>2</sub>
<b>БВПЈ-3</b>	4-CH <sub>3</sub>	<b>БВПЈ-8</b>	4-Cl	<b>БВПЈ-13</b>	4-OCH <sub>3</sub>
<b>БВПЈ-4</b>	3-CH <sub>3</sub>	<b>БВПЈ-9</b>	2,6-di-Cl	<b>БВПЈ-14</b>	3,4-di-OCH <sub>3</sub>
<b>БВПЈ-5</b>	4-OH	<b>БВПЈ-10</b>	2-Cl-6-F	<b>БВПЈ-15</b>	3,4,5-tri-OCH <sub>3</sub>

[a] Нумерација атома у односу на алдехид;

[6] Нумерација за једињење **БВПЈ-2** приказана је у прилогу на Слици П7.1.

**Слика 3.1** Синтеза 1-метил-2,6-bis[2-(супституисани фенил)етенил]пиридијум-јодида (**БВПЈ**)

Добијени ТМПЈ се даље користи за синтезу винил деривата пиридина. ТМПЈ (0,01 mol) реагује са одговарајућим ароматичним алдехидима (0,02 mol) у метанолу (40 mL) уз додатак једне капи пиперидина као катализатора. Реакциона смеша се загрева 2 сата уз рефлукс. Након загревања, смеша се хлади до собне температуре, добијени талог се филтрира и суши на ваздуху. Једињење **БВПЈ-2** је пречишћено кристаллизацијом из смеше 85% анизол/10% метанол/5% вода, једињење **БВПЈ-12** из смеше DMSO-а и воде, док су остала једињења пречишћена кристаллизацијом из метанола (**БВПЈ-1**, **БВПЈ-3–БВПЈ-9** и **БВПЈ-13–БВПЈ-15**) или 96% етанола (једињења **БВПЈ-10** и **БВПЈ-11**).

Чистоћа и структура добијених једињења је потврђена одређивањем тачке топљења, елементалном анализом, FTIR и NMR (<sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C) спектроскопијом.

*1-метил-2,6-bis[2-(фенил)етенил]пиридијум-јодид (БВПЈ-1)*<sup>32</sup> Чврста супстанца жуте боје, принос: 78%; т.т. 254 °C. Елементална анализа: израчунато за C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>IN (M<sub>w</sub> = 425,31 g mol<sup>-1</sup>): C, 62,13; H, 4,74; N, 3,29%; нађено: C 62,20; H, 4,75; N, 4,00%; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3058 ν(C-H)<sub>винил</sub>, арил, 2917 ν(C-H), 2857 ν(=N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>)<sub>алкил</sub>, 1615, 1605, 1483 ν(C=C)<sub>арил</sub>, 1450 δ(C-H), 1286, 1246 ν(C-N)<sub>пиридил</sub>, 976 δ(=CH)<sub>винил</sub>, 810 δ(C-H)<sub>арил</sub>; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 4,28 (3H, *s*, =N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 7,47-7,49 (4H, *d*, CH=CH и пиридил), 7,62-7,27 (6H, *dd*, *J*=30,3 Hz, *J*=15,9 Hz, CH=CH и C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,85-7,87 (4H, *d*, *J*=7,2 Hz, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 8,26-8,29 (2H, *m*, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 8,39-8,44 (1H *t*, *J*=7,8 Hz, пиридил); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ / ppm): 41,9 (=N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 119,1(C<sub>7</sub> и C<sub>7</sub>'), 124,2 (C<sub>3</sub> и C<sub>5</sub>), 128,4

(C<sub>10</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>10'</sub> и C<sub>14'</sub>), 128,9 (C<sub>11</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>11'</sub> и C<sub>13'</sub>), 130,4 (C<sub>12</sub> и C<sub>12'</sub>), 134,9 (C<sub>9</sub> и C<sub>9'</sub>), 142,2 (C<sub>8</sub> и C<sub>8'</sub>), 143,1 (C<sub>4</sub>); 149,88 (C<sub>2</sub>), 153,1 (C<sub>6</sub>).

*1-метил-2,6-bis[2-(2-нафтил)етенил]пиридинијум-јодид (БВПЈ-2)*. Чврста супстанца жуте боје, принос: 67%; т.т. 253 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>30</sub>H<sub>24</sub>N (M<sub>w</sub> = 525,42 g mol<sup>-1</sup>): C, 68,58; H, 4,60; N, 2,67%, нађено: C, 69,08; H, 5,10; N, 3,17%; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3042 ν(C-H)<sub>винил, арил</sub>, 2924 ν(C-H)<sub>алкил</sub>, 2853 ν(=N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>)<sub>алкил</sub>, 1610, 1568, 1488 ν(C=C)<sub>арил</sub>, 1248, 1173 ν(C-N)<sub>пиридил</sub>, 966 δ(=CH)<sub>винил</sub>, 775 δ(-CH)<sub>арил</sub>; <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 4,31 (3H, *s*, =N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 6,91 (2H, *d*, *J* = 7,2 Hz, CH=CH), 7,38-7,45 (6H, *m*, CH=CH, пиридил и C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,63 (4H, *dd*, *J* = 7,9 Hz, *J* = 5,6 Hz, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,80-7,85 (4H, *m*, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 8,00 (2H, *dd*, *J* = 6,8 Hz, *J* = 5,1 Hz, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 8,30-8,36 (2H, *m*, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 8,45 (1H, *br.m.ovl.*, пиридил); <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 41,5 (=N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 113,9 (C<sub>15</sub> и C<sub>15'</sub>), 124,5 (C<sub>7</sub> и C<sub>7'</sub>), 128,2 (C<sub>3</sub> и C<sub>5</sub>), 128,6 (C<sub>10</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>10'</sub> и C<sub>14'</sub>), 129,2 (C<sub>13</sub> и C<sub>13'</sub>), 130,0 (C<sub>17</sub> и C<sub>17'</sub>), 130,4 (C<sub>16</sub> и C<sub>16'</sub>), 133,2 (C<sub>18</sub> и C<sub>18'</sub>), 134,2 (C<sub>12a</sub> и C<sub>12a'</sub>), 134,6 (C<sub>8</sub> и C<sub>8'</sub>), 138,2 (C<sub>9</sub> и C<sub>9'</sub>), 138,6 (C<sub>11a</sub> и C<sub>11a'</sub>), 153,6 (C<sub>4</sub>), 155,8 (C<sub>2</sub> и C<sub>6</sub>).

*1-метил-2,6-bis[2-(4-метилфенил)етенил]пиридинијум-јодид (БВПЈ-3)*. Чврста супстанца жуте боје, принос: 55%; т.т. 204 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>N (M<sub>w</sub> = 453,36 g mol<sup>-1</sup>): C, 63,58; H, 5,34; N, 3,09%, нађено: C, 64,08; H, 5,69; N, 3,59%; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3050 ν(C-H)<sub>винил, арил</sub>, 2917 ν(C-H)<sub>алкил</sub>, 2857 ν(=N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>)<sub>алкил</sub>, 1615, 1560, 1483 ν(C=C)<sub>арил</sub>, 1449 δ(C-H), 1287, 1246 ν(C-N)<sub>пиридил</sub>, 979 δ(=CH)<sub>винил</sub>, 809 δ(C-H)<sub>арил</sub>; <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 2,37 (6H, *s*, -CH<sub>3</sub>), 4,28 (3H, *s*, =N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 7,32 (2H, *s*, *J* = 8,0 Hz, CH=CH), 7,65 (2H, *d*, *J* = 8,0 Hz, CH=CH), 7,68-7,74 (6H, *m*, пиридил и C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 8,26 (4H, *d*, *J* = 7,4 Hz, 2C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 8,42 (1H, *dd*, *J* = 8,0 Hz, *J* = 5,6 Hz, пиридил); <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 22,4 (-2CH<sub>3</sub>), 40,5(=N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 124,3 (C<sub>7</sub> и C<sub>7'</sub>), 128,3 (C<sub>3</sub> и C<sub>5</sub>), 128,9 (C<sub>10</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>10'</sub> и C<sub>14'</sub>), 129,1 (C<sub>11</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>11'</sub> и C<sub>13'</sub>), 134,5 (C<sub>8</sub> и C<sub>8'</sub>), 136,5 (C<sub>9</sub> и C<sub>9'</sub>), 142,4 (C<sub>12</sub> и C<sub>12'</sub>), 153,2 (C<sub>4</sub>), 155,4 (C<sub>2</sub> и C<sub>6</sub>).

*1-метил-2,6-bis[2-(3-метилфенил)етенил]пиридинијум-јодид (БВПЈ-4)*. Чврста супстанца жуте боје, принос: 56%; т.т. 203-204 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>N (M<sub>w</sub> = 453,36 g mol<sup>-1</sup>): C, 63,58; H, 5,34; N, 3,09%, нађено: C, 64,10; H, 5,67; N, 3,60%; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3041 ν(C-H)<sub>винил, арил</sub>, 2919 ν(C-H)<sub>алкил</sub>, 2853 ν(=N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>)<sub>алкил</sub>, 1607, 1566, 1488 ν(C=C)<sub>арил</sub>, 1459, 1331 δ(C-H)<sub>алкил</sub>, 1283, 1234 ν(C-N)<sub>пиридил</sub>, 975 δ(=CH)<sub>винил</sub>, 687 δ(C-H)<sub>арил</sub>; <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 2,37 (6H, *s*, -CH<sub>3</sub>), 4,31 (3H, *s*, =N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 7,30 (2H, *d*, *J* = 7,5 Hz, CH=CH), 7,40 (4H, *m*, CH=CH и C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,62-7,70 (6H, *m*, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> и пиридил), 8,29 (2H, *d*, *J* = 7,6 Hz, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 8,45 (1H, *d*, *J* = 6,4 Hz, пиридил); <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 21,7 (-2CH<sub>3</sub>), 40,2 (=N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 124,25 (C<sub>7</sub> и C<sub>7'</sub>), 128,3 (C<sub>3</sub> и C<sub>5</sub>), 128,9 (C<sub>10</sub> и C<sub>10'</sub>), 129,2 (C<sub>14</sub> и C<sub>14'</sub>), 130,4 (C<sub>12</sub> и C<sub>12'</sub>), 131,5 (C<sub>11</sub> и C<sub>11'</sub>), 134,7 (C<sub>8</sub> и C<sub>8'</sub>), 137,3 (C<sub>13</sub> и C<sub>13'</sub>), 139,61 (C<sub>9</sub> и C<sub>9'</sub>), 153,1 (C<sub>4</sub>), 155,2 (C<sub>2</sub> и C<sub>6</sub>).

*1-метил-2,6-bis[2-(4-хидроксифенил)етенил]пиридинијум-јодид (БВПЈ-5)*<sup>24</sup>. Чврста супстанца црвене боје, принос 31%; т.т. >300 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>2</sub> (M<sub>w</sub> = 330,41 g mol<sup>-1</sup>): C, 79,97; H, 6,10; N, 4,24%; нађено: C, 80,01; H, 6,15; N, 4,30%; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3441 ν(O-H), 3040 ν(C-H)<sub>винил, арил</sub>, 2934 ν(C-H)<sub>алкил</sub>, 2805 ν(=N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>)<sub>алкил</sub>, 1603, 1562, 1483 ν(C=C)<sub>арил</sub>, 1268, 1231 ν(C-N)<sub>пиридил</sub>, 1171, 1102 ν(C<sub>аромат.</sub>-OH), 940 δ(=CH)<sub>винил</sub>, 834 δ(C-H)<sub>арил</sub>; <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 4,24 (3H, *s*, -N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 6,87 (4H, *d*, *J* = 9,0 Hz, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,42 (2H, *d*, *J* = 15,6 Hz, CH=CH), 7,66-7,74 (6H, *m*, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> и CH=CH), 8,17 (2H, *d*, *J* = 7,2 Hz, пиридил), 8,32 (1H, *t*, *J* = 7,2 Hz, пиридил) 9,95 (2H, *s*, -OH); <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 41,1 (-N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 116,2 (C<sub>11</sub> и C<sub>11'</sub>), 122,6 (C<sub>7</sub> и C<sub>7'</sub>), 126,2 (C<sub>3</sub> и C<sub>5</sub>), 130,8 (C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub> и C<sub>10'</sub> и C<sub>12'</sub>), 134,91 (C<sub>9</sub> и C<sub>9'</sub>) 142,5 (C<sub>14</sub> и C<sub>14'</sub>), 142,7 (C<sub>8</sub> и C<sub>8'</sub>), 153,8 (C<sub>4</sub>), 160,7 (C<sub>2</sub> и C<sub>6</sub>), 162,5 (C<sub>13</sub> и C<sub>13'</sub>).

*1-метил-2,6-bis[2-(3-хидроксифенил)етенил]пиридинијум-јодид (БВПЈ-6)*. Чврста супстанца тамно црвене боје, принос: 54%; т.т. 197 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>INO<sub>2</sub> (M<sub>w</sub> = 457,30 g mol<sup>-1</sup>): C, 57,78; H, 4,41; N, 3,06%; нађено: C, 57,33; H, 3,91; N, 3,54%; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3320 ν(O-H), 3045 ν(C-H)<sub>винил, арил</sub>, 2926 ν(C-H)<sub>алкил</sub>, 2852 ν(=N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>)<sub>алкил</sub>, 1608, 1570, 1488

$\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{арил}}$ , 1265, 1235  $\nu(\text{C}-\text{N})_{\text{пиридил}}$ , 1171  $\nu(\text{C}_{\text{аромат.}}-\text{OH})$ , 965  $\delta(\text{=CH})_{\text{винил}}$ , 790  $\delta(-\text{CH})_{\text{арил}}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta/\text{ppm}$ ): 4,27 (3H, *s*, =N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 7,10-7,18 (6H, *m*, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> и CH=CH), 7,44 (2H, *d*, *J* = 7,4 Hz, CH=CH), 7,65 (4H, *m*, пиридил и C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,88 (2H, *td*, *J* = 4,9 Hz, *J* = 4,5 Hz, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 8,26 (1H, *d*, *J* = 7,8 Hz, пиридил), 9,91 (2H, *s*, -OH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta/\text{ppm}$ ): 40,5 (=N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 113,89 (C<sub>14</sub> и C<sub>14'</sub>), 114,27 (C<sub>12</sub> и C<sub>12'</sub>), 119,74 (C<sub>10</sub> и C<sub>10'</sub>), 124,43 (C<sub>7</sub> и C<sub>7'</sub>), 128,24 (C<sub>3</sub> и C<sub>5</sub>), 130,30 (C<sub>11</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>11'</sub> и C<sub>13'</sub>), 139,12 (C<sub>8</sub> и C<sub>8'</sub>), 142,86 (C<sub>9</sub> и C<sub>9'</sub>), 153,52 (C<sub>4</sub>), 158,09 (C<sub>2</sub> и C<sub>6</sub>).

*1-метил-2,6-bis[2-(4-флуорфенил)етенил]пиридинијум-јодид (БВПЈ-7)*. Чврста супстанца тамно црвене боје, принос: 57%; т.т. 213 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>F<sub>2</sub>IN (M<sub>w</sub> = 461,29 g mol<sup>-1</sup>): C, 57,28; H, 3,93; N, 3,04%, нађено: C, 57,68; H, 4,28; N, 3,24%; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3077  $\nu(\text{C}-\text{H})_{\text{винил, арил}}$ , 2933  $\nu(\text{C}-\text{H})_{\text{алкил}}$ , 2853  $\nu(\text{=N}^+-\text{CH}_3)_{\text{алкил}}$ , 1560, 1595, 1484  $\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{арил}}$ , 1288  $\nu(\text{C}-\text{N})_{\text{пиридил}}$ , 1233, 1189  $\nu(\text{C}_{\text{аромат.}}-\text{F})$ , 971  $\delta(\text{=CH})$ , 810  $\delta(-\text{CH})_{\text{арил}}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta/\text{ppm}$ ): 4,30 (3H, *s*, =N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 7,00 (2H, *d*, *J* = 8,8 Hz, CH=CH), 7,36 – 7,71 (4H, *m*, CH=CH, и пиридил), 7,93 (4H, *t*, *J* = 7,0 Hz, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 8,09 – 8,28 (4H, *m*, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 8,44 (1H, *dd*, *J* = 7,9, *J* = 4,4 Hz, пиридил);  $^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta/\text{ppm}$ ): 48,32 (=N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 115,11 (C<sub>11</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>11'</sub> и C<sub>13'</sub>), 124,28 (C<sub>7</sub> и C<sub>7'</sub>), 130,86 (C<sub>3</sub> и C<sub>5</sub>), 131,42 (C<sub>10</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>10'</sub> и C<sub>14'</sub>), 133,73 (C<sub>9</sub> и C<sub>9'</sub>), 140,59 (C<sub>8</sub> и C<sub>8'</sub>), 143,56 (C<sub>4</sub>), 153,48 (C<sub>2</sub> и C<sub>6</sub>), 155,57 (C<sub>12</sub> и C<sub>12'</sub>).

*1-метил-2,6-bis[2-(4-хлорфенил)етенил]пиридинијум-јодид (БВПЈ-8)*. Чврста супстанца жуте боје, принос: 61%; т.т. 208 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>IN (M<sub>w</sub> = 494,20 g mol<sup>-1</sup>): C, 53,47; H, 3,67; N, 2,83%, нађено: C, 53,70; H, 3,32; N, 2,59%; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3026  $\nu(\text{C}-\text{H})_{\text{винил, арил}}$ , 2929  $\nu(\text{C}-\text{H})_{\text{алкил}}$ , 2858  $\nu(\text{=N}^+-\text{CH}_3)_{\text{алкил}}$ ; 1622, 1564, 1487  $\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{арил}}$ , 1280, 1248  $\nu(\text{C}-\text{N})_{\text{пиридил}}$ , 1081  $\nu(\text{C}_{\text{аромат.}}-\text{Cl})$ , 971  $\delta(\text{=CH})_{\text{винил}}$ , 817  $\delta(-\text{CH})_{\text{арил}}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta/\text{ppm}$ ): 4,30 (3H, *s*, =N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 7,02 (2H, *d*, *J* = 7,7 Hz, CH=CH); 7,26-7,52 (4H, *m*, CH=CH и пиридил), 7,73 (4H, *d*, *J* = 7,2 Hz, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 8,05-8,18 (4H, *m*, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 8,45 (1H, *dd*, *J* = 8,1 Hz, *J* = 5,5 Hz, пиридил);  $^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta/\text{ppm}$ ): 48,30 (=N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 124,31 (C<sub>7</sub> и C<sub>7'</sub>), 128,80 (C<sub>11</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>11'</sub> и C<sub>13'</sub>), 130,42 (C<sub>10</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>10'</sub> и C<sub>14'</sub>), 131,01 (C<sub>3</sub> и C<sub>5</sub>), 135,6 (C<sub>9</sub> и C<sub>9'</sub>), 138,2 (C<sub>8</sub> и C<sub>8'</sub>), 144,58 (C<sub>4</sub>), 145,57 (C<sub>12</sub> и C<sub>12'</sub>), 154,50 (C<sub>2</sub> и C<sub>6</sub>).

*1-метил-2,6-bis[2-(2,6-дихлорфенил)етенил]пиридинијум-јодид (БВПЈ-9)*. Чврста супстанца жуте боје, принос: 45%; т.т. 203-204 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>22</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>4</sub>IN (M<sub>w</sub> = 563,09 g mol<sup>-1</sup>): C, 46,93; H, 2,86; N, 2,49%, нађено: C, 46,43; H, 2,41; N, 2,29%; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3038  $\nu(\text{C}-\text{H})_{\text{винил, арил}}$ , 2929  $\nu(\text{C}-\text{H})_{\text{алкил}}$ , 2852  $\nu(\text{=N}^+-\text{CH}_3)_{\text{алкил}}$ , 1615, 1575, 1481  $\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{арил}}$ , 1268  $\nu(\text{C}-\text{N})_{\text{пиридил}}$ , 1075  $\nu(\text{C}_{\text{аромат.}}-\text{Cl})$ , 964  $\delta(\text{=CH})_{\text{винил}}$ , 765  $\delta(-\text{CH})_{\text{арил}}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta/\text{ppm}$ ): 4,24 (3H, *s*, =N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 7,47-7,52 (4H, *m*, CH=CH и пиридил), 7,61 (2H, *d*, *J* = 4,1 Hz, CH=CH), 7,62-7,69 (4H, *m*, -C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>), 8,33-8,37 (2H, *d*, *J* = 8,1 Hz, -C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>), 8,60 (1H, *m*, пиридил);  $^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta/\text{ppm}$ ): 42,82 (=N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 126,16 (C<sub>7</sub> и C<sub>7'</sub>), 128,61 (C<sub>3</sub> и C<sub>5</sub>), 129,43 (C<sub>11</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>11'</sub> и C<sub>13'</sub>), 131,56 (C<sub>12</sub> и C<sub>12'</sub>), 134,12 (C<sub>10</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>10'</sub> и C<sub>14'</sub>), 136,48 (C<sub>8</sub> и C<sub>8'</sub>), 145,16 (C<sub>9</sub> и C<sub>9'</sub>), 152,87 (C<sub>4</sub>), 156,47 (C<sub>2</sub> и C<sub>6</sub>).

*1-метил-2,6-bis[2-(2-хлор-6-флуорфенил)етенил]пиридинијум-јодид (БВПЈ-10)*. Чврста супстанца црне боје, принос: 44%; т.т. 170 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>22</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>2</sub>IN (M<sub>w</sub> = 530,18 g mol<sup>-1</sup>): C, 49,84; H, 3,04; N, 2,64%, нађено: C, 49,62; H, 3,34; N, 3,14%; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3072  $\nu(\text{C}-\text{H})_{\text{винил, арил}}$ , 2929  $\nu(\text{C}-\text{H})_{\text{алкил}}$ , 2853  $\nu(\text{=N}^+-\text{CH}_3)_{\text{алкил}}$ , 1603, 1576, 1486  $\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{арил}}$ , 1242  $\nu(\text{C}-\text{N})_{\text{пиридил}}$ , 1172  $\nu(\text{C}_{\text{аромат.}}-\text{F})$ , 1062  $\nu(\text{C}_{\text{аромат.}}-\text{Cl})$ , 977  $\delta(\text{=CH})_{\text{винил}}$ , 785  $\delta(-\text{CH})_{\text{арил}}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta/\text{ppm}$ ): 4,26 (3H, *s*, =N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 7,49-7,56 (4H, *m*, CH=CH и пиридил), 7,60 (2H, *d*, *J* = 4,7 Hz, C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>), 7,64-7,94 (4H, *m*, C<sub>6</sub>H<sub>3</sub> и CH=CH), 7,99 (2H, *d*, *J* = 8,1 Hz, C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>), 8,60 (1H, *m*, пиридил);  $^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta/\text{ppm}$ ): 45,20 (=N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 115,51 (C<sub>13</sub> и C<sub>13'</sub>), 128,12 (C<sub>7</sub> и C<sub>7'</sub>), 129,51 (C<sub>3</sub> и C<sub>5</sub>), 130,5 (C<sub>11</sub> и C<sub>11'</sub>), 132,41 (C<sub>12</sub> и C<sub>12'</sub>), 134,22 (C<sub>10</sub> и C<sub>10'</sub>), 137,9 (C<sub>8</sub> и C<sub>8'</sub>), 145,5 (C<sub>9</sub> и C<sub>9'</sub>), 150,08 (C<sub>4</sub>), 153,62 (C<sub>2</sub> и C<sub>6</sub>), 160,22 (C<sub>14</sub> и C<sub>14'</sub>).

*1-метил-2,6-bis[2-(4-диметиламинофенил)етенил]пиридинијум-јодид (БВПЈ-11)*<sup>33</sup>. Чврста супстанца црне боје, принос: 65%; т.т. 204-205 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>IN<sub>3</sub> (M<sub>w</sub> = 511,44 g mol<sup>-1</sup>): С, 61,06; Н, 5,91; N, 8,22%, нађено: С, 60,99; Н, 5,98; N, 8,17%; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3025 ν(C-H)<sub>винил, арил</sub>, 2923 ν(C-H)<sub>алкил</sub>, 2853 ν(=N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>)<sub>алкил</sub>, 1594, 1550, 1480 ν(C=C)<sub>арил</sub>, 1263 ν(C-N)<sub>пиридил</sub>, 978 δ(=CH)<sub>винил</sub>, 810 δ(-CH)<sub>арил</sub>; <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 3,02 (12H, *s*, 4-NCH<sub>3</sub>), 4,18 (3H, *s*, -N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>), 6,78 (4H, *d*, *J* = 8,8 Hz, C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>), 7,32 (2H, *ddd*, *J* = 16,0 Hz, CH=CH), 7,65-7,71 (6H, *m*, CH=CH и C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>), 8,00 (2H, *d*, *J* = 8,1 Hz, пиридил), 8,08 (1H, *t* *J* = 8,1 Hz, пиридил); <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 42,1 (4-NCH<sub>3</sub>), 43,4 (-2NCH<sub>3</sub>), 115,2 (C<sub>11</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>11'</sub> и C<sub>13'</sub>), 123,7 (C<sub>7</sub> и C<sub>7'</sub>), 125,1 (C<sub>3</sub> и C<sub>5</sub>), 126,2 (C<sub>9</sub> и C<sub>9'</sub>), 128,9 (C<sub>10</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>10'</sub> и C<sub>14'</sub>), 134,5 (C<sub>8</sub> и C<sub>8'</sub>), 148,5 (C<sub>4</sub>), 149,9 (C<sub>12</sub> и C<sub>12'</sub>), 155,5 (C<sub>2</sub> и C<sub>6</sub>), 114,2 (C<sub>10</sub>), (C<sub>11</sub>), 115,2 (C<sub>9</sub>).

*1-метил-2,6-bis[2-(4-нитрофенил)етенил]пиридинијум-јодид (БВПЈ-12)*. Чврста супстанца црне боје, принос: 61%, т.т. 203,2-204,2 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>IN<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (M<sub>w</sub> = 515,30 g mol<sup>-1</sup>): С, 51,28; Н, 3,52; N, 8,15%, нађено: С, 51,70; Н, 3,84; N, 7,85 %; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3002 ν(C-H)<sub>винил, арил</sub>, 2921 ν(C-H)<sub>алкил</sub>, 2853 ν(=N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>)<sub>алкил</sub>; 1624, 1519, 1490 ν(C=C)<sub>арил</sub>, 1280 ν(C-N)<sub>пиридил</sub>, 1345 ν(N-O); 971 δ(=CH)<sub>винил</sub>; <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 4,30 (3H, *s*, =N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>); 7,20-7,52 (4H, *m*, CH=CH и пиридил), 7,60 (2H, *d*, *J* = 6,8 Hz, CH=CH), 8,20 (4H, *d*, *J* = 7,4 Hz, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 8,36 (4H, *d*, *J* = 7,4 Hz, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 8,57-8,62 (1H, *br.m.ovlp.* пиридил); <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 42,3 (=N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 124,2 (C<sub>11</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>11'</sub> и C<sub>13'</sub>), 124,6 (C<sub>7</sub> и C<sub>7'</sub>), 126,9 (C<sub>3</sub> и C<sub>5</sub>), 125,6 (C<sub>10</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>10'</sub> и C<sub>14'</sub>), 137,8 (C<sub>9</sub> и C<sub>9'</sub>), 139,5 (C<sub>8</sub> и C<sub>8'</sub>), 144,9 (C<sub>12</sub> и C<sub>12'</sub>), 155,2 (C<sub>4</sub>), 157,5 (C<sub>2</sub> и C<sub>6</sub>).

*1-метил-2,6-bis[2-(4-метоксифенил)етенил]пиридинијум-јодид (БВПЈ-13)*. Чврста супстанца жуте боје, принос: 59%, т.т. 207,8 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>INO<sub>2</sub> (M<sub>w</sub> = 485,36 g mol<sup>-1</sup>): С, 59,39; Н, 4,98; N, 2,89%, нађено: С, 59,63; Н, 5,21; N, 2,60%; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3046 ν(C-H)<sub>винил, арил</sub>, 2936 ν(C-H)<sub>алкил</sub>, 2833 ν(=N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub> и -OCH<sub>3</sub>), 1599, 1560, 1484 ν(C=C)<sub>арил</sub>, 1325, 1254 ν(C-N)<sub>пиридил</sub>, 1175, 1023 ν<sub>s</sub>(C-O)<sub>алкил</sub>, 978 δ(=CH)<sub>винил</sub>, 823 δ(-CH)<sub>арил</sub>; <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 3,84 (6H, *s*, -OCH<sub>3</sub>), 4,26 (3H, *s*, =N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 6,81 (4H, *d*, *J* = 7,8 Hz, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,06 (2H, *d*, *J* = 8,4 Hz, CH=CH), 7,51 (2H, *d*, *J* = 8,4 Hz, CH=CH), 7,79 (2H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, *J* = 4,8 Hz, пиридил), 8,22 (4H, *d*, *J* = 7,8 Hz, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 8,34-8,37 (1H, *m*, пиридил); <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 43,1(=N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 55,3(-OCH<sub>3</sub>), 114,1 (C<sub>11</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>11'</sub> и C<sub>13'</sub>), 126,3 (C<sub>7</sub> и C<sub>7'</sub>), 128,4 (C<sub>3</sub> и C<sub>5</sub>), 139,2 (C<sub>10</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>10'</sub> и C<sub>14'</sub>), 140,1 (C<sub>9</sub> и C<sub>9'</sub>), 141,93 (C<sub>8</sub> и C<sub>8'</sub>), 152,7 (C<sub>4</sub>), 153,84 (C<sub>2</sub> и C<sub>6</sub>), 159,8 (C<sub>12</sub> и C<sub>12'</sub>).

*1-метил-2,6-bis[2-(3,4-диметоксифенил)етенил]пиридинијум-јодид (БВПЈ-14)*. Чврста супстанца наранџасте боје, принос: 58%, т.т. 235 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>INO<sub>4</sub> (M<sub>w</sub> = 545,41 g mol<sup>-1</sup>): С, 57,26; Н, 5,17; N, 2,57%, нађено: С, 57,61; Н, 4,89; N, 3,01%; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3045 ν(C-H)<sub>винил, арил</sub>, 2925 ν(C-H)<sub>алкил</sub>, 2852 ν(=N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub> и -OCH<sub>3</sub>)<sub>алкил</sub>, 1599, 1561, 1484 ν(C=C)<sub>арил</sub>, 1357, 1322 ν(C-N)<sub>пиридил</sub>, 1273, 1249, 1016 ν(C-O)<sub>алкил</sub>, 965 δ(=CH)<sub>винил</sub>, 810 δ(-CH)<sub>арил</sub>; <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 3,85 (12H, *s*, *J* = 7,4 Hz, -OCH<sub>3</sub>), 4,29 (3H, *s*, =N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 7,07 (2H, *d*, *J* = 8,4 Hz, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,40 (2H, *d*, CH=CH и пиридил), 7,49-7,68 (6H, *m*, *J* = 8,4 Hz, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, пиридил и CH=CH), 8,21 (2H, *d*, *J* = 7,9 Hz, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>); 8,38 (1H, *t*, *J* = 7,1 Hz, пиридил); <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 43,2 (=N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 56,40 (-2OCH<sub>3</sub>), 60,71 (-2OCH<sub>3</sub>), 110,71 (C<sub>14</sub> и C<sub>14'</sub>), 114,14 (C<sub>11</sub> и C<sub>11'</sub>), 119,74 (C<sub>3</sub> и C<sub>5</sub>), 122,79 (C<sub>10</sub> и C<sub>10'</sub>), 126,40 (C<sub>7</sub> и C<sub>7'</sub>), 136,79 (C<sub>4</sub>), 140,8 (C<sub>9</sub> и C<sub>9'</sub>), 141,40 (C<sub>8</sub> и C<sub>8'</sub>), 153,61 (C<sub>2</sub> и C<sub>6</sub>), 155,68 (C<sub>12</sub> и C<sub>12'</sub>), 159,79 (C<sub>13</sub> и C<sub>13'</sub>).

*1-метил-2,6-bis[2-(3,4,5-триметоксифенил)етенил]пиридинијум-јодид (БВПЈ-15)*. Чврста супстанца наранџасте боје, принос: 61%, т.т. 236 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>INO<sub>6</sub> (M<sub>w</sub> = 605,46 g mol<sup>-1</sup>): С, 55,54; Н, 5,33; N, 2,31%, нађено: С, 55,21; Н, 5,83; N, 2,73%; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3045 ν(C-H)<sub>винил, арил</sub>, 2935 ν(C-H)<sub>алкил</sub>, 2833 ν(=N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub> и -OCH<sub>3</sub>)<sub>алкил</sub>, 1596, 1568,

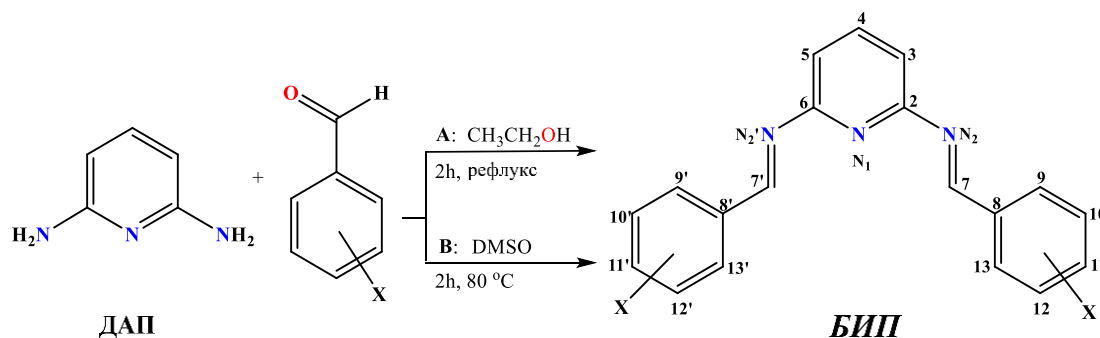


1484  $\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{арил}}$ , 1345, 1326  $\nu(\text{C}-\text{N})$ , 1247, 1122, 1020  $\nu(\text{C}-\text{O})_{\text{алкил}}$ , 964  $\delta(=\text{CH})$ , 820  $\delta(-\text{CH})_{\text{арил}}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ): 3,67 (6H, *s*,  $-\text{OCH}_3$ ), 3,86 (6H, *d*,  $J = 7,5$  Hz,  $-\text{OCH}_3$ ), 4,30 (3H, *s*,  $=\text{N}^+-\text{CH}_3$ ), 7,08 (2H, *d*,  $J = 8,4$  Hz,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ), 7,40-7,43 (2H, *m*,  $\text{CH}=\text{CH}$ ), 7,49-7,68 (6H, *m*,  $J = 8,4$  Hz,  $\text{C}_6\text{H}_4$ , пиридил и  $\text{CH}=\text{CH}$ ), 8,38 (1H, *br.m.ovl.*, пиридил);  $^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ): 43,2 ( $=\text{N}^+-\text{CH}_3$ ), 56,20 ( $-\text{OCH}_3$ ), 60,90 ( $-\text{OCH}_3$ ), 73,22 ( $-\text{OCH}_3$ ), 105,4 ( $\text{C}_{14}$  и  $\text{C}_{14}'$ ), 106,80 ( $\text{C}_{10}$  и  $\text{C}_{10}'$ ), 113,8 ( $\text{C}_{11}$  и  $\text{C}_{11}'$ ), 119,85 ( $\text{C}_3$  и  $\text{C}_5$ ), 126,35 ( $\text{C}_7$  и  $\text{C}_7'$ ), 136,45 ( $\text{C}_4$ ), 140,65 ( $\text{C}_8$  и  $\text{C}_8'$ ), 141,15 ( $\text{C}_9$  и  $\text{C}_9'$ ), 145,6 ( $\text{C}_{12}$  и  $\text{C}_{12}'$ ), 153,8 ( $\text{C}_2$  и  $\text{C}_6$ ), 156,1 ( $\text{C}_{13}$  и  $\text{C}_{13}'$ ).

### 3.3. СИНТЕЗА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ИМИНО ДЕРИВАТА ПИРИДИНА

#### 3.3.1. Синтеза и карактеризација симетричних $N,N'$ -(пиридин-2,6-диил)*bis*[1-(супституисаних фенил)]метанимина

Једињења  $N,N'$ -(пиридин-2,6-диил)*bis*[1-(супституисани фенил)]метанимини (**бис(имино)пиридини** – **БИП**) се добијају кондензацијом пиридин-2,6-диамина (ДАП) и одговарајућих алдехида. У циљу добијања једињења високе чистоће и приноса реакциони услови синтезе су оптимизовани у односу на моларни однос реактанта, температуре и растварача. При томе су пронађена два оптимизована поступка (**Поступак А** и **Поступак Б**).



Једињење	X <sup>[a]</sup>	Једињење	X <sup>[a]</sup>
<b>БИП-1</b>	H	<b>БИП-9</b>	2-хинолил <sup>[б, в]</sup>
<b>БИП-2</b>	1-нафтил <sup>[б, в]</sup>	<b>БИП-10</b>	8-хидрокси-2-хинолил <sup>[б, в]</sup>
<b>БИП-3</b>	4-CH <sub>3</sub>	<b>БИП-11</b>	4-Cl
<b>БИП-4</b>	4-OCH <sub>3</sub>	<b>БИП-12</b>	4-F
<b>БИП-5</b>	3,4,5-tri-OCH <sub>3</sub>	<b>БИП-13</b>	4-Br
<b>БИП-6</b>	2-OH	<b>БИП-14</b>	4- <i>N,N</i> -di-CH <sub>3</sub>
<b>БИП-7</b>	3-OH	<b>БИП-15</b>	4-NO <sub>2</sub>
<b>БИП-8</b>	4-OH	<b>БИП-16</b>	2-пиридил <sup>[б, в]</sup>

[a] Нумерација атома у односу на алдехид;

[б] Нумерација атома једињења **БИП-2**, **БИП-9**, **БИП-10** и **БИП-16** приказана је у прилогу на Слици П7.2;

[в] Супституент X је повезан са алдехидним остатком.

**Слика 3.2** Синтеза симетричних  $N,N'$ -(пиридин-2,6-диил)*bis*[1-(супституисаних фенил)]метанимина (**БИП**)

За синтезу једињења **БИП-1**, **БИП-2**, **БИП-3**, **БИП-6**, **БИП-12** и **БИП-16** у раствор ДАП-а (10 mmol) у етанолу (100 mL) укапава се раствор одговарајућих алдехида (21 mmol) у етанолу (50 mL) (**поступак А** на слици 3.2), а за остала једињења раствор одговарајућих алдехида у диметил-сулфоксиду (DMSO) (20 mL) (**поступак Б** на слици 3.2). Реакциона смеша се загрева 2 сата уз рефлукс (**поступак А**) или на 80 °C у атмосфери азота (**поступак Б**). Завршетак реакције прати се помоћу танкослојне хроматографије. По завршетку реакције,

талог се одвоји од врућег раствора вакуум филтрацијом, испира апсолутним етанолом и суши на ваздуху (**поступак А**) или у атмосфери азота (**поступак Б**).

Чистоћа и структура синтетисаних једињења је потврђена одређивањем тачке топљења, елементалном анализом, FTIR, HRMS и ESR спектроскопијом.

*N,N'*-(пиридин-2,6-диил)bis[1-(фенил)]метанимин (**БИП-1**). Чврста супстанца жуте боје, принос 57%; т.т. >250 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub> (M<sub>w</sub> = 285,35 g mol<sup>-1</sup>): С, 79,98; Н, 5,30; N, 14,73%; нађено: С, 79,91; Н, 5,36; N, 14,68%; IR, cm<sup>-1</sup>: 3377brd ν(C-H) пиридил, 3057, 3025w ν(C-H)арил, 2926md ν(C-H)алкил, 1663sshp ν(C=N)азометин, 1578sshp, 1445md ν(C=C)арил, 1224w ν(C=N)пиридил, 1090md, 1027md, 700st δ(C-H)арил; HRMS: израчунато за C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 286,1347, измерено: 286,1346.

*N,N'*-(пиридин-2,6-диил)bis[1-(1-нафтил)]метанимин (**БИП-2**). Чврста супстанца жуте боје, принос 55%; т.т. >270 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>27</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub> (M<sub>w</sub> = 385,47 g mol<sup>-1</sup>): С, 84,13; Н, 4,97; N, 10,90%; нађено: С, 84,05; Н, 5,07; N, 11,00%; IR, cm<sup>-1</sup>: 3378brd ν(C-H)пиридил, 3058w ν(C-H)арил, 2926md ν(C-H)алкил, 1600sshp ν(C=N)азометин, 1584sshp, 1477w ν(C=C)арил, 1216w ν(C=N)пиридил, 1022md, 770st δ(C-H)арил; HRMS: израчунато за C<sub>27</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 386,1678, измерено: 386,1680.

*N,N'*-(пиридин-2,6-диил)bis[1-(4-метилфенил)]метанимин (**БИП-3**). Чврста супстанца жуте боје, принос 42%; т.т. >280 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub> (M<sub>w</sub> = 313,40 g mol<sup>-1</sup>): С, 80,48; Н, 6,11; N, 13,41%; нађено: С, 80,35; Н, 6,03; N, 13,52%; IR, cm<sup>-1</sup>: 3379brd ν(C-H)пиридил, 3020md ν(C-H)арил, 2920w, 2863md ν(C-H)алкил, 1595sshp ν(C=N)азометин, 1509w, 1478w ν(C=C)арил, 1222w, 1170w ν(C=N)пиридил, 1020md, 778md δ(C-H)арил; HRMS: израчунато за C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 314,1657, измерено: 314,1657.

*N,N'*-(пиридин-2,6-диил)bis[1-(4-метоксифенил)]метанимин (**БИП-4**). Чврста супстанца жуте боје, принос 70%; т.т. >270 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (M<sub>w</sub> = 345,40 g mol<sup>-1</sup>): С, 73,03; Н, 5,54; N, 12,17%; нађено: С, 72,98; Н, 5,58; N, 12,20%; IR, cm<sup>-1</sup>: 3377brd ν(C-H)пиридил, 3065w, 3000w ν(C-H)арил, 2932md, 2834md ν((C-H)алкил и (C-H из CH<sub>3</sub>-O)), 1609sshp ν(C=N)азометин, 1508md, 1461md (C=C)арил, 1247st и 1172st ν(Саромат.-О и CH<sub>3</sub>-О), 1110w ν(C=N)пиридил, 1031md, 810md δ(C-H)арил; HRMS: израчунато за C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 346,1561, измерено: 346,1559.

*N,N'*-(пиридин-2,6-диил)bis[1-(3,4,5-метоксифенил)]метанимин (**БИП-5**). Чврста супстанца жуте боје, принос 48%; т.т. >250 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> (M<sub>w</sub> = 465,51 g mol<sup>-1</sup>): С, 64,51; Н, 5,85; N, 9,03%; нађено: С, 64,48; Н, 5,90; N, 9,10%; IR, cm<sup>-1</sup>: 3371 brd ν(C-H)пиридил, 3060w, 3000w ν(C-H)арил, 2937md, 2834md, ν((C-H)алкил и (C-H из CH<sub>3</sub>-O)), 1599sshp ν(C=N)азометин, 1502md, 1462md ν(C=C)арил, 1232s, 1183st ν(Саромат.-О и CH<sub>3</sub>-О), 1125st ν(C=N)азометин, 1003md, 776w δ(C-H)арил; HRMS: израчунато за C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 466,1899, измерено: 466,1901.

*N,N'*-(пиридин-2,6-диил)bis[1-(2-хидроксифенил)]метанимин (**БИП-6**)<sup>40</sup>. Чврста супстанца жуте боје, принос: 69%; т.т. >250 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (M<sub>w</sub> = 317,35 g mol<sup>-1</sup>): С, 71,91; Н, 4,76; N, 13,24%; нађено: С, 71,98; Н, 4,81; N, 13,16%; IR, cm<sup>-1</sup>: 3480brd ν(O-H), 3373brd (C-H)пиридил, 3057w ν(C-H)арил, 2927st ν(C-H)алкил, 1605shp ν(C=N)азометин 1555md, 1479w ν(C=C)арил, 1228st ν(C=N)пиридил, 1152 ν(Саромат.-OH), 1017md, 755w δ(C-H)арил; HRMS: израчунато за C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 318,1287, измерено: 318,11280.

*N,N'*-(пиридин-2,6-диил)bis[1-(3-хидроксифенил)]метанимин (**БИП-7**). Чврста супстанца жуте боје, принос 45%; т.т. >250 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (M<sub>w</sub> = 317,35 g mol<sup>-1</sup>): С, 71,91; Н, 4,76; N, 13,24%; нађено: С,72,01; Н, 4,68; N, 13,19%; IR, cm<sup>-1</sup>: 3425brd ν(O-

H), 3362brd  $\nu(\text{C-H})_{\text{пиридил}}$ , 3030w  $\nu(\text{C-H})_{\text{арил}}$ , 2927st  $\nu(\text{C-H})_{\text{алкил}}$ , 1595sshp  $\nu(\text{C=N})_{\text{азометин}}$ , 1481md, 1478w  $\nu(\text{C=C})_{\text{арил}}$ , 1230st  $\nu(\text{C=N})_{\text{пиридил}}$ , 1147  $\nu(\text{C}_{\text{аромат.}}-\text{OH})$ , 1000md, 781  $\delta(\text{C-H})_{\text{арил}}$ ; HRMS: израчунато за  $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 318,1287, измерено: 318,11280.

*N,N'*-(пиридин-2,6-диил)bis[1-(4-хидроксифенил)]метанимин (**БИП-8**)<sup>41</sup>. Чврста супстанца жуте боје, принос: 45%; т.т. >250 °C. Елементална анализа: израчунато за  $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$  ( $M_w = 317,35 \text{ g mol}^{-1}$ ): C, 71,91; H, 4,76; N, 13,24%; нађено: C, 71,85; H, 4,82; N, 13,18%; IR,  $\text{cm}^{-1}$ : 3451brd  $\nu(\text{O-H})$ , 3373brd  $\nu(\text{C-H})_{\text{пиридил}}$ , 3059w  $\nu(\text{C-H})_{\text{арил}}$ , 2926st  $\nu(\text{C-H})_{\text{алкил}}$  1615sshp  $\nu(\text{C=N})_{\text{азометин}}$ , 1509md, 1479w  $\nu(\text{C=C})$ , 1215st  $\nu(\text{C=N})_{\text{пиридил}}$ , 1152  $\nu(\text{C}_{\text{аромат.}}-\text{OH})$ , 1010md, 801st  $\delta(\text{C-H})$ ; HRMS: израчунато за  $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 318,1287, измерено: 318,11280.

*N,N'*-(пиридин-2,6-диил)bis[1-(2-хинолил)]метанимин (**БИП-9**). Чврста супстанца жуте боје, принос: 71%; т.т. >280 °C. Елементална анализа: израчунато за  $\text{C}_{25}\text{H}_{17}\text{N}_5$  ( $M_w = 387,45 \text{ g mol}^{-1}$ ): C, 77,50; H, 4,42; N, 18,08%; нађено: C, 77,45; H, 4,48; N, 18,12%; IR,  $\text{cm}^{-1}$ : 3379 brd  $\nu(\text{C-H})_{\text{пиридил}}$ , 3055w  $\nu(\text{C-H})_{\text{арил}}$ , 2927st  $\nu(\text{C-H})_{\text{алкил}}$ , 1597sshp  $\nu(\text{C=N})_{\text{азометин}}$ , 1503md, 1478md  $\nu(\text{C=C})_{\text{арил}}$ , 1306md  $\nu(\text{C=N})_{\text{хинолил}}$ , 1233md  $\nu(\text{C=N})_{\text{пиридил}}$ , 1043md, 1023md,  $\delta(\text{C-H})_{\text{арил}}$ , хинолил, 780st  $\delta(\text{C-H})_{\text{арил}}$ ; HRMS: израчунато за  $\text{C}_{25}\text{H}_{18}\text{N}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 388,1455, измерено: 388,1456.

*N,N'*-(пиридин-2,6-диил)bis[1-(8-хидрокси-2-хинолил)]метанимин (**БИП-10**)<sup>42</sup>. Чврста супстанца црвене боје, принос 68%; т.т. >280 °C. Елементална анализа: израчунато за  $\text{C}_{25}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_2$  ( $M_w = 419,14 \text{ g mol}^{-1}$ ): C, 71,59; H, 4,09; N, 16,70; %; нађено: C, 71,52; H, 4,05; N, 16,77 %; IR,  $\text{cm}^{-1}$ : 3425brd  $\nu(\text{O-H})$ , 3387brd  $\nu(\text{C-H})_{\text{пиридил}}$ , 3032w  $\nu(\text{C-H})_{\text{арил}}$ , 2927st  $\nu(\text{C-H})_{\text{алкил}}$ , 1596sshp  $\nu(\text{C=N})_{\text{азометин}}$ , 1504md, 1478md  $\nu(\text{C=C})_{\text{арил}}$ , 1326md  $\nu(\text{C=N})_{\text{хинолил}}$ , 1238st,  $\nu(\text{C=N})_{\text{пиридил}}$ , 1195brd  $\nu(\text{C}_{\text{аромат.}}-\text{OH})$ , 1076md, 1011md  $\delta(\text{C-H})_{\text{арил}}$ , хинолил, 781md  $\delta(\text{C-H})_{\text{арил}}$ ; HRMS: израчунато за  $\text{C}_{25}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 420,1402, измерено: 420,1410.

*N,N'*-(пиридин-2,6-диил)bis[1-(4-хлорфенил)]метанимин (**БИП-11**)<sup>43</sup>. Чврста супстанца жуте боје, принос: 72%; т.т. >275 °C. Елементална анализа: израчунато за  $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}_3$  ( $M_w = 354,23 \text{ g mol}^{-1}$ ): C, 64,42; H, 3,70; N, 11,86%; нађено: C, 64,51; H, 6,64; N, 11,83%; IR,  $\text{cm}^{-1}$ : 3382brd  $\nu(\text{C-H})_{\text{пиридил}}$ , 3040w  $\nu(\text{C-H})_{\text{арил}}$ , 2923st  $\nu(\text{C-H})_{\text{алкил}}$ , 1600sshp  $\nu(\text{C=N})_{\text{азометин}}$  1487md, 1468md  $\nu(\text{C=C})_{\text{арил}}$ , 1229md  $\nu(\text{C=N})_{\text{пиридил}}$ , 1089sshp  $\nu(\text{C}_{\text{аромат.}}-\text{Cl})$ , 1013md, 791w  $\delta(\text{C-H})_{\text{арил}}$ ; HRMS: израчунато за  $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 355,0541, измерено: 355,0546.

*N,N'*-(пиридин-2,6-диил)bis[1-(4-флуорфенил)]метанимин (**БИП-12**). Чврста супстанца жуте боје, принос: 78%; т.т. >275 °C. Елементална анализа: израчунато за  $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{F}_2\text{N}_3$  ( $M_w = 321,33 \text{ g mol}^{-1}$ ): C, 71,02; H, 4,08; N, 13,08%; нађено: C, 70,94; H, 4,12; N, 13,11%; IR,  $\text{cm}^{-1}$ : 3388brd  $\nu(\text{C-H})_{\text{пиридил}}$ , 3066w  $\nu(\text{C-H})_{\text{арил}}$ , 2923st  $\nu(\text{C-H})_{\text{алкил}}$ , 1600sshp  $\nu(\text{C=N})_{\text{азометин}}$ , 1506md, 1477md  $\nu(\text{C=C})_{\text{арил}}$ , 1227st  $\nu(\text{C=N})_{\text{пиридил}}$ , 1152st,  $\nu(\text{C}_{\text{аромат.}}-\text{F})$ , 1014md, 768md  $\delta(\text{C-H})_{\text{арил}}$ ; HRMS: израчунато за  $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{F}_2\text{N}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 322,1156, измерено: 322,1150.

*N,N'*-(пиридин-2,6-диил)bis[1-(4-бромфенил)]метанимин (**БИП-13**). Чврста супстанца жуте боје, принос: 76%; т.т. >270 °C. Елементална анализа: израчунато за  $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{Br}_2\text{N}_3$  ( $M_w = 443,14 \text{ g mol}^{-1}$ ): C, 51,50; H, 2,96; N, 9,48%; нађено: C, 51,58; H, 3,01; N, 9,42%; IR,  $\text{cm}^{-1}$ : 3378 brd  $\nu(\text{C-H})_{\text{пиридил}}$ , 3047w  $\nu(\text{C-H})_{\text{арил}}$ , 2924st  $\nu(\text{C-H})_{\text{алкил}}$ , 1590sshp  $\nu(\text{C=N})_{\text{азометин}}$ , 1482md, 1448w  $\nu(\text{C=C})_{\text{арил}}$ , 1227w  $\nu(\text{C=N})_{\text{пиридил}}$ , 1010m, 797md  $\delta(\text{C-H})_{\text{арил}}$ ; HRMS: израчунато за  $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{Br}_2\text{N}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 444,7546, измерено: 444,7545.

*N,N'*-(пиридин-2,6-диил)bis[1-(4-диметиламинофенил)]метанимин (**БИП-14**)<sup>8</sup>. Чврста супстанца жуте боје, принос: 78%; т.т. >285 °C. Елементална анализа: израчунато за  $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{Br}_2\text{N}_5$  ( $M_w = 371,49 \text{ g mol}^{-1}$ ): C, 74,36; H, 6,78; N, 18,85%; нађено: C, 74,27; H, 6,83; N, 18,92%; IR,  $\text{cm}^{-1}$ : 3370 brd  $\nu(\text{C-H})_{\text{пиридил}}$ , 3030w  $\nu(\text{C-H})_{\text{арил}}$ , 2927s, 2856md  $\nu((\text{C-H})_{\text{алкил}} \text{ и } \text{C-H} \text{ из } \text{CH}_3-\text{N}=\text{)}$ , 1611sshp  $\nu(\text{C=N})_{\text{азометин}}$ , 1502md 1478w  $\nu(\text{C=C})_{\text{арил}}$ , 1360md  $\nu(\text{C}_{\text{аромат.}}-\text{N})$ , 1227st

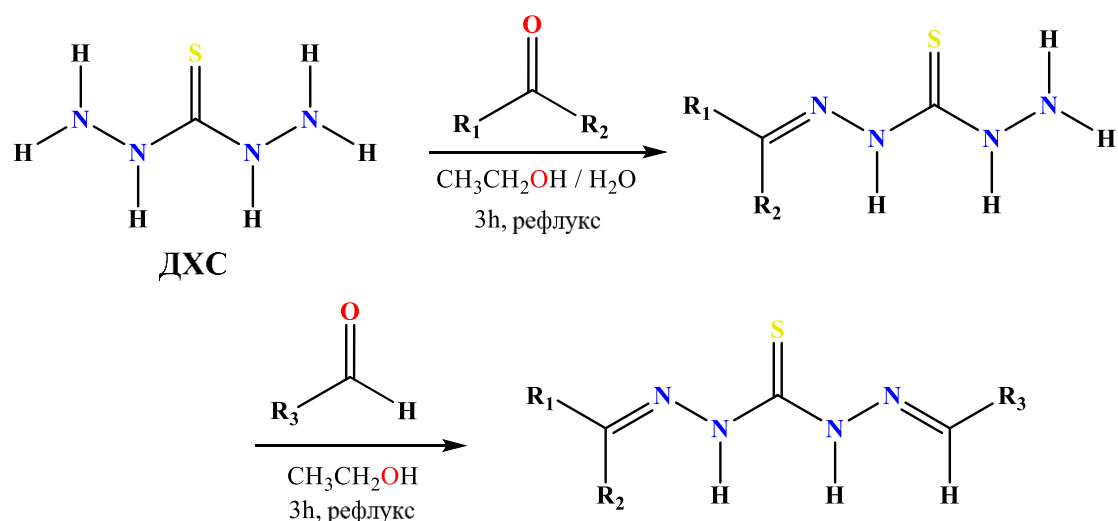
$\nu(\text{C}=\text{N})_{\text{пиридил}}$ , 1091md  $\nu(\text{C}_{\text{алифат}}-\text{N})$  и  $\delta(\text{C}-\text{H})_{\text{арил}}$ , 799st  $\delta(\text{C}-\text{H})_{\text{арил}}$ ; HRMS: израчунато за  $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{Br}_2\text{N}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 372,2232, измерено: 372,2230.

*N,N'*-(пиридин-2,6-диил)bis[1-(4-нитрофенил)]метанимин (**БИП-15**). Чврста супстанца наранџасте боје, принос: 49%; т.т. >275 °C. Елементална анализа: израчунато за  $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2$  ( $M_w = 375,34 \text{ g mol}^{-1}$ ): C, 60,80; H, 3,49; N, 18,66%; нађено: C, 60,76; H, 3,51; N, 18,73%; IR,  $\text{cm}^{-1}$ : 3362 brd  $\nu(\text{C}-\text{H})_{\text{пиридил}}$ , 3030w  $\nu(\text{C}-\text{H})_{\text{арил}}$ , 2927st  $\nu(\text{C}-\text{H})_{\text{алкил}}$ , 1597sshp  $\nu(\text{C}=\text{N})_{\text{азометин}}$ , 1500md, 1478w  $(\text{C}=\text{C})_{\text{арил}}$ , 1350  $\nu(\text{N}=\text{O})$ , 1228st  $\nu(\text{C}=\text{N})_{\text{пиридил}}$ , 1023md, 829st  $\delta(\text{C}-\text{H})_{\text{арил}}$ ; HRMS: израчунато за  $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 376,1019, измерено: 376,1021.

*N,N'*-(пиридин-2,6-диил)bis[1-(2-пиридинил)]метанимин (**БИП-16**). Чврста супстанца жуте боје, принос: 68%; т.т. >250 °C. Елементална анализа: израчунато за  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_5$  ( $M_w = 287,33 \text{ g mol}^{-1}$ ): C, 71,06; H, 4,56; N, 24,37%; нађено: C, 71,10; H, 4,61; N, 24,31%; IR,  $\text{cm}^{-1}$ : 3372 brd  $\nu(\text{C}-\text{H})_{\text{пиридил}}$ , 3045w  $\nu(\text{C}-\text{H})_{\text{арил}}$ , 2927st  $\nu(\text{C}-\text{H})_{\text{алкил}}$ , 1614sshp  $\nu(\text{C}=\text{N})_{\text{азометин}}$ , 1500md, 1478w  $\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{арил}}$ , 1300md  $\nu(\text{C}=\text{N})_{\text{арил}}$ , 1240st  $\nu(\text{C}=\text{N})_{\text{пиридил}}$ , 1076md, 1049md, 768st  $\delta(\text{C}-\text{H})_{\text{арил}}$ ; HRMS: Израчунато за  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 288,1315, измерено: 288,1321.

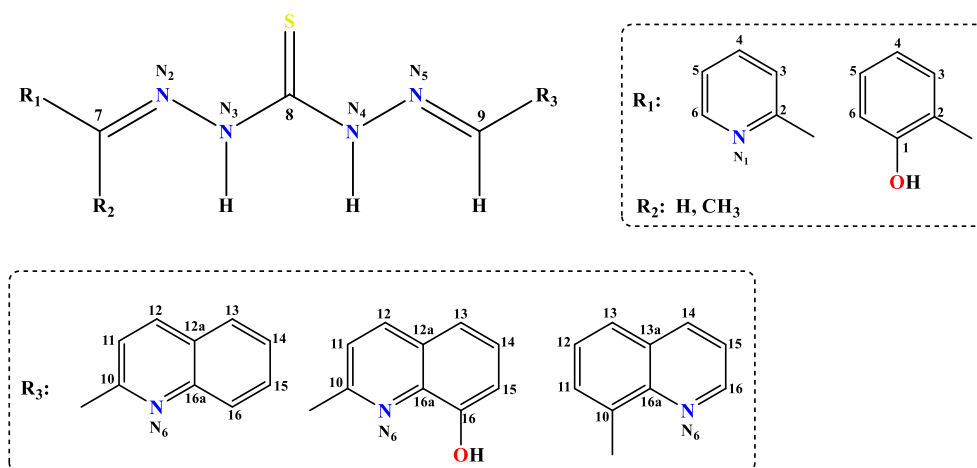
### 3.3.2. Општи поступак синтезе асиметричних дихидразона тиокарбохидразида

Синтеза свих асиметричних дихидразона тиокарбохидразида (дТКХ) је изведена у два корака реакцијом кондензације према шеми приказаној на Слици 3.3.



Једињење	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
дТКХ <sub>2фп-1</sub>	2-Пиридил	H	2-хинолил
дТКХ <sub>2фп-2</sub>	2-Пиридил	H	8-хидрокси-2-хинолил
дТКХ <sub>2фп-3</sub>	2-Пиридил	H	8-хинолил
дТКХ <sub>2ап-1</sub>	2-Пиридил	CH <sub>3</sub>	2-хинолил
дТКХ <sub>2ап-2</sub>	2-Пиридил	CH <sub>3</sub>	8-хидрокси-2-хинолил
дТКХ <sub>2ап-3</sub>	2-Пиридил	CH <sub>3</sub>	8-хинолил
дТКХ <sub>2сал-1</sub>	2-Хидроксифенил	H	2-хинолил
дТКХ <sub>2сал-2</sub>	2-Хидроксифенил	H	8-хидрокси-2-хинолил
дТКХ <sub>2сал-3</sub>	2-Хидроксифенил	H	8-хинолил

Слика 3.3. Општи поступак синтезе асиметричних дихидразона тиокарбохидразида (дТКХ)



Слика 3.4. Нумерација атома новосинтетисаних дТКХ

Најпре је извршена синтеза монохидразона тиокарбохидразида (**мТКХ**) према процедури описаној у литератури<sup>4</sup>. **мТКХ**: (2-пиридинилметилен) дихидразид тиоугљене киселине (**мТКХ<sub>2фп</sub>**), [1-(2-пиридинил)етилиден] дихидразид тиоугљене киселине (**мТКХ<sub>2ап</sub>**) и [(2-хидроксифенил)метилен] дихидразид тиоугљене киселине (**мТКХ<sub>2сал</sub>**) се добијају кондензацијом 1 mmol тиокарбохидразида дихидразида тиоугљене киселине (ТКХ) и 0,5 mmol одговарајућег алдехида или кетона у смеси етанола (30 mL) и дестиловане воде (10 mL). Реакциона смеша се загрева 3 сата уз рефлукс. Настали талог се профилира и пречисти кристализацијом из етанола или метанола.

Чистоћа и структура **мТКХ** је потврђена температуром топљења, елементалном анализом, FTIR и NMR (<sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C) спектроскопијом, и сви добијени резултати су у складу са подацима датим у литератури<sup>4</sup>.

У следећем кораку синтезе добијају се **дТКХ** реакцијом кондензације одговарајућег **мТКХ** (1 mmol) и хинолин алдехида (1,1 mmol) у апсолутном етанолу (20 mL) као растварачу. Смеша се загрева 3 сата уз рефлукс на уљаном купатилу. Настали талог се филтрира вакуум филтрацијом, испира са већом количином етанола, суши на ваздуху и пречисти кристализацијом из етанола.

На основу разлике ароматичних прстенова алдехида или кетона присутних у структури молекула, положају иминске групе у односу на пиридински и хинолински атом азота као и типу супституената на иминској вези (H или CH<sub>3</sub>) синтетисана једињења су подељена у три групе:

1. [1-(1-(2-пиридил)метилен)-5-(супституисани хинолил)] карбонтио дихидразиди (**дТКХ<sub>2фп</sub>**)
2. [1-(1-(2-пиридил)етилиден)-5-(супституисани хинолил)] карбонтио дихидразиди (**ТКХ<sub>2ап</sub>**)
3. [1-(1-(2-хидроксифенил)метилен)-5-(супституисани хинолил)] карбонтио дихидразиди (**дТКХ<sub>2сал</sub>**)

Чистоћа и структура синтетисаних једињења је потврђена одређивањем тачке топљења, елементалном анализом, FTIR и NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, 2D) спектроскопијом.

### 3.3.2.1. Синтеза и карактеризација асиметричних [1-(1-(2-пиридил)метилен)-5-(супституисани хинолил)]карбонтиодихидразида (**дТКХ<sub>2фп</sub>** (1-5))

Синтеза дТКХ<sub>2</sub>фп(1-5) је изведена реакцијом кондензације 1 mmol мТКХ<sub>2</sub>фп и одговарајућих хинолин алдехида (1,1 mmol) на начин предходно описан у делу 3.3.2.

[1-(1-(2-пиридил)метил)-5-(2-хинолил)]карбонтиодихидразид (дТКХ<sub>2</sub>фп-1). Чврста супстанца жуте боје, принос: 81%, т.т. 181-182 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>6</sub>S (M<sub>w</sub> = 334,40g mol<sup>-1</sup>): C, 61,06; H, 4,22; N, 25,13; S, 9,59%; нађено: C, 61,44; H, 4,32; N, 24,62; S, 9,10; %; IR, cm<sup>-1</sup>: 3108w ν(N-H), 3046w ν(C-H)<sub>арил</sub>, 1601md, 1597md ν(C=N)<sub>азометин</sub>, 1529st, 1495w 1240w, 955w ν(S=C-NH: Тиоамид I, II, III и IV редом и (C=C)<sub>арил</sub>), 1299md ν(C=N)<sub>пиридил, хинолил</sub>, 1229md ν(C=S), 1155md ν(N-N); <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 7,42-7,93 (4H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, (C<sub>4</sub>-H и C<sub>5</sub>-H)<sub>пиридил</sub>, (C<sub>14</sub>-H и C<sub>15</sub>-H)<sub>хинолил</sub>), 8,02-8,06(3H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, пиридил, C<sub>13</sub>-H и C<sub>16</sub>-H), 8,14-8,31 (1H, *d*, *J* = 7,5 Hz, хинолил), 8,39 (1H, *s*, C<sub>9</sub>-H), 8,45-8,47 (1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>11</sub>-H), 8,63-8,64 8,39 (1H, *s*, C<sub>7</sub>-H), 8,91-8,92 (1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>6</sub>-H), 12,12-12,58 (2H, *s*, N<sub>3</sub> и N<sub>4</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 118,76 (C<sub>11</sub>), 120,81 (C<sub>3</sub>), 124,87 (C<sub>5</sub>), 125,54 (C<sub>14</sub>), 127,30 (C<sub>13</sub>), 127,78 (C<sub>12a</sub>), 128,38 (C<sub>15</sub>), 129,41 (C<sub>16</sub>), 130,51 (C<sub>4</sub>), 136,96 (C<sub>12</sub>), 137,40 (C<sub>9</sub>), 144,31 (C<sub>16a</sub>), 148,72 (C<sub>6</sub>), 149,99 (C<sub>10</sub>), 153,21 (C<sub>7</sub>), 153,63 (C<sub>2</sub>), 175,61 (C<sub>8</sub>); Тиол облик: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 7,42-7,93 (4H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, (C<sub>4</sub>-H и C<sub>5</sub>-H)<sub>пиридил</sub>, (C<sub>14</sub>-H и C<sub>15</sub>-H)<sub>хинолил</sub>), 8,02-8,06 (3H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, пиридил, C<sub>13</sub>-H и C<sub>16</sub>-H), 8,14-8,31 (1H, *d*, *J* = 7,5 Hz, хинолил), 8,39 (1H, *s*, C<sub>9</sub>-H), 8,45-8,47 (1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>11</sub>-H), 8,63-8,64 (1H, *s*, C<sub>7</sub>-H), 8,91-8,92 (1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>6</sub>-H), 12,01-12,48 (1H, *s*, N<sub>3</sub>), 15,48 (1H, *s*, S-H); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 117,76 (C<sub>11</sub>), 120,81 (C<sub>3</sub>), 124,87 (C<sub>5</sub>), 125,54 (C<sub>14</sub>), 127,30 (C<sub>13</sub>), 127,78 (C<sub>12a</sub>), 128,36 (C<sub>15</sub>), 129,41 (C<sub>16</sub>), 130,73 (C<sub>4</sub>), 136,96 (C<sub>12</sub>), 137,40 (C<sub>9</sub>), 144,31 (C<sub>16a</sub>), 147,85 (C<sub>6</sub>), 149,99 (C<sub>10</sub>), 152,15 (C<sub>7</sub>), 153,63 (C<sub>2</sub>), 176,78(C<sub>8</sub>).

[1-(1-(2-пиридил)метил)-5-(8-хидрокси-2-хинолил)]карбонтиодихидразид (дТКХ<sub>2</sub>фп-2).

Чврста супстанца жуте боје, принос: 88%, т.т. 207-208 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>6</sub>OS (M<sub>w</sub> = 350,40g mol<sup>-1</sup>): C, 58,27; H, 4,03; N, 23,98; S, 9,15%; нађено: C, 57,83; H, 4,04; N, 23,68; S, 9,06; %; IR, cm<sup>-1</sup>: 3404md ν(O-H), 3100md ν(N-H), 3046w ν(C-H)<sub>арил</sub>, 1606md, 1580md ν(C=N)<sub>азометин</sub>, 1532st, 1502md, 1249w, 962w ν(S=C-NH: Тиоамид I, II, III и IV редом и (C=C)<sub>арил</sub>), 1324md, 1298md ν(C=N)<sub>пиридил, хинолил</sub>, 1229st ν(C=S), 1155md ν(N-N); Тион/Тиол (60:40). Тион облик: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 7,15 (1H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>15</sub>-H), 7,46 (2H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>5</sub>-H и C<sub>14</sub>-H), 7,79 (1H, *d*, C<sub>9</sub>-H), 7,90 (2H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>4</sub>-H и C<sub>3</sub>-H), 8,15 (1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>13</sub>-H), 8,36 (1H, *d*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>12</sub>-H), 8,44 (1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>11</sub>-H), 8,60 (1H, *s*, C<sub>7</sub>-H), 8,92 (1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>6</sub>-H), 9,95 (1H, *s*, O-H), 12,26-12,65 (2H, *s*, N<sub>3</sub> и N<sub>4</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 112,18 (C<sub>15</sub>), 117,84 (C<sub>13</sub>), 120,37 (C<sub>11</sub>), 124,42 (C<sub>3</sub>), 125,11 (C<sub>5</sub>), 126,85 (C<sub>14</sub>), 128,33 (C<sub>12a</sub>), 129,41 (C<sub>16</sub>), 136,33 (C<sub>4</sub>), 136,77 (C<sub>12</sub>), 137,40 (C<sub>9</sub>), 144,31 (C<sub>16a</sub>), 148,72 (C<sub>6</sub>), 149,56 (C<sub>10</sub>), 151,44 (C<sub>7</sub>), 153,65 (C<sub>2</sub>), 175,57 (C<sub>8</sub>); Тиол облик: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 7,18 (1H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>15</sub>-H), 7,46 (1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>14</sub>-H), 7,78-7,80 (2H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>5</sub>-H и C<sub>9</sub>-H), 7,89 (1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>4</sub>-H), 8,04-8,14 (2H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, пиридил, C<sub>13</sub>-H), 8,36-8,44 (2H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>11</sub>-H и C<sub>12</sub>-H), 8,60 (1H, *s*, C<sub>7</sub>-H), 8,92 (1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>6</sub>-H), 9,94 (1H, *s*, O-H), 12,01 (1H, *s*, N<sub>3</sub>-H), 15,48 (1H, *s*, S-H); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 112,50 (C<sub>15</sub>), 117,07 (C<sub>13</sub>), 120,37 (C<sub>11</sub>), 124,42 (C<sub>3</sub>), 125,11 (C<sub>5</sub>), 126,85 (C<sub>14</sub>), 128,53 (C<sub>12a</sub>), 129,41 (C<sub>16</sub>), 130,73 (C<sub>4</sub>), 136,77 (C<sub>12</sub>), 137,40 (C<sub>9</sub>), 144,31 (C<sub>16a</sub>), 147,85 (C<sub>6</sub>), 149,56 (C<sub>10</sub>), 151,44 (C<sub>7</sub>), 153,46 (C<sub>2</sub>), 176,81 (C<sub>8</sub>).

[1-(1-(2-пиридил)метил)-5-(8-хинолил)]карбонтиодихидразид (дТКХ<sub>2</sub>фп-3).

Чврста супстанца жуте боје, принос: 75%, т.т. 178-179 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>6</sub>S (M<sub>w</sub> = 334,40g mol<sup>-1</sup>): C, 61,06; H, 4,22; N, 25,13; S, 9,59%; нађено: C, 60,77; H, 4,16; N, 25,08; S, 9,71 %; IR, cm<sup>-1</sup>: 3106w ν(N-H), 3047w ν(C-H)<sub>арил</sub>, 1599md, 1587md ν(C=N)<sub>азометин</sub>, 1525st, 1495w 1257w, 954w ν(S=C-NH: Тиоамид I, II, III и IV редом и (C=C)<sub>арил</sub>), 1390md, 1283md ν(C=N)<sub>пиридил, хинолил</sub>, 1237md ν(C=S), 1122st ν(N-N); Тион/Тиол (68:32). Тион облик: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 7,38 (1H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>5</sub>-H), 7,60 (3H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>14</sub>-H, C<sub>15</sub>-H и C<sub>4</sub>-H), 8,09 (3H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, пиридил, C<sub>13</sub>-H, C<sub>16</sub>-H), 8,43 (1H, *d*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>12</sub>-H), 8,58 (1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>11</sub>-H), 8,79 (1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>6</sub>-H), 8,97 (1H, *d*, C<sub>7</sub>-H), 9,44 (1H,

*d*, C<sub>9</sub>-H), 12,15-12,43 (2H, *s*, N<sub>3</sub> и N<sub>4</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 122,32(C<sub>16</sub>) 122,36 (C<sub>11</sub>), 120,81 (C<sub>3</sub>), 125,41 (C<sub>5</sub>), 127,01 (C<sub>14</sub>), 128,48 (C<sub>13</sub>), 127,78 (C<sub>12a</sub>), 128,38 (C<sub>15</sub>), 129,41, 130,51 (C<sub>4</sub>), 136,96 (C<sub>12</sub>), 137,40 (C<sub>9</sub>), 144,31 (C<sub>16a</sub>), 148,61 (C<sub>6</sub>), 149,88 (C<sub>10</sub>), 150,82 (C<sub>7</sub>), 151,90 (C<sub>2</sub>), 175,50 (C<sub>8</sub>); Тиол облик: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 7,38 (1H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>5</sub>-H), 7,60-7,71 (3H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>14</sub>-H, C<sub>15</sub>-H и C<sub>4</sub>-H), 8,09 (3H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, пиридил C<sub>13</sub>-H, C<sub>16</sub>-H), 8,43 (1H, *d*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>12</sub>-H), 8,97 (1H, *d*, C<sub>7</sub>-H), 9,44 (1H, *d*, C<sub>9</sub>-H), 8,58 (1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>11</sub>-H), 8,79 (1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>6</sub>-H), 12,08 (1H, *s*, N<sub>3</sub>-H), 15,48 (1H, *s*, S-H); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 122,36 (C<sub>16</sub>), 124,74 (C<sub>11</sub>), 120,81 (C<sub>3</sub>), 125,64 (C<sub>5</sub>), 127,09 (C<sub>14</sub>), 128,48 (C<sub>13</sub>), 127,78 (C<sub>12a</sub>), 128,36 (C<sub>15</sub>), 122,36 (C<sub>16</sub>), 130,73 (C<sub>4</sub>), 136,96 (C<sub>12</sub>), 137,40 (C<sub>9</sub>), 144,31 (C<sub>16a</sub>), 148,61 (C<sub>6</sub>), 149,88 (C<sub>10</sub>), 150,82 (C<sub>7</sub>), 151,11 (C<sub>2</sub>), 175,70 (C<sub>8</sub>).

### 3.3.2.2. Синтеза и карактеризација асиметричних [1-(1-(2-пиридил)етилиден)-5-(супституисани хинолил)]карбонтиодихидразида (дТКХ<sub>2ап</sub>(1-5))

Једињења дТКХ<sub>2ап</sub>(1-5) се добијају реакцијом мТКХ<sub>2ап</sub> и одговарајућих хинолин алдехида у молском односу 1: 1,1 како је предходно описано у делу 3.3.2.

[1-(1-(2-пиридил)етилиден)-5-(2-хинолил)]карбонтиодихидразид (дТКХ<sub>2ап</sub>-1). Чврста супстанца жуте боје, принос: 78%, т.т. 186-187 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>S (Mw = 348,43g mol<sup>-1</sup>): C, 62,05; H, 4,63; N, 24,12; S, 9,20%; нађено: C, 61,68; H, 4,66; N, 23,76; S, 9,55%; IR, cm<sup>-1</sup>: 3113w ν(N-H), 3009w ν(C-H)<sub>арил</sub>, 1597md, 1581md ν(C=N)<sub>азометин</sub>, 1536st, 1503w, 1246md, 957w ν(S=C-NH: Тиоамид I, II, III и IV редом и (C=C)<sub>арил</sub>), 1344md, 1282md ν(C=N)<sub>пиридил</sub>, хинолил, 1220md ν(C=S), 1145st ν(N-N); Тион/Тиол (62:38). Тион облик: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): ): 2,45 (3H, *s*, -CH<sub>3</sub>), 7,16-7,46 (1H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>5</sub>-H), 7,65-7,91(3H, *m* *J* = 7,5 Hz, C<sub>4</sub>-H, C<sub>14</sub>-H и C<sub>15</sub>-H), 8,03-8,05 (2H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>13</sub>-H и C<sub>16</sub>-H), 8,14-8,21 (2H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>3</sub>-H и C<sub>12</sub>-H), 8,37 (1H, *s*, C<sub>9</sub>-H), 8,44-(1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>11</sub>-H), 8,57-8,90 (1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>6</sub>-H), 10,96-12,37 (2H, *s*, N<sub>3</sub> и N<sub>4</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 22,47 (-CH<sub>3</sub>), 117,68 (C<sub>11</sub>), 120,96 (C<sub>3</sub>), 124,37 (C<sub>5</sub>), 125,18 (C<sub>14</sub>), 127,44 (C<sub>13</sub>), 127,98 (C<sub>12a</sub>), 128,96 (C<sub>15</sub>), 130,18 (C<sub>16</sub>), 136,64 (C<sub>4</sub>), 136,76 (C<sub>12</sub>), 138,77 (C<sub>9</sub>), 144,56 (C<sub>16a</sub>), 147,47 (C<sub>10</sub>), 148,72 (C<sub>6</sub>), 152,15 (C<sub>7</sub>), 154,68 (C<sub>2</sub>), 176,22 (C<sub>8</sub>); Тиол облик: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 2,53 (3H, *s*, -CH<sub>3</sub>), 7,16-7,46 (1H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>5</sub>-H), 7,65-7,91 (2H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>4</sub>-H, C<sub>14</sub>-H и C<sub>15</sub>-H), 8,03-8,05 (2H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>13</sub>-H и C<sub>16</sub>-H), 8,14-8,21 (2H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>3</sub>-H и C<sub>12</sub>-H), 8,37 (1H, *s*, C<sub>9</sub>-H), 8,44 (1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>11</sub>-H), 8,90 (1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>6</sub>-H), 12,20 (1H, *s*, N<sub>3</sub>), 15,62 (1H, *s*, S-H); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 12,28 (-CH<sub>3</sub>), 117,76 (C<sub>11</sub>), 120,96 (C<sub>3</sub>), 124,37 (C<sub>5</sub>), 124,95 (C<sub>14</sub>), 127,51 (C<sub>13</sub>), 128,08 (C<sub>12a</sub>), 128,96 (C<sub>15</sub>), 130,33 (C<sub>16</sub>), 136,66 (C<sub>4</sub>), 136,76 (C<sub>12</sub>), 138,78 (C<sub>9</sub>), 143,56 (C<sub>16a</sub>), 147,50 (C<sub>10</sub>), 148,80 (C<sub>6</sub>), 152,14 (C<sub>7</sub>), 154,61 (C<sub>2</sub>), 175,70 (C<sub>8</sub>)

[1-(1-(2-пиридил)етилиден)-5-(8-хидрокси-2-хинолил)]карбонтиодихидразид (дТКХ<sub>2ап</sub>-2). Чврста супстанца жуте боје, принос: 88%, т.т. 191-192 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>OS (Mw = 364,11g mol<sup>-1</sup>): C, 57,89; H, 4,59; N, 22,51; S, 8,47%; нађено: C, 58,29; H, 4,39; N, 22,24; S, 8,47 %; IR, cm<sup>-1</sup>: 3481md ν(O-H), 3124w ν(N-H), 3049w ν(C-H)<sub>арил</sub>, 1600w, 1581md ν(C=N)<sub>азометин</sub>, 1533st, 1501md, 1243w, 938w ν(S=C-NH: Тиоамид I, II, III и IV редом и (C=C)<sub>арил</sub>), 1331md, 1299w ν(C=N)<sub>пиридил</sub>, хинолил, 1232st ν(C=S), 1158st ν(N-N); Тион/Тиол облик (64:36). Тион облик: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 2,48 (3H, *s*, -CH<sub>3</sub>), 7,10-7,45 (4H, *m*, *J* = 7,5 Hz, (C<sub>3</sub>-H и C<sub>5</sub>-H)<sub>пиридил</sub>, (C<sub>14</sub>-H и C<sub>15</sub>-H)<sub>хинолил</sub>), 7,60-7,85 (1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>4</sub>-H), 8,07-8,17 (1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>13</sub>-H), 8,24-8,44 (2H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>11</sub>-H и C<sub>12</sub>-H), 8,52 (1H, *s*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>9</sub>-H), 8,60-8,85 (1H, *m*, C<sub>6</sub>-H), 9,57 (1H, *s*, C<sub>16</sub>-OH), 10,81 и 12,20 (2H, *s*, N<sub>3</sub> и N<sub>4</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 22,79 (-CH<sub>3</sub>), 112,75 (C<sub>15</sub>), 117,73 (C<sub>13</sub>), 118,44 (C<sub>11</sub>), 121,35 (C<sub>3</sub>), 125,41 (C<sub>5</sub>), 128,77 (C<sub>14</sub>), 129,28 (C<sub>12a</sub>), 136,77 (C<sub>16a</sub>), 136,96 (C<sub>4</sub>), 138,72 (C<sub>12</sub>), 139,04 (C<sub>9</sub>), 148,16 (C<sub>10</sub>), 149,07 (C<sub>6</sub>), 151,85 (C<sub>7</sub>), 153,82 (C<sub>16</sub>), 155,27 (C<sub>2</sub>), 176,32 (C<sub>8</sub>); Тиол облик: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ/ppm): 2,47 (3H, *s*, -CH<sub>3</sub>), 7,10-7,45 (4H, *m*, *J* = 7,5 Hz, (C<sub>3</sub>-H и C<sub>5</sub>-H)<sub>пиридил</sub>,

(C<sub>14</sub>-H и C<sub>15</sub>-H)<sub>хинолил</sub>, 7,60-7,85 (1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>4</sub>-H), 8,07-8,17 (1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>13</sub>-H), 8,24-8,44 (2H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>11</sub>-H и C<sub>12</sub>-H), 8,52 (1H, *s*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>9</sub>-H), 8,85 (1H, *m*, C<sub>6</sub>-H), 9,57 (1H, *s*, C<sub>16</sub>-OH), 12,17 (1H, *s*, N<sub>3</sub>), 15,38 (1H, *s*, C<sub>8</sub>-SH); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm): 112,75 (C<sub>15</sub>), 117,73 (C<sub>13</sub>), 118,29 (C<sub>11</sub>), 121,35 (C<sub>3</sub>), 125,41 (C<sub>5</sub>), 128,73 (C<sub>14</sub>), 129,28 (C<sub>12a</sub>), 136,77 (C<sub>16a</sub>), 136,96 (C<sub>4</sub>), 138,86 (C<sub>12</sub>), 139,04 (C<sub>9</sub>), 148,16 (C<sub>10</sub>), 149,07 (C<sub>6</sub>), 151,83 (C<sub>7</sub>), 153,82 (C<sub>16</sub>), 155,27 (C<sub>2</sub>), 176,80 (C<sub>8</sub>).

[1-(1-(2-пиридил)етилиден)-5-(8-хинолил)]карбонтиодихидразид (дТКХ<sub>2ап-3</sub>). Чврста супстанца жуте боје, принос: 79%, т.т. 213-214 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>S (M<sub>w</sub> = 348,43g mol<sup>-1</sup>): C, 62,05; H, 4,63; N, 24,12; S, 9,20%; нађено: C, 48,90; H, 4,89; N, 17,95; S 7,08, %; IR, cm<sup>-1</sup>: 3104w  $\nu$ (N-H), 3041w  $\nu$ (C-H)<sub>арил</sub>, 1618md, 1583md  $\nu$ (C=N)<sub>азометин</sub>, 1531st, 1497md, 1243w, 945w  $\nu$ (S=C-NH: Тиоамид I, II, III и IV редом и (C=C)<sub>арил</sub>), 1357md, 1292md  $\nu$ (C=N)<sub>пиридил, хинолил</sub>, 1222md  $\nu$ (C=S), 1152st  $\nu$ (N-N)<sub>алкил</sub>; Тион облик: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm): 2,46 (3H, *s*, -CH<sub>3</sub>), 7,41 (1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>5</sub>-H), 7,86 (2H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>4</sub>-H и C<sub>15</sub>-H), 8,08 (2H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>3</sub>-H и C<sub>12</sub>-H), 8,34 (1H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>13</sub>-H), 8,42 (1H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>14</sub>-H), 8,61 (1H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>6</sub>-H), 8,62-9,00 (2H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>16</sub>-H, и C<sub>11</sub>-H), 9,45 (1H, *s*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>9</sub>-H), 10,91-12,09 (2H, *s*, N<sub>3</sub> и N<sub>4</sub>), <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm): 12,85 (-CH<sub>3</sub>), 121,20 (C<sub>15</sub>), 124,57 (C<sub>3</sub>), 126,57 (C<sub>5</sub>), 126,85 (C<sub>13</sub>), 128,51 (C<sub>11</sub>), 130,57 (C<sub>12a</sub>), 131,41 (C<sub>12</sub>), 136,92 (C<sub>4</sub>), 137,02 (C<sub>10</sub>), 138,96 (C<sub>14</sub>), 146,03 (C<sub>9</sub>), 149,07 (C<sub>16a</sub>), 150,53 (C<sub>6</sub>), 150,88 (C<sub>7</sub>), 152,60 (C<sub>16</sub>), 155,06 (C<sub>2</sub>), 176,58 (C<sub>8</sub>).

### 3.3.2.3. Синтеза и карактеризација асиметричних [1-(1-(2-хидроксифенил)метилен)-5-(супституисани хинолил)]карбонтиодихидразида (дТКХ<sub>2сал(1-5)</sub>)

Једињења дТКХ<sub>2сал(1-5)</sub> се добијају реакцијом 1 mmol мТКХ<sub>2сал</sub> и 1,1 mmol одговарајућих хинолин алдехида (видети део 3.3.2.).

[1-(1-(2-хидроксифенил)метилен)-5-(2-хинолил)]карбонтиодихидразид (дТКХ<sub>2сал-1</sub>). Чврста супстанца жуте боје, принос: 88%, т.т. 126-128 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>OS (M<sub>w</sub> = 349,41g mol<sup>-1</sup>): C, 61,87; H, 4,33; N, 20,04; S, 9,18%; нађено: C, 60,87; H, 4,76; N, 19,08; S 9,34, %; IR, cm<sup>-1</sup>: 3288md  $\nu$ (O-H), 3133w  $\nu$ (N-H), 3040  $\nu$ (C-H)<sub>арил</sub>, 1618md 1589md  $\nu$ (C=N)<sub>азометин</sub>, 1525st, 1502md, 1250w, 950w  $\nu$ (S=C-NH: Тиоамид I, II, III и IV редом и (C=C)<sub>арил</sub>), 1362md, 1295w  $\nu$ (C=N)<sub>пиридил, хинолил</sub>, 1232st  $\nu$ (C=S), 1150st  $\nu$ (N-N); Тион облик: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm): 6,92 (2H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>4</sub>-H и C<sub>6</sub>-H), 7,30 (1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>5</sub>-H), 7,49 (1H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>3</sub>-H), 7,61 (1H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>12</sub>-H), 7,81 (1H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>15</sub>-H), 8,08 (1H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>9</sub>-H), 8,13 (1H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>13</sub>-H) 8,31 (1H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>7</sub>-H), 8,83 (2H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>14</sub>-H, C<sub>16</sub>-H), 9,00 (1H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>11</sub>-H), 9,40 (1H, *s*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>1</sub>-OH), 11,99-12,39 (2H, *s*, N<sub>3</sub>-H и N<sub>4</sub>-H), <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm): 116,60 (C<sub>15</sub>), 117,25 (C<sub>3</sub>), 120,25 (C<sub>5</sub>), 121,80 (C<sub>13</sub>), 129,03 (C<sub>11</sub>), 132,97 (C<sub>12a</sub>), 135,28 (C<sub>12</sub>), 137,76 (C<sub>14</sub>), 139,15 (C<sub>4</sub>), 141,45 (C<sub>10</sub>), (C<sub>9</sub>), 149,64 (C<sub>16a</sub>), 151,53 (C<sub>6</sub>), (C<sub>7</sub>), 151,60 (C<sub>16</sub>), 156,39 (C<sub>2</sub>), 175,20 (C<sub>8</sub>);

[1-(1-(2-хидроксифенил)метилен)-5-(8-хидрокси-2-хинолил)]карбонтиодихидразид (дТКХ<sub>2сал-2</sub>). Чврста супстанца жуте боје, принос: 87%, т.т. 129-130 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S (M<sub>w</sub> = 365,41g mol<sup>-1</sup>): C, 59,17; H, 4,14; N, 19,17; S, 8,77%; нађено: C, 58,95; H, 3,89; N, 20,01 S, 8,70, %; IR, cm<sup>-1</sup>: 3482md  $\nu$ (O-H), 3352md  $\nu$ (N-H), 3049w  $\nu$ (C-H)<sub>арил</sub>, 1597md, 1581md  $\nu$ (C=N)<sub>азометин</sub>, 1530st, 1498md, 1254w, 962w  $\nu$ (S=C-NH: Тиоамид I, II, III и IV редом и (C=C)<sub>арил</sub>), 1331md, 1270md  $\nu$ (C=N)<sub>пиридил, хинолил</sub>, 1232st  $\nu$ (C=S), 1158st  $\nu$ (N-N); Тион облик: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm): 6,93 (2H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>4</sub>-H, C<sub>6</sub>-H), 7,30 (1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>5</sub>-H), 7,52 (1H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>3</sub>-H), 7,69 (1H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>12</sub>-H), 7,80 (1H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>15</sub>-H), 8,05 (1H, *s*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>9</sub>-H) 8,13 (1H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>13</sub>-H) 8,35 (1H, *s*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>7</sub>-H), 8,83 (2H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>14</sub>-H, C<sub>16</sub>-H), 8,99 (1H, *m*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>11</sub>-H), 9,50 (2H, *s*, *J* = 7,5 Hz, C<sub>1</sub>-OH и C<sub>16</sub>-OH), 12,10-12,35 (2H, *s*, N<sub>3</sub>-H и N<sub>4</sub>-H), <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ /ppm): 116,61



(C<sub>15</sub>), 117,20 (C<sub>3</sub>), 120,30 (C<sub>5</sub>), 121,51 (C<sub>13</sub>), 127,04 (C<sub>11</sub>), 131,97 (C<sub>12a</sub>), 135,60 (C<sub>12</sub>), 139,10 (C<sub>14</sub>), 140,99 (C<sub>4</sub>), 145,80 (C<sub>10</sub>), (C<sub>9</sub>), 149,80 (C<sub>16a</sub>), 150,57 (C<sub>6</sub>), (C<sub>7</sub>), 151,20 (C<sub>16</sub>), 158,00 (C<sub>2</sub>), 175,02 (C<sub>8</sub>);

[1-(1-(2-хидроксифенил)метил)-5-(8-хинолил)]карбонтиодихидразид (ДТКХ<sub>2сал</sub>-3). Чврста супстанца жуте боје, принос: 81%, т.т. 208-209 °С. Елементална анализа: израчунато за C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>OS (Mw = 349,41g mol<sup>-1</sup>): C, 61,87; H, 4,33; N, 20,04; S, 9,18%; нађено: C, 61,84; H, 4,28; N, 20,22; S, 9,39 %; IR, cm<sup>-1</sup>: ν<sub>max</sub>: 3288md ν(O-H), 3104md ν(N-H), 3033w ν(C-H)<sub>арил</sub>, 1613, 1584md ν(C=N)<sub>азометин</sub>, 1527st, 1511m, 1254w, 932w ν(S=C-NH: Тиоамид I, II, III и IV редом и (C=C)<sub>арил</sub>), 1360md, 1274md ν(C=N)<sub>пиридил</sub>, хинолил, 1236st ν(C=S), 1152st ν(N-N); Тион облик: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ/ppm): 6,95 (2H, m, J = 7,5 Hz, C<sub>4</sub>-H, C<sub>6</sub>-H), 7,33 (1H, dd, J = 7,5 Hz, C<sub>5</sub>-H), 7,45 (1H, m, J = 7,5 Hz, C<sub>3</sub>-H), 7,63 (1H, m, J = 7,5 Hz, C<sub>12</sub>-H), 7,63 (1H, m, J = 7,5 Hz, C<sub>15</sub>-H), 8,10 (1H, s, J = 7,5 Hz, C<sub>9</sub>-H), 8,13 (1H, m, J = 7,5 Hz, C<sub>13</sub>-H), 8,46 (1H, m, J = 7,5 Hz, C<sub>7</sub>-H), 8,83 (2H, m, J = 7,5 Hz, C<sub>14</sub>-H и C<sub>16</sub>-H), 9,01 (1H, m, J = 7,5 Hz, C<sub>11</sub>-H), 9,48 (1H, s, J = 7,5 Hz, C<sub>1</sub>-OH), 12,09-12,38 (2H, s, N<sub>3</sub>-H и N<sub>4</sub>-H), <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ/ppm): 116,65 (C<sub>15</sub>), 118,25 (C<sub>3</sub>), 119,24 (C<sub>5</sub>), 121,96 (C<sub>13</sub>), 128,03 (C<sub>11</sub>), 130,97 (C<sub>12a</sub>), 136,67 (C<sub>12</sub>), 141,15 (C<sub>4</sub>), 145,47 (C<sub>10</sub>), (C<sub>9</sub>), 138,96 (C<sub>14</sub>), 149,64 (C<sub>16a</sub>), 150,53 (C<sub>6</sub>), (C<sub>7</sub>), 152,60 (C<sub>16</sub>), 157,39 (C<sub>2</sub>), 174,79 (C<sub>8</sub>);

### 3.4. КОРЕЛАЦИОНА АНАЛИЗА

Корелациона анализа је извршена помоћу Microsoft Office Excel 2016 програма. Корелационим методама анализиран је утицај растварача на фреквенције апсорпције као и тумачење механизма односа структуре и антиоксидативног потенцијала. Све корелације су извршене на нивоу поузданости од 95%.

Неспецифични ефекти (диполарност/поларизација) растварача, и специфични ефекти (водоничне везе и интеракције између растварача и растворене супстанце), процењени су помоћу LSER модела применом Камлет-Тафтове (Једначина 2.1) и Каталанове (Једначина 2.2) једначине. Анализа хемијских померања угљеникових атома винил деривата у <sup>13</sup>C NMR спектрима интерпретирана је применом LFER модела. Пренос електронских ефеката супституената је одређен применом Хаметове једначине (Једначина 2.6).

Осим за проучавање утицаја растварача, једнопараметарска и двопараметарска линеарна регресиона анализа коришћена је и за анализу механизма антиоксидативне активности појединих једињења. Процена доприноса појединачних дескриптора као што су енергије НОМО и LUMO орбитала, вредности разлике енергија између НОМО и LUMO орбитала (E<sub>gap</sub>), BDE и IP, заједно са Хаметовим константама била је корисна у тумачењу антиоксидативних механизма.

Квалитет корелационог модела приказан је кроз вредности коефицијента корелације (R), стандардне девијације (SD), Фишеровог теста (F) и бројем растварача/једињења укључених у корелацију (n).

### 3.5. КОНСТАНТЕ КИСЕЛОСТИ ДИХИДРАЗОНА ТИОКАРБОХИДРАЗИДА

#### 3.5.1. Одређивање константе киселости дихидразона тиокарбохидразида

Познавање физичко-хемијских параметара као што је растворљивост, липофилност, стабилност и рK<sub>a</sub> вредност су важни параметри приликом проналажења и дизајна нових лекова. Стога се у најранијим фазама истраживања користе подаци о рK<sub>a</sub> вредностима. Оне се добијају експериментално: потецнометријским и UV-Vis спектрофотометријским мерењима<sup>38</sup> као и електрохемијским мерењима<sup>146</sup>. Помоћу различитих софтвера могу се предвидети рK<sub>a</sub> вредности.

Први корак у одређивању константи киселости ове серије једињења било је теоријско предвиђање рK<sub>a</sub> вредности у сврху разматрања применљивости нама познатих

потенциометријских и спектрофотометријских метода за експериментално одређивање константи киселости.  $pK_a$  вредности предвиђене су помоћу Protonation plugin у оквиру програма MarvinSketch 21.4 развијеног од стране компаније ChemAxon (<https://chemaxon.com/products/marvin>).

### 3.6. МОЛЕКУЛСКО МОДЕЛОВАЊЕ

#### 3.6.1. Квантно-хемијски прорачуни винил и имино деривата пиридина

У претходним студијама показало се да **БВПЈ** једињења постоје у *s-trans/s-trans* и *s-cis/s-cis* облику<sup>24</sup>, док **БИП** једињења углавном постоје у енолиминском облику<sup>40,147</sup> у чврстом стању и раствору. Потпуна геометријска оптимизација структуре свих синтетисаних једињења изведена је у гасној фази применом DFT методе коришћењем B3LYP функционала и Def2SVP основног сета за винил деривате и комбинацију  $\omega$ B97XD/6-311++g(d,p) модела за имино деривате. Јодидни анјон код **БВПЈ** једињења није био укључен у прорачуне. За серију **БИП** једињења прво је извршена геометријска оптимизација основне структуре тј. структуре једињења **БИП-1**. При том је за оптимизацију узет *s-trans/s-trans* изомер као почетна геометрија, јер се показало да је овај изомер стабилнији од *s-cis/s-cis* изомера у структурно сличним **БВПЈ** једињењима<sup>24,148</sup>. Структуре могућих стабилних конформационих облика једињења **БИП-1** приказане су у прилогу на слици П7.3. Почетне конформације изомера код винил деривата су генерисане променом торзионог угла C7-C8-C9-C10 од 0° до 180° са инкрементом од 20° коришћењем B3LYP функционала и Def2SVP основног сета. Конфомер са најнижом енергијом је додатно оптимизован коришћењем истог функционала и Def2TZVP основног сета<sup>149</sup>. Присусутво глобалних минимума за свако оптимизовано једињење је потврђено израчунавањима хармонијских вибрационих фреквенција и одсуством имагинарних (негативних) фреквенција. Теоријски апсорпциони спектри **БВПЈ** једињења су израчунати у имплицитном моделу DMSO као растварача применом временски зависне TD-DFT методе користећи CAM-B3LYP функционал<sup>150</sup> и Def2TZVP основни сет<sup>149</sup> на оптимизованим геометријама у гасној фази. Симулација растварача у TD-DFT прорачунима је изведена стандардним РСМ моделом<sup>151</sup>. Попуњене валенционе анти-везујуће ( $\pi^*$ ) и везујуће ( $\pi$ ) орбитале парцијално двоструких веза су прорачунате на B3LYP/Def2TZVP нивоу, користећи NBO анализу<sup>152</sup>. Фукуијеве функције и Хиршфилдова наелектрисања атома су израчунате такође квантно-хемијским прорачунима. Кондензовани Фукуијев дуални дескриптор ( $\Delta f$ ) израчунат је за све атоме **БИП** једињења да би се мапирала најреактивнија места за интеракцију са површином метала. Региони са позитивним  $\Delta f$  су највероватнија реактивна места за напад нуклеофила, док атоми са негативним вредностима указују на места богата електронима склона електрофилном нападу.

Сви квантно-хемијски прорачуни су изведени уз коришћење Gaussian09<sup>153</sup> верзија D.01 и Gaussian16 верзија B.01<sup>154</sup> програма.

#### 3.6.2. QSAR моделовање примењено на антиоксидативну и антимикробну активност **БИП** једињења

Почетне тродимензионалне структуре **БИП**-а генерисане су коришћењем MMFF94 поља сила<sup>155</sup>. Почетне конформације су генерисане ротацијом свих флексибилних веза са инкрементом од 15°, користећи AMMP програм, а за визуализацију је коришћен програм Vega ZZ 3.1.0.<sup>156</sup> Сваки конформер са најнижом енергијом је додатно оптимизован на нивоу модела  $\omega$ B97XD/6-311++g(d,p) у гасној фази. У циљу проналажења глобалних минимума извршена је вибрациона анализа фреквенције која је потврдила да све структуре **БИП**-а одговарају минимуму површине потенцијалне енергије (PES, енгл. *Potential Energy Surface*). Утицаји растварача израчунати су помоћу SMD (енгл. *Solvation Model based on Density*) модела: воде као биолошки релевантног медијума, метанола и бензена чија ниска диелектрична константа

имитира унутрашњи, фосфолипидни део ћелијске мембране<sup>157</sup>. Енталпије једињења у раствору добијене су додавањем термичке корекције за енталпију гасне фазе (TCE, енгл. *Thermal Corrections of Enthalpy*) енергији израчунатој помоћу SMD модела. Овај приступ је оправдан чињеницом да TCE не зависи значајно од примењеног модела растварача, док прорачуни TCE са имплицитним моделима солватације изузетно повећавају рачунско време без давања додатне тачности<sup>158</sup>. Оптимизација геометрије анјона, радикала и радикал катјона изведена је користећи исти поступак, где су изведени неограничени (енгл. *unrestricted*) прорачуни за радикале и катјон радикале ради коректног третмана врста са неспареним електронима. Енталпије H<sup>+</sup> и e<sup>-</sup> у раствору преузете су из литературе<sup>159</sup>, док је енталпија H атома израчуната на истом нивоу теорије.

За проучавање интрамолекулске водоничне везе, критичне тачке веза (BCPs, енгл. *Bond Critical Points*) су израчунате у програму Multiwfn 3.7<sup>160</sup>, полазећи од геометрије оптимизоване на  $\omega$ B97XD/6-311++g(d,p) нивоу теорије. Нековалентне интеракције (NCI, енгл. *Noncovalent Interaction*) су визуелизоване према методи описаној у литератури<sup>161</sup> у програму Multiwfn 3.7. NCI слике су приказане у програму VMD (енгл. *Visual Molecular Dynamics*)<sup>162</sup>. Ротациона баријера за **БИП-6** израчуната је узимајући торзиони угао између фенолног прстена и азометинске јединице (веза C7-C8) као реакциону координату. Дата торзија систематски је модификована за по 20°, док су сви други геометријски параметри поново оптимизовани.

### 3.6.3. Докинг **БИП** имино деривата пиридина

Структура једињења **БИП-16** докована је у активно место ацетилхолинестеразе (AChE) (PDB ознака 1Q83<sup>163</sup>) користећи AutoDock Vina програм<sup>164</sup>. Ова структура представља протеин-лиганд комплекс са великим bis-такринским лигандом који заузима и периферна анјонска места (PAS, енгл. *Peripheral Anionic Sites*) и анјонска места (AS, енгл. *Anionic Sites*) AChE. Након уклањања лиганда, део за везивање остаје у „отвореној“ конформацији која омогућава **БИП** једињењима да дођу до свих делова активног места AChE. Испорност израчунавања је повећана на 100 и израчунато је 10 могућих начина везивања за свако једињење.

Да би се идентификовале потенцијалне антимицробне молекулске мете за **БИП**, SMILES (енгл. *Simplified Molecular-Input Line System*) линије свих једињења уčitане су у SEA (енгл. *Similarity Ensemble Approach*) web програм.<sup>165</sup> 3D структура протеина леуцил-аминопептидазе идентификована у претходном кораку преузета је из PDB-а, ознака 1CP6<sup>166</sup>. Молекули лиганда и воде су уклоњени и додати су атоми водоника који одговарају стању протонованости при pH 7,40<sup>167</sup>. Структура протеина је подвргнута минимизацији у трајању од 100 ps коришћењем методе коњугованих градијената у програму NAMD 2.12<sup>168</sup> и користећи CHARMM (енгл. *Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics*) поље сила. Протеинска кичма је одржавана фиксном како би се сачувала експериментална структура, док је минимизација енергије свела стерне сметње и одбијања на минимум. Активно место је дефинисано као сви остаци у пречнику од 12 Å од јона Zn<sup>2+</sup>. За припрему улазних фајлова коришћени су параметри AutoDock4Zn<sup>169</sup> у AutoDock 4.2, VegaZZ 3.1.0<sup>156</sup> и AutoDockTools<sup>170</sup>. Један псеудо атом постављен је у тетраедарску оријентацију у односу на јон Zn<sup>2+</sup>, на место где треба координовати инхибитор. Прорачун енталпије везивања помоћу MMFF94 и визуелизација начина везивања урађени су у програму LigandScout 4.2.6<sup>171</sup>.

### 3.6.4. QSAR моделовање примењено на физичко-хемијске и екотоксиколошке особине **БИП** једињења

Процењена вредност акутне и хроничне токсичности за водене организме у оквиру различитих трофичких нивоа (рибе, ракови, алге/водене биљке), тј. вредности 96-часовне LC<sub>50</sub> за рибе *Fathead minnow* и 48-часовни LC<sub>50</sub> за *D. Magna* одређена је применом CONSENSUS модела, користећи софтвер за процену токсичности T.E.S.T. 4.2 (енгл. *Toxicity Estimation*

Software Tool)<sup>172</sup>. Овај модел представља просек предвиђених токсичних вредности из других QSAR модела, при том узимајући у обзир домен применљивости сваке методе. Обично пружа највећу тачност и покривеност предвиђања јер се за израду предвиђања користи неколико метода са мало различитим доменима применљивости.

За процену потенцијала биоаккумуляције коришћена је процењена вредност фактора биоконцентрације (BAF, енгл. *Bioaccumulation Factor*) применом NEAREST NEIGHBOR модела, користећи T.E.S.T.4.2 софтверски пакет<sup>172</sup>. Код NEAREST NEIGHBOR модела токсичност је просек токсичности три структурно најсличније супстанце (структурни аналози). Да би се могла адекватно предвидети екотоксиколошка својства супстанци, сваки од структурних аналога предметне супстанце мора премашити одређени минимални коефицијент сличности косинуса (SCmin, енгл. *Minimum cosine similarity coefficient*). SCmin је постављен на 0,5 тако да је покривеност предвиђањем била слична осталим QSAR методама. Овај модел пружа брзу процену токсичности (испитивана супстанца никада није присутна у одабраном скупу аналога). Недостатак методе најближег суседа је тај што се не узимају у обзир молекулске структурне разлике између испитиване супстанце и њених структурних аналога.

Након извршене предикције горе наведених екотоксиколошких података, ове супстанце су и класификоване у односу на опасност по водену животну средину у складу са критеријума дефинисаним у Правилнику о класификацији, паковању, обележавању и оглашавању хемикалије и одређеног производа у складу са Глобално хармонизованим системом за класификацију и обележавање УН („Сл. Гласник РС”, бр. 105/13, 52/17 и 21/19)<sup>173</sup> који је усклађен са Уредбом ЕУ бр.1272/2008 о класификацији, обележавању и паковању супстанци и смеша<sup>145</sup>.

### 3.7. МЕТОДЕ ОДРЕЂИВАЊА БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ

#### 3.7.1 Одређивање антиоксидативне активности

##### 3.7.1.1. DPPH антирадикалска активност винил и имино деривата пиридина

Анализа 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикала (DPPH<sup>•</sup>) спроведена је мерењем промене апсорбанце DPPH<sup>•</sup> на 517 nm<sup>174</sup>. Једињења су растворена у метанолу (**БВПЈ** једињења) или DMSO-у (**БИП** и **дТКХ** једињења), а затим разблажена у десет различитих концентрација. Комерцијално доступан DPPH<sup>•</sup> радикал је растворен у метанолу у концентрацији од  $5,34 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Серијска разблажења једињења и слепа проба (контрола) су припремљени у микроплочи са 96 бунарчића. У микроплочу са 96 бунарчића додато је 140  $\mu\text{L}$  раствора DPPH<sup>•</sup> и 10  $\mu\text{L}$  метанолног (**БВПЈ** једињења) или DMSO (**БИП** и **дТКХ** једињења) раствора испитиваних једињења и чист метанол односно DMSO (10  $\mu\text{L}$ ) као контрола. Апсорбанца на 517 nm је одређена на UV-Vis спектрофотометру Shimadzu 1700 након инкубације микроплоче у мраку током 30 минута на собној температури. Сва мерења су изведена у три понављања, а проценат неутрализације DPPH<sup>•</sup> радикала израчунат је помоћу једначине:

$$\text{Инхибиција DPPH}^{\bullet} \text{ радикала (\%)} = \frac{(A_{\text{Контрола}} - A_{\text{Узорак}})}{A_{\text{Контрола}}} \times 100 \quad (3.1)$$

где су:  $A_{\text{Узорак}}$  и  $A_{\text{Контрола}}$  вредности апсорбанце на 517 nm DPPH<sup>•</sup> у раствору узорка и у контролном раствору. Аскорбинска киселина је коришћена као референтно једињење. Резултати су приказани као проценат инхибиције DPPH<sup>•</sup> или као израчунате IC<sub>50</sub> вредности једињења тј. концентрација једињења која неутралише 50% DPPH<sup>•</sup>.

### 3.7.1.2. ABTS антирадикалска активност винил и имино деривата пиридина

Анализа способности неутрализације радикала 2,2'-азино-bis(3-етилбензотиазолин-6-сулфонске киселине) (ABTS<sup>•+</sup>) је изведена према процедури из литературе уз мале модификације<sup>174</sup>. Раствор ABTS радикал катјона (ABTS<sup>•+</sup>) је припремљен мешањем 7,8 mM основног раствора ABTS-а са 2,45 mM раствора калијум-перокосидисулфата (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>). Радни раствор је остављен 12-16 часова да би дошло до формирања ABTS<sup>•+</sup> радикала, а затим је разблажен метанолом да би се добила апсорбанца од 0.700 ± 0.020 на 734 nm. Реакциона смеша се састојала од 2,8 mL ABTS<sup>•+</sup> раствора радикал катјона и 200 μL (**БВПЈ**) или 20 μL (**БИП** и **дТКХ**) испитиваног раствора једињења у метанолу (**БВПЈ**) или DMSO-у (**БИП** и **дТКХ**). Као контрола коришћено је 200 μL чистог метанола или 20 μL чистог DMSO растварача у 2,8 mL раствора ABTS<sup>•+</sup>. Након инкубације у мраку на собној температури забележена је апсорбанца на 734 nm на UV/Vis спектрофотометру. Као стандард је коришћена аскорбинска киселина. Сва мерења су изведена у три понављања. Инхибиција ABTS<sup>•+</sup> радикал катјона израчуната је према једначини:

$$\text{Инхибиција ABTS}^{\bullet+} \text{ радикала (\%)} = \frac{(A_{\text{Контрола}} - A_{\text{Узорак}})}{A_{\text{Контрола}}} \times 100 \quad (3.2)$$

где су:  $A_{\text{Узорак}}$  и  $A_{\text{Контрола}}$  средње вредности апсорбанце три понављања на 734 nm ABTS<sup>•+</sup> у раствору узорка и у контролном раствору. Активност је изражена као проценат инхибиције ABTS<sup>•+</sup> радикал катјона или као израчунате IC<sub>50</sub> вредности једињења тј. концентрација једињења која неутралише 50% ABTS<sup>•+</sup> радикала.

### 3.7.1.3. CUPRAC редукциона моћ имино деривата пиридина

Способност антиоксидативног капацитета једињења да редукују јоне Cu<sup>2+</sup> испитана је методом CUPRAC како је описано у литератури<sup>95</sup>. Раствор Cu(II) јона (1,0×10<sup>-2</sup> M) припремљен је растварањем 0,08524 g CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O у 250 mL дестиловане воде. Раствор амонијум-ацетатног пуфера (1,0 M, pH 7,0) припремљен је растварањем 19,27 g амонијум ацетата у 250 mL дестиловане воде. Свеж 7,5×10<sup>-3</sup> M раствор неокупроина је припремљен растварањем 0,078 g неокупроина у 50 mL метанола. Раствор тролокса (5×10<sup>-3</sup> M) припремљен је растварањем 0,00626 g тролокса у DMSO-у и разблажен у пет концентрација. Тестирана једињења су, такође, растворена у DMSO и разблажена у пет концентрација. Свака реакциона смеша састојала се од 0,8 mL испитиваног раствора једињења у DMSO, 1 mL раствора CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,2 mL пуферског раствора амонијум-ацетата и 1 mL раствора неокупроина у метанолу. Исти услови су примењени и за раствор тролокса у DMSO, који се користио као стандард. Као контрола коришћен је: 1 mL раствора CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,2 mL раствора пуфера амонијум-ацетата, 1 mL раствора неокупроина и 0,8 mL чистог DMSO. Након инкубације на собној температури током 30 минута, апсорбанца је мерена на 450 nm на UV/Vis спектрофотометру. Потом су на основу експериментално добијених вредности апсорбанци за свако једињење и тролокс конструисане калибрационе криве зависности апсорбанце од моларне концентрације и из нагиба криве је очитана вредност моларне апсорптивности (ε). Резултати CUPRAC теста изражени су као тролокс еквивалентни антиоксидативни капацитети (TEAC, енгл. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacities*). TEAC вредности су израчунате као однос моларне апсорптивности сваког испитиваног једињења и моларне апсорптивности Тролокса према следећој једначини:

$$\text{TEAC} = \frac{\epsilon_{\text{Узорак}}}{\epsilon_{\text{Тролокс}}} \quad (3.3)$$

где су  $\xi_{\text{Узорак}}$  и  $\xi_{\text{Тролокс}}$  моларне апсорптивности раствора узорка и тролокса.

#### 3.7.1.4. Укупан антиоксидативни капацитет имино деривата пиридина

Укупан антиоксидативни капацитет процењен је анализом фосфомолибдена. Овај тест је заснован на редукцији молибдена(VI) у молибден(V)<sup>175</sup>. Раствор фосфомолибденског реагенса припремљен је мешањем 0,6 М раствора сумпорне киселине,  $28 \times 10^{-3}$  М раствора натријум фосфата и  $4 \times 10^{-3}$  М раствора амонијум молибдата. У епрувете је додато 0,6 mL сваког тестираног једињења и 2,4 mL раствора фосфомолибденског реагенса. Контролни раствор је садржао 2,4 mL раствора реагенса и 0,6 mL чистог DMSO. Епрувете су инкубиране на 95 °C током 90 минута, затим је смеша охлађена до собне температуре. Након тога мерена је апсорбанца на 695 nm на UV-Vis спектрофотометру. Антиоксидативни капацитет је изражен као масени еквивалент аскорбинске киселине.

#### 3.7.2. Одређивање инхибиције ацетилхолинестеразе помоћу *bis*(имино) пиридина

Инхибиција ензима ацетилхолинестеразе (AChE) у испитиваним једињењима је одређена колориметријским тестом<sup>176,177</sup>. Ензим AChE (0,09 U/mL), ацетилхолин јодид (AChI) (0,014 М) и 5,5-дитио-*bis*(2-нитробензова киселина) (ДТНБ) (0,01 М) припремљени су у фосфатном пуферу (0,1 М, рН 8). Испитивана једињења су припремљена у смеши DMSO (10%) и фосфатног пуфера (0,1 М, рН 8), а затим су урађена серијска разблажења једињења (40  $\mu$ L) директно у микроплочама са 96 бунарчића, тако да је опсег концентрација у коначној запремини био 0,4-400  $\mu$ M. У микроплоче са 96 бунарчића помешано је 160  $\mu$ L фосфатног пуфера (0,1 М, рН 8) и 20  $\mu$ L AChE. После 15 минута инкубације на 25 °C, додати су ДТНБ (10  $\mu$ L) и AChI (10  $\mu$ L) и инкубација је настављена још 40 минута. Апсорбанца је очитана на 405 nm, на спектрофотометру (BioTek ELx808, microplate reader, Winooski, VT, SAD). Слепа проба (бланк) се састојала од раствора фосфатног пуфера (180  $\mu$ L), ДТНБ (10  $\mu$ L) и AChI (10  $\mu$ L). Максимална активност ензима добијена је заменом узорака са смешом DMSO/фосфатни пуфер и апсорбанца узорака заменом раствора ензима фосфатним пуфером. Галантамин је коришћен као позитивна контрола. Процент инхибиције ензимске реакције израчунат је према формули:

$$\text{Инхибиција AChE (\%)} = \frac{[(A - B) - (C - D)]}{(A - B)} \times 100 \quad (3.4)$$

где су А, Б, Ц и Д редом апсорпције максималне ензимске активности, слепе пробе, ензимске активности у присуству узорака и боје раствора узорака. Резултати су изражени као концентрација узорка која инхибира 50% ензимске реакције (IC<sub>50</sub>,  $\mu$ M).

#### 3.7.3. Одређивање антимицробне активности имино деривата пиридина

Антимицробна активност је одређивана како би се проверио потенцијални антимицробни ефекат нових синтетисаних једињења на микроорганизме који су добро познати патогени и представљају озбиљну претњу по људско здравље. Синтетисана једињења су појединачно тестирана на одабраним патогеним бактеријским сојевима, укључујући: две Грам-негативне бактерије (*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) и *Escherichia coli* (ATCC 25922)) и три Грам-позитивне бактерије (*Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) и метицилин-резистентни клинички изолат *Staphylococcus aureus* (MRSA)). Да би се одредила антифунгална својства синтетисаних једињења коришћен је патогени гљивични сој *Candida albicans* (ATCC 10231). Сви коришћени микроорганизми су сертификовани од стране ATCC. MRSA је добијен из Градског завода за јавно здравље

(Београд, Србија). Резултати осетљивости антимикробног теста на немутирани сој MRSA публиковани су раније<sup>178</sup>.

За гајење бактеријских врста и потврде одсуства контаминације као подлога је коришћена Триптон соја агар плоча (TSA, енгл. *Tryptic Soy Agar*, Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA)). Подкултура у триптон соја бујон (TSB, енгл. *Tryptic Soy Broth*, Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA)) под аеробним условима (на 37 °C преко ноћи) је нанешен да опорави сваку врсту, непосредно пре тестирања. Да би се добила жељена концентрација од приближно 105-106 cfu/mL, (cfu, енгл. *Colony Forming Units*, представља број формираних колонија тј. број бактеријских ћелија (микроба) које су биле способне да развију своје колоније у mL раствора испитиваних једињења), припремљена су одговарајућа разблажења бактеријских/гљивичних култура. Густина микробне суспензије, која одговара жељеној концентрацији cfu/mL, одређена је спектрофотометријски на UV/Vis спектрофотометру на 600 nm (OD<sub>600</sub>). За гајење гљивичне културе је коришћен квасни сладни агар (YMA, енгл. *Yeast Malt Agar*, Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA)) као подлога и квасни сладни бујон (YMB, енгл. *Yeast Malt Broth*, Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA)) сој гљиве такође гајен аеробно (48 h, на 37 °C) као подкултура.

Основни раствори су припремљени растварањем свих испитиваних једињења (20,00 mmol/L) у 10%-ном раствору DMSO, стерилисани филтрацијом кроз мембрански филтер од 0,22 µm (Sartorius, Germany) и разблажени у TSB за бактеријске сојеве или YMB за гљивични сој до концентрације 10.00 mmol/L. DMSO је одабран као нетоксични растварач и у концентрацији од 10% није имао негативан утицај на раст тестираних микроорганизама.

### 3.7.3.1. Микродилуциона метода

Минималне инхибиторне концентрације (MIC) и минималне бактерицидне/фунгицидне концентрације (MBC/MFC) су одређене методом микроразблаживања (микродулиције) према процедури описаној у литератури<sup>179</sup>. Анализа је изведена у микротитар плочама са 96 бунарчића (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Двострука серијска разблажења испитиваних једињења припремљена су *in situ* до концентрација у опсегу 5-0,0097 mmol/L. За раст бактерија у бактеријској суспензији као индикатор додат је трифенилтетразолијум хлорид (TTC, енгл. *Triphenyltetrazolium chloride*, 0.05%). Бунарчићи са одговарајућим подлогама били су контрола стерилности. Као позитивна контрола коришћено је 100 µL чисте бактеријске/гљивичне суспензије, док је запремина чисте подлоге коришћена као негативна контрола. У аеробним условима бактеријски сојеви су инкубирани на 37 °C у току 24 h и гљивични сој на 37 °C наредних 48 h. Метаболичка активност различитих живих бактеријских ћелија је потврђена појавом розе боје. Ако се појави замућеност или талог у бујону, сматра се да су одрживе ћелије *Candida albicans* присутне. Стандард за бактеријске сојеве био је амоксицилин (0,1368 – 0,000275 mmol/L) а за *Candida albicans* флуконазол (0,1633 – 0,000319 mmol/L). Сви експерименти су рађени у три понављања.

### 3.7.4. Одређивање антиканцер активности дТКХ<sub>2фп</sub> и дТКХ<sub>2ап</sub>

#### 3.7.4.1. Ћелијске културе

Способност дТКХ<sub>2фп</sub> и дТКХ<sub>2ап</sub> једињења да индукују смрт ћелија испитивано је на серији малигних хуманих култура различитог ткивног порекла, и хуманој култури здравих кератиноцита. Све ћелијске културе одржаване су медијуму DMEM (енгл. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, *Dominique Dutscher*, Кат.бр. L0102-500), обогаћеног са 10 % (v/v) феталног говеђег серума (FBS, енгл. *Fetal Bovine Serum*, Life Technologies, кат.бр. 10270-106) претходно инактивисаног на 56 °C током 30 минута, и са 1 % (v/v) антибиотика (пеницилин 10 000 IU/mL/стрептомицин 10 000 µg/mL, Life Technologies, кат.бр. 15140-122). Ћелијске културе су

држане у влажном инкубатору (37 °C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub>) током умножавања и током инкубације са испитиваним једињењима.

Коришћене су пет хуманих ћелијских култура: аденокарцином дебелог црева (LoVo, ATCC® CCL-229<sup>TM</sup>), аденокарцином јajника (SkOV-3, ATCC® HTB-77<sup>TM</sup>), неситноћелијски аденокарцином плућа (A549, ATCC® CCL-185<sup>TM</sup>), аденокарцином дојке (MCF-7, ATCC® HTB-22<sup>TM</sup>) и кератиноцита коже (HaCaT, CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Germany, Кат. бр. 300493). Посуда за узгајање адхерентних ћелијских култура набављена је од ThermoFisher, Кат.бр. 156499.

#### **3.7.4.2. Припрема испитиваних једињења**

Сва испитивана једињења су растворена у DMSO (Sigma-Aldrich, Кат. br. D2650) у концентрацији 20 mM. Радна разблажења су припремана са обогаћеним DMEM-ом непосредно пре стављања испитиваних једињења на ћелије. Највећа финална концентрација DMSO на ћелијама постигнута је у узорцима тестираним концентрацијом од 100 µM износила је 0,5% (v/v).

#### **3.7.4.3. Трипсинизација ћелија у култури**

Све ћелијске културе коришћене током овог испитивања су порекла епителног ткива, те имају особину да се лепе за подлогу суда у коме се умножавају или третирају, односно да се самоорганизују у једном слоју (монолејер). Процесом трипсинизације ћелије се из монолејера преводе у форму суспензије, што је неопходно за одређивање њихове густине у жељеном волумену за сађење у микротитар плоче, или за анализу на проточном цитометру. Процедура трипсинизације је потпуно идентична небитно у коју се сврху примењује. Једина разлика која постоји током извођења условљена је тиме у каквом суду се налазе ћелије које треба трипсинизирати, тако да се реагенси у фласк додају у већем волумену у поређењу са бунарчићем микротитар плоче.

Принцип процедуре је да се, након одливања медијума из флашка/бунарчића, додатно елиминише пристство феталног говеђег серума двоструким испирањем раствором етилендиаминтетрасирћетне киселине (EDTA, енгл. *Ethylenediaminetetraacetic acid*, Sigma-Aldrich, Кат. бр. E5134) пре доношења трипсина (BioWest, Кат. бр. L0930-100). Фетални говеђи серум инхибира ензимску активност трипсина, док EDTA додатно хелира јоне калцијума и магнезијума који имају значајну улогу у формирању међућелијских веза, и способности ћелије да се лепи за подлогу суда у коме се налази. Након додавања трипсина на ћелије, суд са ћелијама се оставља 5-15 минута у инкубатору на 37 °C, након чега се под микроскопом могу видети заокружене ћелије које плутају изнад површине суда у коме се налазе.

У сврху одређивања густине ћелија за сађење у микротитар плоче (коришћене су микротитар плоче са 96 бунарчића, Corning®, Кат. бр. CLS3596), у фласк са трипсином и одлепљеним ћелијама додаје се 5 mL обогаћене DMEM подлоге, након чега се ћелије у укупном волумену покупе пастеровом пипетом и пребаце у пластичну градуисану тубу од 15 mL (Starstedt, Кат. бр. 62.554.502). Туба се центрифугира (Центрифуга, Fisher Scientific, Кат. бр. 05-413-402) 1500 обртаја у минути током 10 минута, након чега се супернатант одлије и на ћелије у талогу дода обогаћени DMEM до ознаке 5 mL. Ћелије се потом ресуспендују пастеровом пипетом. Аутоматском пипетом одмери се 0,05 mL суспензије ћелија и пребаци у пластичну микротубу са капицом (Starstedt, Кат. бр. 72.690.001) запремине 2,5 mL, у коју се потом додаје 0,45 mL боје трипан плаво (Sigma-Aldrich, Кат. br. T8154). Мешавина боје и ћелија се вортексира, и из ње се узима 0,05 mL и наноси на хемоцитометарску комору за бројање. Бројање се врши под микроскопом, при чему се у обзир не узимају ћелије које су обојене трипан плавим јер је присуство боје знак да су им оштећени структура и функција ћелијског зида (ћелија у некрози). Ћелије се броје у одређеним квадрантима зависно од типа



хемцитометарске коморе која се користи, а њихова густина се изражава као број ћелија у 1 mL.

Процедура трипсинизације ћелија у бунарчићима микротитар плоче у сврху припреме за анализу на проточном цитометру као додатни корак има центрифугирање плоче пре одливања трипсина, као пре сваке наредне манипулације микротитар плочом који подразумева промену садржаја течне фазе узорка. Центрифугирање (2000 обртаја у минути, током 10 минута, собна температура) доводи до тога да се ћелије које више нису залепљене на површини бунарчића оборе центрифугалном силом и тиме спречи њихов губитак у следећем кораку одливања супернатанта (извртање микротитар плоче на папирни убрус).

#### **3.7.4.4. Бојење ћелија Калцеином АМ и пропидијум јодидом**

Ћелије су сађене у микротитар плоче (Corning®, Кат.бр. CLS3596) са 96 бунарчића у волумену од 0,1 mL (50000 ћелија/1mL) и остављене преко ноћи да се залепе на дно. Следећег дана додата су испитивана једињења у запремини од 0,05 mL радног штока, тако да је њихова финална концентрација по бунарчићима била 30, 50, 75 и 100  $\mu$ M. Бунарчићи у које је додато 0,05 mL DMSO-а у финалној концентрацији од 0,5% коришћени су као негативна контрола. Након што је додавање једињења у третиране бунарчиће и контролне бунарчиће завршено, микротитар плоче су враћене у влажни инкубатор. Након 24 сата (период инкубације), у све бунарчиће додата је мешавина флуоресцентних боја САМ, (Merck, Кат. бр. 206700) и PI (Sigma-Aldrich, Кат. бр. P4170) претходно растворених у фосфатном пуферу, тако да је њихова финална концентрација по бунарчићу била 0,5 mg/mL за САМ и 1  $\mu$ g/mL за PI. Микротитар плоче су потом остављене у мраку на собној температури током наредних 30 минута. Ћелије су анализирани на Celigo цитометру („*imidžing*” (imaging) citometar, Nexcelom Bioscience LLC, USA) користећи филтере за црвену и зелену флуоресценцију. Добијени резултати обрађивани су Celigo (Nexcelom Bioscience LLC, USA) софтверским пакетом, тако што је софтвер одредио број виабилних ћелија у негативној контроли и третираним узорцима. Процент преживљавања ћелија у третираним узорцима прерачунат је по формули:

$$\text{Преживљавање (\%)} = \frac{\text{број живих ћелија у третираном узорку}}{\text{број живих ћелија у нетретираној контроли}} \times 100 \quad (3.5)$$

График односа концентрације и постигнутог ефекта формиран је тако да је проценат преживљавања на ординати унешен за одговарајућу вредност концентрације на апсциси (логаритмована вредност). Крива односа концентрације и ефекта формирана је коришћењем асиметричне петопараметарске сигмоидне логистичке једначине у GraphPad Prism v. 8 (GraphPad Software, San Diego, USA) софтверском пакету. Концентрација која је смањила преживљавање за 50% (IC<sub>50</sub>) израчуната је као непозната са добијене криве у истом софтверском пакету.

#### **3.7.4.5. Бојење Анексином V и PI**

Ћелије су сађене у микротитар плоче са 96 бунарчића у волумену од 0,1 mL (100 000 ћелија/1 mL). Засађене ћелије су остављене преко ноћи у инкубатору, а сутрадан су у бунарчиће додата испитивана једињења у запремини од 0,05 mL радног штока, тако да је њихова финална концентрација по бунарчићима била у распону од 1-100  $\mu$ M. Као позитивна контрола коришћене су ћелије у бунарчићима којима је уместо испитиваних једињења додат Celastrol (Enzo Life Sciences, Кат. бр. ALX-350-332-M025) (у финалној концентрацији од 50  $\mu$ M), а као негативна контрола, ћелије којима је додат DMSO у финалној концентрацији од 0,05%. Микротитар плоче су држане наредних 24 сата у влажном инкубатору. По истеку трајања инкубације ћелије су трипсинизирани. Након што је трипсин одливан из бунарчића у њих је додато 0,1 mL фосфатног пуфера и по 3  $\mu$ L Анексина V (Immuno Tools, Кат. бр.

31490013) и PI (у финалној концентрацији 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Потом су микротитар плоче држане током 20 минута у влажном инкубатору. Непосредно пре анализе у сваки од бунарчића додато је још по 0,15 mL фосфатног пуфера. Ћелије су анализирани на Guava проточном цитометру (Guava® easyCyte 12HT Benchtop, Millipore, Кат. бр. 0500-4012) користећи InCyte софтверски пакет (GuavaSoft softverski paket, Millipore, Кат. бр. 0500-4115).

Процент ћелија обојених са Анексином V и/или PI сабране су за сваки узорак појединачно. Графикон односа концентрације и ефекта добијен је тако што је проценат обојених ћелија на ординати унесен за одговарајућу вредност концентрације на апсциси (логаритмована вредност). Крива односа концентрације и ефекта формирана је коришћењем асиметричне петопараметарске сигмоидне логистичке једначине у GraphPad Prism v. 8 софтверском пакету. Концентрација која је довела до тога да се 50 % ћелија обоји са једном или обе ове флуоресцентне боје ( $\text{CdC}_{50}$ ) израчуната је као непозната са добијене криве у истом софтверском пакету.

#### ***3.7.4.6. Одређивање промена по фазама ћелијске деобе***

Након завршене анализе обојености ћелија Анексином V и PI, микротитар плоче су центрифугиране а супернатант потом одстрањен. У све бунарчиће додато је по 0,25 mL 70% етанола и плоче су остављене у фрижидеру (4-8 °C) током 12-24 сата. Након вађења из фрижидера, поновног центрифугирања и одливања етанола, у бунарчиће је додато по 0,1 mL претходно припремљеног раствора рибонуклеазе А (Sigma-Aldrich, Кат. бр. R4875) (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  у фосфатном пуферу). Плоче су током наредних 60 минута држане у влажном инкубатору. PI (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  у фосфатном пуферу) је додат у волумену од 0,1 mL тако да је финална концентрација била 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  по бунарчићу и плоче су остављене у мраку на собној температури наредних 30 минута. Распоред ћелија по фазама ћелијске деобе и фреквенција ћелија у sub-G1 зони (узнапредовале фазе ћелијске смрти) су анализирани на Guava проточном цитометру користећи InCyte софтверски пакет.

#### ***3.7.4.7. Одређивање активације каспазе 8 и/или 9 у третираним ћелијама***

Ћелије су сађене у микротитар плочу са 96 бунарчића у волумену од 0,1 mL (100 000 ћелија/1 mL) и остављене у влажном инкубатору преко ноћи да би се залепиле за подлогу бунарчића. Сутрадан су на ћелије додата испитивана једињења у волумену од 0,05 mL, тако да је њихова финална концентрација износила 75  $\mu\text{M}$ . Бунарчићи у којима је на ћелије додат DMSO (0,05% у обогаћеној DMEM подлози) коришћене су као нетретирана контрола. Ћелије су потом држане у влажном инкубатору током 6 сати, након чега су подвргнуте трипсинизацији. По одливању трипсина из бунарчића, на ћелије је додато 0,2 mL фосфатног пуфера, те су потом третирани и нетретирани узорци према препорукама произвођача бојени специфичним реагенсима који детектују присуство активираних форми каспазе 8 (CaspGLOW™ fluorescein active caspase-8 staining kit, BioVision, Кат. бр. K188-25) и каспазе 9 (CaspGLOW™ red active caspase-9 staining kit, BioVision, Кат. бр. K199-25). Ћелије су анализирани на Guava проточном цитометру користећи InCyte софтверски пакет.

Статистичка значајност одређена је поређењем процента ћелија са активираним каспазом 8 и/или 9 у третираном узорку са процентом ћелија са активираним каспазом 8 и/или 9 у нетретираној контроли користећи неупарени Студентов t-тест са Welch -овом корекцијом, у GraphPad v8 софтверу.

#### ***3.7.4.8. Одређивање присуства супероксидних радикала у митохондријама***

Ћелије су сађене у микротитар плочу са 96 бунарчића у волумену од 0,1 mL (100 000 ћелија/1 mL) и остављене у влажном инкубатору преко ноћи да би се залепиле за подлогу бунарчића. Сутрадан су на ћелије додата испитивана једињења у волумену од 0,05 mL, тако да

је њихова финална концентрација износила 75 $\mu$ M. Бунарчићи у којима је на ћелије додат DMSO (0,05% у обогаћеној DMEM подлози) коришћене су као нетретирана контрола. Ћелије су потом држане у влажном инкубатору током 6 сати, након чега су подвргнуте трипсинизацији. По одливању трипсина из бунарчића, на ћелије је додато 0,2 mL фосфатног пуфера, те су потом третирани и нетретирани узорци према препорукама произвођача бојени MitoSox Red (MitoSOX™ Red, ThermoFischer Scientific, Кат. бр. M36008) реагенсом који специфично маркира супероксидне радикале у митохондријама. Ћелије су анализирани на Guava проточном цитометру користећи InCyte софтверски пакет.

Про-оксидативни потенцијал испитиваних једињења процењиван је на основу два параметра:

1. процента ћелија позитивних на присуство супероксидних радикала у митохондријама;
2. просечног интензитета флуоресценције (MFI, енгл. *Mean Fluorescent Intensity*) изражених у релативним јединицама (AU, енгл. *Arbitrary Units*).

Статистичка значајност одређена је поређењем MFI вредности утврђених за нетретирану контролу и третиране узорке користећи Kruskal-Wallis тест, са неупареним Студентовим *t*-тестом са Welch-овом корекцијом као post-тестом, у GraphPad v8 софтверу.

### 3.7.4.9 Испитивање антимиграторне активности

Ћелије су сађене у микротитар плочу са 96 бунарчића у волумену од 0,1 mL (100 000 ћелија/1 mL) и остављене у влажном инкубатору током неколико дана да би се умножиле до густине која прекрива 80% површине сваког од бунарчића (конфлуентан монолејер). По постизању жељене густине ћелија, обогаћени медијум је одливан из бунарчића и у бунарчиће је наливен DMEM медијум без феталног говеђег серума обогаћен само комбинацијом антибиотика (пеницилин 10 000 IU/mL, стрептомицин 10 000  $\mu$ g/mL). Микротитар плоче су остављене у влажном инкубатору током наредних 18-24 сати. Фетални говеђи серум обилује факторима раста, по структури протеини или хормони, који мотивишу ћелије да улазе у митотску деобу. Инкубирање ћелија у медијуму без серума доводи све ћелије у G0/G1 фазу и спречава њихову деобу. По истеку овог периода, врхом наставка за аутоматску пипету (Sarstedt, Кат. бр. 70.760.211) у сваком бунарчићу направљен је дефект у конфлуентном монолејеру. Дефект је формиран једним потезом наставка тако да се на дну бунарчића формира површина без ћелија са оштро дефинисаним ивицама које чини преостали неоштећени монолејер. Ћелије у бунарчићу су потом обојене са САМ, и направљено оштећење у монолејеру је снимљено на Celigo цитометру. Медијум из бунарчића је затим пажљиво одстрањен и додат је у бунарчиће по 0,1 mL DMEM-а којем је осим антибиотика додат и фетални говеђи серум али у концентрацији од 1%. Држање ћелија у медијуму без серума дуже од 24 сата може неповољно утицати на њихову виталност, а тиме и способност миграције. Серум у концентрацији до 1% не обезбеђује довољну стимулацију ћелијама за деобу, а истовремено их спречава да улазе у процес апоптозе или некрозе. Стога овакви услови експеримента искључују могућност да је попуњавање формираног дефекта у монолејеру могло да настане услед умножавања ћелија митотском деобом, или да до попуњавања није дошло услед ћелијске смрти инициране испитиваним једињењима<sup>180</sup>. Разблажења иницијаног штока испитиваних једињења направљена су у DMEM-у концентрације серума од 1% и додата у бунарчиће у волумену од 0,05 mL, тако да су финалне концентрације на ћелијама износиле 1 и 10  $\mu$ M. На нетретиране контролне ћелије додат је DMSO у концентрацији од 0,05% у DMEM-у са 1% феталног говеђег серума. Микротитар плоче су остављене у влажном инкубатору наредних 24 сата, након чега су ћелије поново бојене са САМ и снимљене на Celigo цитометру. Промене у површини формираног дефекта између 0 и 24 сата анализирани су помоћу Tscratch (TScratch softverski paket, Computational Science, ETH Zurich, Switzerland) софтвера.

Статистичка значајност промена изазваних сваки од тестираних једињења испитиваног у две концентрације у односу на нетретирану контролу утврђена је Kruskal-Wallis

тестом са неупареним Студентовим t-тестом са Welch-овом корекцијом као post-тестом, у GraphPad v. 8 софтверу.

### 3.8. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИКОРОЗИВНЕ АКТИВНОСТИ

#### 3.8.1 Припрема узорка и раствора електролита

Металне плочице од челика (Fe хладно ваљана челична трака C0146 C0147, 50 x 30 mm дебљине 1,5 mm, испитивана површина 1 cm<sup>2</sup> и Zn (30 x 30 mm дебљине 3 mm, испитивана површина 1 cm<sup>2</sup>) су припремљене (исполирани шмиргл папиром SiC до гранулације 1200 и испрани ацетоном у ултразвучном купатилу) и коришћене у електрохемијским мерењима. 0,5M раствор натријум хлорида (NaCl) је припремљен растварањем 29,22 g NaCl у 1000 mL дестиловане воде. 0,1M хлороводонична киселина (HCl) је припремљена растварањем 8,3 mL 37% HCl у 1000 mL дестиловане воде. Концентрација коришћених инхибитора била је мењана у циљу проналаска оптималне количине. Сви експерименти су изведени на собној температури на pH 3 и pH 7.

#### 3.8.2. Одређивање инхибиције корозије електрохемијским мерењима

Електрохемијска мерења су вршена у електрохемијској ћелији са три електроде на собној температури. Као радна електрода коришћени су узорци метала Fe (хладно ваљана челична трака C0146 C0147) и Zn (1 cm<sup>2</sup> испитиване површине), Платинаста мрежа је коришћена као помоћна електрода, док је засићена каломелова електрода (SCE, енгл. Saturated Calomel Electrode) коришћена као референтна електрода. Инхибиција корозије испитиваних једињења је одређена помоћу LPR и EIS метода.

##### 3.8.2.1. Одређивање инхибиције корозије методом линеарне поларизационе отпорности

Метода линеарне поларизационе отпорности (LPR) је коришћена за одређивање вредности густине струје корозије ( $j_{cor}$ , mV s<sup>-1</sup>) и брзине корозије  $v_{cor}$  на основу добијене вредности за поларизациони отпор метала ( $R_p$ ,  $\Omega$  cm<sup>2</sup>) у 0,5M воденом раствору NaCl и 0,1M HCl без и у присуству различитих концентрација инхибитора. LPR мерења су изведена поларизацијом радне електроде од катодног до анодног потенцијала ( $E_{cor}$ , mV) у опсегу од  $\pm 10$  mV, при том региструјући струју од 0,166 mV s<sup>-1</sup>. Затим је из експериментално добијених вредности  $E_{cor}$  потенцијала и струје конструисана поларизациона крива. Из нагиба експерименталне  $E_{cor}$ - $j$  криве одређена је вредност отпора  $R_p$ . Мерења су вршена коришћењем Reference 1010E Potentiostat/Galvanostat/ZRA, (произвођач Gamry Instruments, Inc.).

##### 3.8.2.2. Одређивање инхибиције корозије методом електрохемијске импедансне спектроскопије

Електрохемијска импедансна спектроскопија (EIS) омогућава одређивање вредности  $R_p$ , на основу којих се може израчунати брзина корозије  $v_{cor}$ . Мерења су извршена на потенцијалу корозије ( $E_{corr}$ ), у опсегу фреквенција од 100000 Hz до 0.1 Hz, користећи амплитуду наизменичног напона од  $\pm 10$  mV. Прво је снимљен одговарајући наизменични одзив, а затим одређена електрохемијска импеданса система Z, у зависности од фреквенције. На основу вредности електрохемијске импедансе на врло високим и врло ниским фреквенцијама добија се вредност  $R_p$ , која се даље користи за израчунавање густине струје, односно брзине корозије метала. Снимања су вршена коришћењем Reference 1010E Potentiostat/Galvanostat/ZRA, (произвођач Gamry Instruments, Inc.). Експериментални EIS резултати добијени су помоћу рачунског Gamry Elchem Analyst за израчунавање еквивалентног електричног кола.

## 4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Једињења која у својој структури имају хетероциклични прстен испољавају разноврсну биолошку и фармаколошку активност и стога налазе широку примену у медицинској хемији. Последњих година, због поседовања антифунгалне, антиканцер, антибактеријске, антиоксидативне и других активности, посебно су интересантне хетероцикличне Шифове базе<sup>3,4,11,18</sup>. Сходно томе, у овој дисертацији синтетисано је 40 различитих винил и имино деривата пиридина. Њихова структура је у потпуности окарактерисана експерименталним техникама, а резултати су употпуњени теоријским прорачунима геометрије, електронске структуре и физичко-хемијских својстава. Осим тога, проучаван је однос између структуре и биолошке/антиоксидативне активности.

Како деривати пиридина показују и антикорозивна својства, у овом раду су приказани и резултати инхибиције корозије метала помоћу синтетисаних деривата и проучаван је њихов механизам деловања. Такође, кроз предвиђање екотоксиколошких својстава имино деривата, процењен је и могући утицај синтетисаних једињења на животну средину.

### 4.1. *BIS*(ВИНИЛ)ПИРИДИНИЈУМ-ЈОДИДИ – *БВПЈ*

#### 4.1.1. Структурна и спектрална анализа *БВПЈ*

Структура синтетисаних *БВПЈ* деривата потврђена је применом IR и NMR (<sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C) спектроскопије, док је чистоћа једињења потврђена одређивањем тачке топљења и елементалном анализом.

IR спектри једињења показују траке у области 3002-3077 cm<sup>-1</sup> које се приписују C-H истежућој вибрацији винилне групе. Апсорпциони пикови између 2805-2857 cm<sup>-1</sup>, 1624-1483 cm<sup>-1</sup> и 1173-1357 cm<sup>-1</sup> потичу од вибрација истезања  $\nu(=N^+-CH_3)$ ,  $\nu(C=C)$  и  $\nu(C-N)$  група и потврђују присуство пиридина и ароматичне структуре у свим *БВПЈ*.

Присуство винил групе у NMR спектрима се уочава у области од 7,00 до 7,74 ppm. Хемијска померања протона из ароматичног и пиридинског прстена присутна су у области од 6,78 до 8,62 ppm. Такође, у <sup>13</sup>C NMR спектрима сигнали од 119,1 до 142,7 ppm и између 105,40 до 162,5 ppm одговарају C-атомима винил, арил и пиридил група у молекулу *БВПЈ*-а. На основу вредности хемијских померања у NMR спектрима синтетисаних *БВПЈ* процењен је утицај различитих супституената на промене електронске густине, као и постојање „push-pull” ефекта у испитиваним молекулима.

Детаљна карактеризација дата је у експерименталном делу, а NMR спектри у Прилогу (Слике П7.4-П7.7.).

#### 4.1.2. Оптимизација геометрије и TD-DFT прорачуни *БВПЈ* једињења

У овом делу биће приказане оптимизоване структуре и TD-DFT прорачуни најстабилнијих конформера винил деривата пиридина добијених на основу квантно-хемијских прорачуна. *БВПЈ* у својој структури садрже два симетрично супституисана арилна прстена која су за централни пиридински прстен повезана етиленском (винилном) групом. Како је ротација око етиленске везе могућа, било је потребно извршити оптимизацију геометрије узимајући у обзир велики број ротационих изомера како би се добила структура са најнижом енергијом. У литератури је познато да се конверзија између ротационих изомера догађа ротацијом арилвинилних делова око квази-једноструких веза са пиридинским прстеном кроз термичке или фотохемијске процесе<sup>30</sup>. Такође, у ранијим студијама<sup>29</sup> структурно сличних једињења објављено је да су најповољније конформације једињења у чврстом стању одређене слабирним интеракцијама између два атома водоника на винилним групама и њима блиских група. Положај *s-cis/s-cis* и *s-trans/s-trans* равнотеже у растварачима различите поларности зависи од енергије одговарајућег изомера, енергије активације неопходне за

међусобну конверзију, као и типа и јачине интеракције између растворене супстанце и растварача. Енергије најстабилнијих геометрија оба изомера петнаест **БВПЈ** израчунате су на DFT нивоу теорије користећи B3LYP/Def2TZVP метод и дате су у Табели 4.1.

**Табела 4.1** Енергије оптимизоване структуре<sup>[a]</sup> **БВПЈ** једињења израчунате на B3LYP/Def2TZVP нивоу теорије

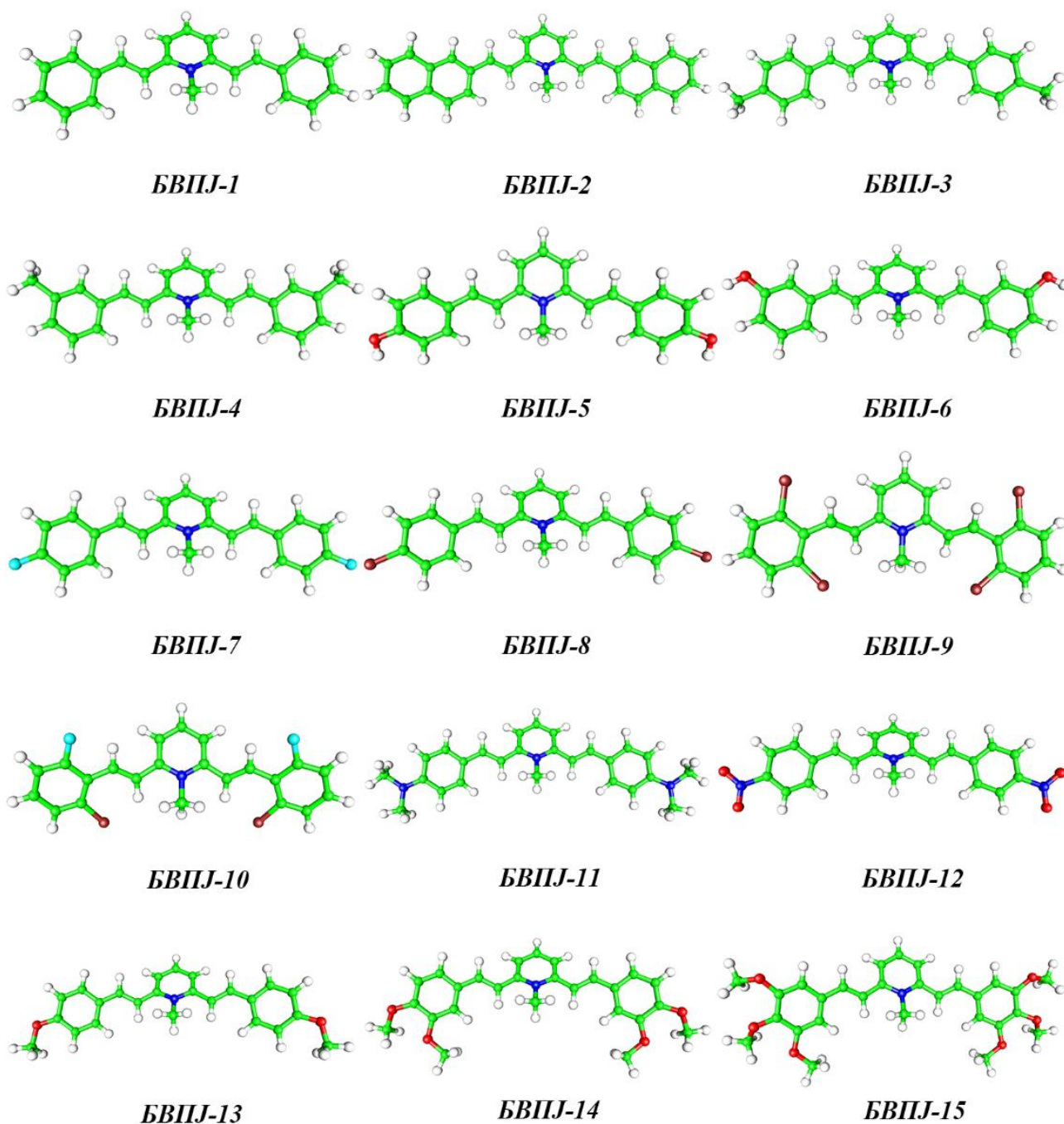
Једињење	Енергија (у атомским јединицама)		$\Delta E$ (kcal/mol)
	<i>s-trans/s-trans</i> изомер	<i>s-cis/s-cis</i> изомер	
<b>БВПЈ-1</b>	-905,23742	-905,22834	-5,70
<b>БВПЈ-2</b>	-1212,63497	-1212,62578	-5,77
<b>БВПЈ-3</b>	-983,90554	-983,89653	-5,65
<b>БВПЈ-4</b>	-983,90280	-983,89390	-5,58
<b>БВПЈ-5</b>	-1055,75594	-1055,74715	-5,51
<b>БВПЈ-6</b>	-1055,74958	-1055,74088	-5,46
<b>БВПЈ-7</b>	-1103,79731	-1103,78806	-5,80
<b>БВПЈ-8</b>	-1824,48456	-1824,47538	-5,76
<b>БВПЈ-9</b>	-2743,71593	-2743,70593	-6,28
<b>БВПЈ-10</b>	-2023,03443	-2023,02504	-5,89
<b>БВПЈ-11</b>	-1173,29633	-1173,28752	-5,53
<b>БВПЈ-12</b>	-1314,39540	-1314,38607	-5,86
<b>БВПЈ-13</b>	-1134,38775	-1134,37902	-5,48
<b>БВПЈ-14</b>	-1363,50965	-1363,50185	-4,90
<b>БВПЈ-15</b>	-1592,63340	-1592,62566	-4,86

[a] узета је у обзир само структура катјона, јодидни јон је искључен из прорачуна

Енергије оптимизованих структура у гасној фази (Табела 4.1) указују на доминантно присуство *s-trans/s-trans* конформационог облика свих испитиваних једињења, што је у складу са претходно пријављеним кристалографским подацима<sup>29</sup>. У претходној студији оптимизације геометрије 4-хидрокси супституисаног деривата (**БВПЈ-5**), *s-cis/s-cis* конформација је утврђена као најстабилнија<sup>24</sup>. Међутим, ови подаци су добијени помоћу DGDZVP основног сета који није био примењиван за **БВПЈ** једињења, па самим тим добијени резултати нису били упоредиви. Структуре и геометријски елементи *s-trans/s-trans* конформера приказани су на Слици 4.1 и у табели у Прилогу (Табела П7.1). У зависности од врсте и броја група везаних за два симетрична ароматична прстена варирају и дужине веза, растојање и углови између веза. На Слици П7.8 дати су торзиони углови значајни за анализу геометријских карактеристика **БВПЈ** једињења.

На основу приказаних резултата добијених оптимизацијом геометрије (Табела П7.1) приметан је утицај супституената на поједине дужине веза. Електрон-донорске групе скраћују дужину C<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub> (C<sub>6</sub>-C<sub>7'</sub>) и C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub> (C<sub>8'</sub>-C<sub>9'</sub>) веза, осим када се група налази у *meta*- положају (Слика 4.1 и Табела П7.1). Најјачи утицај на смањење дужине веза C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub> и C<sub>6</sub>-C<sub>7'</sub>-C<sub>8'</sub>-C<sub>9'</sub> показују групе у *para*- положају због високог доприноса проширене  $\pi$ -електронске делокализације. Мањи утицај електрон-донорске групе у *ortho*- положају повезан је са стерним ефектом, који доводи до модификације степена делокализације  $\pi$ -електрона. Супротно томе, код једињења која у својој структури садрже електрон-акцепторске групе долази до повећања дужине ове четири везе (са изузетком халогена у *para*- положају), док је утицај на дужину C<sub>1</sub>-N<sub>1</sub> везе занемарљив. Другачији тренд код атома халогена је последица њихових двојаких својстава, односно позитивног резонанционог (+R) и негативног индуктивног ефекта (-I). Изузетак су, такође, и дужине двоструких C<sub>7</sub>=C<sub>8</sub> (C<sub>7</sub>=C<sub>8'</sub>) веза које опадају код једињења са електрон-акцепторским групама, а повећавају се код једињења са електрон-донорским супституентима. Анализом елемената геометрије **БВПЈ** закључује се да највећи утицај на

дужине веза имају једињења са најјачом електрон-акцепторском ( $-\text{NO}_2$ ) и електрон-донорском групом ( $-\text{N}, \text{N}(\text{CH}_3)_2$ ).



**Слика 4.1** Оптимизоване геометрије најстабилнијег *s-trans/s-trans* конформационог облика **BPPJ** једињења

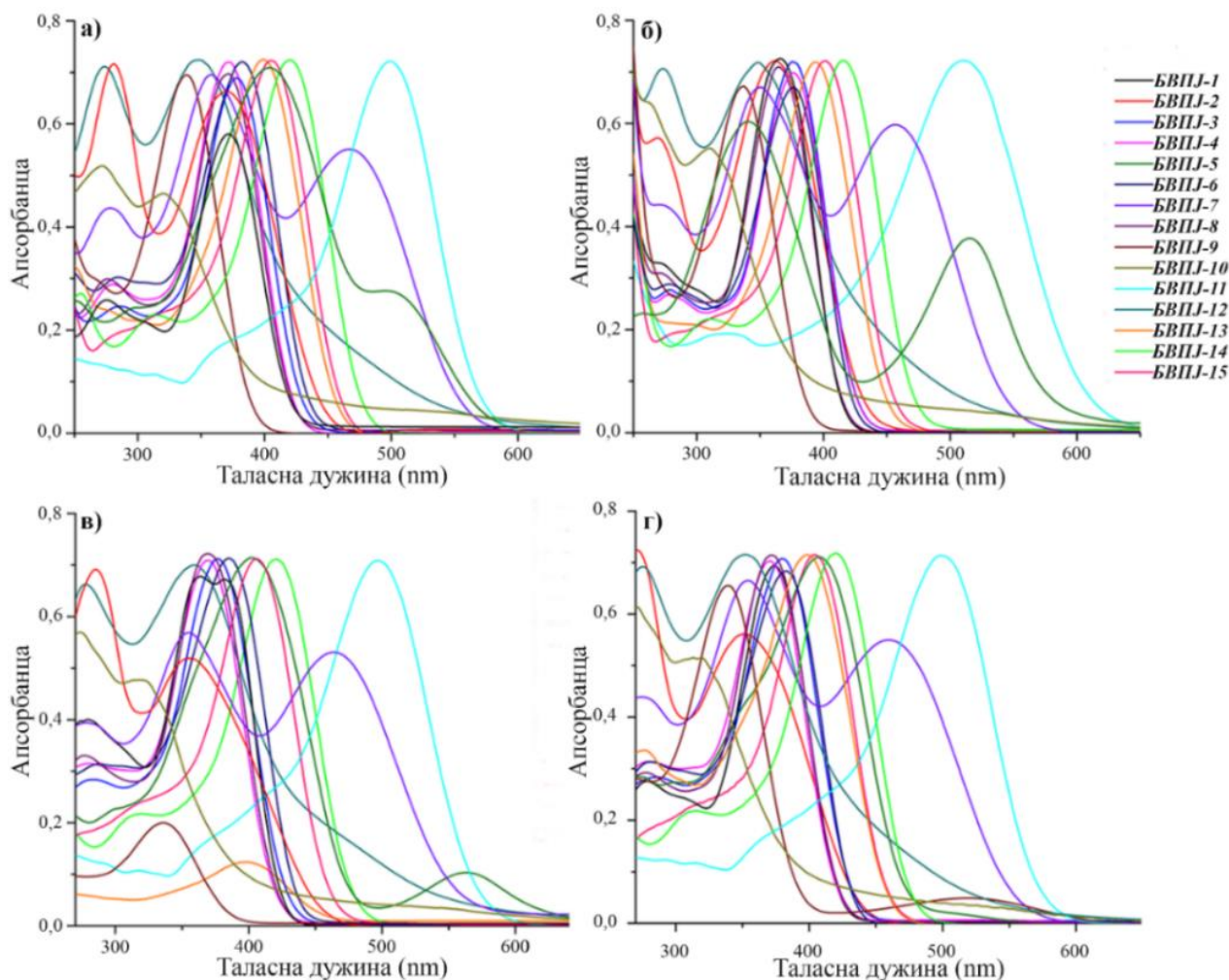
Поред тога, у поређењу са несупституисаним једињењем (**BPPJ-1**), уочено је да углови веза варирају у различитим једињењима. Према резултатима из Табеле П7.1, једињења са халогеним супституентима у *ortho*- положају имају највећи утицај на углове веза. Ово се може повезати са специфичном природом и Ван дер Валсовим (енгл. *Van der Waals*) радијусом атома халогена (уједначен допринос позитивног резонантног (+R) и негативног индуктивног (-I) ефеката). Ова својства су посебно изражена код најмањег атома халогена, флуора. Сви ови ефекти за последицу имају одговарајуће прилагођавање геометрије као одговор на

електронске захтеве околине. Из вредности торзионих углова датих у Табели П7.1 види се одступање од планарности. Ово одступање се повећава са порастом електрон-акцепторских способности супституента, док једињење са најјачом електрон-донорском групом показује већу планарност.

### 4.1.3. UV-Vis спектрална анализа

#### 4.1.3.1. Солватохромизам испитиваних БВПЈ – вишепараметарска корелација

У овој дисертацији солватохромна својства испитиваних једињења проучавана су одређивањем UV-Vis апсорпционих максимума у изабраном сету растварача. UV-Vis спектроскопска метода се често користи за процену утицаја растварача, смеше растварача, ефеката супституената, температуре и других параметара на електронску структуру молекула. Апсорпциони спектри проучаваних **БВПЈ** одређени су у двадесет растварача различите поларности. Резултати показују сложеност спектра и присуство два или три, по таласним дужинама блиских, електронских прелаза. На Слици 4.2 приказани су UV-Vis апсорпциони спектри свих испитиваних једињења у четири изабрана растварача. Вредности главних апсорпционих трака чији интензитети и фреквенције апсорпције зависе од електронске структуре испитиваних једињења и својстава растварача дате су у Прилогу (Табела П7.2).



Слика 4.2 Апсорпциони спектри **БВПЈ** једињења у: а) EtOH, б) AcN, в) DMSO и г) FA



У поређењу са несупституисаним једињењем **БВПЈ-1**, у свим коришћеним растварачима електрон-донорске групе узрокују повећање  $\pi$ -коњугације и померају апсорпционе максимуме ка већим таласним дужинама (батохромно померање) услед ефикаснијег преноса  $\pi$ -електрона кроз супституисане ароматичне прстенове. Супротно томе, електрон-акцепторске групе доводе до померања апсорпционих максимума ка мањим таласним дужинама (хипсохромно померање).

Према Вангу (енгл. *Wang*) и сарадницима<sup>28</sup>, апсорпциони и емисиони максимуми спектра *N*-метил-2,3-дистирил пиридина се након метилације померају ка већим таласним дужинама стварајући збирни коњуговани систем врло сличан молекулу цијанина. Анализа утицаја супституената на промену електронске густине у испитиваним једињењима у складу је са познатом чињеницом да повећана коњугација електрона показује веће батохромно померање.

Из вредности апсорпционих максимума ( $\nu_{\max}$ ) (Табела П7.2 и Слика 4.2) примећује се да једињења са електрон-донорском групом у *para*- положају услед боље  $\pi$ -електронске коњугације показују већи батохромни померај. С друге стране, присуство електрон-донорске метил групе у *meta*- положају у једињењу **БВПЈ-4** ремети коњугацију и у поређењу са једињењем **БВПЈ-1** показује хипсохромно померање. На основу вредности померања апсорпционих максимума (Табела П7.2) у поларним растварачима уочава се да *para*-хидрокси супституисано једињење (**БВПЈ-5**) показује веће батохромно померање. Ефекат положаја супституента у молекулу на солватохромна понашања једињења може се објаснити упоређивањем једињења **БВПЈ-13**, **БВПЈ-14** и **БВПЈ-15** на једној и **БВПЈ-9** и **БВПЈ-10** на другој страни. UV-Vis спектри једињења **БВПЈ-13**, **БВПЈ-14** и **БВПЈ-15** (моно-, ди- и три-супституисани деривати са електрон-донорском метокси групом) показују батохромно померање у поређењу са несупституисаним једињењем **БВПЈ-1**.

Сагледавајући структуру очекивано је да ће једињење **БВПЈ-15** са три јаке електрон-донорске групе показати највеће померање. Међутим, збирни утицаји две *meta*- и једне *para*-метокси групе доприносе нижој делокализацији  $\pi$ -електрона и на тај начин смањују батохромно померање спектра у поређењу са спектром једињења **БВПЈ-14**. Са друге стране, халоген-супституисани деривати **БВПЈ-9** и **БВПЈ-10** показују веће хипсохромно померање у односу на једињење са најјачом електрон-акцепторском групом (**БВПЈ-12**). Атоми халогена показују комплексан утицај услед доприноса позитивног резонанционог и негативног индуктивног ефекта, као и стерног ефекта атома у *ortho*- положају. За очекивати је да ће увођење супституента са јачим електрон-донорским ефектом у молекулу показати веће батохромно померање, као последица присуства интрамолекулског преноса наелектрисања (ICT енгл. *Intramolecular Charge Transfer*). У складу са тим за једињење са најјачом електрон-донорском групом (**БВПЈ-11**) примећује се батохромни померај апсорпционог максимума за  $\nu_{\max} = 20,34 \text{ cm}^{-1}$  (Слика 4.2).

#### 4.1.3.2. Проучавање солватохромизма **БВПЈ** једињења методом линеране корелације енергије солватације – LSER анализа

Положај, интензитет и облик трака апсорпционих спектра зависе од својстава растварача. Вишепараметарски приступ се често примећује како би се описао и проценио утицај растварача на промену апсорпционих максимума. Интеракције између молекула растварача и растворене супстанце квантитативно се процењују помоћу Камлет-Тафтовог и Каталановог LSER модела. LSER анализа се често користи као основни концепт предиктивне анализе који се односи на проучавање везе између структуре и својстава испитиваних молекула. Вредности параметара коришћених растварача за оба LSER модела дате су у прилогу (Табела П7.3)<sup>53,58</sup>. Коефицијент корелације (*R*), стандардна девијација (*SD*), Фишеров тест значајности (*F*), вредности регресионих коефицијента *v*, *s*, *a*, *b* (Камлет-Тафт) и *c*, *d*, *a*, *b* (Каталан) добијене на нивоу поузданости 95% представљени су у Табелама 4.2 и 4.3.

Статистичка анализа је показала да се обе једначине (Камлет-Тафт и Каталан) могу успешно користити у LSER анализи испитиваних симетричних **БВПЈ** једињења.

Разноврсност резултата корелације, у односу на предзнак и вредности солватохромних параметара датих у Табели 4.2, показује да и ефекти растварача и ефекти супституената утичу на положај UV апсорпционих максимума. Негативни предзнак коефицијента  $s$  за једињења од **БВПЈ-4** до **БВПЈ-6**, од **БВПЈ-8** до **БВПЈ-10**, **БВПЈ-12** и **БВПЈ-13** указује на батохромно померање са повећањем диполарности/поларизабилности растварача. Хипсохромни померај (позитиван  $s$  коефицијент), примећен код осталих једињења, сугерише бољу стабилизацију побуђеног стања у односу на основно стање. Код једињења **БВПЈ-12** јак електрон-акцепторски ефекат нитро групе доприноси већој стабилизацији диполарне структуре у побуђеном стању. Сличан резултат је добијен за једињење **БВПЈ-10** и осликава синергетски утицај електрон-акцепторског и резонанционог доприноса атома флуора као и стерног ефекта оба супституента на стабилизацију побуђеног стања. Иначе, ефекти растварача на промену  $\nu_{\max}$  за једињења са хидрокси супституентима (**БВПЈ-5** и **БВПЈ-6**), доприносе већој стабилизацији побуђеног стања. Овакво понашање је такође примећено и раније код сличних једињења<sup>24</sup>, и може се претпоставити да потиче од високог степена симетрије испитиваних једињења. Поред тога, сагледавајући структуру синтетисаних **БВПЈ** једињења, може се видети да не садрже слободан електронски пар на атому азота из пиридина, који би могао да прихвати протон у интеракцији са растварачем. Међутим, растварачи који поседују атом водоника могу остварити водоничну интеракцију са кисеоником или азотом из супституената на фенилном (арилном) прстену.

Највеће вредности коефицијента  $b$ , пронађене за једињења **БВПЈ-5** и **БВПЈ-6**, указују на НВА интеракцију са растварачем преко електронског пара у -ОН групама на фенилном прстену са НВД растварачима. Негативна вредност коефицијента  $b$ , указује да долази до батохромног померања UV-Vis спектра једињења и да је већа стабилност побуђеног стања у односу на основно са повећањем НВА својстава растварача. Добијени резултати такође показују да је протон-донорски капацитет -ОН групе у *para*- положају значајно повећан услед присуства ефекта пиридинијум катјона који узрокује повећање протон-донорског капацитета у односу на -ОН групу у *meta*- положају (-2,21 насупрот -1,41).

На основу добијених вредности за коефицијент  $a$  (Табела 4.2) може се закључити да је са повећањем НВД способности растварача већа стабилизација основног стања за једињења **БВПЈ-1**, **БВПЈ-2**, **БВПЈ-6**, **БВПЈ-8**, **БВПЈ-12**, **БВПЈ-14** и **БВПЈ-15** односно побуђеног стања за сва остала једињења. Овакви специфични ефекти растварача у великој мери зависе од способности успостављања водоничне везе на одговарајућим местима у испитиваним једињењима и њихове конформационе расподеле.

**Табела 4.2** Резултати корелационе анализе за **БВПЈ** једињења добијени применом Камлет–Тафтове једначине

Једињење	$w \times 10^{-3}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$s \times 10^{-3}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$b \times 10^{-3}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$a \times 10^{-3}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$R^a$	$SD^b$	$F^c$	Растварачи искључени из корелације
<b>БВПЈ-1</b>	25,19 $\pm 0,19$	0,90 $\pm 0,1$	0,95 $\pm 0,20$	0,34 $\pm 0,09$	0,93	0,11	20,94	THF, Ацетон, ТСМ, AcN, Анизол, NMF,
<b>БВПЈ-2</b>	26,45 $\pm 0,20$	0,18 $\pm 0,21$	0,72 $\pm 0,18$	0,55 $\pm 0,12$	0,93	0,14	21,08	Ацетон, EtOAc, DMF, DMSO, EtOH, Диоксан
<b>БВПЈ-3</b>	26,41 $\pm 0,08$	0,10 $\pm 0,08$	0,17 $\pm 0,09$	-0,40 $\pm 0,04$	0,96	0,05	42,89	Анизол, ТСМ, <i>t</i> -AmOH, THF
<b>БВПЈ-4</b>	27,44 $\pm 0,08$	-0,11 $\pm 0,07$	-0,34 $\pm 0,08$	-0,28 $\pm 0,04$	0,94	0,06	31,41	Анизол, ТСМ, THF, DMF
<b>БВПЈ-5</b>	27,26 $\pm 0,33$	-0,78 $\pm 0,33$	-2,21 $\pm 0,27$	-0,72 $\pm 0,18$	0,95	0,22	34,68	EtAc, THF, Диоксан, 2-PrOH, AcN
<b>БВПЈ-6</b>	27,04 $\pm 0,15$	-0,31 $\pm 0,16$	-1,41 $\pm 0,14$	0,27 $\pm 0,09$	0,95	0,11	32,81	EtAc, THF, DMSO, DMA, Анизол, 1- PrOH
<b>БВПЈ-7</b>	22,03 $\pm 0,11$	0,28 $\pm 0,11$	-0,90 $\pm 0,14$	-0,19 $\pm 0,06$	0,95	0,08	33,09	Анизол, Ацетон, ТСМ, <i>t</i> -AmOH, 2- PrOH
<b>БВПЈ-8</b>	26,81 $\pm 0,11$	-0,17 $\pm 0,13$	-0,22 $\pm 0,11$	0,48 $\pm 0,07$	0,93	0,08	24,90	DMF, DMSO, <i>t</i> - AmOH, AcN, NMF
<b>БВПЈ-9</b>	29,84 $\pm 0,07$	-0,14 $\pm 0,08$	-0,12 $\pm 0,07$	-0,29 $\pm 0,05$	0,93	0,05	20,21	<i>i</i> -PrOH, NMF, MeOH, <i>t</i> -AmOH, Анизол, THF
<b>БВПЈ-10</b>	28,26 $\pm 0,31$	-1,17 $\pm 0,59$	0,75 $\pm 0,54$	-0,69 $\pm 0,22$	0,93	0,23	19,90	<i>t</i> -AmOH, NMF, Ацетон, MeOH, THF, DMA
<b>БВПЈ-11</b>	20,15 $\pm 0,20$	0,44 $\pm 0,20$	-0,69 $\pm 0,23$	-0,54 $\pm 0,13$	0,94	0,14	23,39	<i>i</i> -BuOH, <i>t</i> -AmOH, DMA, FA, Анизол, DMSO, NMF
<b>БВПЈ-12</b>	28,93 $\pm 0,28$	-1,60 $\pm 0,39$	-0,17 $\pm 0,24$	0,69 $\pm 0,15$	0,95	0,14	28,20	<i>i</i> -BuOH, <i>t</i> -AmOH, DMA, Анизол, DMSO, F, NMF
<b>БВПЈ-13</b>	25,38 $\pm 0,12$	-0,94 $\pm 0,15$	0,77 $\pm 0,13$	-0,36 $\pm 0,08$	0,94	0,09	20,92	FA, <i>i</i> -PrOH, Диоксан, AcN, DMA, NMP
<b>БВПЈ-14</b>	22,14 $\pm 0,20$	0,42 $\pm 0,19$	0,13 $\pm 0,18$	0,10 $\pm 0,11$	0,93	0,13	14,16	Диоксан, EtAc, Ацетон, AcN, Анизол, DMSO, <i>i</i> - PrOH
<b>БВПЈ-15</b>	23,90 $\pm 0,08$	0,48 $\pm 0,09$	0,40 $\pm 0,08$	0,21 $\pm 0,05$	0,93	0,06	25,28	Диоксан, EtAc, NMF, DMA

<sup>a</sup>Коефицијент корелације; <sup>b</sup>Стандардна девијација; <sup>c</sup>Фишерев тест значајности.

Резултати квантитативног раздвајања неспецифичних ефеката растварача на ефекте поларизабилности и диполарности (коефицијенти  $s$  и  $d$ ) изведени применом Каталанове једначине (једначина 2.2) дати су у Табели 4.3. Ови резултати показују боље разумевање привлачних/одбојних интеракција растварача и растворене супстанце и омогућавају процену њиховог одговарајућег доприноса на померање  $\nu_{\text{max}}$  у UV-Vis спектру. Корелациони резултати

(Табела 4.3) потврђују да су поларизација и диполарност растварача главни фактори који утичу на померање  $\nu_{\max}$ , док киселост и базност растварача имају умерен до мали допринос.

**Табела 4.3** Резултати корелационе анализе за **БВПЈ** једињења добијени применом Каталанове једначине.

Једињење	$\nu \times 10^{-3}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$c \times 10^{-3}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$d \times 10^{-3}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$b \times 10^{-3}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$a \times 10^{-3}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$R^a$	$Sd^b$	$F^c$	Растварачи искључени из корелације
<b>БВПЈ-1</b>	25,77 $\pm 0,29$	0,33 $\pm 0,33$	0,92 $\pm 0,12$	0,20 $\pm 0,12$	0,72 $\pm 0,12$	0,94	0,09	18,63	THF, EtAc, NMF, EtOH, DMA DMA, AcN,
<b>БВПЈ-2</b>	27,13 $\pm 0,48$	1,81 $\pm 0,61$	1,80 $\pm 0,26$	0,76 $\pm 0,21$	-0,72 $\pm 0,19$	0,96	0,13	22,98	Диоксан, THF, EtOH, NMP, Диоксан,
<b>БВПЈ-3</b>	25,29 $\pm 0,23$	0,04 $\pm 0,26$	1,11 $\pm 0,13$	0,41 $\pm 0,10$	-0,50 $\pm 0,09$	0,95	0,08	29,88	THF, EtAc
<b>БВПЈ-4</b>	27,27 $\pm 0,27$	-1,07 $\pm 0,33$	0,87 $\pm 0,13$	-0,22 $\pm 0,11$	-0,48 $\pm 0,09$	0,95	0,28	25,36	Диоксан, EtAc, AcN THF, EtOH
<b>БВПЈ-5</b>	29,10 $\pm 0,71$	-3,69 $\pm 0,87$	0,67 $\pm 0,31$	-2,92 $\pm 0,33$	-1,63 $\pm 0,30$	0,96	0,24	30,74	EtAc, iPrOH THF
<b>БВПЈ-6</b>	27,73 $\pm 0,60$	-0,37 $\pm 0,969$	-0,81 $\pm 0,24$	-1,50 $\pm 0,24$	0,39 $\pm 0,24$	0,93	0,17	14,93	NMF, DMA, DMSO, EtAc, THF
<b>БВПЈ-7</b>	20,76 $\pm 0,29$	-0,18 $\pm 0,32$	1,20 $\pm 0,17$	-0,29 $\pm 0,14$	-0,13 $\pm 0,11$	0,94	0,09	17,81	Диоксан, THF, EtAc, TCM,
<b>БВПЈ-8</b>	28,32 $\pm 0,24$	-2,10 $\pm 0,28$	-0,10 $\pm 0,10$	-0,44 $\pm 0,10$	-0,85 $\pm 0,10$	0,96	0,07	30,89	DMSO, DMF, MeOH
<b>БВПЈ-9</b>	30,44 $\pm 0,25$	-0,97 $\pm 0,34$	-0,23 $\pm 0,09$	-0,41 $\pm 0,11$	-0,55 $\pm 0,09$	0,93	0,05	14,80	iPrOH, AcN, Ацетон, NMF, MeOH
<b>БВПЈ-10</b>	33,11 $\pm 0,72$	-2,31 $\pm 0,92$	-0,57 $\pm 0,30$	1,02 $\pm 0,32$	-2,51 $\pm 0,36$	0,93	0,22	16,20	NMF, Ацетон, MeOH, THF
<b>БВПЈ-11</b>	19,17 $\pm 0,59$	-1,98 $\pm 0,50$	1,75 $\pm 0,43$	-0,14 $\pm 0,20$	-0,32 $\pm 0,21$	0,95	0,14	35,20	Диоксан, THF, DMA, EtOH,
<b>БВПЈ-12</b>	28,91 $\pm 0,73$	0,60 $\pm 0,73$	-1,96 $\pm 0,45$	-0,27 $\pm 0,38$	1,76 $\pm 0,29$	0,94	0,20	20,44	DMA, AcN Диоксан, iBuOH, EtAc,
<b>БВПЈ-13</b>	27,24 $\pm 0,29$	-2,65 $\pm 0,36$	-0,38 $\pm 0,10$	0,27 $\pm 0,11$	-0,70 $\pm 0,13$	0,94	0,07	17,82	FA, NMF, 1-BuOH, DMSO, iPrOH
<b>БВПЈ-14</b>	22,83 $\pm 0,37$	-1,26 $\pm 0,44$	1,53 $\pm 0,20$	0,25 $\pm 0,16$	0,15 $\pm 0,15$	0,95	0,12	26,90	Диоксан, EtAc, THF
<b>БВПЈ-15</b>	24,29 $\pm 0,21$	0,42 $\pm 0,26$	0,53 $\pm 0,10$	0,21 $\pm 0,09$	0,43 $\pm 0,09$	0,94	0,06	19,78	Диоксан, DMSO, MeOH

<sup>a</sup>Коефицијент корелације; <sup>b</sup>Стандардна девијација; <sup>c</sup>Фишеров тест значајности

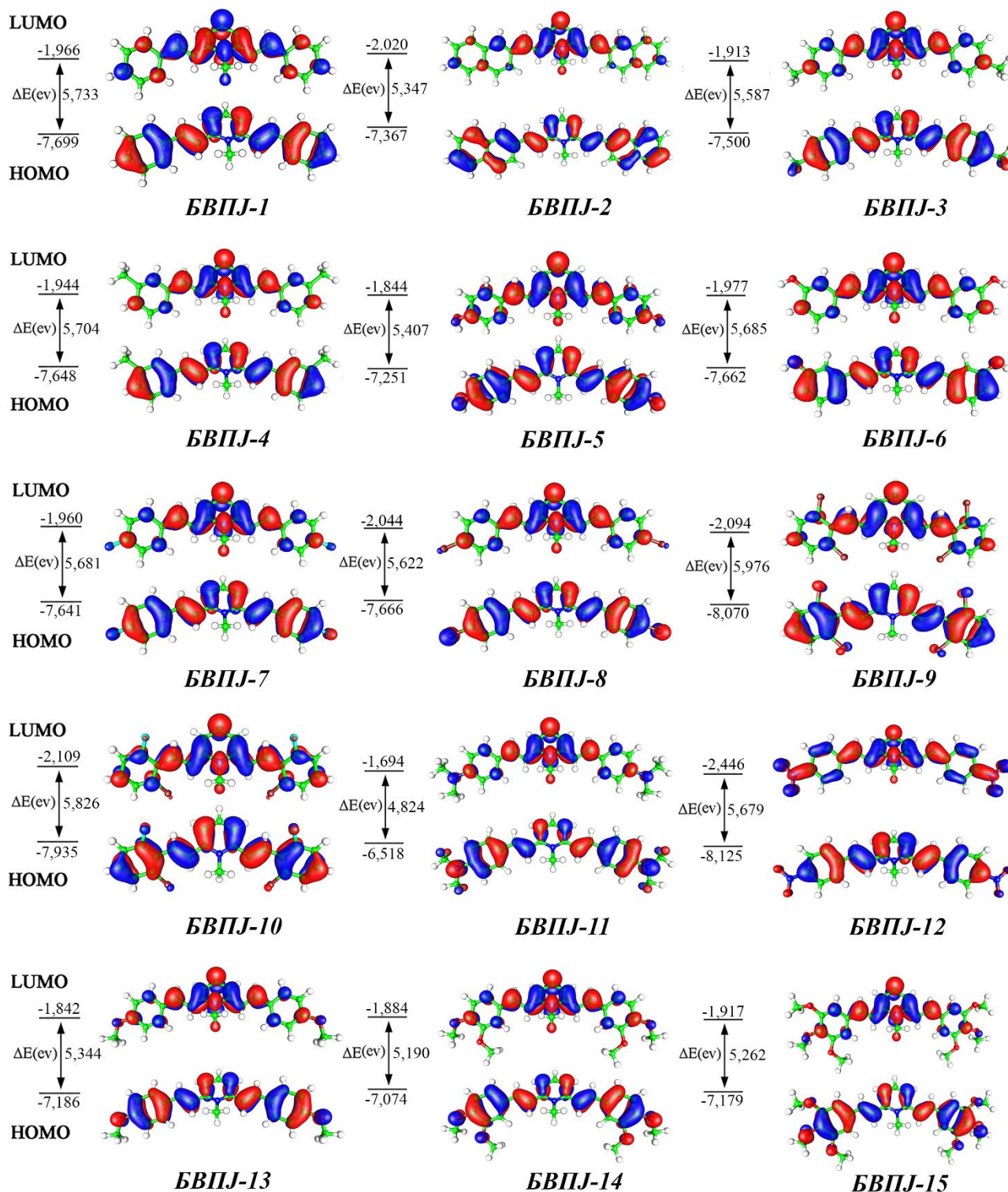
Испитивана једињења имају перманентни електрични диполни момент услед симетричне структуре<sup>181,182</sup>, па се самим тим и могу очекивати значајне диполарне интеракције растварача и растворених супстанци. Високе вредности коефицијента  $d$  за једињења **БВПЈ-2** (1,80), **БВПЈ-11** (1,75), **БВПЈ-12** (-1,96) и **БВПЈ-14** (1,53) ово потврђују. Може се закључити да суперпозиција локалног дипола, односно поларизована структура пиридинијум катјона, као и ефекти супституента могу допринети јачим диполарним интеракцијама између растварача и растворене супстанце. Из тога произилази да се величина диполарне интеракције повезује са електрон-акцепторским потенцијалом присутним на арилним престеновима, као и са бројем метокси група у једињењима **БВПЈ-13**, **БВПЈ-14**, **БВПЈ-15**. Највећа вредност диполне интеракције за једињење **БВПЈ-12** може се објаснити суперпозиционирањем два супротна електрон-акцепторска дејства, нитро групе и пиридина. Уопштено, диелектрично својство молекула под дејством растварача може променити покретљивост  $\pi$ -електрона, што значи да се ефекат поларизације не преноси нужно директно са супституента на растварач.

Увођење супституената са различитим електронским својствима (електрон-акцепторска/електрон-донорска) као и јачина њиховог утицаја (јака, умерена, слаба) узрокује одговарајућу промену електронске густине па стога и постоји широк опсег вредности коефицијента  $s$ . На основу вредности овог коефицијента види се да поларизабилност растварача има највећи утицај на једињења која имају јаке електрон-донорске супституенте. Тренд промене коефицијената  $s$  и  $d$  су дефинисани на следећи начин: већим вредностима коефицијента  $s$  одговарају ниже вредности коефицијента  $d$ . Изузетак су једињења **БВПЈ-2**, **БВПЈ-4**, **БВПЈ-11** и **БВПЈ-14**. Специфичне интеракције између растварача и растворене супстанце остварене водоничним везивањем су од мањег значаја, осим за једињења **БВПЈ-5**, **БВПЈ-6** и **БВПЈ-10**, где се високе вредности НВА ефекта повезују са присуством -ОН група. Оба коефицијента  $a$  и  $b$  повезана са НВД и НВА ефектима растварача имају различит предзнак и релативно мале вредности/варијације, док су изузеци присутни за једињења **БВПЈ-5** и **БВПЈ-10**.

#### 4.1.3.3. Природа молекулских орбитала – TD-DFT студија

Понашање испитиваних једињења изазвано променом својстава растварача може се описати помоћу електронске структуре једињења у основном и побуђеном стању. Резултати TD-DFT прорачуна стабилности молекула показали су да *s-trans/s-trans* облик доминира и у гасној фази и у раствору. Будући да је енергија потребна за ротацију већа од топлотне енергије изомерних облика, сматра се да је *s-trans/s-trans* изомер доминантан у раствору. До сличних резултата дошли су Перуђа (енгл. *Perugia*) и сарадници који су проучавали структуру апсорпционих трака једињења код којих се двострука веза налази у *orto*- положају у односу на атом азота централног пиридинског прстена<sup>183</sup>. Њихова заједничка карактеристика је присуство апсорбанце између 350–450 nm која потиче од *s-trans* изомера и траке средњег интензитета између 275–315 nm која се приписује *cis*-ротамеру.<sup>181</sup>

Механизам електронског побуђивања и промене укупне расподеле наелектрисања у основном и побуђеном стању испитиваних молекула проучавани су на основу прорачуна енергије граничних молекулских орбитала ( $E_{\text{HOMO}}$ / $E_{\text{LUMO}}$ ) и њихове разлике ( $E_{\text{gap}}$ ) применом B3LYP/Def2TZVP методе у DMSO. Добијени резултати су представљени на Слици 4.3 и Табели П7.4. Из добијених података види се да се вредности  $E_{\text{gap}}$  смањују за молекуле са електрон-донорским супституентима и повећавају за једињења са електрон-акцепторским супституентима, у поређењу са несупституисаним једињењем **БВПЈ-1**. Веће вредности  $E_{\text{gap}}$  се примећују код једињења са најјачим електрон-акцепторским супституентом **БВПЈ-12** и код *orto*- халоген дисупституисаних једињења **БВПЈ-9** и **БВПЈ-10**, и последица је веће стабилизације НОМО орбитала, тј. НОМО орбитале ових једињења имају нижу енергију у односу на несупституисано једињење. Оптимизоване геометрије и одговарајући параметри дати на Слици 4.3 и у Табели П7.4, указују да ова једињења највише одступају од планарности.



Слика 4.3 НОМО и LUMO орбитале и вредности  $E_{\text{gap}}$  за *s-trans/s-trans* изомер у раствору DMSO

Као последица *N*-метилације централног пиридинског прстена и присуства јодидног јона, *s-trans/s-trans* конформација је најстабилнија за сва једињења. НОМО орбитала несупституисаног (БВПЈ-1) и нафтил супституисаног једињења (БВПЈ-2) је делокализована преко целог молекула, док је LUMO орбитала померена према централном пиридинском прстену (Слика 4.3). Увођење слабије електрон-донорске метил групе у једињењима БВПЈ-3 и БВПЈ-4 не доводи до значајне промене у електронској густини НОМО и LUMO орбитала у

поређењу са једињењем **БВПЈ-1**. Енергетска разлика ових једињења слична је енергетској разлици једињења **БВПЈ-1**, иако присуство нафтил групе доводи до значајног смањења  $E_{\text{gap}}$  вредности. Са друге стране, увођење јаке електрон-донорске хидроксилне групе у једињењима **БВПЈ-5** и **БВПЈ-6** узрокује померање електронске густине НОМО орбитала према спољашњем фенилном прстену. Поред тога, увођење флуоро и хлоро група у једињењима од **БВПЈ-7** до **БВПЈ-10**, и увођење диметиламино и нитро групе (једињења **БВПЈ-11** и **БВПЈ-12**) доводи до сличне дистрибуције електронске густине у НОМО и LUMO орбиталама. Већа стабилизација НОМО и LUMO орбитале узрокује да је вредност  $E_{\text{gap}}$  за **БВПЈ-9** највећа (Слика 4.3 и Табела П7.4) а најмања за **БВПЈ-11**. Код једињења **БВПЈ-13** до **БВПЈ-15** електронска густина и код НОМО и код LUMO орбитала је делокализована, с тим што су код сва три једињења НОМО орбитале делокализоване симетрично на метокси супституисане фенилне прстенове, док су LUMO орбитале делокализоване на централном пиридинском прстену. Резултати теоријских израчунавања оптимизације геометрије ова три једињења показују да постоје одговарајуће разлике у њиховој просторној конформацији. Код једињења **БВПЈ-13** *para*-ОСН<sub>3</sub> метокси група, која има умерен електрон-донорски карактер, се налази у истој равни као и суседно фенилно језгро (торзиони угао 179,8°) што омогућава неометану интеракцију између њих. Супротно томе, код једињења **БВПЈ-14** метокси група која се налази у мета положају је ротирана и не лежи у истој равни са фенилним језгром (торзиони угао 130,0°) што онемогућава ефикасну интеракцију па је њен електрон-донорски утицај смањен. Утицај *para*-ОСН<sub>3</sub> групе је непромењен (торзиони угао 179,9°). Код једињења **БВПЈ-15** постоји значајно стерно одбијање које узрокује девијацију од планарности две -ОСН<sub>3</sub> групе везане на угљеникове атоме С<sub>11</sub> и С<sub>12</sub> за 141,5° односно 135,1°. Таква оријентација утиче на смањење електрон-донорског капацитета *p*-ОСН<sub>3</sub> групе и електрон-акцепторског потенцијала *m*-ОСН<sub>3</sub> групе која је везана за угљеников атом С<sub>11</sub> (Слика 3.1). На слици 4.3 се може видети како електронски ефекти супституената утичу на укупну расподелу наелектрисања у НОМО/LUMO орбиталама. Евидентно је да идући од **БВПЈ-13** до **БВПЈ-15** једињења, са сваком додатном метокси групом не долази до линеарне промене. Ово указује да расподела наелектрисања не зависи само електронских својстава супституената већ и од њихове међусобне интеракције, положаја и просторног распореда.

Код једињења са повећаном електронском густином, услед веће поларизабилности па стога и веће стабилности побуђеног стања у односу на основно стање, олакшан је интрамолекулски пренос наелектрисања. Побуђено и основно стање су у оваквом случају енергетски близу па се унутрашња конверзија ефикасно одвија. На основу приказаних резултата **БВПЈ** јасно се види да и структурни и електронски фактори доприносе интрамолекулском преносу наелектрисања. Додатна TD-DFT израчунавања као што су осцилаторна снага, енергија вертикалног побуђивања и електронски прелази дати су у Табели 4.4.

Резултати TD-DFT прорачуна указују на велики допринос појединачних НОМО→LUMO прелаза из основног у прво побуђено стање (више од 80% за сва једињења, Табела 4.4). Такође се примећује да за сва испитивана једињења постоји одговарајуће учешће НОМО-1→LUMO+1 побуђивања (у опсегу од 4,8 до 10,3%) и НОМО-2→LUMO (5,4%, 4,4%, 4,3% и 2,3 % за једињења **БВПЈ-2**, **БВПЈ-6**, **БВПЈ-11** и **БВПЈ-14** редом) и НОМО-4 →LUMO (у опсегу од 2,1 до 5,5% за једињења **БВПЈ-2**, **БВПЈ-3**, **БВПЈ-5**, **БВПЈ-8**, **БВПЈ-9**, **БВПЈ-11**, **БВПЈ-13** и **БВПЈ-15**). На основу представљених резултата, закључује се да је већина израчунатих  $E_{\text{gap}}$  вредности и осталих TD-DFT параметара у складу са експерименталним резултатима UV-Vis мерења.

**Табела 4.4** Резултати TD-DFT прорачуна за прелазе из основног у прво побуђено стање за *s-trans/s-trans* изомер у раствору (DMSO).

Једињења	Енергија (eV)	Осцилаторна снага	Побуђивање	СИ коефицијент експанзије	% доприноса једноелектронских прелаз
<b><i>БВПЈ-1</i></b>	3,3423	1,64	HOMO→LUMO	0,669	89,5
			HOMO-1→LUMO+1	0,180	6,5
<b><i>БВПЈ-2</i></b>	3,1425	2,33	HOMO→LUMO	0,633	80,1
			HOMO-1→LUMO+1	-0,186	6,9
			HOMO-2→LUMO	0,164	5,4
			HOMO-4→LUMO	0,108	2,3
<b><i>БВПЈ-3</i></b>	3,2372	1,81	HOMO→LUMO	0,665	88,4
			HOMO-1→LUMO+1	0,189	7,1
			HOMO-4→LUMO	-0,102	2,1
<b><i>БВПЈ-4</i></b>	3,3243	1,68	HOMO→LUMO	0,667	90,0
			HOMO-1→LUMO+1	0,177	6,3
<b><i>БВПЈ-5</i></b>	3,1170	1,80	HOMO→LUMO	0,661	87,4
			HOMO-1→LUMO+1	-0,196	7,7
			HOMO-4→LUMO	0,114	2,6
<b><i>БВПЈ-6</i></b>	3,3465	1,57	HOMO→LUMO	0,648	84,0
			HOMO-2→LUMO	0,148	4,4
			HOMO-1→LUMO+1	-0,155	4,8
			HOMO-3→LUMO+1	-0,105	2,2
<b><i>БВПЈ-7</i></b>	3,3134	1,66	HOMO→LUMO	0,667	90,0
			HOMO-1→LUMO+1	-0,180	6,5
<b><i>БВПЈ-8</i></b>	3,2810	1,87	HOMO→LUMO	0,662	87,6
			HOMO-1→LUMO+1	-0,190	7,2
			HOMO-4→LUMO	0,112	2,5
<b><i>БВПЈ-9</i></b>	3,5346	1,46	HOMO→LUMO	0,663	87,9
			HOMO-1→LUMO+1	0,167	5,6
<b><i>БВПЈ-10</i></b>	3,4153	1,62	HOMO→LUMO	0,668	89,2
			HOMO-1→LUMO+1	-0,183	6,7
<b><i>БВПЈ-11</i></b>	2,7069	2,24	HOMO→LUMO	0,643	82,7
			HOMO-1→LUMO+1	0,227	10,3
			HOMO-2→LUMO	0,147	4,3
<b><i>БВПЈ-12</i></b>	3,3543	1,97	HOMO→LUMO	0,646	83,5
			HOMO-1→LUMO+1	-0,216	9,3
			HOMO→LUMO+2	0,133	3,5
<b><i>БВПЈ-13</i></b>	3,0670	1,87	HOMO→LUMO	0,657	86,3
			HOMO-1→LUMO+1	-0,202	8,2
			HOMO-4→LUMO	0,102	2,1
<b><i>БВПЈ-14</i></b>	2,9961	1,91	HOMO→LUMO	0,646	83,5
			HOMO-1→LUMO+1	-0,209	8,7
			HOMO-2→LUMO	0,108	2,3
			HOMO-4→LUMO	-0,110	2,4
<b><i>БВПЈ-15</i></b>	3,0685	1,90	HOMO→LUMO	0,645	83,2
			HOMO-1→LUMO+1	-0,204	8,3
			HOMO-4→LUMO	0,166	5,5



#### 4.1.4. Дужина везе и коефицијент попуњености орбитала за квантификацију „push-pull” ефекта у испитиваним једињењима

Параметри „push-pull” ефекта као што су дужина везе ( $d/\text{Å}$ ), степен попуњености орбитала,  $\pi^*/\pi$  (однос антивезујућих  $\pi^*$  и везујућих  $\pi$  орбитала) двоструке везе  $C_7=C_8$  ( $C_7'=C_8'$ ) у донор-акцепторском ланцу  $C_{2(6)}-C_{7(7')}=C_{8(8')}=C_{9(9')}$  и диполни момент ( $\mu$ ) дати су у Табели 4.5. Оваква анализа може предвидети геометријски распоред испитиваног једињења.

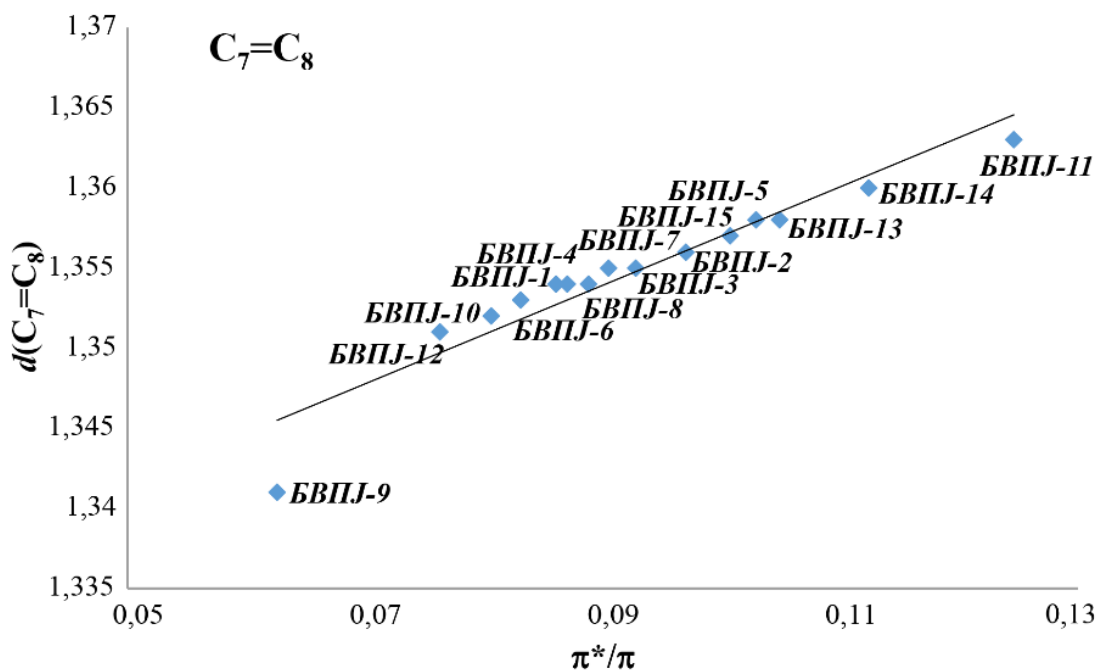
**Табела 4.5.** Попуњеност антивезујућих  $\pi^*$  и везујућих  $\pi$  орбитала, дужина двоструке  $C_7=C_8$  везе и диполни момент  $\mu$  испитиваних једињења

Једињење	$\pi$	$\pi^*$	$\pi^*/\pi$	$d(\text{Å})$ ( $C_7=C_8$ )	$\mu$ (Debye)
<b>БВПЈ-1</b>	1,82526	0,15876	0,0870	1,350	0,8966
<b>БВПЈ-2</b>	1,81746	0,17875	0,0984	1,353	1,5543
<b>БВПЈ-3</b>	1,82137	0,17052	0,0936	1,352	0,8267
<b>БВПЈ-4</b>	1,82415	0,16036	0,0879	1,351	1,1363
<b>БВПЈ-5</b>	1,81816	0,18795	0,1034	1,354	1,8774
<b>БВПЈ-6</b>	1,82614	0,15344	0,0840	1,350	1,4956
<b>БВПЈ-7</b>	1,82530	0,16726	0,0916	1,351	2,7830
<b>БВПЈ-8</b>	1,82407	0,16605	0,0910	1,351	3,4324
<b>БВПЈ-9</b>	1,84253	0,12374	0,0672	1,345	0,9777
<b>БВПЈ-10</b>	1,82999	0,15070	0,0824	1,350	1,1652
<b>БВПЈ-11</b>	1,80429	0,22558	0,1250	1,360	1,2702
<b>БВПЈ-12</b>	1,83057	0,14132	0,0772	1,348	7,3266
<b>БВПЈ-13</b>	1,81621	0,19164	0,1055	1,355	1,5326
<b>БВПЈ-14</b>	1,81328	0,20205	0,1114	1,356	2,2403
<b>БВПЈ-15</b>	1,81553	0,19041	0,1049	1,355	4,4609

Већа одступања од планарности код двоструке везе имају за последицу прелазак електрона у  $\pi^*$  орбиталу, што значи да мања вредност степена попуњености орбитала ( $\pi^*_{(C=C)}/\pi_{(C=C)}$ ) указује на мањи степен девијације<sup>184</sup>. Израчунати  $\pi^*/\pi$  однос за испитивана једињења и вредности дужине двоструке  $C_7=C_8$  везе (Табела 4.5) указују на мало одступање од планарности симетричних стирилних делова (Табела П7.1).

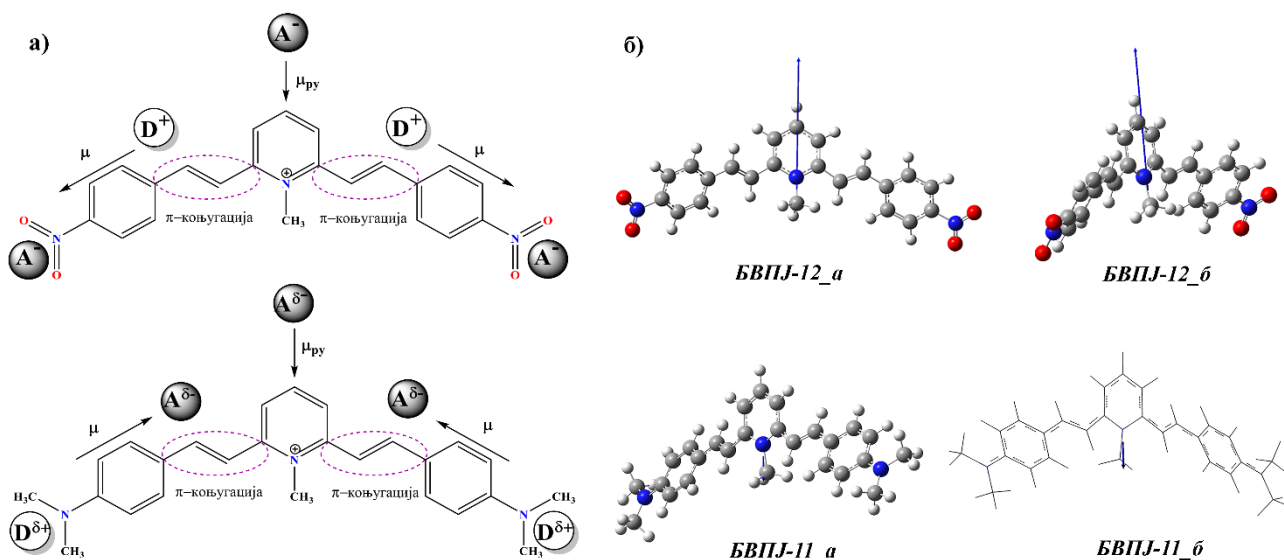
Резултати корелације дужине везе  $d(C_7=C_8)$  и степена попуњености парцијалне двоструке везе  $\pi^*/\pi$  приказани су на Слици 4.4 и у Табели 4.6. Може се закључити да повећање донор-акцепторског карактера супституената узрокује повећање дужине  $C_7=C_8$  везе.

Као што се може видети на Слици 4.4, једињење **БВПЈ-9** показује значајно одступање од корелације. Највише вредности диполног момента су добијене за једињења са електрон-акцепторском нитро групом (Табела 4.5). Познато је да молекули веће хиперполаризабилности имају веће диполне моменте, што погодује примени једињења као нелинаерних оптичких материјала (NLO, енгл. *Non-Linear Optics*)<sup>185</sup>. Повећање „push-pull” карактера једињења је могуће постићи појачавањем електрон-акцепторских својстава пиридинил групе коришћењем јаким електрон-донорских супституената. Слабија двострука веза је последица веће удаљености између донорске и акцепторске групе.



Слика 4.4 Корелација дужине везе  $d(C_7=C_8)$  и коефицијента попуњености орбитала парцијалне двоструке везе у испитиваним **БВПЈ** једињењима

Како би се објаснило постојање и величина диполног момента једињења потребно је узети у обзир све локалне векторе који постоје, јер збирни вектор представља управо њихову суперпозицију. У складу са електронским својствима супституената (донор/акцептор), на Слици 4.5 представљени су локални диполни моменти једињења са најјачим електрон-донорским и електрон-акцепторским супституентом. На основу смера локалних вектора јасно се може закључити да је велика вредност укупног диполног момента једињења **БВПЈ-12** (Табела 4.5) последица њиховог истог смера.



Слика 4.5 а) Допринос локалних диполних момената укупном диполном моменту, и б) Теоријски израчунат укупни диполни момент за једињења са најјачим електрон-донорским и електрон-акцепторским супституентом

#### 4.1.4.1. Разлике у хемијским померањима ( $\Delta\delta$ ) као мера „push–pull” ефекта

Јака поларизација двоструке везе такође се лако уочава помоћу  $^{13}\text{C}$  NMR спектара услед повећане електронске густине винилног угљеника на донорској страни и смањене електронске густине атома угљеника на акцепторској страни „push–pull” алкена<sup>184</sup>. Разлика у хемијским померањима два  $sp^2$ -хибридизована угљеника која чине двоструку везу ( $\Delta\delta$ ) је важан дескриптор „push–pull” ефекта. Веће вредности  $\Delta\delta_{(C7=C8)}$ , као мера „push–pull” ефекта, подразумевају већи степен резонанције и присуство електрон-донорских супституената на фенилном делу молекула. Јаке електрон-донорске групе у *para*- положају фенил супституисаних једињења **БВПЈ-5** и **БВПЈ-11** повећавају  $\Delta\delta_{(C7=C8)}$ . Супротно томе, електрон-донорске групе у *meta*- положају фенилног прстена (једињење **БВПЈ-6**) или присуство више од једне електрон-донорске групе супституената узрокују знатно нижи пораст вредности  $\Delta\delta_{(C7=C8)}$  у односу на несупституисано једињење **БВПЈ-1**. Слабија електрон-донорска метил група у једињењима **БВПЈ-3** и **БВПЈ-4** једнако смањује вредност  $\Delta\delta_{(C7=C8)}$ . У случају једињења супституисаних атомима халогена (од **БВПЈ-7** до **БВПЈ-10**), мали утицај електрон-акцепторске групе у *ortho*- положају (једињења **БВПЈ-9** и **БВПЈ-10**) смањује делокализацију  $\pi$ -електрона и самим тим вредност  $\Delta\delta_{(C7=C8)}$  у односу на *para*- супституисана једињења **БВПЈ-7** и **БВПЈ-8**. Нитро група као јака електрон-акцепторска група у једињењу **БВПЈ-12** доприноси најнижој вредности  $\Delta\delta_{(C7=C8)}$ . Хемијска померања дата у Табели П7.5 су у корелацији са одговарајућим дужинама веза као трећим индикатором „push–pull” ефекта. Корелациони резултати приказани на Слици П7.9 и у Табели 4.6. указују да повећање „push–pull” карактера парцијалне двоструке везе  $C7=C8$  доводи до издуживања везе и повећања разлика хемијског померања  $\Delta\delta_{(C7=C8)}$ .

**Табела 4.6** Корелације изабраних дужина веза и  $\pi^*/\pi$ ,  $\Delta\delta_{C7=C8}$  и  $\sigma$

Корелација	$\rho$	h	R	SD	F	Једињења укључена у корелацију	
d(C <sub>2</sub> -C <sub>7</sub> ) у односу на $\pi^*/\pi$	-0,274± 0,013	1,478± 0,001	0,986	0,0007	428,84	Сва <b>БВПЈ</b> једињења	
d(C <sub>7</sub> =C <sub>8</sub> ) у односу на $\pi^*/\pi$	0,310± 0,030	1,330± 0,002	0,952	0,0015	127,31	Сва <b>БВПЈ</b> једињења	
	0,240± 0,005	1,330± 0,0005	0,997	0,0002	2137	<b>БВПЈ</b> једињења [a]	
d(C <sub>8</sub> -C <sub>9</sub> ) у односу на $\pi^*/\pi$	-0,410± 0,045	1,490± 0,004	0,934	0,002	81,79	Сва <b>БВПЈ</b> једињења	
d(C <sub>7</sub> =C <sub>8</sub> ) у односу на $\Delta\delta_{C7=C8}$	1,340± 0,002	0,0008± 0,0001	0,953	0,001	49,50	<b>БВПЈ-5, БВПЈ-6, БВПЈ-7, БВПЈ-8, БВПЈ-10 и БВПЈ-12</b>	
	1,350± 0,0008	0,0005± 0,0007	0,973	0,0006	72,30	<b>БВПЈ-1, БВПЈ-3, БВПЈ-4, БВПЈ-11, БВПЈ-13, БВПЈ-14 и БВПЈ-15</b>	
$\mu$ у односу $\sigma$	(2,42 ±0,32) $\sigma^2$	(3,76 ±0,18) $\sigma$	2,80± 0,12	0,997	0,22	258,65	<b>БВПЈ</b> једињења [б]
	(-2,97 ±0,07) $\sigma^2$	(2,26 ±0,05) $\sigma$	1,28± 0,007	0,999	0,011	1241,68	<b>БВПЈ</b> једињења [в]

[a] Искључено једињење **БВПЈ-9**, [б] Искључено једињење **БВПЈ-15** и [в] Искључено једињење **БВПЈ-1**

#### 4.1.5. Анализа линеарних односа слободне енергије (LFER) примењена на вредности NMR хемијских померања *БВПЈ*

Упоредо са проучавањем „*push-pull*” ефекта испитиваних једињења интересантно је пратити утицај супституената на промену електронске густине у околини етиленске везе. У том циљу примењена је LFER анализа NMR ( $^1\text{H}$  NMR и  $^{13}\text{C}$  NMR) података. LFER анализа је коришћена за одређивање квантитативних односа утицаја својстава супституената на  $^{13}\text{C}$  NMR и  $^1\text{H}$  NMR померања атома угљеника. Валидни корелациони резултати добијени су само за  $^{13}\text{C}$  NMR податке, док  $^1\text{H}$  NMR корелациона анализа није дала задовољавајуће резултате. Најбољи корелациони резултати добијени су за угљенике  $\text{C}_2$ ,  $\text{C}_7$ ,  $\text{C}_8$  и  $\text{C}_9$ , и представљени су у Табели 4.7 и на Сликама П7.10-П7.13.

Резултати представљени у Табели 4.7 указују да супституенти на фенилним прстеновима испитиваних једињења утичу на хемијска померања атома угљеника. Уочене високе вредности константе пропорционалности ( $\rho$ ), за изабране атоме угљеника указују на значајну осетљивост NMR хемијских померања на електронске ефекте супституената. Хемијска померања атома угљеника  $\text{C}_7$  и  $\text{C}_9$  показала су нормалан ефекат са две одвојене корелације (Слика П7.11 и П7.13), што значи да се ефекат заклањања језгра тј. смањење електронске густине око посматраног угљеника повећава са повећањем електрон-акцепторског својства супституента.

**Табела 4.7** Резултати корелације  $^{13}\text{C}$  NMR података испитиваних једињења са  $\sigma$  константама добијених применом Хаметове једначине <sup>[a]</sup>

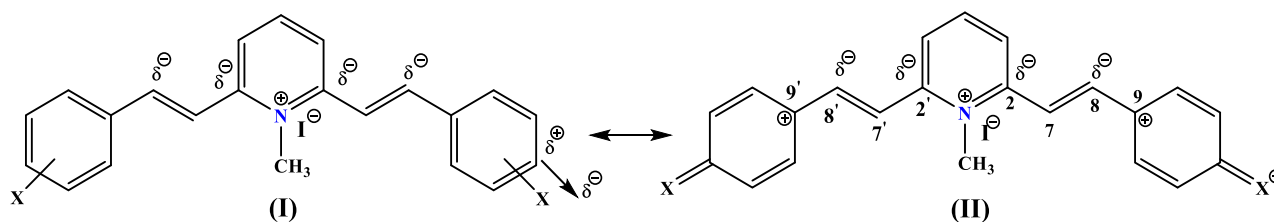
Атом	$\rho$	h	R	F	Sd	Једињења искључена из корелације
$\text{C}_2$	-3,15 $\pm 0,41$	153,22 $\pm 0,21$	0,975	58,05	0,29	<b><i>БВПЈ-5</i> и <i>БВПЈ-6</i></b>
	4,79 $\pm 0,61$	153,22 $\pm 0,31$	0,976	61,20	0,48	<b><i>БВПЈ-3</i> и <i>БВПЈ-10</i></b>
$\text{C}_7$	3,01 $\pm 0,38$	126,50 $\pm 0,20$	0,970	63,86	0,45	-
	2,63 $\pm 0,45$	124,05 $\pm 2,63$	0,932	33,25	0,41	<b><i>БВПЈ-12</i></b>
$\text{C}_8$	-5,38 $\pm 0,41$	140,50 $\pm 0,18$	0,978	172,9 0	0,59	<b><i>БВПЈ-1</i>, <i>БВПЈ-3</i>, <i>БВПЈ-4</i> и <i>БВПЈ-12</i></b>
$\text{C}_9$	4,36 $\pm 0,50$	141,93 $\pm 0,23$	0,962	73,88	0,65	<b><i>БВПЈ-5</i></b>
	3,07 $\pm 0,72$	134,82 $\pm 3,07$	0,925	17,85	0,85	-

[a] Литературни подаци дати су у Прилогу у Табели П.7 <sup>60</sup>

Промена вредности  $\rho$  (Табела 4.7) последица је успостављања јаке интеракције система донор-акцептор и акцептор-акцептор у коме атом азота из пиридина делује као акцептор, док увођење супституената различитих својстава узрокује наизменичну промену густине електрона на винилном делу молекула (слика 4.5).

Према NMR подацима, *ortho*- супституисана једињења ***БВПЈ-9*** и ***БВПЈ-10*** и нитро супституисано једињење ***БВПЈ-12*** показују највеће хемијско померање. Велика вредност хемијског померања ***БВПЈ-12*** једињења је последица присуства јаке електрон-акцепторске нитро групе, док код једињења ***БВПЈ-9*** и ***БВПЈ-10*** поред електронских ефеката супституената велики утицај има и стерни ефекат. Стерни ефекат подразумева све оне структурне промене попут дужине и углова веза које су узроковане величином *ortho*- супституената. Уопштено, може се претпоставити да се ефекти супституената у *ortho*- положају могу класификовати као електронски, стерни и анизотропни<sup>186,187</sup>, од којих прва два имају највећи значај.

Висока негативна вредност константе пропорционалности за угљеникове атоме C<sub>2</sub> (за електрон-доноре) и C<sub>8</sub> указује на акумулацију позитивног наелектрисања на овим атомима са повећањем електрон-донорског капацитета супституената. Објашњење за супротан ефекат супституената на угљенике C<sub>2</sub> (за електрон-доноре) и C<sub>8</sub> лежи у концепту  $\pi$ -поларизације који је увео Рејнолдс (енгл. *Reynolds*)<sup>188</sup> и унакрсне поларизације метилованих деривата<sup>28</sup>, и објашњава се одговарајућим резонанционим структурама са доприносом  $\pi$ -поларизације. Ефекат поља, индукован диполним моментом супституента, изазива секундарну поларизацију  $\pi$ -електрона у суседном, независном  $\pi$ -електронском систему без преноса  $\pi$ -електрона (Слика 4.6). Овај концепт локализоване  $\pi$ -поларизације и проширене поларизације је коришћен за објашњење ефекта поларних супституената са бочних ланаца ароматичних деривата.



Слика 4.6 Резонанционе структуре **БВПЈ** једињења супституисаних електрон-акцепторским групама (X) са доприносом  $\pi$ -поларизације

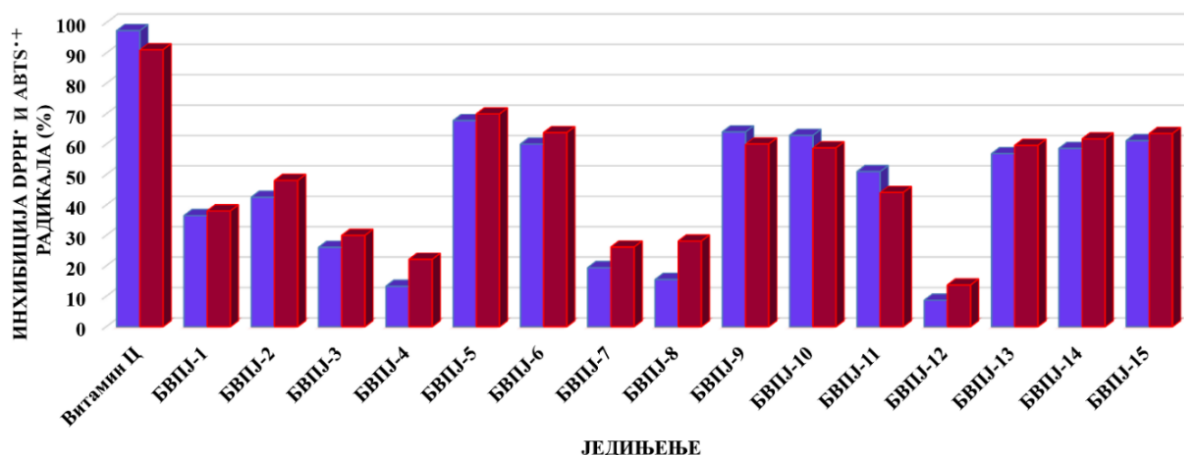
У структури (I) (Слика 4.6), присуство електрон-акцепторског супституента индукује дипол на C-X вези. Електрон-акцепторски ефекат индукованог дипола се преноси кроз молекулску структуру изазивајући поларизацију појединих  $\pi$  орбитала (локализована поларизација) (Слика 4.6; структура (II)). Експериментални резултати се такође могу објаснити уз помоћ концепта резонанционе поларизације коњугованог система (проширена поларизација). Резултат је повећање електронске густине на C<sub>2</sub> (C<sub>2'</sub>) и C<sub>8</sub> (C<sub>8'</sub>), чиме је објашњена већа заштита ових атома. Обрнути ефекат супституента се испољава на C<sub>2</sub> угљениковом атому за електрон-доноре и на C<sub>8</sub> за све остале супституенте. *Orto*- супституенти са високим електрон-акцепторским потенцијалом узрокују већу заштиту из два разлога: електрон-акцепторског и *orto*- ефекта.

Приказ  $\pi$ -електронске коњугације који помаже у разумевању специфичног понашања промене хемијских померања посматраних угљеника, дат је као резонанциона структура на примеру несупституисаног једињења **БВПЈ-1** (Слика П7.14). Због специфичног положаја у молекулу, супротни ефекти имају утицаја на C<sub>2</sub> атом угљеника. Прво, азот из пиридина због близине тежи да смањи електронску густину са његовим електрон-акцепторским својствима (слика П7.14. структура г), док са друге стране  $\pi$ -резонанциони ефекат фенилног дела молекула тежи да повећа електронску густину (слика П7.14. структуре д - ж). Поред тога, позитивно наелектрисање такође се јавља и на C<sub>8</sub> угљениковом атому (слика П7.14, структура д), на коме је и запажен обрнути ефекат супституента (Табела 4.7).

На основу вредности торзионих углова датих у Табели П7.1, одговарајуће одступање од планарности указује да пренос резонанционог ефекта из супституисаног фенилног прстена може у одређеној мери бити смањен. Резонанциона интеракција у продуженом резонанционом систему се, према томе, може постићи помоћу  $\pi$ ,  $\pi$ -коњугације, у зависности од присутног супституента. Уопштено, електрон-акцепторски супституенти привлаче електронску густину са пиридирил прстена изазивајући померање електронске густине дуж етиленске везе. Супротно важи за електрон-донорски супституисана једињења. Електрон-донорски супституенти подржавају електрон-акцепторску резонанциону интеракцију у пиридину, тако да је ефекат заклањања C<sub>2</sub> атома резултат „*push*” – ефекта фенилног прстена богатог електронима, што се одражава кроз повећану електронску густину на C<sub>7</sub> и C<sub>9</sub> угљениковим атомима.

#### 4.1.6. Антиоксидативна активност *БВПЈ* једињења

Испитивана једињења показују широк спектар антирадикалске активности инхибицијом DPPH<sup>•</sup> и ABTS<sup>•+</sup> радикала. Самим тим се може претпоставити да је већа способност једињења да отпусте атом водоника, односно формирају стабилан радикал, у корелацији са већом антиоксидативном активношћу. Поред тога, за очекивати је да структура једињења и електронска својства супституената имају значајну улогу у стабилизацији генерисаног радикала<sup>189</sup>. Присуство електрон-донорских и електрон-акцепторских група на ароматичним (фенилним) прстеновима и присуство пиридинил прстена могу имати важну улогу у активности<sup>90,190</sup>. Такође, показано је да је антиоксидативна активност повезана са бројем супституената у молекулу<sup>94</sup>. Стога је разлика у активности синтетисаних једињења очекивана. Резултати антиоксидативне активности винил деривата добијени применом DPPH и ABTS слободнорадикалских метода и изражени као проценат инхибиције приказани су на Слици 4.7. Добијени резултати показују сличан тренд антиоксидативне активности испитиваних једињења за обе методе (DPPH и ABTS). Већина једињења показује умерена до добра антиоксидативна својства, а антиоксидативна активност опада у следећем низу: **БВПЈ-5** > **БВПЈ-9** > **БВПЈ-10** > **БВПЈ-6** > **БВПЈ-15** > **БВПЈ-14** > **БВПЈ-13** > **БВПЈ-11**. Ова једињења показују више од 50% инхибиције, што је упоредиво са аскорбинском киселином (витамином Ц) у истој концентрацији. Објашњавајући везу између структуре и активности, закључује се да оба једињења са хидроксилном групом у *meta*- или *para*- положају на фенилном прстену (**БВПЈ-5** и **БВПЈ-6**) показују добру активност изражену кроз проценат инхибиције од 67,77 и 60,03% у DPPH, односно 69,96 и 63,81% у ABTS тесту (Слика 4.7). Такође, у низу једињења од **БВПЈ-13** до **БВПЈ-15** антиоксидативни капацитет се благо повећава са сваком додатном метокси групом што показује да осим положаја електрон-донорске групе у фенилном прстену, на активност једињења утиче и број група. Уопштено говорећи, електрон-донорске групе повећавају електронску густину у стирилном делу молекула и стабилизују настале стирилне радикале резонанционим ефектом, смањујући тако енергију везе С-Н у овом делу молекула што појачава антирадикалску способност *БВПЈ* деривата<sup>191</sup>. Супротно томе, присуство електрон-акцепторских група узрокује дестабилизацију стирилног дела повлачењем електронске густине, што доводи до смањења антиоксидативног потенцијала. Овај феномен је примећен код једињења **БВПЈ-7**, **БВПЈ-8** и **БВПЈ-12** са електрон-акцепторским F-, Cl- и NO<sub>2</sub>- групама у *para*- положају. Супротно од *para*- халоген супституисаних једињења присуство два атома халогена у *ortho*- положају значајно повећава антиоксидативну активност па тако једињења **БВПЈ-9** и **БВПЈ-10** показују проценат инхибиције од 64,04 и 62,89% у DPPH тесту и 60,06 и 58,81% у ABTS тесту.



Слика 4.7 Антиоксидативна активност *БВПЈ* једињења одређена применом DPPH (■) и ABTS (■) методе

## 4.2. *Bis*(ИМИНО)ПИРИДИНИ – *БИП*

### 4.2.1. Спектрална и структурна карактеризација *БИП* једињења

Једињења ове серије су синтетисана кондензацијом 2,6-диаминопиридина са различитим фенил-супституисаним ароматичним алдехидима и окарактерисана различитим техникама.

FT-IR спектрална анализа потврдила је присуство азометинске групе, пиридина и ароматичних прстенова у структури молекула *БИП*-а. Потпуна FT-IR структурна анализа дата је експерименталном делу.

Иако постоје студије<sup>138</sup> које извештавају о успешној карактеризацији ових једињења помоћу NMR спектроскопије, током снимања спектра једињења *БИП-4*, *БИП-14*, и *БИП-15* примећено је одсуство оштрих резонантних пикова. Да би се добили NMR сигнали, покушано је снимање спектра у три деутерисана растварача DMSO-*d*<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub>, и ацетону-*d*<sub>6</sub> (на собној температури и загревањем на 50 °C), или снимањем дужи временски период. У свим случајевима добијали су се само широки сигнали ниског интензитета (прилог Сlike П7.15 и П7.16). При томе су сва једињења била потпуно растворна у деутерисаним растварачима (растворљивост већа од 10 mg/0,4 mL).

Из тог разлога, за проверу чистоће једињења примењене су различите технике. Према елементарној анализи, узорци велике чистоће добијени су директно из реакционе смеше пажљивом кристализацијом, испирањем са апсолутним етанолом и сушењем у струји азота. Структура и чистоћа *БИП* једињења је потврђена и снимањем масених спектра високе резолуције (HRMS). (прилог Сlike П7.17 и П7.18). На основу добијених података из HRMS спектра, поред молекулског јона примећују се и јони M+1 и M+2 који се приписују делимичном или потпуном редуковању азометинске групе<sup>192</sup>. Претходно је описано да је једињење *БИП-10* добијено са високим приносом и чистоћом без икаквог пречишћавања<sup>42</sup>.

Како структура *БИП*-а указује да могу да делују као тридентатни лиганди, након потврђене чистоће претпостављено је да присуство парамагнетних металних комплекса у раствору има за последицу одсуство <sup>1</sup>H NMR сигнала. С обзиром на то да синтеза није укључивала присуство металних јона, претпоставка о могућности стварања парамагнетних органометалних једињења током синтезе је искључена.

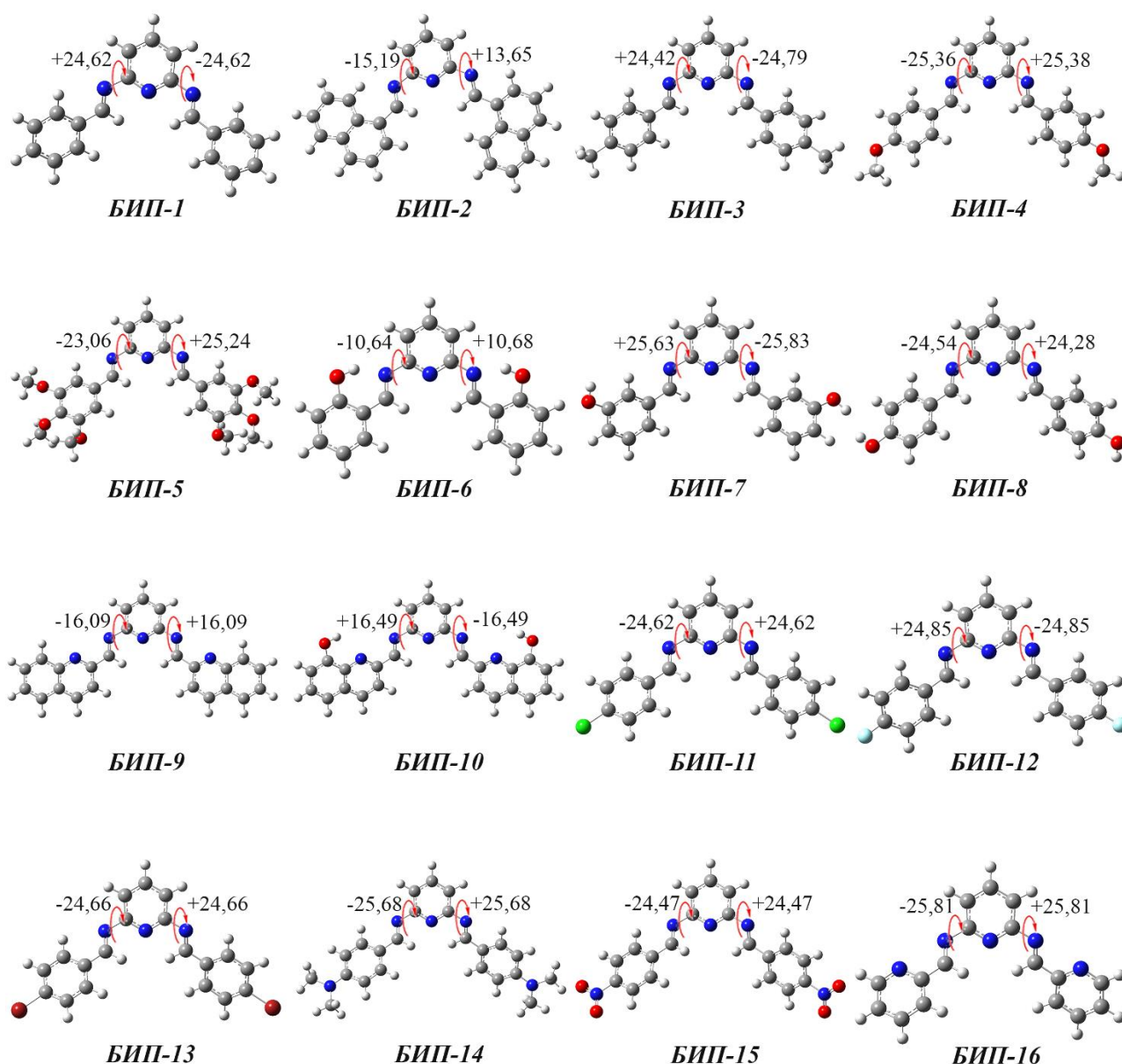
У претходној студији<sup>42</sup> аутори су објаснили немогућност снимања NMR спектра структурно сличних једињења користећи ESR спектроскопију. У овој студији, снимањем ESR спектра структурно сличних једињења откривено је да долази до формирања стабилног радикала највероватније лоцираног на атому угљеника пиридинског прстена. Из тог разлога снимљени су ESR спектри свих једињења. Сва испитивана једињења су показала исти ESR сигнал али са различитим интензитетом (због прегледности приказани су ESR спектри два једињења, прилог, Сlike П7.19). Вредност *g*-фактора испитиваних једињења је између 2,00622 и 2,00658. Овако мале разлике у вредностима *g*-фактора указују да је формирање радикалног центра на истом атому у структури свих једињења. Из структуре и вредности *g*-фактора примећује се за сва једињења стварање радикала на атомима угљеника, а не на *N*-центрима, што је у складу са литературним подацима<sup>42</sup>. Формирање стабилног радикал катјона као парамагнетне врсте спречило је добијање NMR сигнала. Хиперфина структура у ESR спектру испитиваних једињења није уочена, што указује на одсуство језгара са нуклеарним спином 1 или ½ код радикал катјона насталих јонизацијом *БИП* једињења у раствору.

### 4.2.2. Оптимизација геометрије *БИП* једињења

Геометрије *БИП* оптимизоване помоћу DFT прорачуна представљене су на Слици 4.8, а подаци о геометрији једињења као што су дужине везе, углови између веза и торзиони углови дати су у прилогу у Табели П7.7. Из података добијених оптимизацијом геометрије закључује се да најкраће везе између централног пиридинског прстена и имино групе имају једињења са

јаким електрон-донорским групама попут  $N,N(\text{CH}_3)_2$  (једињење **БИП-14**), што указује да се електронски ефекти преносе са супституената на централни пиридински део.

Узимајући у обзир симетрију једињења, може се очекивати висок степен планарности. Из тог разлога проучаване су вредности торзионих углова између централног пиридинског прстена и имино групе (Слика 4.8). Најмањи торзиони угао од  $10,64^\circ$  и најпланарнија структура се примећује за једињење **БИП-6**, због присуства  $-\text{OH}$  групе у *ortho*- положају. У овом положају хидроксилна група се налази близу имино групе омогућавајући интрамолекулско водонично везивање (ИВ, енгл. *Intramolecular Hydrogen Bonding*) између водоника хидроксилне групе и имино азота, формирајући тако шесточлане прстенове који стабилизују планарну структуру. Веће вредности торзионих углова, око  $16^\circ$  израчунате за једињења **БИП-2**, **БИП-9** и **БИП-10**, вероватно су последица присуства још једног ароматичног прстена у молекулу. За сва остала једињења ове вредности су између  $23^\circ$  и  $26^\circ$  (Слика 4.8).



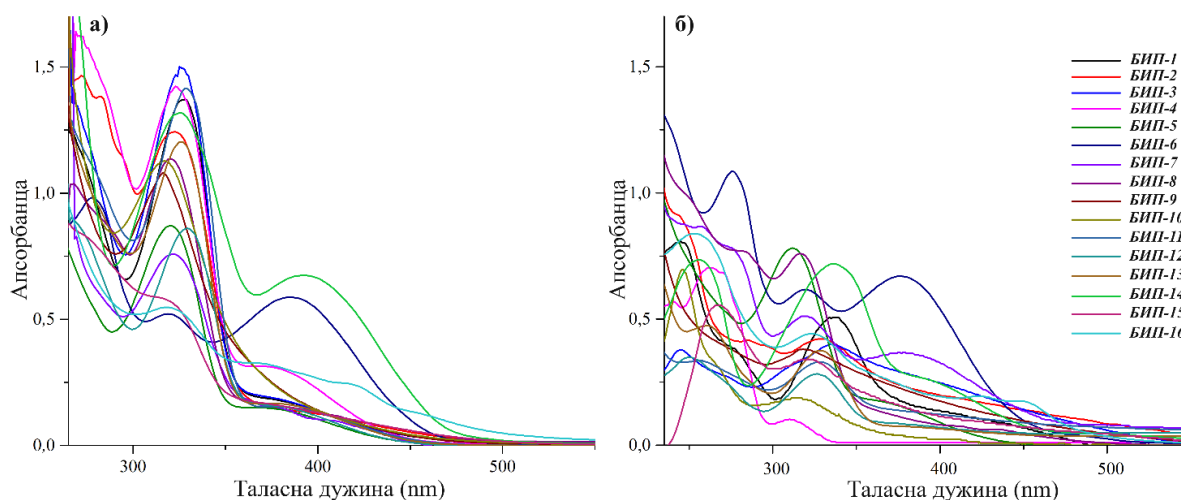
Слика 4.8 Оптимизоване геометрије **БИП** једињења са назначеним торзионим угловима



### 4.2.3 Солватохромна својства *bis*(имино)пиридина

У овом делу дисертације проучаван је утицај својстава растварача на померање максимума апсорпције у UV-Vis спектрима испитиваних *bis*(имино)пиридина (**БИП**). Апсорпциони спектри и одговарајући максимуми свих једињења снимани су у двадесет два растварача различите поларности у опсегу таласних дужина 200–800 nm, а добијени резултати су дати у Табели П7.8. У свим растварачима појављују се два пика, један у опсегу од 307 до 380 nm и други око 400 nm, као што је приказано на Слици 4.9 за два растварача (DMF и MeOH). На основу приказаних UV-Vis спектра уочавају се различити  $n-\pi^*$  електронски прелази услед присуства слободних електронских парова на атомима азота из азометинске групе и пиридинског језгра, као и  $\pi-\pi^*$  прелази који су резултат побуђивања електрона у  $\pi$ -коњугованим системима ароматичног и пиридинског дела молекула. Добијени резултати у Табели П7.8 указују да постоји зависност промене положаја апсорпционих максимума са променом поларности растварача и присуства електрон-донорских/-акцепторских супституената у структури молекула. Иако се опсеги апсорпције свих супституисаних једињења јављују на сличним таласним дужинама као и за несупституисани дериват **БИП-1**, они ипак указују на одређени утицај електронских ефеката супституената.

Присуство супституената са електрон-донорским ефектом омогућава већи допринос проширене  $\pi$ -електронске делокализације. Из тог разлога очекивало се да метокси, хидрокси, а посебно диметиламино група, као јаке електрон-донорске групе, допринесу продуженој коњугацији и на тај начин изврше померање апсорпционих максимума ка већим таласним дужинама. Међутим, апсорпциони максимуми једињења од **БИП-4** до **БИП-8**, **БИП-10** и **БИП-14** су хипсохромно померени у поређењу са несупституисаним једињењем **БИП-1** у опсегу таласних дужина 307-380 nm. У поларним апротичним растварачима као што је DMF (Слика 4.9а) апсорпциони максимум *meta*-хидрокси супституисаног једињења **БИП-7** је хипсохромно померен у односу на *ortho*- и *para*-хидрокси деривате услед већег доприноса негативног индуктивног ефекта. Супротан ефекат је примећен код протичних растварача (нпр. MeOH (Слика 4.9б)). Може се закључити да разлике у солватацији основног и побуђеног стања ових једињења и разлике у коњугацији слободног електронског пара на атому азота са супституентима на ароматичном прстену доводе до негативног солватохромизма. Осим тога највероватније долази и до преклапања трака  $n-\pi^*$  са  $\pi-\pi^*$  прелазом ароматичног система. Мала разлика у спектрима је примећена у поларним апротичним растварачима за једињења **БИП-4**, **БИП-6** и **БИП-14** (Слика 4.9а) у односу на несупституисано једињење **БИП-1**. У опсегу таласних дужина око 400 nm ова једињења показују батохромно померање што указује на израженији ИСТ карактер у овој области. У истој области у метанолу се овај ефекат уочава за **БИП-6** и **БИП-7** (Слика 4.9б). Увођење слабије електрон-донорске метил групе у једињењу **БИП-3** не доводи до промене у положају апсорпционих максимума у односу на **БИП-1**.



Слика 4.9 Апсорпциони спектри испитиване серије у: а) DMF, б) MeOH

Са друге стране, апсорпциони максимуми једињења са електрон-акцепторским групама у поређењу са несупституисаним једињењем **БИП-1** показали су незнатно батохромно померање у DMF и хипсохромно померање у MeOH. Халоген-супституисана једињења **БИП-11**, **БИП-12** и **БИП-13** услед присуства слабог резонанционог ефекта и јаког негативног индуктивног ефекта у *para*-положају изазивају хипсохромно померање у протичним растварачима, док се мали батохромни ефекат у односу на **БИП-1** јавља у апротичним растварачима. Овакав тренд се примећује и код једињења супституисаног са нитро групом (**БИП-15**). Нитро група у *para*-положају утиче на мало батохромно или хипсохромно померање апсорпционих максимума у DMF или MeOH, редом (Слика 4.9). Ово може бити последица утицаја јаког електрон-акцепторског ефекта нитро групе која својим негативним резонанционим и индуктивним ефектом у *para*-положају у интеракцији са неvezујућом (n) орбиталом азометинске групе утиче на спектрална померања. Ефекти солватације, првенствено слободних електронских парова на атомима азота услед НВД ефекта растварача, доприносе различитом солватохромном понашању једињења **БИП-15** у ова два растварача.

Апсорпциони максимуми једињења са хинолинском структуром **БИП-9** и **БИП-10** и једињења **БИП-2** и **БИП-16** показују хипсохромно померање услед стерних ефеката *ortho*-супституената на ароматичном прстену.

#### 4.2.3.1 Корелациона анализа Камлет-Тафтовим солватохромним моделом – LSER анализа

С обзиом на то да испитивана једињења садрже сет супституената у опсегу од јаких електрон-донорских до јаких електрон-акцепторских група извршена је корелација апсорпционих фреквенција које одговарају максимумима пикова у области 307-380 nm применом LSER анализе. Квантитативна процена утицаја специфичних и неспецифичних интеракција растварача на померање апсорпционих максимума *bis*(имино)пиридина (**БИП**) извршена је применом Камлет-Тафтове једначине. Вредности Камлет-Тафтових параметара растварача дати су у Табели П7.3<sup>53</sup>, док су израчунате вредности и вредности регресионих коефицијента добијене корелационом анализом дате у Табели 4.8.

Резлтати дати у Табели 4.8 показују да је утицај специфичних и неспецифичних ефеката растварача на померање апсорпционих максимума у UV-Vis спектрима испитиваних једињења веома сложен због разноликог доприноса растварача и електронских својстава супституената у испитиваним једињењима. Такође, резултати указују на то да се електронски ефекти имино групе и пиридинског језгра разликују код једињења са електрон-донорским и електрон-акцепторским супституентима.

**Табела 4.8** Резултати корелационе анализе за **БИП** једињења добијени применом Камлет-Тафтове једначине

Једињење	$\nu \times 10^{-3}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$s \times 10^{-3}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$b \times 10^{-3}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$a \times 10^{-3}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$R^a$	$SD^b$	$F^c$	Растварачи искључени из корелације
<b>БИП-1</b>	30,88 $\pm 0,08$	0,37 $\pm 0,10$	-1,04 $\pm 0,083$	-0,85 $\pm 0,060$	0,99	0,09	269,20	-
<b>БИП-2</b>	30,80 $\pm 0,16$	1,12 $\pm 0,24$	-1,21 $\pm 0,17$	-0,12 $\pm 0,13$	0,95	0,17	42,59	EtAc, FA, DMSO
<b>БИП-3</b>	30,08 $\pm 0,80$	1,77 $\pm 0,45$	-1,53 $\pm 0,32$	-0,52 $\pm 0,32$	0,94	0,29	33,66	Fa, EtAc, EtOH, 2- Пиролидин, Ацетон
<b>БИП-4</b>	26,68 $\pm 0,51$	6,32 $\pm 0,70$	-2,26 $\pm 0,57$	3,85 $\pm 0,46$	0,93	0,57	32,64	2-Пиролидон, Диоксан, 2- BuOH
<b>БИП-5</b>	29,87 $\pm 0,24$	0,35 $\pm 0,33$	1,17 $\pm 0,28$	1,31 $\pm 0,22$	0,94	0,28	36,99	2-Пиролидон, 2-BuOH, AcN
<b>БИП-6</b>	30,79 $\pm 0,23$	1,36 $\pm 0,27$	-0,93 $\pm 0,19$	-0,47 $\pm 0,16$	0,95	0,18	45,59	2-Пиролидон, TCE, THF, 1- PrOH
<b>БИП-7</b>	29,60 $\pm 0,03$	3,02 $\pm 0,04$	-1,88 $\pm 0,03$	1,26 $\pm 0,02$	0,99	0,03	2400	-
<b>БИП-8</b>	29,77 $\pm 0,02$	0,97 $\pm 0,02$	0,91 $\pm 0,02$	0,74 $\pm 0,01$	0,99	0,02	3732	-
<b>БИП-9</b>	30,21 $\pm 0,16$	2,03 $\pm 0,27$	-0,69 $\pm 0,19$	0,32 $\pm 0,18$	0,93	0,17	32,41	EtAc, FA, Диоксан, 2- Пиролидон
<b>БИП-10</b>	30,52 $\pm 0,30$	1,91 $\pm 0,39$	-0,94 $\pm 0,24$	-0,24 $\pm 0,21$	0,92	0,21	20,59	EtAc, FA, TCE, Ацетон, 2- Пиролидон, AcN
<b>БИП-11</b>	27,97 $\pm 0,54$	2,33 $\pm 0,8$	0,82 $\pm 0,78$	-2,14 $\pm 0,44$	0,92	0,56	24,11	AcN, Ацетон, DCM, TCM
<b>БИП-12</b>	27,40 $\pm 0,29$	3,95 $\pm 0,43$	-0,60 $\pm 0,32$	0,97 $\pm 0,24$	0,93	0,28	31,75	FA, DMSO, TCM, THF
<b>БИП-13</b>	28,55 $\pm 0,40$	2,99 $\pm 0,56$	-1,72 $\pm 0,48$	2,64 $\pm 0,33$	0,91	0,44	20,75	AcN, EtAc, NMP, MeOH, DCM
<b>БИП-14</b>	30,72 $\pm 0,24$	0,43 $\pm 0,35$	-0,62 $\pm 0,26$	-0,93 $\pm 0,24$	0,93	0,23	26,04	2-Пиролидон, Анизол, EtAc, FA, Ацетон,
<b>БИП-15</b>	27,26 $\pm 0,35$	2,55 $\pm 0,42$	1,40 $\pm 0,30$	1,25 $\pm 0,19$	0,94	0,29	35,10	TCE, AcN, 2- BuOH
<b>БИП-16</b>	32,02 $\pm 0,25$	-0,56 $\pm 0,32$	-1,15 $\pm 0,26$	-0,69 $\pm 0,20$	0,91	0,27	17,48	AcN, Анизол, Ацетон, EtOH, Диоксан, NMP

<sup>a</sup>Коефицијент корелације; <sup>b</sup>Стандардна девијација; <sup>c</sup>Фишеров тест значајности.

Позитивне вредности коефицијента  $s$  добијене за сва једињења, осим за **БИП-16**, указују да неспецифичне интеракције са променом поларности растварача доводе до хипсохромног померања апсорпционог максимума. Ове вредности сугеришу бољу стабилизацију основног стања у односу на побуђено. Боља стабилизација побуђеног стања за једињење **БИП-16**, са негативним предзнаком коефицијента  $s$ , указује на већи допринос диполарности/поларизабилности растварача стабилизацији побуђеног стања. Ово значи да у побуђеном стању **БИП-16** има већи диполни момент него у основном стању и зато је боље стабилизован поларним растварачима.

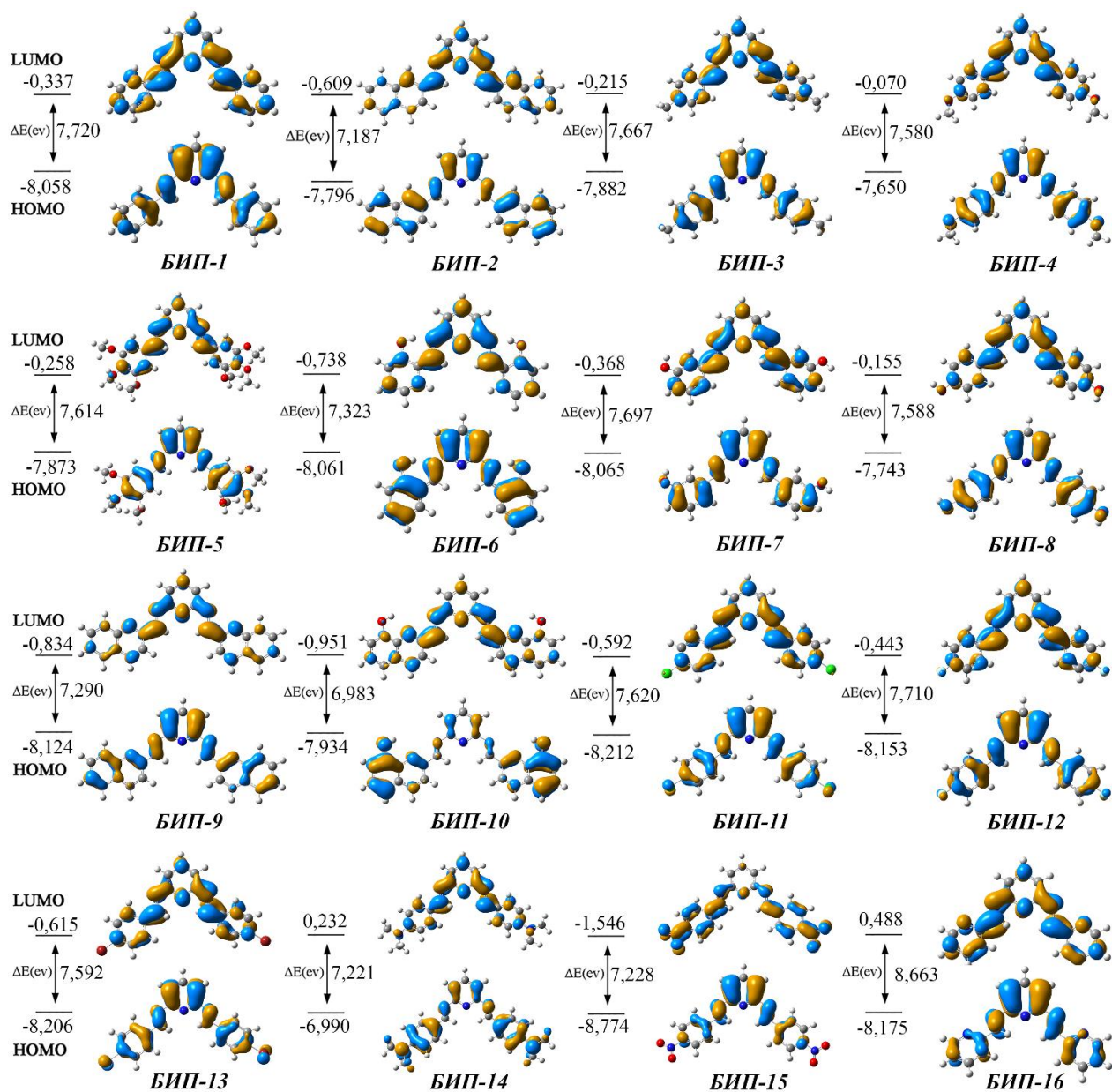
Специфичне интеракције између растварача и растворене супстанце су последица водоничног везивања и указују да су негативне вредности параметара  $b$  и  $a$  последица израженијег доприноса НВД и НВА ефекта растварача, редом, стабилизацији побуђеног стања испитиваних једињења. Негативне вредности коефицијента  $b$  за сва једињења, осим за **БИП-5**, **БИП-8**, **БИП-11** и **БИП-15**, указују на израженији допринос стабилизацији побуђеног стања молекула протон-акцепторским (НВА) ефектом растварача. Позитивне вредности коефицијента  $a$  за једињења **БИП-4**, **БИП-5**, **БИП-7** до **БИП-10**, **БИП-12**, **БИП-13** и **БИП-15** указују на бољу стабилизацију основног стања у односу на побуђено стање протон-донорским (НВД) ефектом растварача. Највећа вредност коефицијента  $b$  је добијена за једињење супституисано нитро групом, **БИП-15**, док је највећа вредност коефицијента  $a$  добијена за једињење са *para*-метокси групом, тј. **БИП-4**. На основу изложеног може се закључити да НВА ефекат растварача значајније доприноси батохромном померању UV-Vis максимума, тј. позитивном солватохромизму.

#### 4.2.3.2 TD-DFT теоријско израчунавање апсорпционих спектра

У наставку истраживања извршена су теоријска израчунавања UV-Vis спектра применом TD-DFT методе, израчунавање енергија НОМО и LUMO орбитала и вредности енергетске разлике ( $E_{\text{gap}}$ ) неопходне да се изврши трансфер електрона током побуђивања. Теоријски спектри за сва испитивана једињења одређени су у гасној фази и растварачима (води, бензену и метанолу) применом B3LYP/6-31G(d,p) модела и показали су добро слагање са експерименталним резултатима UV-Vis мерења. Добијени резултати приказани су на Слици 4.10 и Табелама 4.9 и П7.9.

На основу добијених резултата, са слике 4.10 примећује се да разлике у енергијама НОМО и LUMO орбитала као дескриптор интрамолекулског трансфера наелектрисања из основног у побуђено стање, зависе од електронских својстава супституената и њиховог положаја у молекулу. Највећа разлика у енергији највише попуњене орбитале и најниже непопуњене орбитале добијена за једињење са 2-пиридил групом **БИП-16** је последица веће стабилизације НОМО орбитале једињења у односу на несупституисано једињење.

Ниже вредности  $E_{\text{gap}}$  су добијене за једињења са електрон-донорским супституентима, а најмања вредност у поређењу са несупституисаним једињењем је добијена за хинолински дериват, једињење **БИП-10**. Слична вредност  $E_{\text{gap}}$  једињења са најјачом електрон-донорском (**БИП-14**) и најјачом електрон-акцепторском групом (**БИП-15**) је последица различитих ефеката који доприносе значајнијој стабилизацији НОМО/LUMO орбитала код једињења **БИП-15**, а супротно важи за једињење **БИП-14**. Два супротна ефекта истовремено постоје код једињења **БИП-15** и то електрон-акцепторски ефекат нитро групе и ефекат пиридинског језгра који доприносе значајнијој стабилизацији електронске расподеле у молекулским орбиталама у основном и побуђеном стању једињења **БИП-15**.



Слика 4.10 НОМО и LUMO орбитале и вредности  $E_{\text{gap}}$  БИП једињења

**Табела 4.9** Резултати TD-DFT прорачуна за електронске прелазе из основног у побуђено стање

Једињење	Енергија (eV)	Осцилаторна снага	Побуђивање	СИ коефицијент експанзије	% доприноса једноелектронских прелаза
<i>БИП-1</i>	4,0351	0,6178	НОМО→LUMO		
			НОМО-4→LUMO+1	0,6206	77,03
			НОМО-1→LUMO+1	0,1834	6,73
			НОМО-1→LUMO+1	-0,1301	3,38
<i>БИП-2</i>	3,7778	1,1311	НОМО→LUMO	0,5929	70,31
			НОМО-1→LUMO+1	0,2535	12,85
			НОМО-2→LUMO	-0,1346	3,62
			НОМО→LUMO		
<i>БИП-3</i>	4,0112	0,7504	НОМО-5→LUMO+1	0,6229	77,60
			НОМО-1→LUMO+1	0,1594	5,08
			НОМО-1→LUMO+1	-0,1590	3,03
			НОМО-4→LUMO	0,1230	5,06
<i>БИП-4</i>	3,9748	0,8619	НОМО→LUMO		
			НОМО-1→LUMO+1	0,6196	76,78
			НОМО-2→LUMO	0,1986	7,89
			НОМО-3→LUMO+1	0,1487	4,42
<i>БИП-5</i>	3,9860	0,8052	НОМО-5→LUMO+1	0,1487	4,42
			НОМО-1→LUMO+1	-0,1210	2,93
			НОМО→LUMO	0,6081	73,96
			НОМО-5→LUMO+1	0,1446	4,18
<i>БИП-6</i>	7,7426	0,8156	НОМО-5→LUMO+1	0,1389	3,86
			НОМО-1→LUMO+1	-0,1368	3,74
			НОМО→LUMO	0,6108	74,61
			НОМО-1→LUMO+1	-0,2999	17,99
<i>БИП-7</i>	4,0294	0,6198	НОМО→LUMO		
			НОМО-4→LUMO+1	0,6091	74,20
			НОМО-1→LUMO+1	0,1695	5,75
			НОМО-1→LUMO+1	0,1314	3,45
<i>БИП-8</i>	3,9803	0,8071	НОМО-1→LUMO+1	-0,1073	2,30
			НОМО-5→LUMO		
			НОМО→LUMO	0,6231	77,65
			НОМО-1→LUMO+1	0,1878	7,05
<i>БИП-9</i>	3,7571	0,6198	НОМО-2→LUMO	-0,1433	4,11
			НОМО-3→LUMO+1	-0,1301	3,38
			НОМО→LUMO	0,5155	53,15
			НОМО-4→LUMO	0,2601	13,53
<i>БИП-9</i>	3,7571	0,6198	НОМО-9→LUMO+1	-0,1454	4,23
			НОМО-9→LUMO+1	-0,1369	3,75
			НОМО-2→LUMO	0,1235	3,05
			НОМО-7→LUMO	-0,1127	2,54
<i>БИП-9</i>	3,7571	0,6198	НОМО-7→LUMO	0,1106	2,45
			НОМО-7→LUMO	0,1106	2,45

			НОМО- 3→LUMO+1		
			НОМО→LUMO+2		
			НОМО→LUMO		
<b>БИП-10</b>	3,6392	0,5416	НОМО- 1→LUMO+1	0,5264	55,42
			НОМО- 2→LUMO+2	-0,3940	31,05
			НОМО- 2→LUMO+2	0,1237	3,06
			НОМО-2→LUMO	0,1090	2,38
			НОМО→LUMO		
			НОМО- 1→LUMO+1	0,6184	76,48
<b>БИП-11</b>	3,9931	0,7689	НОМО- 3→LUMO+1	-0,1589	5,05
			НОМО- НОМО-2→LUMO	-0,1562	4,88
			НОМО- НОМО-2→LUMO	0,1305	3,41
			НОМО→LUMO+6	-0,1064	2,26
			НОМО→LUMO		
			НОМО- 3→LUMO+1	0,6246	78,02
<b>БИП-12</b>	4,0368	0,6482	НОМО- 1→LUMO+1	-0,1671	5,58
			НОМО- 1→LUMO+1	0,14064	3,95
			НОМО-2→LUMO	-0,1280	4,66
			НОМО→LUMO		
			НОМО- 1→LUMO+1	0,6146	75,55
<b>БИП-13</b>	3,9796	0,8263	НОМО-2→LUMO	-0,1660	5,51
			НОМО- 5→LUMO+1	0,1389	3,86
			НОМО- 3→LUMO+1	0,1143	2,61
			НОМО- 3→LUMO+1	0,1137	2,58
			НОМО- 3→LUMO+1	-0,1022	2,09
			НОМО→LUMO+5		
			НОМО→LUMO	0,5857	68,61
<b>БИП-14</b>	3,7864	1,2497	НОМО- 1→LUMO+1	-0,2929	17,16
			НОМО-2→LUMO	0,1786	6,38
			НОМО→LUMO		
			НОМО→LUMO+2	0,5685	64,64
<b>БИП-15</b>	3,8825	0,7814	НОМО- 1→LUMO+1	-0,2696	14,54
			НОМО- 2→LUMO+1	0,1670	5,58
			НОМО- 2→LUMO+1	-0,1473	4,34
			НОМО→LUMO		
			НОМО- 2→LUMO+1	0,5525	60,05
<b>БИП-16</b>	3,9370	0,3763	НОМО- НОМО-5→LUMO	0,2972	17,66
			НОМО-8→LUMO	0,1305	3,41
			НОМО-3→LUMO	-0,1246	3,10
			НОМО-3→LUMO	0,1166	2,72

Резултати у Табели 4.9 указују да је за сва једињења присутан велики допринос НОМО→LUMO прелаза из основног у побуђено стање (у опсегу 53-77%). Такође, значајан допринос НОМО-1→LUMO+1 прелаза је уочен код следећих испитиваних једињења **БИП-2** (12,85 %), **БИП-6** (17,99 %) и **БИП-10** (31,05 %), као и НОМО-4→LUMO (13,53%) за једињење

**БИП-9.** Остали прелази учествују са доприносом мањим од 10% и представљају одраз електронске структуре испитиваних једињења.

#### 4.2.4 Антиоксидативни капацитет БИП једињења

Антиоксидативни капацитет природних антиоксиданата углавном је повезан са нискоенергетском фенолном -ОН везом, где се након процеса трансфера електрона (ЕТ, једначине 2.21 и 2.22 теоријски део) или атома водоника (НАТ, једначина 2.19) формирају стабилне радикалске врсте. Осим четири деривата са -ОН групама, структуре испитиваних *bis*(имино)пиридина (**БИП**) се веома разликују од структура природних антиоксиданата. Антиоксидативни капацитет шеснаест **БИП** деривата испитиван је помоћу четири *in vitro* метода које карактеришу различит механизам антиоксидативне активности молекула: DPPH и ABTS као методе хватања слободних радикала, CUPRAC тест као мера смањења (редукције) антиоксидативног капацитета и фосфомолибденски тест који карактерише укупни антиоксидативни капацитет. Добијени резултати се упоређени са антиоксидативним капацитетима два добро позната стандарда, аскорбинском киселином и тролоксом.

##### 4.2.4.1. Методе хватања слободних радикала

DPPH и ABTS су најчешће коришћени тестови за процену способности уклањања слободних радикала нових синтетских или природних антиоксиданата. Ова мерења се заснивају на редукцији радикалских врста путем преноса електрона и/или атома водоника са антиоксиданата на слободни радикал, што је праћено променом апсорбанце. Претходно је показано да хетероцикличне Шифове базе поседују добру антиоксидативну активност у DPPH и ABTS тестовима, при чему присуство електрон-донорске групе на фенолном прстену доприноси повећању активности<sup>5</sup>.

Добијени резултати дати у Табели 4.10 указују да свих шеснаест **БИП** деривата показује добру антирадикалску активност према DPPH, са вредностима IC<sub>50</sub> између 0,027 и 0,375 mM. Једињења **БИП-8** и **БИП-10** су најактивнија у DPPH тесту, док су **БИП-8**, **БИП-10** и **БИП-14** најактивнији антиоксиданти у ABTS тесту. Најактивније једињење **БИП-10** садржи хинолинску структуру и хидроксилну групу на хетероцикличном делу, што може допринети продуженој делокализацији π-електрона и стабилизацији радикалских врста. И у литератури је описано да је 8-хидроксихинолин препознат као структурни фрагмент који доприноси повећаној антиоксидативној активности<sup>193</sup>.

Поред тога, антиоксидативни капацитет **БИП** са хидроксилним групама је у корелацији са положајем -ОН групе, са следећим редом активности: **БИП-10** >> **БИП-8** > **БИП-7** > **БИП-6**. Присуство јаког ИНВ у једињењу **БИП-6** претходно је потврђено анализом кристалне структуре<sup>40</sup>. Присуство ове интеракције отежава пренос атома водоника на реактивне радикалске врсте.



**Табела 4.10.** IC<sub>50</sub> вредности **БИП** једињења одређене применом DPPH и ABTS теста

Једињење	DPPH IC <sub>50</sub> * (mM)	ABTS IC <sub>50</sub> * (mM)
<b>БИП-1</b>	0,280±0,051	0,120±0,024
<b>БИП-2</b>	0,289±0,040	0,111±0,007
<b>БИП-3</b>	0,153±0,022	0,178±0,011
<b>БИП-4</b>	0,168±0,025	0,084±0,035
<b>БИП-5</b>	0,184±0,033	0,140±0,057
<b>БИП-6</b>	0,175±0,021	0,195±0,009
<b>БИП-7</b>	0,109±0,005	0,088±0,018
<b>БИП-8</b>	0,084±0,045	0,034±0,014
<b>БИП-9</b>	0,215±0,015	0,117±0,023
<b>БИП-10</b>	0,027±0,010	0,031±0,011
<b>БИП-11</b>	0,184±0,022	0,218±0,012
<b>БИП-12</b>	0,197±0,014	0,191±0,022
<b>БИП-13</b>	0,162±0,016	0,209±0,016
<b>БИП-14</b>	0,188±0,031	0,030±0,011
<b>БИП-15</b>	0,375±0,020	0,247±0,051
<b>БИП-16</b>	0,226±0,037	0,205±0,022
Аскорбинска киселина	0,039±0,019	0,052±0,034

\*Вредности IC<sub>50</sub> су изражене као средња вредност ± стандардна девијација три независна мерења

У поређењу са DPPH тестом, испитивана једињења показују бољу активност у ABTS тесту са вредностима IC<sub>50</sub> у опсегу од 0,030 до 0,247 mM (Табела 4.10). Резултати указују да је позитиван допринос електрон-донорских супституената у једињењима израженији него у DPPH тесту. У складу са тим, **БИП-14** дериват који у својој структури садржи диметиламино групу у *para*- положају показује највећу активност. Овај ефекат се примећује и код једињења **БИП-4** који у свом молекулу садржи метокси групу, као још једну јаку електрон-донорску групу. Тренд активности хидроксилних деривата је исти као и код DPPH теста. Најјачи електрон-акцептор у овој серији је једињење **БИП-15** са нитро групом у *para*- положају и оно показује најмању активност.

#### 4.2.4.2. Тест редуције антиоксидативног капацитета и укупни антиоксидативни капацитет једињења БИП

Антиоксидативна активност једињења се такође приписује хелирању јона прелазних метала као што су гвожђе (Fe<sup>2+</sup>) и бакар (Cu<sup>2+</sup>), који су важни катализатори за *in vivo* стварање реактивних кисеоничних врста. Претходно је описано да **БИП** имају добру способност хелирања метала, делујући као тридентатни лиганди који формирају укљештене (енгл. *pincer*) комплексе са металним јонима<sup>194</sup>. Према томе, поред уобичајених тестова уклањања радикала (DPPH и ABTS), примењена је и метода редуције антиоксидативног капацитета помоћу CUPRAC како би се пружили додатни детаљи о антиоксидативној активности испитиваних једињења. Резултати CUPRAC теста су упоређивани са тролоксом као референтним антиоксидантом (Табела 4.11) и одређивани из односа моларне апсорптивности (моларног апсорпционог коефицијента) једињења и тролокса (Табела П7.10 и Слика П7.20а и П7.20б).

Једињења **БИП-10** и **БИП-14** са јаким електрон-донорским групама показују највеће редуционе капацитете, док електрон-акцепторски супституенти једињења од **БИП-11** до **БИП-13** и **БИП-15** утичу на смањење антиоксидативног капацитета (Табела 4.11).

**Табела 4.11** Резултати CUPRAC теста, дати у односу на тролокс и резултати теста укупног антиоксидативног капацитета (ТАС) применом фосфомолибденске методе, изражени као еквивалентна маса аскорбинске киселине.

Једињење	Редукциони тест	Укупни антиоксидативни тест
	CUPRAC	(ТАС)
	TEAC	Фосфомолибденски тест
<i>БИП-1</i>	0,273	0,165
<i>БИП-2</i>	0,292	0,132
<i>БИП-3</i>	0,663	0,133
<i>БИП-4</i>	0,350	0,156
<i>БИП-5</i>	0,839	0,183
<i>БИП-6</i>	0,143	0,178
<i>БИП-7</i>	0,198	0,119
<i>БИП-8</i>	0,451	0,146
<i>БИП-9</i>	0,453	0,536
<i>БИП-10</i>	1,104	0,209
<i>БИП-11</i>	0,193	0,163
<i>БИП-12</i>	0,256	0,148
<i>БИП-13</i>	0,171	0,139
<i>БИП-14</i>	0,977	0,306
<i>БИП-15</i>	0,202	0,146
<i>БИП-16</i>	0,533	0,211
Тролокс	1,000	-

Укупни антиоксидативни капацитет (ТАС) изведен фосфомолибденским тестом заснива се на редукцији Мо(VI) у Мо(V) и праћењу одговарајуће промене апсорбанце<sup>96</sup>. Добијени резултати су представљени у Табели 4.11 као масени еквиваленти аскорбинске киселине. Најактивније једињење *БИП-9* у свом саставу садржи 2-хинолил супституент, што указује на важност додатних координирајућих атома азота у комплексирању Мо(VI).

#### 4.2.5. DFT студије проучавања односа структуре и антиоксидативног капацитета

Антиоксидативна активност молекула зависи од његове структуре као и од својстава растварача. Структурне карактеристике које стабилизују радикалске врсте настале преносом електрона или преносом атома водоника са молекула антиоксиданта на реактивну радикалску врсту повећавају антиоксидативни капацитет молекула. Према томе, при испитивању односа структуре и антиоксидативне активности серије једињења треба узети у разматрање не само присуство одређених функционалних група већ и укупну геометрију молекула антиоксиданта. Оптимизацијом геометрије основног стања молекула *БИП* (Слика 4.8) добијају се важни структурни параметри за даља проучавања односа структуре и антиоксидативног капацитета. Израчунате вредности торзионих углова (Табела П7.7 и Слика 4.8) престављају индикацију степена коњугације молекула, који може имати значајног утицаја на антиоксидативну активност.

Молекули испољавају антиоксидативну активност помоћу једног од претходно описаних механизма (НАТ, SET-РТ или SPLET, Теоријски део 2.5.1.1), или њиховом комбинацијом. Према експерименталним подацима (Табеле 4.10 и 4.11), може се закључити да електрон-донорски супституенти повећавају, док електрон-акцепторски супституенти смањују антиоксидативни капацитет испитиваних једињења. Како би се испитао механизам антиоксидативне активности ових једињења, израчунато је неколико молекулских дескриптора антиоксидативне активности применом DFT методе, док су солватациони ефекти воде, бензена и метанола моделовани и упоређени са резултатима у гасној фази (Табела 4.12).

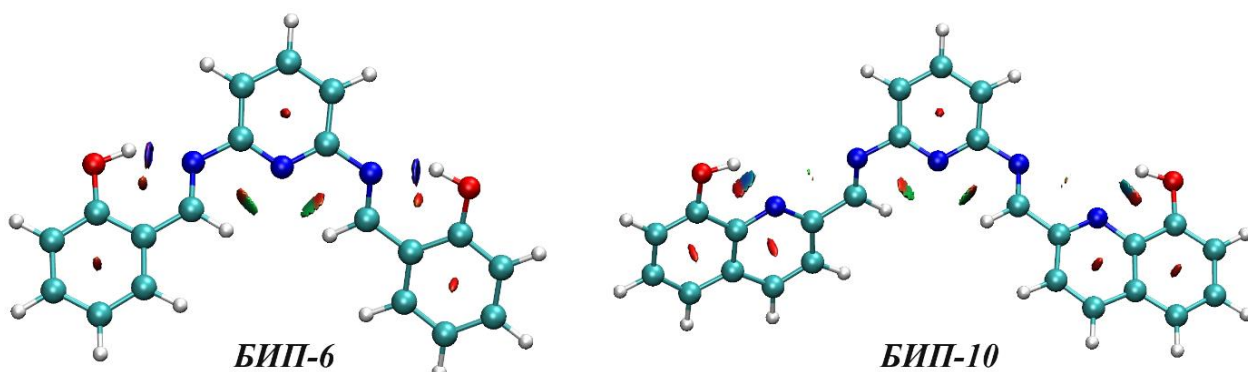
Табела 4.12. BDE, IP и PA вредности **БИП**-а израчунати на  $\omega$ B97XD/6-311++g(d,p) нивоу теорије у гасној фази и коришћењем SMD солватационог модела воде, бензена и метанола.

Једињење	Реактивна група	BDE (kcal/mol)				IP (kcal/mol)				PA (kcal/mol)			
		Гас	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	H <sub>2</sub> O	MeOH	Гас	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	H <sub>2</sub> O	MeOH	Гас	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	H <sub>2</sub> O	MeOH
<b>БИП-1</b>	Имино	97,89	98,11	100,53	99,98	174,13	153,15	138,81	139,46	399,38	156,22	92,19	93,19
	Пиридил 4-Н	111,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Пиридил 3-Н	114,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>БИП-2</b>	Имино	94,23	99,25	101,12	102,62	172,79	152,74	141,21	144,34	389,94	148,80	85,73	85,88
<b>БИП-3</b>	Имино	97,27	97,40	99,66	99,14	169,03	149,27	136,11	136,71	400,74	156,62	90,98	92,33
<b>БИП-4</b>	Имино	100,02	100,43	102,65	102,33	165,12	146,59	135,12	135,46	394,49	150,66	85,44	86,69
<b>БИП-5</b>	Имино	97,21	97,33	99,54	99,01	168,30	149,90	138,49	138,84	400,02	157,07	91,74	92,79
<b>БИП-6</b>	Имино	99,69	100,05	102,02	101,74	177,66	156,12	141,07	141,55	390,64	150,42	89,92	90,94
	ОН	96,70	95,25	91,46	92,43	-	-	-	141,55	349,77	110,10	43,80	45,83
<b>БИП-7</b>	Имино	100,25	100,66	102,90	102,58	174,16	153,36	138,75	139,30	391,34	148,38	84,33	85,55
	ОН	91,46	91,30	92,94	93,84	-	-	-	139,30	348,71	107,18	38,59	40,79
<b>БИП-8</b>	Имино	97,65	97,84	100,23	99,69	168,18	148,72	135,97	136,25	400,99	157,61	93,04	94,08
	ОН	81,75	81,76	84,64	85,00	-	-	-	136,25	335,33	96,80	38,04	39,42
<b>БИП-9</b>	Имино	93,07	94,18	98,19	97,68	171,59	152,48	139,97	140,45	381,91	143,15	87,76	88,32
<b>БИП-10</b>	имино	94,43	95,28	98,42	97,99	177,12	156,69	141,88	142,56	378,29	141,34	87,09	87,60
	ОН	88,27	85,98	81,23	82,37	-	-	-	142,56	345,80	105,99	40,08	42,25
<b>БИП-11</b>	Имино	97,62	97,89	100,31	99,80	177,17	155,51	139,48	140,27	393,26	152,58	91,11	92,00
<b>БИП-12</b>	Имино	97,49	97,72	100,06	99,55	176,28	154,29	138,64	139,39	387,84	146,22	84,20	85,29
<b>БИП-13</b>	Имино	97,65	97,92	100,34	99,83	177,15	155,88	139,68	140,48	392,81	152,42	91,02	91,91
<b>БИП-14</b>	Имино	97,47	97,53	99,74	99,18	152,77	136,17	127,07	127,09	407,21	162,03	94,19	95,40
<b>БИП-15</b>	Имнио	95,50	95,14	95,49	95,12	189,02	163,29	143,13	144,16	366,96	131,19	73,43	73,91
<b>БИП-16</b>	Имнио	94,93	96,15	99,81	99,39	173,61	153,38	140,05	140,58	386,46	145,93	87,41	88,22

VDE као молекулски дескриптор преноса атома водоника израчунат је за сва једињења. Како би се одредила најнижа енергија везе, прво је израчуната VDE вредност несупституисаног једињења (**БИП-1**) за неколико атома водоника (одузимање Н атома имино групе и Н атома из пиридина у *meta*- и *para*- положају). Према резултатима датим у Табели 4.12, имино С-Н атом је најреактивније место и највероватнија мета напада реактивних слободних радикала. Стога је за сва остала **БИП** једињења имино група сматрана местом за пренос атома водоника (НАТ механизам). За деривате супституисане хидроксилним групама **БИП-6**, **БИП-8** и **БИП-10**, такође је узета у обзир VDE вредност фенолне -ОН групе.

Судећи по термодинамичким подацима, НАТ процес између DPPH<sup>•</sup> и испитиваних једињења може се очекивати само за деривате супституисане хидроксилним групама **БИП-8** и **БИП-10**, јер вредност VDE за DPPH<sup>•</sup>-Н износи 82,6 kcal/mol<sup>195</sup>, па је за сва остала једињења равнотежа: **БИП**-Н + DPPH<sup>•</sup>  $\rightleftharpoons$  **БИП**<sup>•</sup> + DPPH<sub>2</sub> померена ка реактантима. Веће вредности VDE за **БИП-6** могу се објаснити стварањем ИНВ између ОН- групе и N атома на имино вези која стабилизује основно стање. Пренос атома водоника из -ОН групе ремети ИНВ, што доводи до повећања енергетске разлике између основног стања и О<sup>•</sup> радикала, и повећања VDE вредности према Једначини 2.20.

Како бисмо тестирали хипотезу да ИНВ игра важну улогу у реакцији испитиваних једињења и DPPH<sup>•</sup>, израчуната је јачина ове везе за два деривата који садрже -ОН групу (**БИП-6** и **БИП-10**) користећи анализу засновану на теорији атома у молекулима (AIM, енгл. *Atoms In Molecules*). Положаји критичних тачака веза (BCPs) корисних за проучавање ИНВ **БИП-6** и **БИП-10** добијени су NCI анализом (Слика 4.11). Тополошка анализа дала је неколико параметра као што су: електронска густина ( $\rho$ ), Лапласијан (енгл. *Laplacian*) електронске густине ( $\nabla^2\rho$ ) и густина потенцијалне енергије ( $V(r)$ ) која је директно пропорционална енергији водоничне везе и резултати су дати у Табели 4.13. Према Еспинози (енгл. *Espinosa*) и сарадницима<sup>196</sup>, јачина водоничне везе ( $E_{\text{НВ}}$ ) може се приближно одредити као  $1/2 V(r)$ .



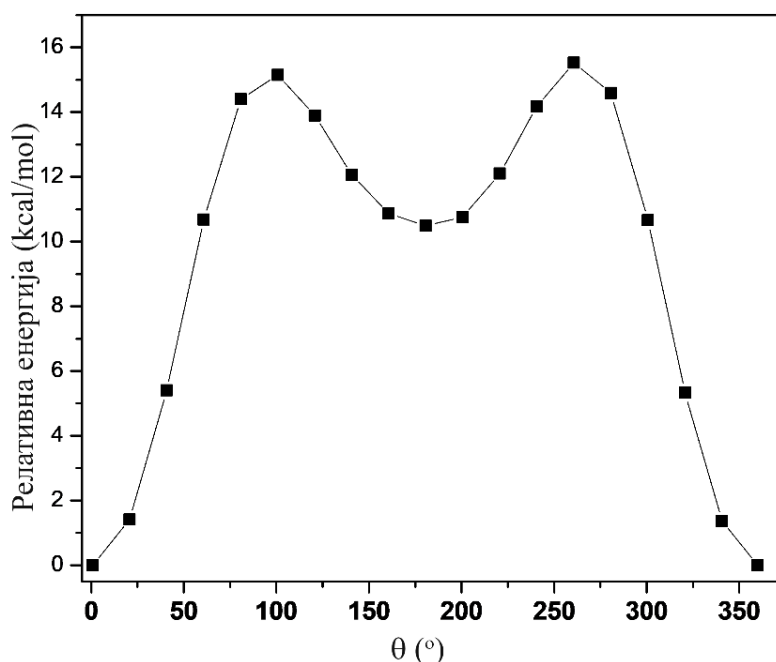
**Слика 4.11** Резултати NCI анализе за једињења **БИП-6** и **БИП-10**. Регије са водоничном везом приказане су као плаве, стерне интеракције су обојене црвено, а Ван дер Валсове интеракције су приказане као зелене површине.

**Табела 4.13** Електронска густина, Лапласијан електронске густине, потенцијална енергија, енергија Н везе, растојање донаор-акцептор за О-Н...N интрамолекулске водоничне везе једињења **БИП-6** и **БИП-10**.

Једињење	$\rho$ (a.u.)	$\nabla^2\rho$ (a.u.)	D-A растојање (Å)	$V(r)$ (a.u.)	$E_{\text{НВ}}$ (kcal/mol)
<b>БИП-6</b>	0,04772	0,1167	1,748	-0,04450	13,96
<b>БИП-10</b>	0,02466	0,0930	2,069	-0,01934	6,07

Природа интрамолекулског водоничног везивања у једињењу **БИП-6** је додатно проучавана израчунавањем ротационе баријере око везе С<sub>7</sub>-С<sub>8</sub> (Слика 4.12.). Израчуната

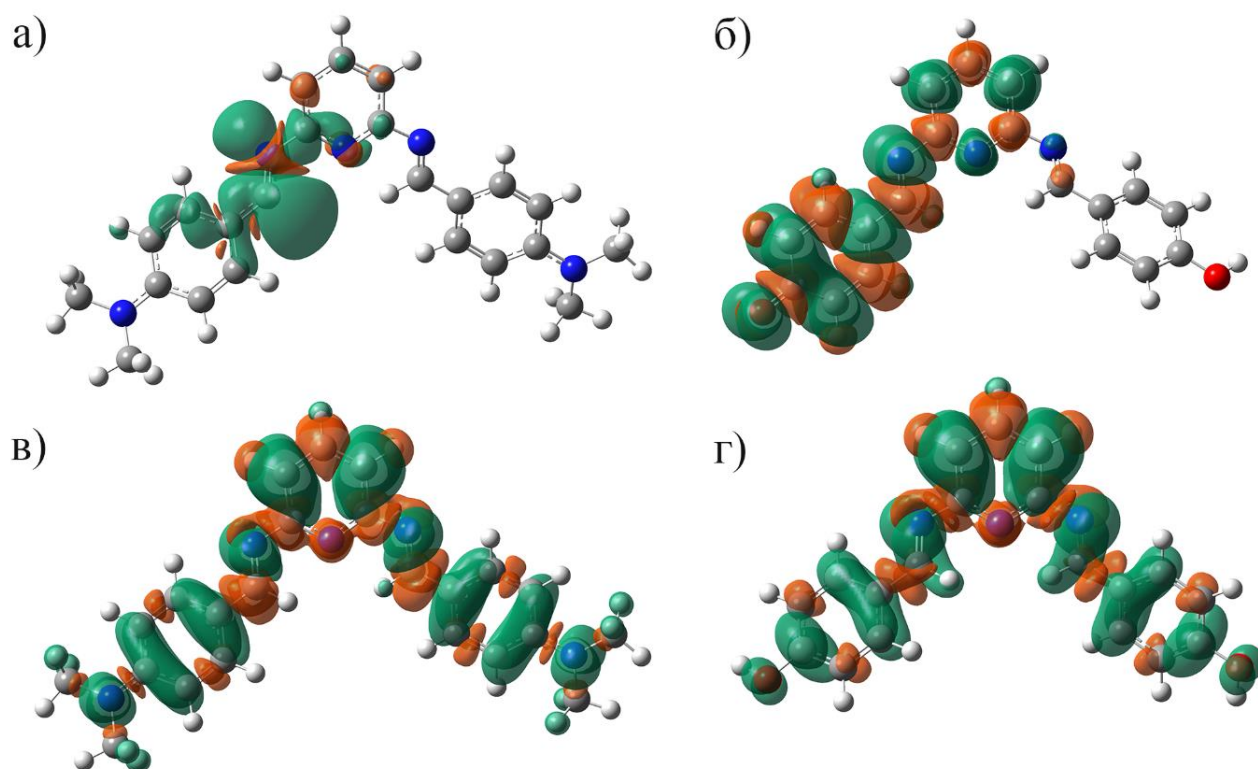
ротациона баријера (15,52 kcal/mol) потиче од јаке ИНВ интеракције са малим доприносом стерног ефекта.



**Слика 4.12** Промене у конформационој енергији једињења **БИП-6** након систематске ротације везе С7-С8 (торзија фенол-азометин) за 20 ° и оптимизација геометрије свих конформера. Вредности на у-оси приказане су у односу на најстабилнији конформер у коме је ИНВ најизраженији

Изузетно јака ИНВ једињења **БИП-6** објашњава његову ниску антиоксидативну активност. Са друге стране, иако се ИНВ може очекивати и код једињења **БИП-10** који је веома јак антиоксидант у свим тестовима (Табеле 4.10 и 4.11), из Табеле 4.13 види се да је јачина одговарајућег ИНВ код једињења **БИП-10** знатно мања у поређењу са **БИП-6**, па је -ОН група у положају 8 доступнија за интеракцију са слободним радикалима. У поређењу са израчунавом енергијом интеракције за пар фенол-вода (7,7 kcal/mol)<sup>197</sup>, може се закључити да -ОН група једињења **БИП-6** остаје „закључана“ у псеудо шесточланом прстену када је једињење солватисано молекулима воде, док се код **БИП-10** радије успоставља интермолекулска Н веза са молекулима растварача, па -ОН група остаје слободна.

Расподела густине спина (SD, енгл. *Spin Density*) је још један користан параметар за визуелизацију степена делокализације спина у радикалским врстама насталим путем НАТ или SET-РТ процеса. Већа делокализација указује на бољу стабилизацију радикала/радикал катјона и на ниже вредности BDE и IP (једначине 2.20 и 2.23). Просторна расподела спинске густине у насталом радикалу/радикал катјону такође може пружити информације о реактивности различитих активних места у молекулу<sup>198</sup>. Расподела спинске густине за радикале настале одузимањем атома водоника из два једињења са јаким електрон-донорским групама (**БИП-8** и **БИП-14**) приказана је на Слици 4.13. Хидроксилни радикали (Слика 4.13б) имају много израженију спинску делокализацију у поређењу са имино радикалима (Слика 4.13а). Густина спина радикал катјона (Слике 4.13в и 4.13г) делокализована је преко целог молекула, где је највећи удео густине спина смештен на атомима угљеника пиридинског прстена. Шематски приказ дистрибуције спинске густине за свих шеснаест **БИП** једињења израчунатих у гасној фази и води дат је у прилогу, Слике П7.21-П7.24.



**Слика 4.13** Расподела спинске густине за: а) имино радикал једињења **БИП-14**; б) О радикал једињења **БИП-8**; в) радикал катјон једињења **БИП-14**; г) радикал катјон једињења **БИП-8**; спинске густине су представљене на изоконтурном нивоу од 0.0004 атомске јединице енергије (а.у.)

Високо локализована густина спина код имино радикала објашњава слаб утицај супституената на BDE вредности. Са друге стране, изражена делокализација спинске густине радикал катјона указује на његову стабилност и потврђује присуство парамагнетних врста у раствору. Свеукупни резултати показују малу зависност BDE вредности од природе супституента и растварача, па су потребни додатни дескриптори како би се у потпуности објаснили експериментално добијени резултати.

Предложено настајање стабилног радикал катјона у раствору указује на малу јонизацију **БИП** једињења, што би требало да фаворизује SET-PT механизам. Најнижа вредност IP у свим срединама пронађена је за једињење **БИП-14**, а највиша за једињење **БИП-15**. С обзиром да та једињења имају јаке електрон-донорске или електрон-акцепторске групе везане у *para*-положају бензенових прстенова, IP је под јаким утицајем положаја и природе супституената. Даље, статистички значајне корелације између IP вредности и Хаметових константи супституената (Слика П7.25) сугеришу да се јонизациони потенцијал **БИП** једињења може успешно предвидети применом LFER принципа, чиме се штеди рачунско време за дизајн нових антиоксиданата заснованих на структури **БИП** једињења. Са друге стране, мала статистичка значајност корелације између BDE вредности и Хаметових константи супституената  $\sigma$  ( $r = 0,02$  (за гасну фазу) до  $0,08$  (за воду)) додатно потврђује слаб утицај супституената на вредности BDE испитиваних једињења.

Сходно томе, висока вредност BDE једињења **БИП-14** сугерише да НАТ није термодинамички повољан процес, тако да SET-PT механизам највише доприноси значајној активности **БИП-14** добијеној у DPPH и ABTS тестовима.

Са термодинамичке тачке гледишта, пожељни антиоксидативни механизам одређен је апсолутним вредностима BDE, IP и PA као првих корака НАТ, SET-PT и SPLET механизма. Из Табеле 4.12 се јасно види да је НАТ повољан механизам којим **БИП** једињења уклањају

реактивне слободне радикале у гасној фази и бензену, док је SPLET изводљив само у води. Треба напоменути да укупне антиоксидативне карактеристике једињења такође зависе од природе реактивних слободних радикала, интеракције са околином, као и од кинетике процеса.

Постоји још један уобичајени поступак за разјашњавање антиоксидативног механизма на основу дескриптора израчунатих DFT методом. Према Рајту (енгл. *Wright*) и сарадницима<sup>91</sup>, два главна механизма за уклањање радикала, НАТ и SET-РТ, јављају се истовремено, али са различитим брзинама, а доминантни процес се може објаснити на основу разлике вредности BDE и IP израчунатих за фенол и антиоксидант у гасној фази. Аутори су закључили да је НАТ механизам доминантан за антиоксиданте са  $\Delta_{\text{BDE}} \approx -10$  kcal/mol и  $\Delta_{\text{IP}}$  до  $-36$  kcal/mol, док је SET-РТ доминантан механизам за антиоксиданте са  $\Delta_{\text{IP}}$  изнад  $-45$  kcal/mol. Узимајући у обзир експерименталне податке за BDE и IP фенола (88,0 kcal/mol, односно 196,2 kcal/mol)<sup>91,199</sup> и податке из Табеле 4.12, може се закључити да је НАТ доминантан механизам за деривате супституисане хидроксилним групама **БИП-8** и **БИП-10**, док је SET-РТ доминантан механизам за једињење **БИП-14**.

Главни механизам једињења **БИП-8** (дериват са -ОН групом у *para*- положају) такође се може утврдити поређењем са експерименталним подацима за једињење **БИП-4** (дериват са 4-OCH<sub>3</sub> групом). Једињењу **БИП-4** недостаје реактивна -ОН група и стога не може да реагује путем НАТ механизма, док би метокси група као јак електрон-донор требало да додатно стабилизује радикал катјон и олакша SET-РТ механизам. Замена -ОН са -OCH<sub>3</sub> групом повећава вредности IC<sub>50</sub> 2-3 пута (Табела 4.10), што указује да је НАТ доминантан механизам за једињење **БИП-8**.

#### 4.2.6. Однос структуре и антиоксидативног капацитета – Тумачење механизма корелационим методама

Антиоксидативни механизам **БИП** једињења такође је анализиран користећи једнопараметарску и двопараметарску анализу линеарне регресије, тј. принципе линеарних односа слободне енергије (LFER). Анализа корелације DFT дескриптора (НОМО/LUMO енергије, вредности  $E_{\text{gap}}$  (Слика 4.10 и Табела П7.9)), BDE и IP (Табела 4.12), и Хаметових константи (Табела П7.6)) са антиоксидативним активностима испитиваних једињења (Табеле 4.10 и 4.11) додатно помаже у тумачењу антиоксидативних механизма.

У првом кораку, разматран је однос способности хватања слободних радикала молекула **БИП** једињења и енергија НОМО орбитала (Слика 4.10 и Табела П7.9) Резултати корелације приказани су на Слици П7.26 као експоненцијални и линеарни односи активности у DPPH и ABTS тесту (Табела 4.10) у односу на НОМО енергију. На Слици П7.26 уочава се да са повећањем активности долази до повећања енергије НОМО орбитала. Уопштено, може се закључити да електрон-донорске групе узрокују повећање енергије НОМО орбитала, док је супротан тренд уочен за електрон-акцепторске групе. Такође, вредности  $E_{\text{gap}}$  углавном прате сличан тренд (Слика 4.10 и Табела П7.9). За једињење **БИП-10**, одговарајућа стабилност НОМО/LUMO орбитале доводи до ниже вредности  $E_{\text{gap}}$  (Слика 4.10). У овом једињењу обе орбитале су симетрично делокализоване, НОМО преко 8-хидроксихинолин-2-ил јединица, а LUMO преко имино везе и пиридинског прстена. Такође, интрамолекулско водонично везивање и електрон-донорски карактер диметиламино и хидроксилних група у једињењима **БИП-6**, **БИП-8** и **БИП-14** узрокује већи степен делокализације, што доводи до повећане активности. Линеарна зависност активности једињења у ABTS тесту у односу на НОМО енергију (Слика П.266) је у складу са предложеним антиоксидативним механизмом (једначина 2.19).

Резултати добијени корелацијама између експерименталних IC<sub>50</sub> и ТЕАС вредности и вредности термодинамичких дескриптора (BDE, IP и PA), свих синтетисаних једињења, показују ниску статистичку валидност. Прихватљиви и слични резултати корелације IC<sub>50</sub> (DPPH и ABTS) и ТЕАС (CUPRAC) у односу на BDE добијени су за једињења од **БИП-6** до **БИП-8** и **БИП-10** у води и метанолу (прилог Сликe П7.27, П7.29 и П7.31). Добијене су две

различите корелационе криве: линеарна за DPPH тест (Слика П7.27) и параболична за ABTS и CUPRAC (слике П7.29 и П7.31). Овакви резултати указују да је НАТ повољан механизам за хидрокси-супституисана једињења **БИП-6**, **БИП-8** и **БИП-10** у DPPH тесту, док у ABTS и CUPRAC тестовима учествују и други процеси, са главним доприносом НАТ механизма. Такође, различити трендови корелације DPPH, ABTS и CUPRAC активности у односу на IP за остала једињења, дати на Сликама П7.28, П7.30 и П7.32 указују на сложен механизам антиоксидативне активности. У складу са овим, супротне вредности нагиба кривих добијених за корелације IC<sub>50</sub> у односу на IP за ABTS (Слика П7.30) и CUPRAC тест (Слика П 7.32) у два растварача, потврђују сложене утицаје различитих параметара на добијене вредности антоксидативног капацитета.

Додатно је извршена корелација антиоксидативног капацитета **БИП** једињења са Хаметовим константама ( $\sigma$ ) (Слике П7.33 и П7.34). Различита добијена зависност активности DPPH, ABTS, CUPRAC и ТАС у односу на  $\sigma$  константе указује да електронски ефекти супституената нису једини одговорни за антиоксидативни механизам испитиваних једињења. У процени доприноса термодинамичких дескриптора BDE и IP измереној антиоксидативној активности важан је LFER вишепараметарски приступ. Овако добијени резултати корелације су, уз претпоставку да се коефицијенти корелације односе на допринос НАТ и SET-PT механизма, примењени у анализи укупног антиоксидативног механизма. У Табели 4.14 дати су процентуални доприноси НАТ и SET-PT механизма добијени из резултата корелације између активности једињења (Табела 4.10) и вредности BDE и IP дескриптора (Табела 4.12)

**Табела 4.14.** Процентуални допринос НАТ и SET механизма у DPPH и ABTS тестовима **БИП**

Тест	BDE (kcal/mol)	IP (kcal/mol)	BDE/IP (%)	R	SD	F	Једињења искључена из корелације
DPPH	0,00899 ±0,00270	0,00830 ±0,00449	52/48	0,698	0,063	6,18	-
	0,00848 ±0,00181	0,00396 ±0,00319	69/31	0,815	0,042	11,86	<b>БИП-15</b>
	0,00909 ±0,00175	0,0108 ±0,00569	46/54	0,846	0,041	13,87	<b>БИП-15</b> и <b>БИП-14</b>
	0,0122 ±0,00205	0,0197 ±0,00627	38/62	0,884	0,034	17,82	<b>БИП-15, БИП-14</b> и <b>БИП-8</b>
	0,0657 ±0,00216	0,0121 ±0,00358	35/65	0,753	0,050	8,514	-
	0,00948 ±0,00152	0,0142 ±0,00244	40/60	0,931	0,032	29,35	<b>БИП-1, БИП-2,</b> <b>БИП-4</b> и <b>БИП-9</b>
ABTS	0,00132 ±0,0100	0,0123 ±0,00364	10/90	0,804	0,043	6,392	<b>БИП-2, БИП-4,</b> <b>БИП-6, БИП-7,</b> <b>БИП-8, БИП-10</b>

Резултати двопараметарске корелације IC<sub>50</sub> у DPPH тесту у односу на BDE и IP, указују да је за сва једињења већи допринос BDE (52%) у односу на IP механизам (48%) (Табела 4.14). Искључење једињења **БИП-15** из корелације доводи до повећања доприноса BDE механизма на 69%, док у случају искључења и диметиламино супституисаног једињења (**БИП-14**) долази до његовог смањења на 46%. Овај резултат указује да диметиламино група доприноси значајној стабилизацији формираног имино радикала, односно да продужена  $\pi$ -делокализација фаворизује стабилизацију бензилиденског радикала. Искључивање свих хидрокси супституисаних једињења (**БИП-6**, **БИП-7**, **БИП-8**, **БИП-10**) не даје задовољавајуће корелације, док је искључивање **БИП-8** смањило допринос НАТ механизма на 38% (Табела 4.14).



За резултате корелације  $IC_{50}$  свих једињења у АВТS тесту у односу на ВDЕ и IP вредности добијено је да постоји већи допринос IP параметра (65%), што указује да молекул реагује првенствено са АВТS<sup>•+</sup> радикалом помоћу SET-PT механизма. Искључивање једињења **БИП-1**, **БИП-2**, **БИП-4** и **БИП-9** побољшало је статистичку ваљаност корелације и при томе су добијени доприноси НАТ и SET-PT механизма од 40% и 60%, редом. Са друге стране, корелација добијена искључивањем једињења **БИП-2**, **БИП-4**, **БИП-6**, **БИП-7**, **БИП-8** и **БИП-10** указује на претежно присуство SET-PT механизма у води и метанолу. *Orto*-хидрокси супституисано једињење **БИП-6** реагује претежно путем SET-PT механизма услед формирања  $\pi$ -делокализоване псеудоцикличне структуре која отежава одузимање Н атома хидроксилне групе (Слика 4.11). У зависности од електронских својстава и природе супституената добијени резултати корелације, дати у Табели 4.14, указују да се механизам радикалске активности састоји од одговарајућег доприноса преноса електрона (IP) и од преноса Н атома (BDE).

Ови резултати показују да је допринос НАТ и SET-PT механизма у укупном антиоксидативном процесу веома сложен и да зависи и од структурних и електронских својстава супституената.

#### 4.2.7. Инхибиторна активност **БИП** према ацетилхолинестерази (AChE)

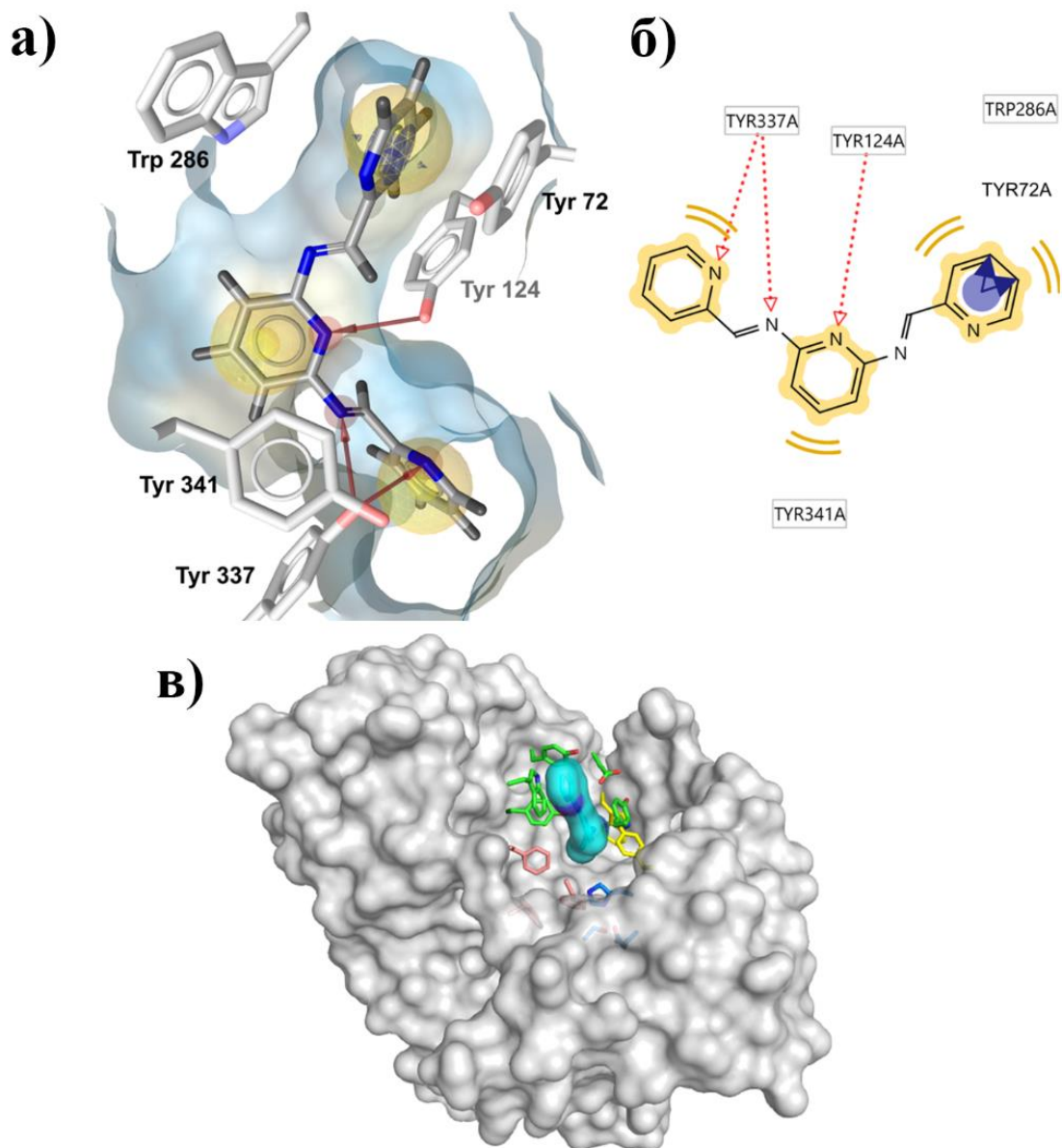
У оквиру овог дела дисертације испитана је инхибиторна активност деривата **БИП** према ензиму АСhЕ. Сва испитивана једињења су показала слабу до умерену инхибиторну активност (Табела 4.15). Најактивнији дериват је једињење **БИП-16** ( $IC_{50} = 21 \pm 4 \mu M$ ) које садржи два *o*-пиридил супституента.

Табела 4.15 Инхибиторна активност једињења **БИП** према ензиму АСhЕ

Једињење	$IC_{50} \pm SD$ ( $\mu M$ )	Једињење	$IC_{50} \pm SD$ ( $\mu M$ )
<b>БИП-1</b>	205±26 <sup>f</sup>	<b>БИП-9</b>	391±42 <sup>b</sup>
<b>БИП-2</b>	122±16 <sup>g</sup>	<b>БИП-10</b>	335±20 <sup>bc</sup>
<b>БИП-3</b>	204±14 <sup>ef</sup>	<b>БИП-11</b>	204±20 <sup>ef</sup>
<b>БИП-4</b>	266±22 <sup>de</sup>	<b>БИП-12</b>	367±30 <sup>b</sup>
<b>БИП-5</b>	336±18 <sup>bc</sup>	<b>БИП-13</b>	457±26 <sup>a</sup>
<b>БИП-6</b>	207±10 <sup>ef</sup>	<b>БИП-14</b>	288±16 <sup>cd</sup>
<b>БИП-7</b>	240±10 <sup>def</sup>	<b>БИП-15</b>	215±18 <sup>ef</sup>
<b>БИП-8</b>	196±22 <sup>f</sup>	<b>БИП-16</b>	21±4 <sup>h</sup>

Ниска инхибиторна активност **БИП** једињења која садрже различите супституенте са различитим електронским и стерним ефектима указује да је неопходна даља модификација структуре како би се постигла инхибиторна активност у наномоларном опсегу.

Да би се разјаснио начин везивања најактивнијег једињења **БИП-16** у активно место АсhЕ, извршен је молекулски докинг. Претпостављени начин везивања и интеракције са лигандом приказани су на Слици 4.14.



**Слика 4.14** а) Положај и интеракције **БИП-16** у активном месту АСhЕ добијени докинг прорачунима. Фармакофоре које означавају хидрофобне интеракције приказане су као жуте сфере; фармакофорне тачке које представљају НВА потенцијал једињења су приказане као црвене сфере; Интеракције НВД група аминокиселинских остатака протеина са НВА елементима једињења приказане су као црвене стрелице, док су *stacking* интеракције једињења са триптофаном 286 (Trp 286) и тирозином 72 (Tyr 72) приказане као плави прстенови на пиридинском прстену који је позициониран при врху активног места ензима. б) Дводимензионални приказ стабилних интеракција између **БИП-16** и АСhЕ; в) Приказ положаја лиганда (светлоплава сфера) у везивном месту АСhЕ. Аминокиселински (АК) остаци периферног анијонског места обојени су зелено, ацил-везивно место је означено црвеном бојом АК остатака, анијонско место смештено у дубини везивног џепа приказано је жутиим АК остацима, док је каталитичка тријада (глутаминска киселина 334 (Glu 334), хистидин 447 (His 447) и серин 203 (Ser 203)) означена плавим АК остацима.

Као што се може видети са Слике 4.14в, једињење **БИП-16** углавном заузима периферно анијонско место смештено на ободу активног места АСhЕ<sup>200</sup>. Једна пиридил група остварује  $\pi$ - $\pi$  интеракцију са Trp 286 и Tyr 72, док је централни пиридински прстен водонично

везан са Туг 124. Централни прстен пиридина такође остварује хидрофобне интеракције са Туг 341. У интеракцији једињења са периферним ањонским местом, које се налази дубље у везивном цепу АСhЕ, учествује само АК остатак Туг 337. Афинитет везивања добијен прорачунима у програму AutoDock Vina износи -8,9 kcal/mol, док енталпија везивања израчуната помоћу MMFF94 поља сила износи је -43,43 kcal/mol. Добијени резултати указују да би се већи афинитет ове групе једињења и АСhЕ могао постићи повећањем величине молекула на начин да се оствари више интеракција унутар ањонских места, нарочито са Тр 86.

#### 4.2.8. Антимикробна активност **БИП** једињења

*Bis*-имино пиридини (**БИП**) као и њихови комплекси са различитим металним јонима често су проучавани антимикробни агенси<sup>3,19</sup>. У складу са тим, да би се проценио антимикробни потенцијал испитиваних једињења и извеле прелиминарне информације о односу структуре и биолошке активности, тестирана су једињења на неколико патогених Грам-позитивних и Грам-негативних сојева бактерија и једном соју гљивица. Активност једињења је упоређена са амоксицилином, када је испитивање рађено на бактеријама, односно са флуконазолом за испитивање на гљивичном соју. Резултати антимикробног и антифунгалног дејства дати у Табели 4.16 показују антимикробно деловање испитиваних једињења према свим испитиваним бактеријама. У опсегу испитиваних концентрација, једињења показују активност према бактеријама *Escherichia coli* (МИС 0,31-5,00 mmol/L), *Enterococcus faecalis* (МИС 0,16-5,00 mmol/L) и *Staphylococcus aureus* (МИС 0,16-5,00 mmol/L). Посебно треба нагласити да показују активност и према високо отпорној бактерији *S. aureus* MRSA (МИС 0,08-5,00 mmol/L).

Значајну антимикробну активност према бактеријама *E. faecalis* и *P. aeruginosa* (МВС 5,00 mmol/L) показује једињење **БИП-16**. Претходне студије су показале да једињења **БИП-6**, **БИП-8** и **БИП-16** имају умерено антимикробно дејство, док њихови метални комплекси показују значајно већу активност<sup>19</sup>.

Такође, скоро половина анализираних једињења показује фунгистатско деловање према гљивици *C. albicans* (МИС 0,16-5,00 mmol/L). Два једињења, **БИП-16** и **БИП-6**, испољила су јако антифугално дејство према *C. albicans* које је упоредиво са флуконазолом (МФС 0,31 mmol/L за **БИП-6** и **БИП-16** у односу на 0,16 mmol/L за флуконазол).

Ови резултати указују да међу шеснаест испитиваних једињења, једињење **БИП-16** (*bis*-2-пиридил дериват) показује најјаче антимикробно дејство. Такође, дериват са -ОН групом у *orto*- положају (једињење **БИП-6**) показује значајну антимикробну активност.

**Табела 4.16** Антимикробна активност **БИП** једињења, амоксицилина (позитивне контроле за сојеве бактерија) и флуконазола (позитивне контроле за гљивичне сојеве), изражена као MIC (mmol/L) и MBC/MFC (mmol/L), одређена микродилуционом методом.

Једињење	<i>Candida albicans</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	
	ATCC 10231		ATCC 27853		ATCC 25922		ATCC 29212		ATCC 25923		Клинички изолат	
	MIC	MFC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<b>БИП-1</b>	- <sup>1</sup>	-	5,00 <sup>a,A2</sup>	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-
<b>БИП-2</b>	-	-	-	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-	2,50 <sup>b,B</sup>	-	0,62 <sup>d,C</sup>	5,00 <sup>a</sup>	2,50 <sup>b,B</sup>	-
<b>БИП-3</b>	-	-	-	-	-	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-	-	-
<b>БИП-4</b>	-	-	-	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-
<b>БИП-5</b>	1,25 <sup>c,B</sup>	-	-	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-	-	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-
<b>БИП-6</b>	0,16 <sup>d,D</sup>	0,31 <sup>a,B</sup>	5,00 <sup>a,A</sup>	-	2,50 <sup>b,B</sup>	-	2,50 <sup>b,B</sup>	-	1,25 <sup>c,C</sup>	-	0,08 <sup>d,E</sup>	2,50 <sup>b,A</sup>
<b>БИП-7</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>БИП-8</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>БИП-9</b>	-	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-	2,50 <sup>b,B</sup>	-	1,25 <sup>c,C</sup>	5,00 <sup>a</sup>	2,50 <sup>b,B</sup>	-
<b>БИП-10</b>	5,00 <sup>a,A</sup>	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-	-	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-
<b>БИП-11</b>	5,00 <sup>a,A</sup>	-	-	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-
<b>БИП-12</b>	-	-	-	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-	2,50 <sup>b,B</sup>	5,00 <sup>a</sup>	5,00 <sup>a,A</sup>	-
<b>БИП-13</b>	2,50 <sup>b,B</sup>	-	-	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-	2,50 <sup>b,B</sup>	-	-	-
<b>БИП-14</b>	-	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-	5,00 <sup>a,A</sup>	5,00 <sup>a,A</sup>	2,50 <sup>b,B</sup>	-	1,25 <sup>c,C</sup>	-	1,25 <sup>c,C</sup>	5,00 <sup>a,A</sup>
<b>БИП-15</b>	1,25 <sup>c,C</sup>	-	-	-	5,00 <sup>a,A</sup>	-	2,50 <sup>b,B</sup>	-	2,50 <sup>b,B</sup>	-	-	-
<b>БИП-16</b>	0,16 <sup>d,B</sup>	0,31 <sup>a,C</sup>	0,31 <sup>b,A</sup>	5,00 <sup>a,A</sup>	0,31 <sup>c,A</sup>	5,00 <sup>a,A</sup>	0,16 <sup>c,B</sup>	5,00 <sup>a,A</sup>	0,16 <sup>e,B</sup>	2,50 <sup>b,B</sup>	0,08 <sup>d,C</sup>	2,50 <sup>b,B</sup>
Амоксицилин			0,07 <sup>c,A</sup>	0,14 <sup>b,A</sup>	0,02 <sup>d,B</sup>	0,07 <sup>b,B</sup>	0,001 <sup>d,C</sup>	0,01 <sup>b,C</sup>	0,001 <sup>f,C</sup>	0,004 <sup>c,D</sup>		
Флуконазол	0,04 <sup>e</sup>	0,16 <sup>b</sup>										

<sup>1</sup>Није постигнуто; <sup>2</sup>Вредности у истој колони са различитим малим словима, као и вредности у истом реду са различитим великим словима значајно се разликују при  $\alpha = 0,05$  (ANOVA)

#### 4.2.8.1. Одређивање могућих молекулских мета које интерагују са **БИП** и молекулски докинг у предвиђене мете релевантне за антимикуробну активност једињења

У циљу рационализације антибактеријске активности **БИП** једињења предвиђене су могуће молекулске мете у бактеријским ћелијама на основу структуре **БИП**, као и молекулско моделовање.

Могући протеини значајни за антибактеријско дејство **БИП** једињења предвиђени су на основу критеријума структурне сличности са једињењима познатог механизма дејства<sup>165</sup>. Примењена метода групише протеине на основу хемијске сличности активних лиганата, тако да претрага структурне сличности новог молекула са базом података молекула даје рационалну претпоставку о потенцијалним ћелијским метама и могућем механизму дејства. Три најбоље рангиране молекулске мете за сваки од најактивнијих лиганата (једињења **БИП-6**, **БИП-10** и **БИП-16**) представљене су у Табели 4.17, док су предложене молекулске мете за друге лиганде наведене у Табели П7.11.

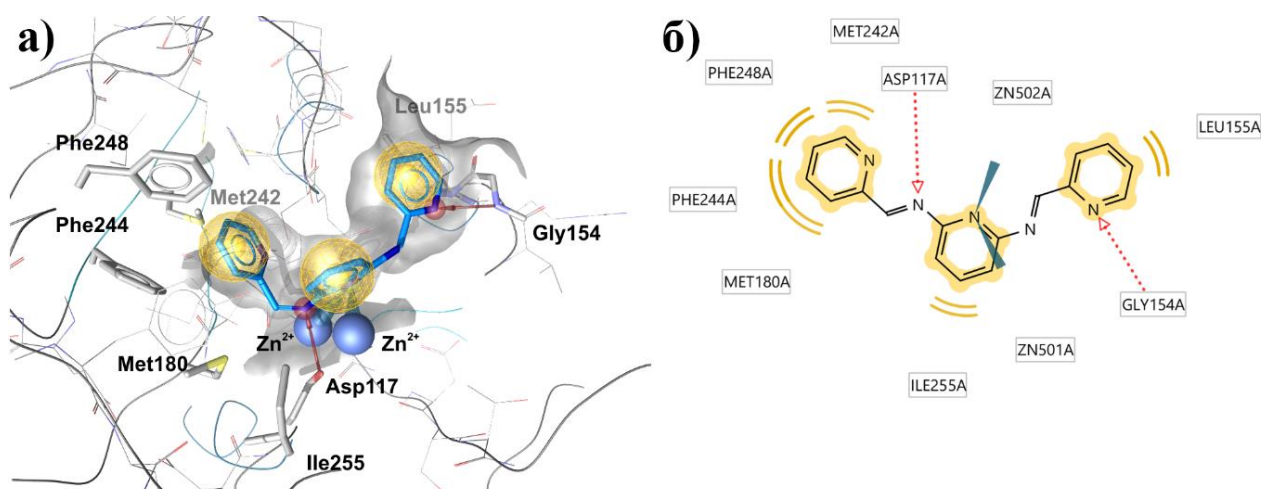
**Табела 4.17** Три најбоље рангиране молекулске мете по критеријуму сличности за једињења **БИП-6**, **БИП-10** и **БИП-16**. Укупни ранг је комбинација неколико параметара као што су удаљеност од средње вредности (*Z*-скор) и Танимотов индекс сличности (Max TC).

Једињење	Предложена мета	<i>Z</i> -скор	Max TC
<b>БИП-6</b>	Ензим за претварање ендотелина типа 2 (енгл. <i>Endothelin-converting enzyme 2</i> )	6,9499	0,3590
	Цистеин протеаза-3 (енгл. <i>Cysteine protease falcipain-3</i> )	35,7526	0,4286
	<b>Бактеријска леуцил аминокептидаза</b>	17,6778	0,3235
<b>БИП-10</b>	Gag-Pro-Pol полипротеин	76,2021	0,3000
	Ензим за претварање ендотелина типа 2	56,1682	0,3256
	<b>Бактеријска леуцил аминокептидаза</b>	21,9179	0,4000
<b>БИП-16</b>	Амин оксидаза осетљива на амилорид са Cu <sup>2+</sup> (енгл. <i>Amiloride-sensitive amine oxidase [copper-containing]</i> )	17,6168	0,2955
	<b>Бактеријска леуцил аминокептидаза</b>	17,1653	0,3143
	Гама-1 подјединица 5'-АМР-активиране протеин киназе	15,7955	0,3171

Као што се види из Табеле 4.17, бактеријска леуцил аминокептидаза је препозната као најбоље рангирана мета за једињења **БИП-6**, **БИП-10** и **БИП-16**. То је Zn<sup>2+</sup> зависна протеаза која селективно откида леуцин са N-краја полипептидног ланца. Ова три једињења су показала запажену активност према испитиваним бактеријама (Табела 4.16), па је очекивано претпоставити овај ензим као молекулску мету **БИП** једињења у бактеријским ћелијама.

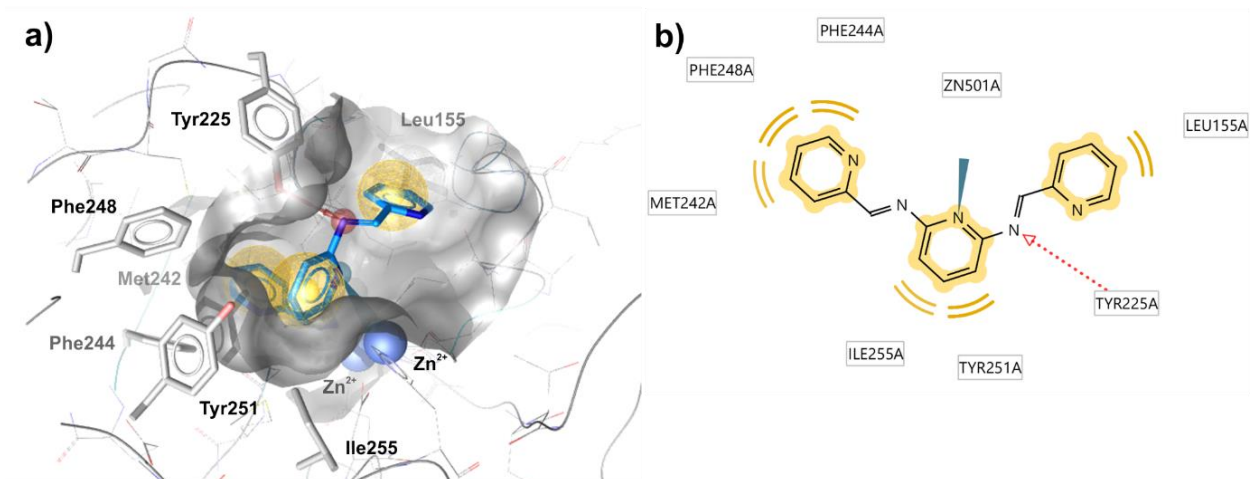
Да би се окарактерисале могуће интеракције између најактивнијег једињења **БИП-16** и бактеријске леуцил аминокептидазе, изведене су две симулације молекулског докинга. У првој симулацији, након уклањања лиганда из активног места аминокептидазе није извршена минимизација енергије протеина помоћу молекулске динамике тако да је активно место аминокептидазе остало у истој конформацији као у њеном комплексу са инхибитором 1-бутил борном киселином. У другој симулацији, енергија бочних АК остатака протеина је минимизована да би се уклонила стерна одбијања. Према најнижој процењеној слободној енергији везивања (-7,71 наспрам -7,42 kcal/mol), комплекс **БИП-16** у неминимизованој структури протеина (Слика 4.15) стабилнији је у односу на минимизовану структуру (Слика 4.16). Један пиридински прстен налази се дубоко у месту за везивање, формирајући хидрофобне интеракције са Met 180, Met 242, Phe 244 и Phe 248. Други пиридински део налази се на улазу у везивно место, формирајући хидрофобну интеракцију са Leu 155 и водоничну

везу са Gly 154. Атом азота централног пиридинског прстена попуњава координаону сферу оба тетраедарска  $Zn^{2+}$  јона на начин на који је био везан и познати инхибитор 1-бутил борна киселина у кристалној структури. АК остатак Asp 117 који учествује у каталитичком механизму ензима је водонично везан за атом азота из азометинске везе (Слика 4.15).



**Слика 4.15** а) Могући начин везивања *БИП-16* у активном месту Leu аминокептидазе (PDB ознака 1CP6); б) Дијаграм који приказује најважније интеракције протеина и лиганда у 2D.

Осенчена површина представља активно место ензима. Хидрофобне фармакофоре су приказане као жуте сфере, а НВА фармакофоре приказане су као црвене сфере. Интеракције водоничног везивања приказане су црвеним стрелицама, а интеракције са цинком плавим испуњеним стрелицама.



**Слика 4.16.** а) Могући начин везивања *БИП-16* у активном месту Leu аминокептидазе (PDB ознака 1CP6); б) Дијаграм који приказује најважније интеракције протеина и лиганда у 2D.

Осенчена површина представља активно место ензима. Хидрофобне фармакофоре су приказане као жуте сфере, а НВА фармакофоре приказане су као црвене сфере. Интеракције водоничног везивања приказане су црвеним стрелицама, а интеракције са цинком плавим испуњеним стрелицама

Квалитативна анализа односа структуре и активности открива да су једињења која имају додатни координирајући атом у близини тридентатног *bis*(имино) пиридинског дела најактивнији антибактеријски агенси. С обзиром да се  $Zn^{2+}$  зависна Leu аминопептидаза показала као највероватнија молекулска мета за најактивнија једињења из серије **БИП**, можемо претпоставити да је способност хелирања метала главна структурна карактеристика одговорна за антибактеријску активност.

### **4.3. ИСПИТИВАЊЕ ВИНИЛ (БВПЈ) И ИМИНО (БИП) ДЕРИВАТА ПИРИДИНА КАО ПОТЕНЦИЈАЛНИХ ИНХИБИТОРА КОРОЗИЈЕ**

У наставку истраживања ове докторске дисертације рађена су испитивања прве и друге серије једињења (**БВПЈ** и **БИП**) на узорцима метала у циљу проучавања њиховог могућег дејства као инхибитора корозије. Тестирања су рађена на гвожђу и цинку применом електрохемијских метода. Укупно је тестирано тридесет и једно једињење прве и друге серије. Међу испитиваним једињењима винил деривати нису показали добре резултате инхибиторне активности и из тог разлога нису даље разматрани и неће бити приказани у овом делу рада. За разлику од винил, имино деривати показали су значајну активност приликом испитивања, од којих су три деривата била најактивнија. У даљем наставку истраживања биће приказано испитивање инхибиторне активности **БИП** деривата електрохемијским мерењима и проучавање механизма њиховог деловања применом теоријских прорачуна.

#### **4.3.1 Испитивање ефикасности инхибиције БИП**

##### **4.3.1.1 Линеарна поларизациона отпорност (LPR)**

Активност **БИП** једињења као потенцијалних инхибитора корозије испитана је на узорцима гвожђа и цинка у 0,5М раствору NaCl на рН 3 и рН 7 применом LPR методе. Од шеснаест испитиваних једињења најбољу активност показала су три деривата са 2-хинолил, диметиламинофенил и 2-пиридил групама (**БИП-9**, **БИП-14** и **БИП-16**, редом) на којима су даље вршена сва детаљна електрохемијска мерења. С обзиром да се у индустрији метала киселине користе за третман металних површина, инхибиторна активност **БИП-9**, **БИП-14** и **БИП-16** је испитивана и у 1М раствору HCl. У циљу проналажења оптималне концентрације потенцијалног инхибитора којом би се постигла најбоља ефикасност инхибиције (*E*) на површини метала, мењана је концентрација синтетисаних једињења. Резултати ефикасности инхибиције за различите концентрације три деривата са најбољом активношћу (**БИП-9**, **БИП-14** и **БИП-16**) у 0,5М раствору NaCl и 1М раствору HCl дати су у Табелама 4.18. и 4.19.

**Табела 4.18** Параметри корозије добијени електрохемијским мерењем (LPR методом) на гвожђу или цинку у 0,5М раствору NaCl (на pH 3 или pH 7) при промени концентрације **БИП-9**, **БИП-14** и **БИП-16**.

Једињење	$c$ ( $\times 10^{-6}$ mol dm $^{-3}$ )	$E_{\text{согг}}$ (mV)	$R_p$ ( $\Omega$ cm $^2$ )	$E$ (%)
<b>БИП-9</b> на гвожђу (pH 7)	0,0	-634	939	/
	1,5	-670	1122	16,3
	2,8	-680	1174	20,0
	5,9	-710	3207	70,7
	8,8	-716	2753	65,9
	11,6	-717	2327	59,6
<b>БИП-14</b> на гвожђу (pH 3)	0,0	-711	457	/
	6,2	-695	608	24,8
	12,1	-690	727	37,1
	15,1	-678	651	29,8
	17,8	-678	729	37,3
	23,4	-694	1502	69,6
<b>БИП-14</b> на цинку (pH 7)	0,0	-654	1484	/
	6,2	-687	1800	17,6
	12,1	-700	2084	28,8
	15,1	-712	2928	49,3
	17,8	-717	3125	52,5
	20,7	-708	2340	36,6
<b>БИП-16</b> на гвожђу (pH 3)	0,0	-697	426	/
	26,8	-724	900	52,7
	53,3	-711	1140	62,6
	156,7	-636	1331	68,0
	208,1	-627	1545	72,4
	257,9	-632	1235	65,5
<b>БИП-16</b> на цинку (pH 7)	0,0	-1049	410	/
	26,8	-1055	492	16,7
	53,3	-1060	654	37,3
	156,7	-1064	937	56,2
	208,1	-1065	1096	62,6
	257,9	-1063	983	58,3

Из приказаних резултата може се приметити да сва три синтетисана једињења (**БИП-9**, **БИП-14** и **БИП-16**) имају релативно добру инхибиторску ефикасност на испитиваним узорцима гвожђа и цинка при различитим експерименталним условима (Табеле 4.18. и 4.19). Такође, резултати указују на високо добијене вредности  $E$  при концентracији  $22,2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  за **БИП-9** (76,7%) и концентracијама  $28,8 \times 10^{-6}$  и  $37,2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  за **БИП-14** и **БИП-16** (93,8% и 77,8%, редом) када се користи 1М раствор HCl (Табела 4.19) у поређењу са резултатима добијеним у 0,5М раствору NaCl.

Може се претпоставити да једињења формирају везу са јонима метала на површини координацијом преко слободних електронских парова азота, чиме се успорава реакција оксидације/редукције на површини метала. На основу добијене вредности за  $E_{\text{согг}}$  може се видети да су сва три једињења (инхибитора) **БИП-9**, **БИП-14** и **БИП-16** мешовитог типа, што одговара карактеристикама органских инхибитора.



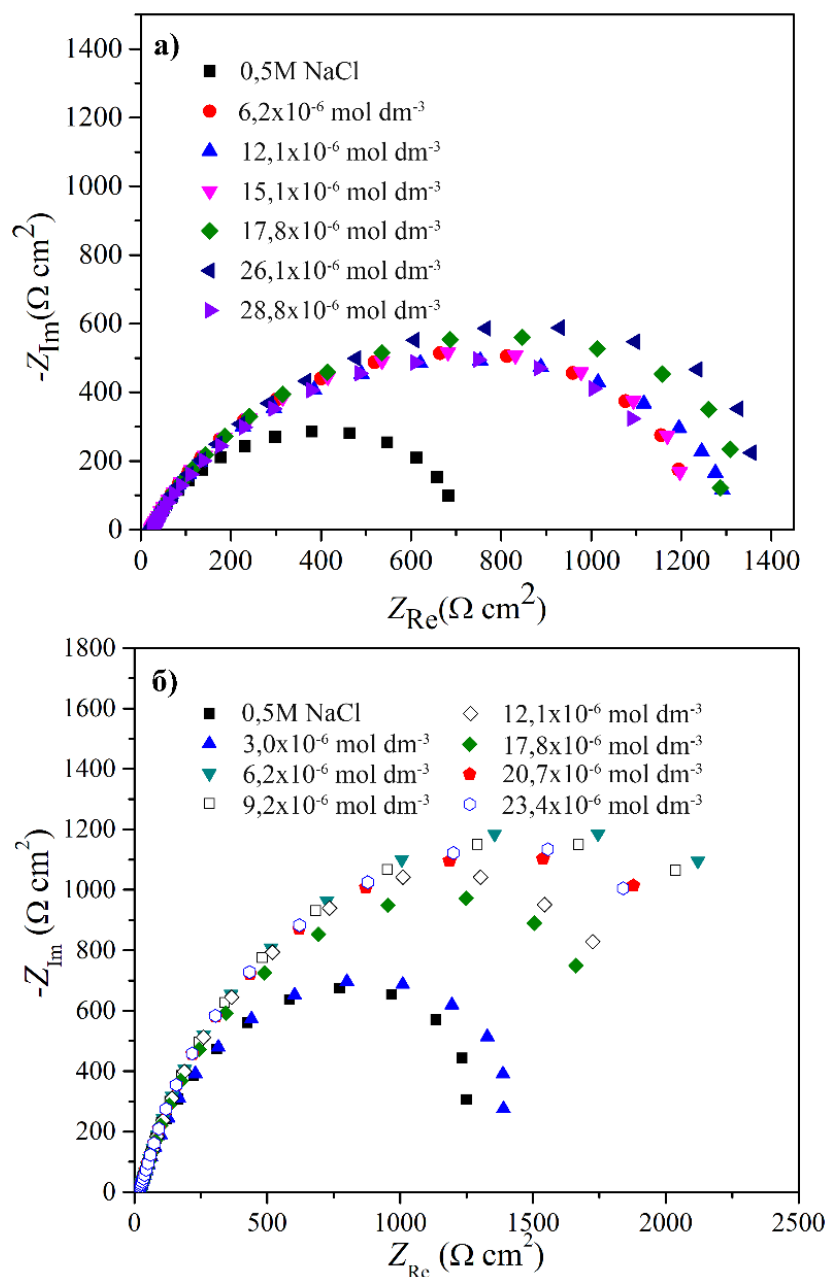
**Табела 4.19** Параметри корозије добијени електрохемијским мерењем (LPR методом) на гвожђу у 1М раствору HCl при промени концентрације **БИП-9**, **БИП-14** и **БИП-16**.

Једињење	$c$ ( $\times 10^{-6}$ mol dm $^{-3}$ )	$E_{\text{согг}}$ (mV)	$R_p$ ( $\Omega$ cm $^2$ )	$E$ (%)
<b>БИП-9</b>	0,0	-473	484	/
	2,8	-471	1174	58,8
	5,9	-470	1436	66,3
	11,6	-478	1668	71,0
	16,8	-479	1980	75,6
	22,2	-478	2078	76,7
	27,6	-479	2019	76,0
<b>БИП-14</b>	0,0	-481	167	/
	3,0	-480	245	31,8
	6,2	-479	348	52,0
	12,1	-476	584	71,4
	17,8	-475	1035	83,9
	23,4	-474	2021	91,7
	28,8	-470	2675	93,8
<b>БИП-16</b>	0,0	-471	240	/
	3,8	-474	419	42,7
	7,7	-474	651	63,1
	15,3	-473	905	73,5
	22,6	-473	1020	76,5
	29,9	-471	1058	77,3
	37,2	-471	1080	77,8

Познато је да су церијумове соли добри инхибитори корозије, који имају високу ефикасност инхибиције и еколошки су прихватљиви<sup>201</sup>. Међу њима церијум(III)-ацетат се показао као добар инхибитор корозије у 0,1М раствору NaCl<sup>202</sup>, док се у литератури не могу наћи наводи који се односе на испитивање његове инхибиторне ефикасности у 0,5М раствору NaCl на цинку и гвожђу. Како би се испитало синергетско дејство церијум(III)-ацетата са једињењима **БИП-9**, **БИП-14** и **БИП-16** било је неопходно испитати и његов самостални инхибиторски ефекат на истим узорцима и при истим условима. Добијени резултати приказани су у Табели П7.12. Резултати у Табели П7.12 указују да церијум(III)-ацетат на гвожђу има инхибиторни ефекат при врло ниским концентрацијама и може се користити као ефикасан инхибитор корозије у воденим растворима. У случају цинка, ово једињење се не показује као добар инхибитор. На основу вредности  $E_{\text{согг}}$  закључује се да је церијум(III)-ацетат инхибитор мешовитог типа.

#### 4.3.1.2 Електрохемијска импедансна спектроскопија (EIS)

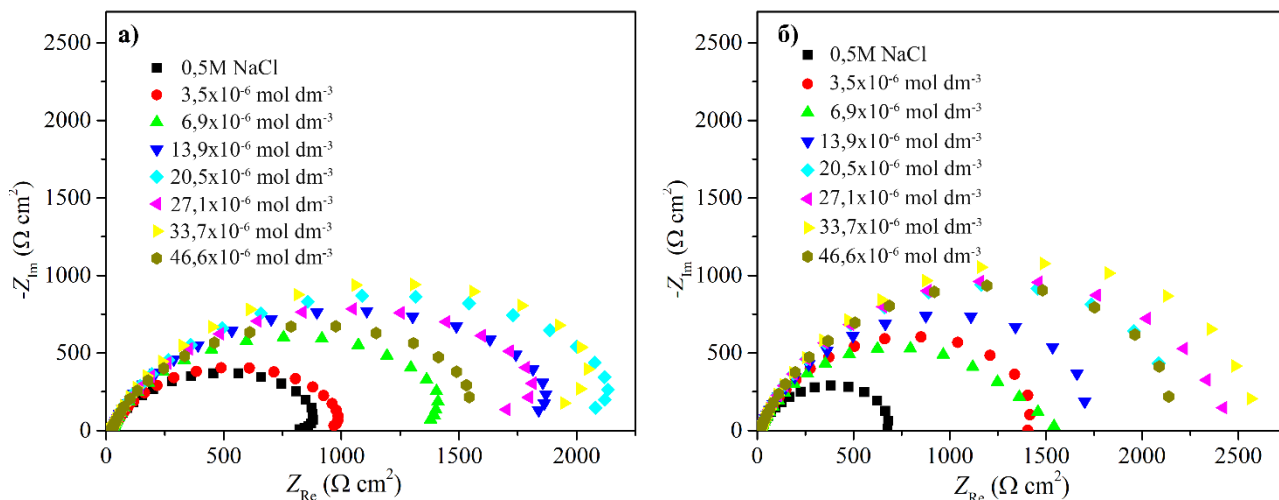
EIS метода је коришћена за испитивање зависности ефикасности инхибиције од концентрације за једињења која су показала најбољу инхибиторну ефикасност (**БИП-9**, **БИП-14** и **БИП-16**) код LPR методе. За испитивање инхибиторне ефикасности примењене су различите концентарције одабраних инхибитора, а у циљу добијања оптималне концентрације на којој ће се показати најбоља ефикасност. На Сликама 4.17 и 4.18 приказани су Најквистови дијаграми за резултате добијене електрохемијском EIS методом у 0,5М раствору NaCl без и у присуству **БИП-14** једињења (инхибитора), а у Табели П7.13 дати су резултати испитивања инхибиторне ефикасности и церијум(III)-ацетата.



Слика 4.17 Најквистов дијаграм за гвожђе у 0,5М раствору NaCl без и у присуству инхибитора **БИП-14**, концентрациона зависност а) рН 3, б) рН 7

Добијене Најквистове криве показују повећану отпорност на корозију са повећањем концентрације једињења **БИП-14** на рН 3 (Слика 4.17а). Повећање отпорности на корозију може се објаснити стварањем слоја инхибитора на металној површини где су везе са металном површином формиране преко слободних електронских парова атома азота<sup>203</sup>. На вишим концентрацијама од  $26,1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  долази до смањења отпорности на корозију. Смањење отпорности на корозију при вишим концентрацијама могло би бити због структурно сложеног одвајања слоја од површине услед његове дестабилизације. Будући да инхибитор има тенденцију везивања за површину, вероватно формира нови слој који даје већу инхибиторну активност. На рН 7 (Слика 4.17б) отпорност на корозију достиже максималну вредност при  $6,2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  и са повећањем концентрације благо се смањује.

Најквистови дијаграми на слици 4.18 приказују промену отпора (пораст ефикасности инхибитора) са променом концентрације инхибитора церијум(III)-ацетата за цинк (Слика 4.18а) и гвожђе (Слика 4.18б) у 0,5М раствору NaCl на рН 7 и рН 3. Повећање концентрације инхибитора смањује брзину корозије, а на основу неправиланог тренда раста може се претпоставити да се ради о физичкој адсорпцији.

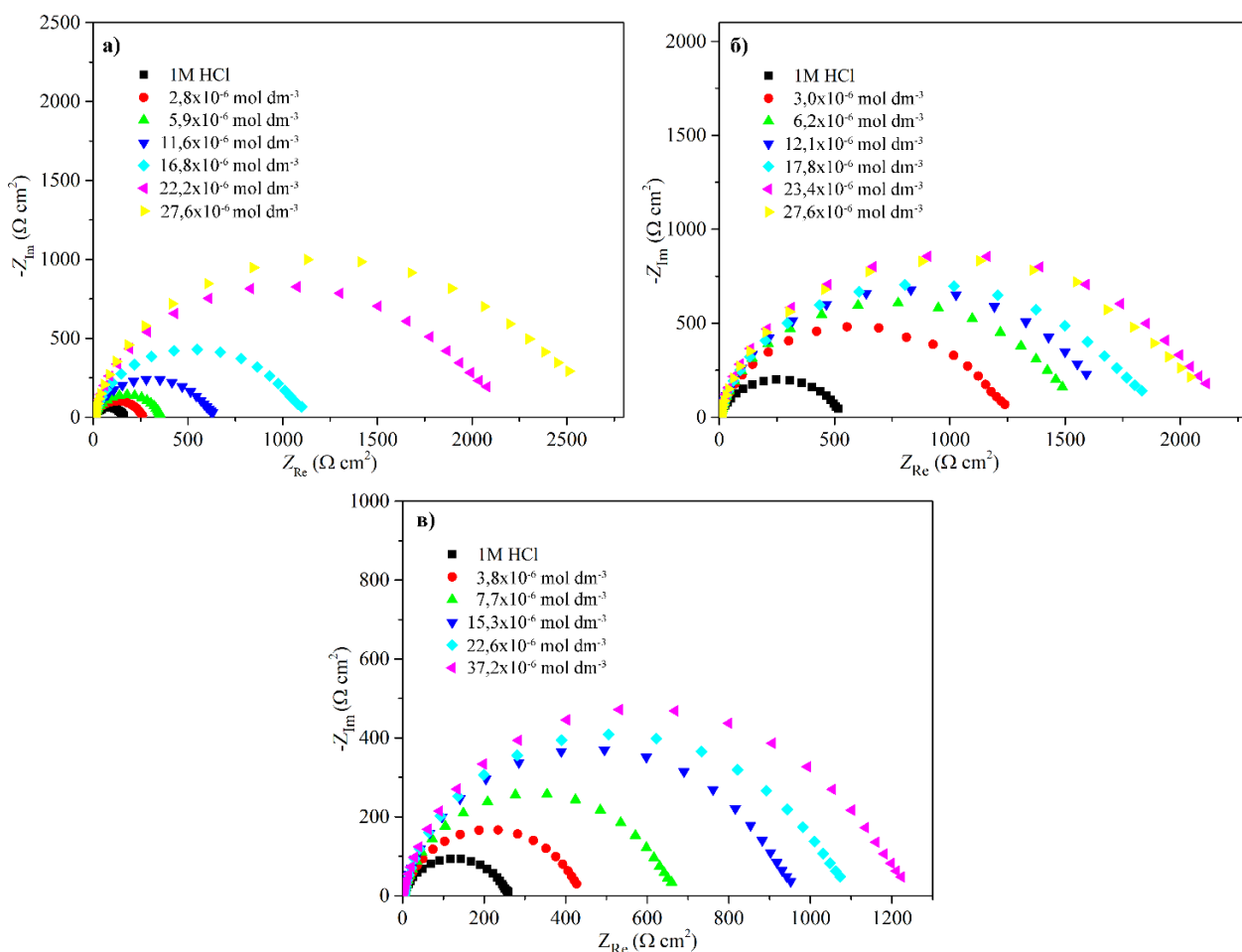


**Слика 4.18** Најквистов дијаграм за гвожђе у 0,5М раствору NaCl без и у присуству инхибитора церијум(III)-ацетата, концентрациона зависност: а) цинк (рН 7) и б) гвожђе (рН 3)

Претпоставља се да на површини цинка настаје танак филм церијум-хидроксида и церијум-оксида. Јони  $\text{Ce}^{3+}$  реагују са хидроксилним јонима који се налазе у раствору (са металне површине), блокирајући тако њихову реакцију са металом (успоравајући корозију), односно то је катодна заштита јер се блокирају катодни укључци (нечистоће у металу). Вредност отпора се правилно повећава на одређену концентрацију инхибитора ( $20,5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ), што може потврдити претпоставку стварања филма (Слика 4.18). Даљи пораст концентрације инхибитора церијум(III)-ацетата резултира променом у расту отпорности, што може указивати на десорпцију и поновно формирање филма (**адсорпција**). Ова појава је карактеристична за физичку везу метал-инхибитор (**физисорпција**).

Инхибиторска ефикасност једињења **БИП-9**, **БИП-14** и **БИП-16** је даље испитана на гвожђу у 1М раствору HCl. Добијени резултати приказани су Најквистовим дијаграмима на Слици 4.19.

Најквистови дијаграми на Слици 4.19 имају сличан облик у свим испитиваним концентрацијама, што сугерише да је оперативан сличан механизам корозије. Такође, као што се може видети, полукругови немају савршен облик који је узрокован храпавошћу површине метала и другим нечистоћама у металу<sup>204</sup>. У поређењу са слепом пробом (1М HCl), пречник полукругова се повећава додавањем инхибитора, при чему доводи да отпорност на корозију расте.



Слика 4.19 Најквистов дијаграм за гвожђе у 1М раствору HCl без и у присуству инхибитора а) *БИП-9*, б) *БИП-14* и в) *БИП-16*

#### 4.3.2. Временска зависност

Временска зависност је испитана за једињења *БИП-9*, *БИП-14* и *БИП-16* у 0,5М раствору NaCl на гвожђу и цинку, као и у 1М раствору HCl на гвожђу применом LPR и EIS метода. Добијени резултати су дати у Табелама 4.20 и 4.21.

Резултати дати у табели 4.20 указују да инхибиторна ефикасност једињења *БИП-16* опада са временом и за цинк и за гвожђе, што указује на физичку адсорпцију овог једињења. Већи пад инхибиторне ефикасности уочен код гвожђа у односу на цинк, може бити последица делимичне десорпције инхибитора са површине метала. Супротан ефекат се уочава када се користе два инхибитора истовремено, при чему се примећује позитиван допринос синергетског ефекта церијум(III)-ацетата и одговарајућег једињења инхибиторној ефикасности. Синергетски ефекат једињења *БИП-16* и церијум(III)-ацетата на цинку доводи до повећања инхибиторне ефикасности на 70,8% (Табела 4.20) у поређењу са ефикасношћу коју показују *БИП-16* и церијум(III)-ацетат појединачно (62,6%, Табела 4.18 и 60,4% Табела П7.13, редом).

Синергетски ефекат једињења и церијум(III)-ацетата повећава ефикасност са временом. Церијум(III)-ацетат је класификован као спори инхибитор корозије, што значи да је потребан одређени временски период пре него што се заштитни филм једињења формира на целој површини и обично се то деси након неколико дана.

**Табела 4.20** Параметри корозије добијени EIS методом на гвожђу и цинку у 0,5М раствору NaCl без и у присуству инхибитора

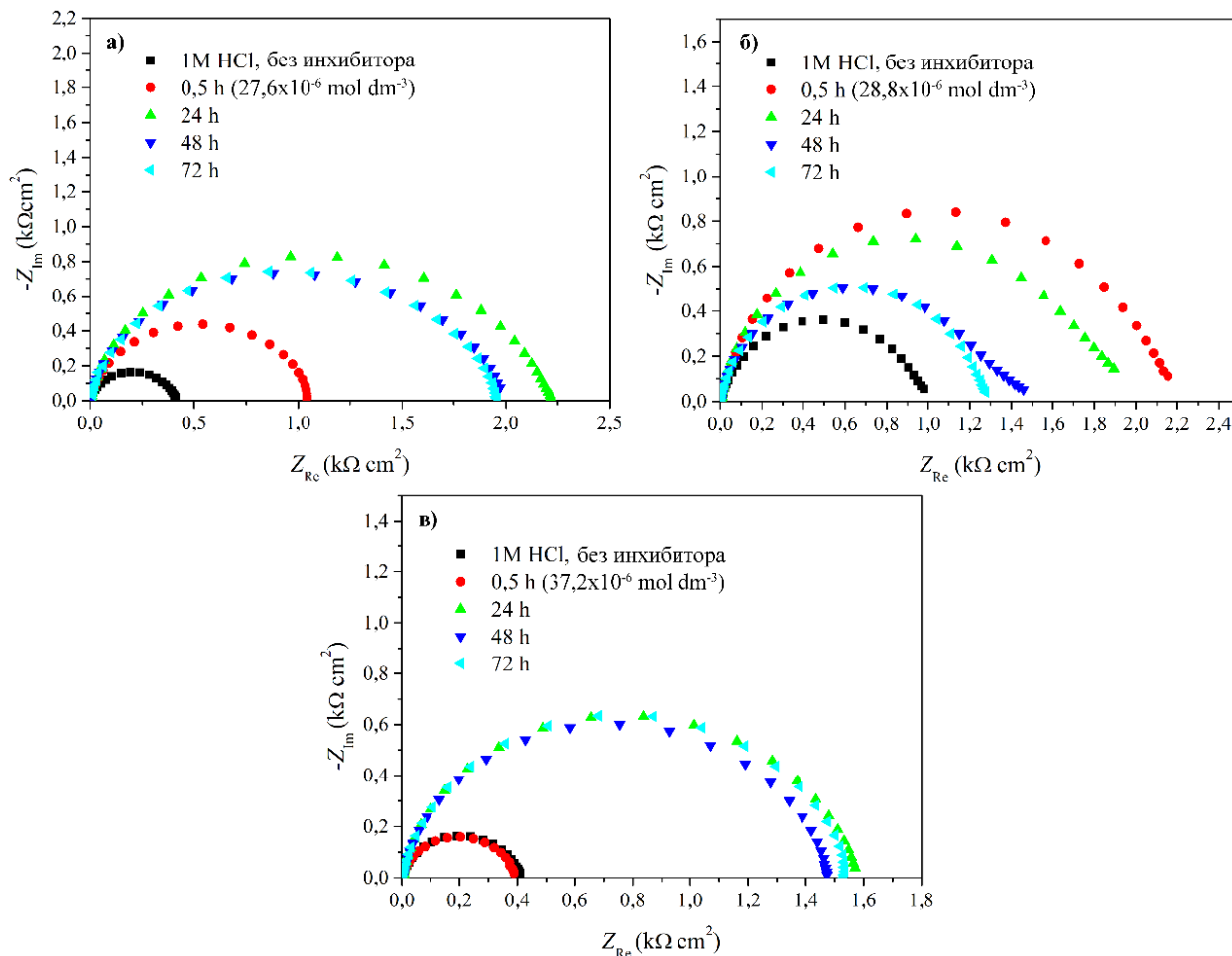
Једињење	Време (h)	$E_{\text{corr}}$ (mV)	$R_p$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ )	$E$ (%)
$\text{Ce}^{3+}$ ( $6,9 \times 10^{-6}$ mol dm <sup>-3</sup> ) + <b>БИП-9</b> ( $5,9 \times 10^{-6}$ mol dm <sup>-3</sup> ) на гвожђу, 0,5М NaCl (pH 7)	Слепа проба (NaCl) 0,5 h	-664	2046	/
	0,5h	-696	2938	30,4
	120h	-744	4465	54,2
<b>БИП-16</b> ( $167,1 \times 10^{-6}$ mol dm <sup>-3</sup> ) на гвожђу, 0,5М NaCl (pH 3)	Слепа проба (NaCl) 0,5 h	-709	667	/
	1 h	-711	2282	70,8
	24 h	-584	1164	42,7
	48 h	-585	1105	39,6
	72 h	-629	910	26,7
<b>БИП-16</b> ( $167,1 \times 10^{-6}$ mol dm <sup>-3</sup> ) на цинку, 0,5М NaCl (pH 3)	Слепа проба (NaCl) 0,5 h	-1086	179	/
	1 h	-1090	843	78,8
	24 h	-1067	898	80,1
	48 h	-1079	533	66,4
	72 h	-1067	592	69,8
$\text{Ce}^{3+}$ ( $65,3 \times 10^{-6}$ mol dm <sup>-3</sup> ) + <b>БИП-16</b> ( $151,4 \times 10^{-6}$ mol dm <sup>-3</sup> ) на цинку 0,5М NaCl (pH 7)	Слепа проба (NaCl) 0,5 h	-1047	580	/
	0,5h	-1055	883	34,3
	120h	-1049	1988	70,8

**Табела 4.21** Параметри корозије добијени LPR и EIS методом на гвожђу у 1М раствору HCl без и у присуству **БИП-9**, **БИП-14**, **БИП-16**

Једињење	t (h)	LPR			EIS		
		$E_{\text{corr}}$ (mV)	$R_p$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ )	$E$ (%)	$E_{\text{corr}}$ (mV)	$R_p$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ )	$E$ (%)
<b>БИП-9</b>	Слепа проба (HCl) 0,5 h	-501	371	/	-502	400	/
	0,5 h	-492	968	61,7	-492	1040	61,5
	24 h	-475	2232	83,4	-475	2123	81,1
	48 h	-466	2036	81,7	-467	1853	78,4
	72 h	-473	1912	80,6	-474	1777	77,5
<b>БИП-14</b>	Слепа проба (HCl) 0,5 h	-462	1003	/	-463	964	/
	0,5h	-479	2246	55,3	-480	2130	54,7
	24h	-477	1918	47,7	-478	1808	46,7
	48 h	-479	1553	35,4	-480	1275	24,4
	72 h	-488	1338	25	-488	1235	21,9
<b>БИП-16</b>	Слепа проба (HCl) 0,5 h	-501	371	/	-502	400	/
	0,5h	-492	363	/[a]	-493	386	/[a]
	24h	-480	1557	76,1	-481	1541	74
	48h	-476	1494	75,2	-476	1460	72,6
	72h	-480	1578	76,5	-481	1545	74,1

[a] Не показује инхибиторну ефикасност

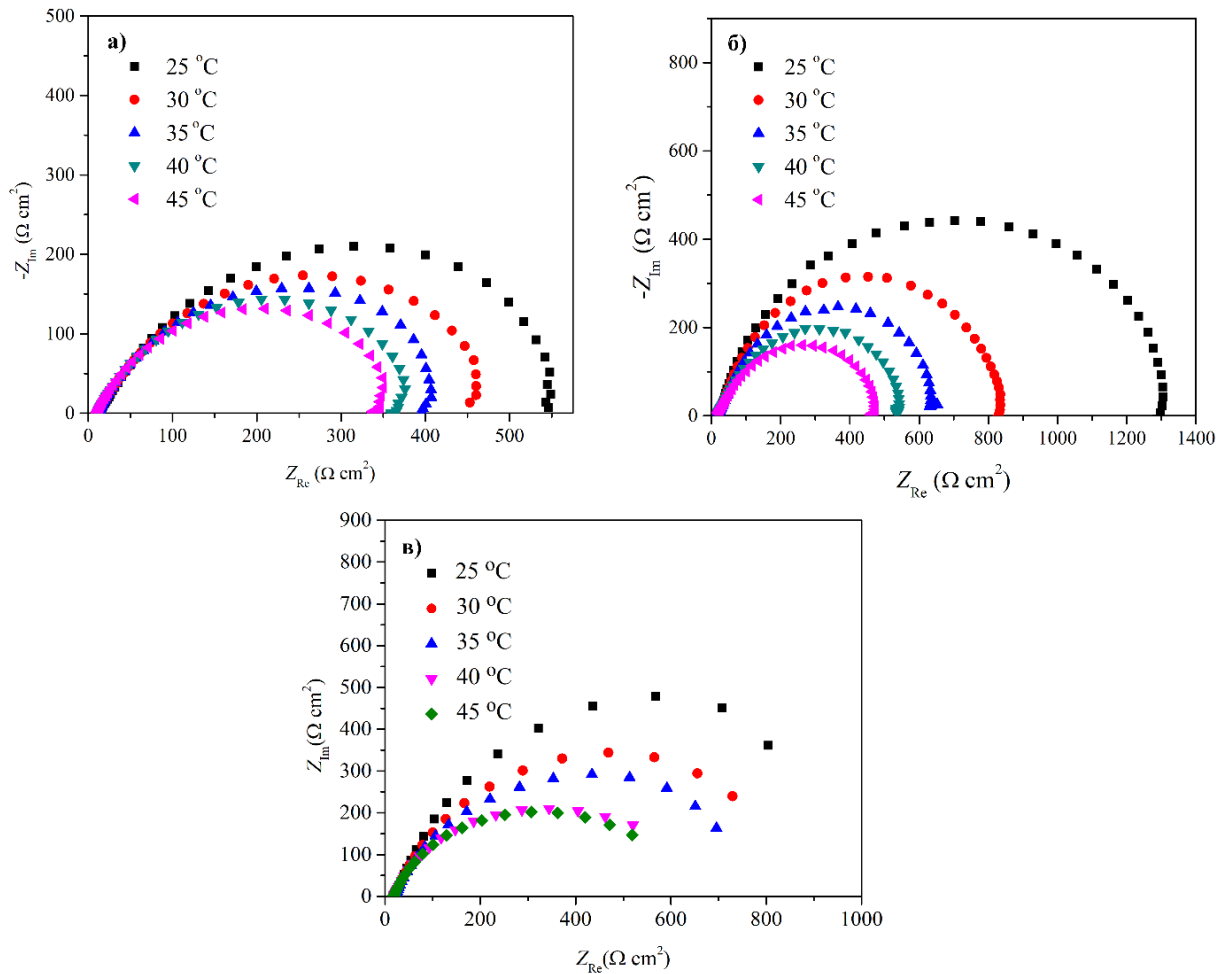
Резултати са Сlike 4.20 и из Табеле 4.21 приказују промену инхибиторне ефикасности са временом у 1М раствору HCl. Уочава се да **БИП-9** и **БИП-16** (Сlike 4.21а и в) имају повећан инхибиторни ефекат са променом времена, док инхибиторни ефекат једињења **БИП-14** са временом опада. Претпоставља се да је разлог томе што **БИП-14** слабије интерагује са испитиваним металом.



Слика 4.20 Најквистови дијаграми за временску зависност, за гвожђе, у 1М раствору HCl без и са присуством инхибитора за: а) **БИП-9**, б) **БИП-14** и в) **БИП-16**

### 4.3.3. Кинетички параметри

Температурна зависност проучавана је применом EIS методе. Инхибиторна ефикасност једињења **БИП-16** на гвожђу и цинку и синергетско дејство овог једињења са церијум(III)-ацетатом на гвожђу и цинку испитани су у температурном опсегу од 25 до 45 °C у 0,5М раствору NaCl на рН 3. Такође, испитивана је инхибиторна ефикасност **БИП-9**, **БИП-14** и **БИП-16** на гвожђу у 1М раствору HCl у температурном опсегу од 20 до 40 °C. Коришћењем EIS методе, мерени су  $E_{corr}$  и  $R_p$  за раствор без инхибитора и у присуству инхибитора а добијени резултати су приказани у прилогу у Табелама П7.14 и П7.15 и представљени на Сликама 4.21 и 4.22.

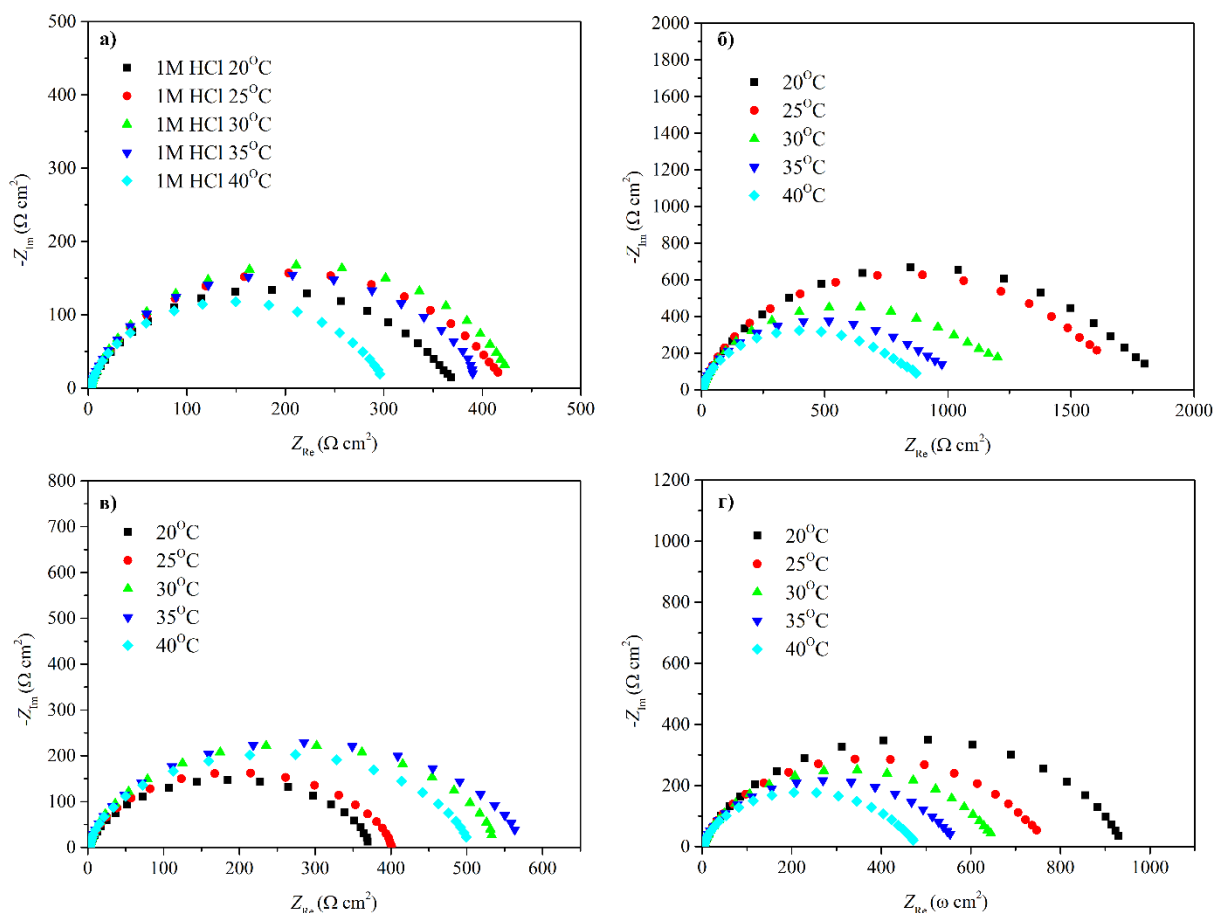


Слика 4.21 Најквистови дијаграми за температурну зависност: а) гвожђе (рН 3) за **БИП-16**, б) цинк (рН 3) за **БИП-16**, в) гвожђе (рН 3) за **БИП-16** + церијум(III)-ацетат

Вредности поларизационих отпора ( $R_p$ ) се смањују са порастом температуре без и у присуству инхибитора, услед чега се смањује и инхибиторна ефикасност једињења **БИП-16** у 0,5М раствору NaCl (Табела П7.14 и Слика 4.21). Ово смањење указује на десорпцију молекула инхибитора на површини метала<sup>141,205</sup>. Највећа вредност  $E$  (81,8%) је добијена на температури 25 °C и рН 3 на цинку (Табела П7.14 и слика 4.21б), док је на гвожђу износила 31,8% (Табела П7.14 и слика 4.21а). Синергетски ефекат **БИП-16** и церијум(III)-ацетата (Табела П7.14 и Слика 4.21в) не показује задовољавајуће резултате у датом температурном интервалу.

На Слици 4.22 приказани су Најквистови дијаграми за температурну зависност на челику у 1М раствору HCl без присуства и са присуством инхибитора (једињења **БИП-9**, **БИП-14** и **БИП-16**) на оптималној концетрацији. Резултати на Слици 4.22 и Табели П7.15 показују сличан тренд ефикасности ових једињења са порастом температуре као код 0,5М раствора NaCl.

У 1М раствору HCl за сва једињења, вредност  $R_p$  се смањује за **БИП-9** и **БИП-16**, док се за **БИП-14** повећав са порастом температуре. Ово смањење такође указује на десорпцију инхибитора са металне површине



**Слика 4.22** Најквистови дијаграми за температурну зависност на гвожђу у 1М раствору HCl: а) без инхибитора, б) са **БИП-9** ( $27,6 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) в) са **БИП-14** ( $28,8 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) и г) са **БИП-16** ( $37,2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ )

Веза између температуре и густине струје која је директно пропорционална брзини корозије (температурна зависност) може се анализирати коришћењем Аренијусове једначине.

$$j_{cor} = \frac{B}{R_p} = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (4.1)$$

У овој једначини  $j_{cor}$  (mV/s) представља густину струје корозије,  $B$  је константа која за гвожђе износи 20 mV, а за цинк 40 mV,  $R_p$  је поларизациона отпорност.  $A$  је Аренијусов предекспоненцијални фактор,  $E_a$  (kJ/mol) је енергија активације,  $R$  (J/molK) је универзална гасна константа и  $T$  је температура (K).

Израчунате су вредности  $E_a$  за цинк и гвожђе у 0,5М раствору NaCl без инхибитора и у присуству **БИП-16** и за раствор без и са синергетским дејством **БИП-16** и церијум(III)-ацетата у оптималним концентрацијама.  $E_a$  је такође израчуната за гвожђе у 1М HCl за **БИП-16**, **БИП-14** и **БИП-9**. Густина струје се рачуна као  $1/R_p$  и у функцији је температуре ( $\ln(1/R_p) = f(1000/T)$ ). Ова графичка зависност је права са нагибом  $-E_a/R$  и одсечком  $\ln A$ , помоћу које је израчуната вредност  $E_a$ .

На основу резултата мерења испитиваних једињења као инхибитора корозије на различитим концентрацијама и температурама у 0,5М NaCl/1М HCl поред  $E_a$  израчунати су и други термодинамички параметри: енталпија ( $\Delta H$ ) и ентропија ( $\Delta S$ ) коришћењем једначина:



$$j_{corr} = \frac{RT}{N_A h} \exp\left(-\frac{\Delta H}{RT}\right) \exp\left(\frac{\Delta S}{R}\right) \quad (4.2)$$

$$\ln \frac{I}{R_p T} = \left(\ln \frac{R}{N_A h B} + \frac{\Delta S}{R}\right) - \frac{\Delta H}{RT} \quad (4.3)$$

У овим једначинама  $N_A$  ( $\text{mol}^{-1}$ ) је Авогадрова константа а  $h$  (Js) је Планкова константа.

Помоћу графика  $\ln(1/(R_p T)) = f(1000/T)$ , израчунавају се  $\Delta H$  и  $\Delta S$ . Ова графичка зависност је права са нагибом  $-\Delta H/R$  и одсечком  $\ln \frac{R}{N_A h B} + \frac{\Delta S}{R}$ .

Добијени резултати (Табеле 4.22 и 4.23) показују да је вредност енергије активације већа у присуству инхибитора него у одсуству због повећања енергетске баријере за реакцију корозије. Већа енергија активације и смањење брзине корозије могу бити последица стварања заштитног филма инхибитора на металној површини. Углавном повећање енергије активације указује на физичку адсорпцију, док је непромењена или смањена енергија у корелацији са појавом хемисорпције на површини метала. Стога је адсорпција молекула органских инхибитора на металној површини сложене природе и није је могуће разматрати само као физичку или хемијску адсорпцију.

**Табела 4.22** Кинетички параметри  $E_a$ ,  $\Delta H$  и  $\Delta S$  за гвожђе и цинк у 0,5М раствору NaCl без и у присуству инхибитора **БИП-16** и синергије **БИП-16** са церијум(III)-ацетатом

Једињење	$E_a$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	$R^{[a]}$
0,5 М NaCl, гвожђе	13,40	10,84	-169,35	0,965
<b>БИП-16</b> (167,1×10 <sup>-6</sup> mol dm <sup>-3</sup> ), гвожђе	19,05	16,49	-275,85	0,974
0,5 М NaCl, цинк	27,91	25,35	-217,31	0,968
<b>БИП-16</b> (167,1×10 <sup>-6</sup> mol dm <sup>-3</sup> ), цинк	36,46	33,90	-217,14	0,942
0,5 М NaCl, гвожђе	4,25	1,69	-326,60	0,894
<b>БИП-16</b> + Ce <sup>3+</sup> (151,4×10 <sup>-6</sup> mol dm <sup>-3</sup> + 28,4×10 <sup>-6</sup> mol dm <sup>-3</sup> ), гвожђе	29,54	19,51	-270,14	0,948
0,5 М NaCl, цинк	33,63	31,08	-226,06	0,8707
<b>БИП-16</b> + Ce <sup>3+</sup> (151,4×10 <sup>-6</sup> mol dm <sup>-3</sup> + 65,3×10 <sup>-6</sup> mol dm <sup>-3</sup> ), цинк	59,19	56,63	-140,08	0,982

[a] степен регресије добијен одређивањем енергије активације

**Табела 4.23** Кинетички параметри  $\Delta H$  и  $\Delta S$  за гвожђе у 1М раствору HCl без и у присуству инхибитора **БИП-9**, **БИП-14** и **БИП-16**.

Једињење	$E_a$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	$R^{[a]}$
1М HCl	14,09	11,58	-378,57	0,746
<b>БИП-9</b> (27,6×10 <sup>-6</sup> mol dm <sup>-3</sup> )	30,93	28,42	-243,30	0,976
1М HCl	14,09	11,58	-378,57	0,746
<b>БИП-14</b> (28,8×10 <sup>-6</sup> mol dm <sup>-3</sup> )	20,33	16,83	-378,82	0,921
1М HCl	14,09	11,58	-378,57	0,746
<b>БИП-16</b> (37,2×10 <sup>-6</sup> mol dm <sup>-3</sup> )	26,44	23,93	-246,99	0,996

[a] степен регресије добијен одређивањем енергије активације

Позитивна вредност  $\Delta H$  указује на ендотермну природу процеса растварања метала у присуству и одсуству инхибитора. Већа вредност  $\Delta H$  у присуству инхибитора показује теже растварање метала у присуству инхибитора. Негативна вредност активационе ентропије указује да је формирање активационог комплекса у кораку који одређује укупну брзину реакције повезано са процесом асоцијације.

#### 4.3.4. Адсорпциона изотерма и термодинамички параметри процеса

Адсорпциона изотерма може се одредити под претпоставком да је ефекат инхибиције углавном последица адсорпције на површини метала. Будући да су добијене термодинамичке вредности алгебарска сума адсорпције органских молекула и десорпције молекула воде, овај процес можемо назвати супституционом адсорпцијом. Дакле, повећање ентропије може се приписати повећању ентропије растварања и позитивнијој енталпији десорпције воде<sup>206</sup>.

С обзиром на то да је адсорпција инхибитора повезана са термодинамичким параметрима, било је потребно израчунати константу равнотеже адсорпције ( $K_{ads}$ ).  $K_{ads}$  је израчуната из Ленгмируве (енгл. *Langmuir*) једначине изотерме:

$$\frac{c}{\theta} = \frac{1}{K_{ads}} + c \quad (4.4)$$

Где је:  $c$  ( $\text{mol dm}^{-3}$ ) концентрација присутног инхибитора,  $\theta$  степен покривености површине метала и израчунава се из:

$$\theta = \frac{E}{100} \quad (4.5)$$

$E$  је ефикасност инхибитора и добија се из једначине:

$$E = \frac{R_{inh} - R_0}{R_{inh}} \quad (4.6)$$

$R_{inh}$  је поларизациона отпорност (брзина корозије) инхибитора, док је  $R_0$  поларизациона отпорност раствора без инхибитора.

Константа равнотеже процеса адсорпције повезана је са термодинамичким параметром стандардном слободном Гибсовом (енгл. *Gibbs*) енергијом адсорпције ( $\Delta G_{ads}$ ) према једначини:

$$K_{ads} = \frac{1}{55,5} \exp\left(\frac{-\Delta G_{ads}}{RT}\right) \quad (4.7)$$

График  $c/\theta - c$  зависност је права са одсечком  $1/K_{ads}$ , док се помоћу једначине 4.7 добија вредност за Гибсову слободну енергију ( $\Delta G_{ads}$ ).

У табели 4.24 наведене су израчунате вредности  $K_{ads}$  и  $\Delta G_{ads}$  за једињења **БИП-9**, **БИП-14** и **БИП-16** у 0,5М раствору NaCl и 1М HCl.

**Табела 4.24** Термодинамички параметри за гвожђе у 0,5М раствору NaCl и у 1М раствору HCl са различитим концентрацијама једињења **БИП-9**, **БИП-14** и **БИП-16**.

Једињење	0.5M NaCl		1M HCl	
	$K_{ads}$ ( $\times 10^5 \text{ mol dm}^{-3}$ )	$\Delta G_{ads}$ , (kJ/mol)	$K_{ads}$ ( $\times 10^5 \text{ mol dm}^{-3}$ )	$\Delta G_{ads}$ , (kJ/mol)
<b>БИП-9</b>	2,00	-40,19	10,00	-44,18
<b>БИП-14</b>	0,50	-36,76	1,43	-39,36
<b>БИП-16</b>	1,25	-39,03	3,33	-41,46

Уопштено, већа вредност  $K_{ads}$  повезана је са јаком адсорпцијом и већом инхибицијом. Негативне вредности  $\Delta G_{ads}$  осигуравају спонтану адсорпцију и доводе до стабилног адсорбованог слоја на површини метала. Вредност -20 kJ/mol или нижа вредност  $\Delta G_{ads}$  показује електростатичку интеракцију између органских молекула присутних у раствору и површине метала. Са друге стране,  $\Delta G_{ads}$  вредности блиске или веће од -40 kJ/mol доводе до расподеле наелектрисања или преноса наелектрисања између органских молекула и металне површине. Резултати  $K_{ads}$ ,  $\Delta H_{ads}$  и  $\Delta S_{ads}$  на оптималној концентрацији **БИП-16** на 25 °C, на гвожђу и цинку у 0,5М раствору NaCl и на оптималној концентрацији **БИП-9**, **БИП-14** и **БИП-16** на 25 °C, у 1М HCl дати су у Табелама 4.25 и 4.26

**Табела 4.25** Термодинамички параметри  $K_{ads}$ ,  $\Delta H_{ads}$ ,  $\Delta S_{ads}$  за гвожђе и цинк у 0,5М NaCl за **БИП-16** и са синергијом **БИП-16** и церијум(III)-ацетатом на оптималној концентрацији

Једињење	$K_{ads}$ ( $\times 10^4 \text{ mol dm}^{-3}$ )	$\Delta H_{ads}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_{ads}$ (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
<b>БИП-16</b> ( $167,1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) гвожђе	0,31	-21,81	-65,184
<b>БИП-16</b> ( $167,1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) цинк	2,97	4,563	14,176
<b>БИП-16</b> + Ce <sup>3+</sup> ( $151,4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ + $28,4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) гвожђе	0,57	108,805	364,383

**Table 4.26** Термодинамички параметри  $K_{ads}$ ,  $\Delta H_{ads}$ ,  $\Delta S_{ads}$  за гвожђе и цинк у 1М HCl са **БИП-9**, **БИП-14** и **БИП-16** на оптималној концентрацији

Једињење	$K_{ads}$ ( $\times 10^5 \text{ mol dm}^{-3}$ )	$\Delta H_{ads}$ (kJ/mol)	$\Delta S_{ads}$ (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
<b>БИП-9</b> ( $27,6 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ )	1,07	-52,01	-44,81
<b>БИП-14</b> ( $28,8 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) <sup>[a]</sup>	/	/	/
<b>БИП-16</b> ( $37,2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ )	-0,22	-69,45	-116,59

[a] На температури 25 °C не показује инхибиторну активност

Ако је реакција ендотермна ( $\Delta H_{ads} > 0$ ), онда је присутна хемисорпција, а ако је егзотермна ( $\Delta H_{ads} < 0$ ), онда може бити или физисорпција или хемисорпција. У егзотермном процесу физисорпција се може разликовати од хемисорпције на основу вредности  $\Delta H_{ads}$ . За физисорпцију, енталпија адсорпције је обично мања од 40 kJ/mol, а за хемисорпцију је већа од 100 kJ/mol. У овом случају ради се о физисорпцији.

#### 4.3.5 DFT студије проучавања инхибиторне активности

Како би се стекао додатни увид о интеракцијама испитиваних једињења са површином метала и подржали експериментални резултати мерења урађени су квантно-хемијски

прорачуни. Добијене вредности енергија НОМО и LUMO орбитала и вредности  $E_{\text{gap}}$  (Слика 4.10 и Табела П7.9) показују да је електронска густина граничних молекулских орбитала веома делокализована, где се НОМО углавном дистрибуира на централном пиридинском делу, док је LUMO углавном локализована на азометинским групама. Ово указује на сличан електрон-донорски и електрон-акцепторски капацитет већег броја атома једињења **БИП**, што даље значи да би целокупна структура молекула могла учествовати у интеракцији са површином метала чиме би се постигле добре перформансе као инхибитора корозије.

Поред тога, још један важан квантно-хемијски параметар у одређивању адсорпционог понашања молекула инхибитора је број пренесених електрона на површину метала ( $\Delta N$ ).  $\Delta N$  се израчунава помоћу квантно-хемијских дескриптора и формуле:

$$\Delta N = \frac{\chi_{\text{Fe}} - \chi_{\text{inh}}}{2(\eta_{\text{Fe}} + \eta_{\text{inh}})} \quad (4.8)$$

Где  $\chi_{\text{Fe}}$  и  $\chi_{\text{inh}}$  представљају апсолутну електронегативност гвожђа (7 eV) и инхибитора, а  $\eta_{\text{Fe}}$  и  $\eta_{\text{inh}}$  представљају њихове апсолутне тврдоће. Квантно-хемијски дескриптори  $\chi$  и  $\eta$  се израчунавају из граничних НОМО и LUMO молекулских орбитала према формулама 4.9 и 4.10:

$$\chi = \frac{-E_{\text{НОМО}} - E_{\text{LUMO}}}{2} \quad (4.9)$$

$$\eta = \frac{-E_{\text{НОМО}} + E_{\text{LUMO}}}{2} \quad (4.10)$$

Израчунате вредности  $\chi$ ,  $\eta$  и  $\Delta N$  за испитивана једињења дате су у Табели 4.27. Вредности  $\chi_{\text{Fe}}$  и  $\eta_{\text{Fe}}$  (7, односно 0 eV) преузете су из литературе<sup>207</sup>.

**Табела 4.27** Вредности  $\chi$ ,  $\eta$  и  $\Delta N$  испитиваних једињења

Једињење	$\chi$ (ev)	$\eta$ (ev)	$\Delta N$ (ev)
<b>БИП-1</b>	4,198	3,860	0,363
<b>БИП-2</b>	4,202	3,593	0,389
<b>БИП-3</b>	4,049	3,834	0,385
<b>БИП-4</b>	3,860	3,790	0,414
<b>БИП-5</b>	4,066	3,807	0,385
<b>БИП-6</b>	4,399	3,662	0,355
<b>БИП-7</b>	4,216	3,849	0,362
<b>БИП-8</b>	3,949	3,794	0,402
<b>БИП-9</b>	4,479	3,645	0,346
<b>БИП-10</b>	4,443	3,492	0,366
<b>БИП-11</b>	4,402	3,810	0,341
<b>БИП-12</b>	4,298	3,855	0,350
<b>БИП-13</b>	4,411	3,796	0,341
<b>БИП-14</b>	3,379	3,611	0,501
<b>БИП-15</b>	5,160	3,614	0,255
<b>БИП-16</b>	3,843	4,332	0,364

Удео електрона пренет са једињења инхибитора на површину метала означен са  $\Delta N$  указује на пренос електрона са молекула на металну површину када је  $\Delta N > 0$ , док се процес преноса електрона са металне површине на молекул дешава када је  $\Delta N < 0$ <sup>208,209</sup>. Резултати

показују да су све вредности  $\Delta N$  позитивне, што значи да молекули формирају координативне везе путем преноса електрона на метал. Већа електронегативност молекула доводи до боље интеракције једињења са површином метала<sup>210</sup>. Као што је приказано у Табели 4.27, електрон-акцепторске групе су повећале електронегативност једињења, док једињења супституисана електрон-донорским супституентима смањиле су њихову електронегативност.

Даљим рачунањем параметра Фукуи функција ( $f(r)$ , енгл. *Fukui functions*)<sup>211,212</sup> вршено је иситивање реактивности молекула. Овај параметар даје информације о електрофилним ( $f^+$ ) и нуклеофилним ( $f^-$ ) активним местима у органским молекулима и ослања се на модел који су развили Пар (енгл. *Parr*) и Јанг (енгл. *Yang*)<sup>209,213</sup>, по којима је реактивност пропорционална вредности  $f(r)$ .

Фукуи функција представља промену густине електрона са променом броја електрона и израчунава се на основу разлика у густини електрона ( $\rho$ ) радикал катјона ( $N+1$ ), радикал анјона ( $N-1$ ) и неутралног молекула ( $N$ ) (Једначине 4.11–4.13) Добијене вредности  $f(r)$  дате су у прилогу у Табели П7.16.

$$f^+(r) = \rho_{N+1}(r) - \rho_N(r) \quad (4.11)$$

$$f^-(r) = \rho_N(r) - \rho_{N-1}(r) \quad (4.12)$$

$$f^0(r) = \frac{f^+(r) + f^-(r)}{2} = \frac{\rho_{N+1}(r) - \rho_{N-1}(r)}{2} \quad (4.13)$$

Користећи кондензоване  $f(r)$ , пожељна места за нуклеофилни ( $f_A^+$ ), електрофилни ( $f_A^-$ ) и радикалски напад ( $f_A^0$ ) могу се израчунати из разлика у атомским наелектрисањима ( $q$ ) (Једначине 4.14–4.16).

$$f_A^+ = q_N^A - q_{N+1}^A \quad (4.14)$$

$$f_A^- = q_{N-1}^A - q_N^A \quad (4.15)$$

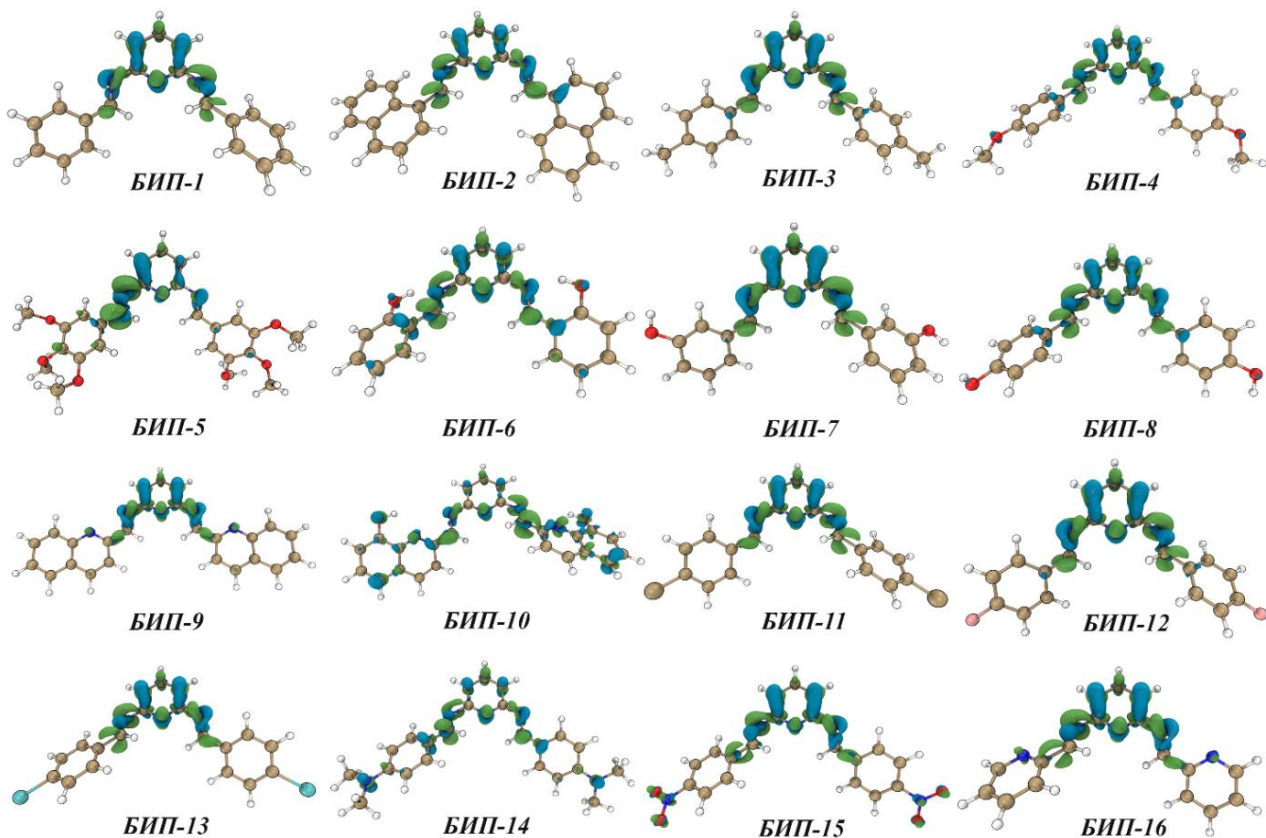
$$f_A^0 = \frac{f_A^+ + f_A^-}{2} \quad (4.16)$$

где је  $q$  наелектрисање атома А у катјонском ( $N+1$ ), анјонском ( $N-1$ ) и неутралном, облику ( $N$ ). У овој студији израчуната су Хиршфилдова (енгл. *Hirschfield*) атомска наелектрисања за све атоме. Такође је израчунат и кондензовани дуални дескриптор ( $\Delta f$ ) (Табела П7.16) који показује највероватнија места на молекулу где ће се десити реакција:

$$\Delta f = f_A^+ - f_A^- = 2q_N^A - q_{N+1}^A - q_{N-1}^A \quad (4.17)$$

Фукуи функције **БИП** једињења одређених DFT методом приказане су на Слици 4.23.

Вредности  $f(r)$  су локализоване на централном пиридинском прстену и на азометинским групама за све деривате (Слика 4.23). Вредности  $\Delta f$  у овим деловима молекула су негативне, што нам говори да је централни део молекула **БИП** највероватније место одакле ће молекули донирати електрон површини метала. Ови резултати су складу са добијеним резултатима за НОМО и LUMO орбитале и вредности  $E_{\text{gap}}$  (Слика 4.10 и Табела П7.9).



Слика 4.23 Фукуи функције **БИП** једињења одређене DFT прорачунима

#### 4.3.6. Еко-токсиколошка процена ризика **БИП** коришћењем QSAR модела за предвиђање њихових физичко-хемијских и еко-токсиколошких својстава

Узимајући у обзир да за имино **БИП** деривате као новосинтетисана једињења не постоје експериментални подаци у вези њихових еко-токсиколошких својстава, коришћени су одговарајући QSAR модели за процену: растворљивости имино **БИП** деривата у води на 25 °C и еко-токсиколошких својстава ових једињења и то за различите трофичке нивое односно за рибе и дагње (96-часовни *Fathead Minnow* LC<sub>50</sub> и 48-часовни *D. magna* LC<sub>50</sub>). За процену фактора биоакмулације (BAF) је примењена QSAR метода најближег суседа у одсуству кластера експерименталних података за једињења сличне молекулске структуре из других QSAR модела. Добијени резултати QSAR процене физичко-хемијских и еко-токсиколошких својстава дати су у табели 4.28.

Предсказани подаци дати Табели 4.28 указују на ниске вредности LC<sub>50</sub> за сва једињења осим за **БИП-16**. Овако добијени процењени еко-токсиколошки подаци (акутне токсичности, BAF) (Табела 4.28) испитиваних **БИП** једињења и вредности М-фактора (Табела 4.28) указују на то да су сва ова једињења, осим једињења **БИП-2**, класификована као једињења са акутном (краткорочном) опасности по животну средину - категорија 1 према CLP (*eng.* Classification, Labelling and Packaging labelling) критеријумима. Једињење **БИП-2** није могуће класификовати јер су процењене вредности растворљивости у води и LC<sub>50</sub> за *Fathead minnow* приближне па у овом случају није могла да се адекватно процени опасност по животну средину у складу са CLP критеријумима. Према CLP критеријумима већа LC<sub>50</sub> вредност указује на мању акутну токсичност једињења у води. У складу са тим једињење **БИП-16** са највећом процењеном вредношћу LC<sub>50</sub> (0,41 mg/L за *Fathead minnow* и 1 mg/L за *D. magna*) има нижу акутну токсичност по водене организме од свих осталих имино **БИП** деривата.

Узимајући у обзир да су процењене вредности ВАФ-а за сва једињења испод 500 и да недостају подаци о њиховој брзој биоразградњи, ова једињења се не могу класификовати као једињења са хроничном (дугорочном) опасношћу по водену животну средину упркос ниским вредностима акутне токсичности у води.

Због једне од могућих начина примене једињења као антикорозивног средства у потенцијалним комерцијалним смешама (обично у концентрацији од 5% v/v), само смеша која садржи једињење **БИП-16** (5%) није класификована као опасна по животну средину у складу са CLP критеријумима за класификацију супстанци на основу њихових физичко-хемијских и еко-токсиколошких својстава. Узимајући у обзир да исто једињење показује и добра антикорозивна својства, као и најмању акутну токсичност за водене организме, може бити изабрано као најприхватљивије решење синтетисано у складу са принципима циркуларне економије.

**Табела 4.28** QSAR процена физичко-хемијских и еко-токсиколошких својстава **БИП** једињења

Једињење	Растворљивост (mg/L)	96-часовна LC <sub>50</sub> за рибе <i>Fathead minnow</i> (mg/L)	48-часовна LC <sub>50</sub> за дагње <i>D. magna</i> (mg/L)	ВАФ	М фактор	Класификација супстанце	Класификација 5% смеше
<b>БИП-1</b>	6,20	0,4000	0,0777	27,50	10	*	*
<b>БИП-2</b>	0,034	0,0370	0,0724	13,38	10	**	**
<b>БИП-3</b>	1,43	0,1400	0,0232	14,56	10	*	*
<b>БИП-4</b>	2,85	0,1600	0,0505	14,56	10	*	*
<b>БИП-5</b>	1,94	0,0345	0,1000	84,77	10	*	*
<b>БИП-6</b>	2,72	0,2700	0,0328	14,13	10	*	*
<b>БИП-7</b>	5,76	0,3000	0,0780	14,13	10	*	*
<b>БИП-8</b>	2,87	0,3000	0,0427	14,13	10	*	*
<b>БИП-9</b>	0,095	0,1400	0,0580	13,38	10	*	*
<b>БИП-10</b>	1,46	0,0184	0,4900	12,84	10	*	*
<b>БИП-11</b>	0,68	0,1400	0,0085	4,53	100	*	*
<b>БИП-12</b>	0,81	0,1100	0,0398	3,99	10	*	*
<b>БИП-13</b>	0,20	0,0543	0,0061	4,53	100	*	*
<b>БИП-14</b>	6,33	0,0382	0,2000	5,32	10	*	*
<b>БИП-15</b>	0,10	0,0354	0,1800	5,41	10	*	*
<b>БИП-16</b>	14,92	0,41000	1,0000	27,50	1	*	***

\* Акутна опасност по водену животну средину кат. 1

\*\* није могуће адекватно класификовати без експерименталних физичко-хемијских и екотоксиколошких података

\*\*\* Није класификована као опасна смеша по водену животну средину

#### 4.4. АСИМЕТРИЧНИ ДИХИДРАЗОНИ ТИОКАРБОХИДРАЗИДА – дТКХ

##### 4.4.1. Структурна и спектрална карактеризација

За сва дТКХ једињења FT-IR подаци показали су апсорпционе траке у области 3108-3200 cm<sup>-1</sup>, услед вибрација истезања секундарне N-H групе и траке између 1606-1590 cm<sup>-1</sup> услед вибрација истезања C=N азометинске групе. Траке средњег интензитета примећене у области између 1288-1300 cm<sup>-1</sup> и 1111-1151 cm<sup>-1</sup> припададе су вибрацијама истезања C=S<sup>II</sup> и N-N група. Апсорпције између 1595-1516 cm<sup>-1</sup>, 1495-1460 cm<sup>-1</sup>, 1260-1237 cm<sup>-1</sup>, 947-960 cm<sup>-1</sup> су

приписане вибрацијама истезања C=S-NH групе које потичу од доприноса тиоамидних трака Тиоамид I, Тиоамид II, Тиоамид III и Тиоамид IV, редом<sup>214,215</sup>

Анализа NMR хемијских померања извршена је у циљу анализе могућих структурних изомера, конформера, као и одређивање таутомерних облика. Анализом NMR потврђено је присуство водоника на имино групи, пиридинском и хинолинском прстену, као и присуство тиолне групе. На основу резултата анализе корелација у 2D спектрима може се потврдити структура синтетисаних једињења. Детаљна карактеризација дата је у експерименталном делу а NMR спектри одабраних једињења дати су у прилогу Слике П7.35-П7.43.

#### 4.4.2 Одређивање константи киселости

Предвиђене константе киселости дате у Табели 4.29 показују блискост  $pK_a$  вредности тиокарбохидразинских N-H атома, као и пиридинских азота оба прстена. Како класичне спектрофотометријске методе захтевају јасно одвојене кораке протоновања ( $\Delta pK_a \geq 3$ ) ради линеаризације спектралних података, у случају ове серије једињења немогуће је одређивање  $pK_a$  вредности свих јонизабилних група. Потенциометрија је алтернативна метода која омогућава одређивање блиских  $pK_a$  вредности применом рачунарских програма који моделују комплексне равнотежне реакције у раствору<sup>216</sup>. Међутим, главно ограничење потенциометрије је растворљивост једињења у води која мора бити већа од 0,001 mol/L на свим pH вредностима током титрације што је обично опсег од 2 до 12. Како су дихидразони тиокарбохидразида у води слабо растворна једињења, примена потенциометријских метода такође није била могућа и стање протонованости једињења на различитим pH је процењено на основу теоријских прорачуна.

Табела 4.29. Предвиђене  $pK_a$  вредности дТКХ једињења

Једињење	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>4</sub>	N <sub>5</sub>	N <sub>6</sub>	C <sub>1</sub> -ОН	C <sub>16</sub> -ОН
дТКХ <sub>2фп</sub> -1	3,14	-	12,47	11,22	-	2,33	-	-
дТКХ <sub>2фп</sub> -2	3,21	-	11,22	12,47	-	2,55	-	9,27
дТКХ <sub>2фп</sub> -3	2,94	-	11,24	12,50	-0,31	3,69	-	-
дТКХ <sub>2ап</sub> -1	3,01	-	11,19	12,45	-	2,29	-	-
дТКХ <sub>2ап</sub> -2	3,10	-	11,20	12,45	-	2,48	-	9,27
дТКХ <sub>2ап</sub> -3	2,81	-	11,22	12,47	-0,71	3,75	-	-
дТКХ <sub>2сал</sub> -1	-	1,61	12,50	11,25	-	2,49	8,76	-
дТКХ <sub>2сал</sub> -2	-	1,22	12,50	11,25	-	2,74	8,64	9,38
дТКХ <sub>2сал</sub> -3	-	1,68	12,52	11,28	-0,27	3,59	8,76	-

#### 4.4.3. Одређивање антиоксидативне активности

С обзиром да су једињења са тионском и хинолинском групом позната по добрим антиоксидативним активностима<sup>11,193,217</sup>, у овом делу дисертације извршено је испитивање антиоксидативне активности треће серије једињења.

Антиоксидативна активност новосинтетисаних једињења дихидразона тиокарбохидразида (дТКХ) је одређена способношћу неутрализације слободних радикала (DPPH и ABTS методе) и редукцијом јона тешких метала (CUPRAC и TAC методе). Добијени резултати су упоређивани са аскорбинском киселином или тролоксом као референтним стандардним антиоксидантима. На основу структуре и анализе резултата антиоксидативне активности, дТКХ једињења се могу поделити у три групе. Прву и другу групу чине серије дТКХ<sub>2фп</sub> и дТКХ<sub>2ап</sub> једињења која садрже 2-пиридил групу и разликују се у зависности од супституента (H атома или метил групе) на азометинском угљенку. Трећу групу чини серија дТКХ<sub>2сал</sub> једињења са присутном фенилном групом кондензованом са тиокарбохидразонским делом молекула.



#### 4.4.3.1. DPPH и ABTS антиоксидативна анализа

Резултати добијени *in vitro* антиоксидативним DPPH и ABTS тестовима упоређивани су са аскорбинском киселином (Табела 4.30) и указују на добру антирадикалску активност свих испитиваних дТКХ (дТКХ<sub>2фп</sub>, дТКХ<sub>2ап</sub> и дТКХ<sub>2сал</sub>) једињења.

Табела 4.30. IC<sub>50</sub> вредности дТКХ одређене применом DPPH и ABTS теста

Једињење	DPPH	ABTS
	IC <sub>50</sub> <sup>[a]</sup> (mM)	IC <sub>50</sub> <sup>[a]</sup> (mM)
дТКХ <sub>2фп</sub> -1	0,191±0,051	0,172±0,076
дТКХ <sub>2фп</sub> -2	0,109±0,036	0,089±0,042
дТКХ <sub>2фп</sub> -3	0,143±0,032	0,095±0,053
дТКХ <sub>2ап</sub> -1	0,132±0,034	0,105±0,096
дТКХ <sub>2ап</sub> -2	0,106±0,089	0,080±0,045
дТКХ <sub>2ап</sub> -3	0,123±0,041	0,083±0,036
дТКХ <sub>2сал</sub> -1	0,148±0,062	0,098±0,061
дТКХ <sub>2сал</sub> -2	0,127±0,032	0,079±0,022
дТКХ <sub>2сал</sub> -3	0,144±0,061	0,091±0,050
Аскорбинска киселина	0,070±0,051	0,060±0,021

[a] Вредности IC<sub>50</sub> су изражене као средња вредност ± стандардна девијација три независна мерења

Анализа добијених резултата датих у табели након испитивања антиоксидативне активности DPPH тестом указује да сва једињења показују значајан антиоксидативни потенцијал. Такође, резултати указују и да постоји сличан тренд активности код све три групе једињења. Најактивнији деривати у DPPH тесту су дТКХ<sub>2фп</sub>-2, дТКХ<sub>2ап</sub>-2 и дТКХ<sub>2сал</sub>-2. Добра активност ових једињења може се приписати присуству електрон-донорске групе у *ortho*-положају на хинолинском прстену у односу на тиокарбохидразид. Ова група услед присутног резонанционог, и *ortho*-стерног ефекта доводи до стабилизације радикала насталог у интеракцији једињења са слободним DPPH<sup>•</sup> радикалом. У литератури је утврђено да једињења са -ОН групом у *ortho*-положају на хинолинском прстену према N-H групи испољавају добре антиоксидативне активности<sup>193</sup>.

Осим присуства функционалне групе, присуство пиридинског, хинолинског и фенилног прстена, као и положаја атома азота у пиридинском и хинолинском прстену су додатни фактор који значајно утиче на антиоксидативни потенцијал испитиваних једињења. Једињења супституисана са 2-хинолил (дТКХ<sub>2фп</sub>-1, дТКХ<sub>2ап</sub>-1 и дТКХ<sub>2сал</sub>-1) и 8-хинолил (дТКХ<sub>2фп</sub>-3, дТКХ<sub>2ап</sub>-3 и дТКХ<sub>2сал</sub>-3) групама на азометинском атому угљеника немају у својој структури електрон-донорску групу као што је -ОН и услед свог превасходно електрон-акцепторског ефекта не доприносе значајнијој стабилизацији генерисаног радикала што се манифестује као мања активност ових једињења. Код ових једињења може се претпоставити да је положај атома азота у хинолинском прстену један од разлога боље активности.

На основу резултата ABTS теста, уочава се да сва синтетисана једињења показују бољи антиоксидативни капацитет и способност уклањања ABTS<sup>•+</sup> радикал катјона, у опсегу IC<sub>50</sub> вредности 0,079 до 0,172 mM (Табела 4.30) у поређењу са резултатима добијеним DPPH тестом при истој концентрацији. Такође, ефекат електрон-донорског супституента је израженији и најјачи антиоксидативни потенцијал испољавају једињења дТКХ<sub>2фп</sub>-2, дТКХ<sub>2ап</sub>-2 и дТКХ<sub>2сал</sub>-2. Једињења дТКХ<sub>2фп</sub>-3, дТКХ<sub>2ап</sub>-3 и дТКХ<sub>2сал</sub>-3 у ABTS тесту показују добру активност сличну једињењима са 8-хидрокси-2-хинолил групом, док једињења дТКХ<sub>2фп</sub>-1, дТКХ<sub>2ап</sub>-1 и дТКХ<sub>2сал</sub>-1 показују умерену активност, у поређењу са референтним стандардом, аскорбинском киселином.

Осим тога, антиоксидативни капацитети за серије 2-пиридил деривата (дТКХ<sub>2фп</sub> и дТКХ<sub>2ап</sub>) зависе и од присуства супституента (H или -CH<sub>3</sub>) на азометинском атому угљеника. У поређењу са дТКХ<sub>2фп</sub> испитивана једињења из серије дТКХ<sub>2ап</sub> показују бољу активност у

DPPH и ABTS тестовима, услед доприноса позитивног индуктивног и хиперкоњугационог ефекта, као и стерног ефекта метил групе која има мали електрон-донорски потенцијал.

Сагледавајући структуру једињења из серије дТКХ<sub>2сaл</sub> очекивано је да показују добру антирадикалску активност, обзиром да су структурно слична природним антиоксидантима. Мања активност једињења ове серије у поређењу са дТКХ<sub>2фп</sub> и дТКХ<sub>2ап</sub> није изненађујућа јер код испитиваних дТКХ<sub>2сaл-1</sub>, дТКХ<sub>2сaл-2</sub> и дТКХ<sub>2сaл-3</sub> постоји могућност формирања интрамолекуларске водоничне везе у молекулима. Претпоставља се да ова веза између хидроксилне групе на фенилном прстену и Н атома са имино везе утиче на пренос атома водоника са радикала на антиоксидант и доводи до смањења антиоксидативног потенцијала.

#### 4.4.3.2. CUPRAC антиоксидативна анализа

Познато је да једињења тиокарбохидразида могу да формирају комплексе са металима дајући једињења са добрим биолошким својствима<sup>215</sup>. Из тог разлога антиоксидативна активност ове серије једињења је испитана и применом CUPRAC теста. Приликом испитивања формирану Cu<sup>2+</sup>-Nc комплекс у оксидо-редукционом процесу са испитиваним једињењима редукује се до Cu<sup>+</sup>-Nc комплекса. При томе долази до промене боје из светло плаве у жуту, што се на UV-Vis спектрофотометру прати као повећање апсорбанце. Резултат се изражава као повећана TEAC вредност која се добија из нагиба калибрационе криве испитиваних једињења и референтног антиоксиданта тролокса (Табела 4.31 и Сlike П7.45-7.47)

Сва једињења су показала већу активност у поређењу са референтним стандардом тролоксом. Највеће редукционе капацитете показују једињења са јаком електрон-донорском групом: дТКХ<sub>2фп-2</sub>, дТКХ<sub>2ап-2</sub> и дТКХ<sub>2сaл-2</sub>.

**Табела 4.31** Резултати CUPRAC теста, дати у односу на Тролокс и резултати теста укупног антиоксидативног капацитета (ТАС) применом фосфомолибденске методе, изражени као еквивалентна маса аскорбинске киселине.

Једињење	Редукциони тест	Укупни антиоксидативни тест
	CUPRAC	(ТАС)
	TEAC	Фосфомолибденски тест
дТКХ <sub>2фп-1</sub>	1,298	0,985
дТКХ <sub>2фп-2</sub>	2,048	0,922
дТКХ <sub>2фп-3</sub>	2,024	0,595
дТКХ <sub>2ап-1</sub>	1,471	0,837
дТКХ <sub>2ап-2</sub>	2,196	0,929
дТКХ <sub>2ап-3</sub>	1,593	0,579
дТКХ <sub>2сaл-1</sub>	1,667	0,708
дТКХ <sub>2сaл-2</sub>	2,012	0,846
дТКХ <sub>2сaл-3</sub>	1,755	0,875
Тролокс	1,000	-

#### 4.4.3.3. ТАС антиоксидативна анализа

ТАС анализа се заснива на редукцији Мо(VI) у Мо(V), приликом интеракције фосфомолибденског реагенса са испитиваним једињењем. Редукција молибдена је праћена формирањем комплекса, при чему долази до промене апсорбанце<sup>96</sup>. Резултати дати у Табели 4.31 представљају антиоксидативни капацитет једињења који је изражен као масени еквивалент аскорбинске киселине (витамина Ц). Према добијеним резултатима, сва једињења показују добру антиоксидативну активност, од 1 mg једињења еквивалентно је у опсегу 0,579 до 0,985 mg витамина Ц.

#### 4.4.4 Одређивање антибактеријске и антифунгалне активности

У Табели 4.32 представљени су резултати антибактеријске и антифунгалне активности одређене микродилуционом методом за шест синтетисаних дТКХ (дТКХ<sub>2фп</sub> и дТКХ<sub>2ап</sub>) једињења. Да би се одредио антимикуробни потенцијал ових једињења она су тестирана на неколико Грам-позитивних и Грам-негативних сојева бактерија и једном соју гљивица. Као и за серију **БИП** једињења, у овој студији коришћено је шест патогених микроорганизама, од којих су пет бактеријских *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, и клинички изолат *Staphylococcus aureus* MRSA и један фунгални патоген (*Candida albicans*). Активност једињења је упоређена са амоксицилином, код бактеријских сојева, односно са флуконазолом за испитивање на гљивичном соју. Резултати дати у Табели 4.32 показују антимикуробно деловање испитиваних дТКХ<sub>2фп</sub> и дТКХ<sub>2ап</sub> у опсегу испитиваних концентрација. Сва испитивана једињења, показују умерену до значајну антимикуробну активност према бактеријама *Escherichia coli* (MIC 0,08-5,00 mmol/L), *Enterococcus faecalis* (MIC 0,08-5,00 mmol/L), *Staphylococcus aureus* (MIC 0,08-2,50 mmol/L) и *Staphylococcus aureus* MRSA (MIC 0,08-1,25 mmol/L). Осим једињења дТКХ<sub>2фп</sub>-3 инхибиторну активност према бактерији *Pseudomonas aeruginosa* испољавају сва остала једињења у опсегу концентрација (MIC 0,08-2,50 mmol/L), а међу њима дТКХ<sub>2ап</sub>-3 испољава инхибиторно дејство које је упоредиво са амоксицилином (MIC 0,08 mmol/L за дТКХ<sub>2ап</sub>-3 у односу на 0,07 mmol/L за амоксицилин).

Може се приметити да сва једињења поседују значајну антифунгалну активност (MIC 0,08-0,31 mmol/L) према *Candida albicans*. Два једињења, дТКХ<sub>2фп</sub>-1 и дТКХ<sub>2ап</sub>-3, испољила су јако антифунгално дејство према *C. albicans* које је упоредиво са флуконазолом (MFC 0,08 mmol/L за дТКХ<sub>2ап</sub>-3 у односу на 0,16 mmol/L за флуконазол), док је дТКХ<sub>2фп</sub>-1 показао исто дејство као флуконазол).

**Табела 4.32** Антимикробна активност дТКХ<sub>2фп</sub> и дТКХ<sub>2ап</sub>, амоксицилина (контрола само за сојеве бактерија) и флуконазол (контрола само за гљивичне сојеве), изражена као МИС (mmol/L) и МВС/МФС (mmol/L), одређена микродилуционом методом

Једињење	<i>Candida albicans</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	
	АТСС 10231		АТСС 27853		АТСС 25922		АТСС 29212		АТСС 25923		Клинички изолат	
	МИС	МФС	МИС	МВС	МИС	МВС	МИС	МВС	МИС	МВС	МИС	МВС
дТКХ <sub>2фп</sub> -1	0,08	0,16	0,62	2,50	0,16	5,00	2,50	5,00	0,16	2,50	0,16	0,16
дТКХ <sub>2фп</sub> -2	0,16	1,25	2,50	5,00	0,31	-	0,08	5,00	0,08	5,00	0,08	0,62
дТКХ <sub>2фп</sub> -3	0,16	0,31	-	-	5,00	-	5,00	-	2,50	-	1,25	-
дТКХ <sub>2ап</sub> -1	0,16	0,31	5,00	-	1,25	-	2,50	5,00	0,31	-	0,62	1,25
дТКХ <sub>2ап</sub> -2	0,31	1,25	5,00	-	1,25	-	1,25	1,25	0,31	1,25	0,08	1,25
дТКХ <sub>2ап</sub> -3	0,08	0,08	0,08	5,00	0,08	-	5,00	5,00	0,08	5,00	0,08	0,08
Амоксицилин			0,07	0,14	0,02	0,07	0,001	0,01	0,001	0,004		
Флуконазол	0,04	0,16										

#### 4.4.5 Антиканцер активост дТКХ<sub>2фп</sub> и дТКХ<sub>2ап</sub>

*Ћелије карцинома дебелог црева су показала највећу осетљивост на третман испитиваним једињењима*

Експеримент је рађен на све четири малигне културе коришћених у овом истраживању. Тестирана једињења су на ћелије нанесена у четири концентрације, а инкубација је трајала 24 сата. Постигнут ефекат утврђен је двоструким флуоресцентним бојењем са Калцеином АМ (САМ) и пропидијум јодидом (PI) и потоњим снимањем на Целиго цитометру. Добијене флуоресцентне фотографије анализирани су Целиго софтверским пакетом који је са високом прецизношћу дефинисао број живих (САМ-позитивних) ћелија у сваком од бунарчића. Како се може видети у Табели 4.33, шест једињења успело је да током 24 сата смањи број виталних малигнућ ћелија у односу на одговарајућу нетретирану контролу. LoVo ћелије показале су знатно већу осетљивост у поређењу са друге три малигне културе, те је свих шест активних једињења успело да барем у једној од тестираних концентрација редукује број живих ћелија за више од 50%.

Четири једињења је показало извесну активност на А549 ћелијама, три на Skov3 ћелијама, али ни једно од њих није успело да индукује смрт у више од половине ћелија у свакој од ове две културе. Најслабији ефекат остварен је на Mcf7 култури где је смањење броја виталних ћелија детектовано само у узорцима третираним једињењем дТКХ<sub>2ап</sub>-3. На основу морфолошких параметара може се закључити да су испитивана једињења иницирала апоптозну смрт у свим третираним ћелијским културама. Обзиром да добијени резултати недвосмислено показују да су дТКХ<sub>2ап</sub>-2, дТКХ<sub>2ап</sub>-3, дТКХ<sub>2фп</sub>-1 и дТКХ<sub>2фп</sub>-5 показала највећу активност на LoVo ћелијама (Табела 4.33), одлучено је да се следеће анализе антиканцерске активности усредсреде на ћелије аденокарцинома дебелог црева третираних са ова четири најефикаснија једињења.

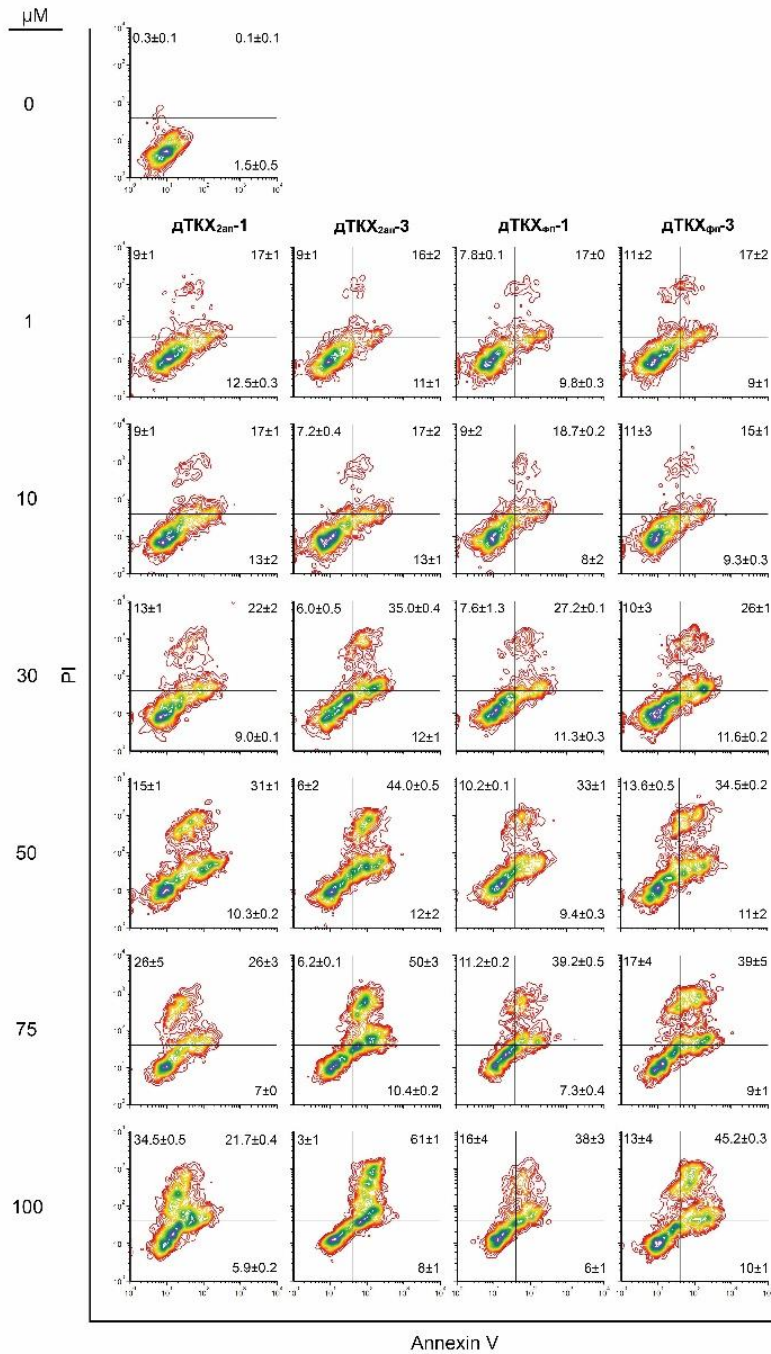
*Једињење дТКХ<sub>2ап</sub>-2 је индуковало концентрацијски-зависан пораст процента ћелија у раној некрози.*

Наставак испитивања организован је са циљем да се квантитативно утврди учесталост апоптозне ћелијске смрти методом двоструког бојења анексином V (Annexin V) и PI. Током овог тестирања ћелије су током 24 сата инкубирани са испитиваним једињењима која су тестирана у ширем распону концентрација (1-100  $\mu$ M). Како се може видети на Слици 4.24, заједничка особина свих испитиваних једињења јесте да изазивају концентрацијски-зависан пораст у инциденци ћелијске смрти.

**Табела 4.33** Утицај испитиваних једињења на преживљавање ћелија након 24 сата третмана. Резултати су представљени као средња вредност процента преживљавања  $\pm$  стандарда девијација добијених из три независна експеримента. У табели су наведени резултати за једињења која су редуковала проценат живих ћелија за више од 15%. Осенчени су резултати у којима је преживљавање ћелија мање од 50% што се сматра пожељном ефикасношћу

Једињење	Концентрација ( $\mu\text{M}$ )	LoVo ћелије	Skov3 ћелије	A549 ћелије	Mcf7 ћелије
дТКХ <sub>2ап</sub> -1	30	70,1 $\pm$ 3,5	72,5 $\pm$ 7,3	85,3 $\pm$ 7,7	-
	50	68,7 $\pm$ 2,6	70,7 $\pm$ 2,5	77,4 $\pm$ 7,2	-
	75	53,5 $\pm$ 4,6	70,0 $\pm$ 1,9	62,9 $\pm$ 0,3	-
	100	39,6 $\pm$ 1,2	66,0 $\pm$ 3,4	58,6 $\pm$ 10,3	-
дТКХ <sub>2ап</sub> -2	30	57,9 $\pm$ 3,9	-	-	-
	50	54,1 $\pm$ 1,1	-	-	-
	75	45,4 $\pm$ 1,5	-	-	-
	100	39,3 $\pm$ 0,8	-	-	-
дТКХ <sub>2ап</sub> -3	30	50,4 $\pm$ 0,6	78,6 $\pm$ 1,0	68,0 $\pm$ 1,9	92,3 $\pm$ 8,6
	50	45,9 $\pm$ 2,1	76,2 $\pm$ 0,1	65,3 $\pm$ 1,3	82,2 $\pm$ 1,7
	75	41,5 $\pm$ 1,8	73,9 $\pm$ 5,2	64,8 $\pm$ 1,3	71,2 $\pm$ 4,0
	100	38,1 $\pm$ 1,8	55,2 $\pm$ 2,2	51,1 $\pm$ 1,0	53,4 $\pm$ 0,7
дТКХ <sub>2фп</sub> -1	30	60,0 $\pm$ 3,2	-	80,7 $\pm$ 8,5	-
	50	45,2 $\pm$ 0,6	-	68,0 $\pm$ 2,8	-
	75	44,5 $\pm$ 5,1	-	62,4 $\pm$ 2,0	-
	100	40,1 $\pm$ 5,1	-	54,9 $\pm$ 4,6	-
дТКХ <sub>2фп</sub> -2	30	61,5 $\pm$ 1,1	-	75,5 $\pm$ 1,8	-
	50	58,7 $\pm$ 1,8	-	73,4 $\pm$ 0,5	-
	75	56,9 $\pm$ 2,2	-	62,6 $\pm$ 3,0	-
	100	53,2 $\pm$ 0,1	-	56,7 $\pm$ 3,2	-
дТКХ <sub>2фп</sub> -3	30	54,7 $\pm$ 2,8	75,4 $\pm$ 2,6	79,0 $\pm$ 1,3	-
	50	47,7 $\pm$ 0,1	74,0 $\pm$ 3,2	58,1 $\pm$ 1,2	-
	75	47,5 $\pm$ 0,1	73,4 $\pm$ 3,2	57,1 $\pm$ 0,4	-
	100	46,7 $\pm$ 0,1	71,7 $\pm$ 2,1	55,7 $\pm$ 2,4	-

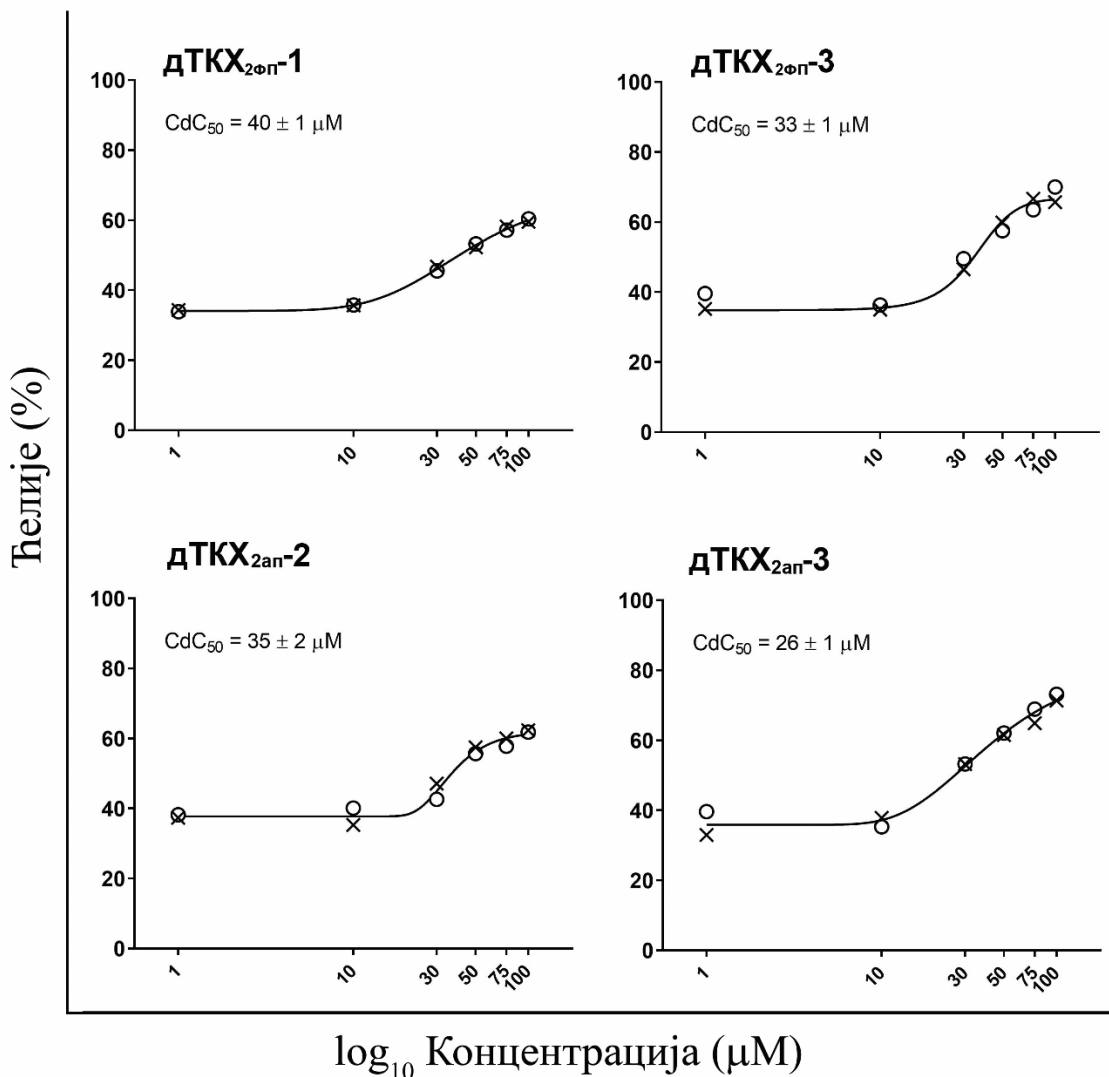
\* - преживљавање третираних ћелија је веће од 85 %.



**Слика 4.24** Репрезентативне слике резултата двоструког бојења анексином V и PI након 24 сата третмана LoVo ћелија на испитиваним једињењима. На основу маркирања примењеним флуорофорама ћелије се дискриминишу као виабилне (необојене ћелије, доњи леви квадрант), ћелије у раној фази апоптотичне смрти (обојене само анексином V, доњи десни квадрант), ћелије у раној фази некротичне смрти (обојене само са PI, горњи леви квадрант), и ћелије у напредним фазама ћелијске смрти (обојене са обе флуорофоре, горњи десни квадрант). Нумеричке вредности представљају средњу вредност ± стандардна девијација два независна експеримента.

Једињење дТКХ<sub>2ап-2</sub> се издвојило као једино које је изазвало повећање процента ћелија у раној некрози пропорционално порасту примењене концентрације. Насупрот њему, у узорцима третираним са једињењем дТКХ<sub>2ап-3</sub> детектоване су готово искључиво двоструко бојене ћелије, док је учесталост ћелија у раној некрози опадала са порастом концентрације овог једињења. У случају дТКХ<sub>2фп-1</sub> и дТКХ<sub>2фп-3</sub> одговор LoVo ћелија је био мешовит, али учесталост ране некрозе ни у једном од узорака није прелазила 15%. Дозно-зависне криве

добијене су сумирањем процената свих обојених ћелија (анексин и/или PI) за одговарајућу концентрацију (Слика 4.25), те је на основу кретања добијене кривуље израчуната концентрација која на графику колерира са 50% ефикасности. На основу вредности  $CdC_{50}$ , једињење дТКХ<sub>2ап-3</sub> јесте најефикасније, а за њим следе дТКХ<sub>2фп-3</sub>, дТКХ<sub>2ап-2</sub> и дТКХ<sub>2фп-1</sub>.



**Слика 4.25** Криве односа концентрације и ефекта за испитивана једињења на LoVo ћелијама након 24 сата третмана. Резултати су представљени као проценат укупне ћелијске смрти детектоване двоструким бојењем анексином V и PI читаних из два независна експеримента (кружићи и крстићи). Кривуља је дефинисана формулом за петопараметарску асиметричну криву, јединствену за оба репликата. Уместо  $\log_{10}$  вредности, на апсциси су уписане егзактне концентрације да би се омогућила усклађеност са описом резултата у тексту.

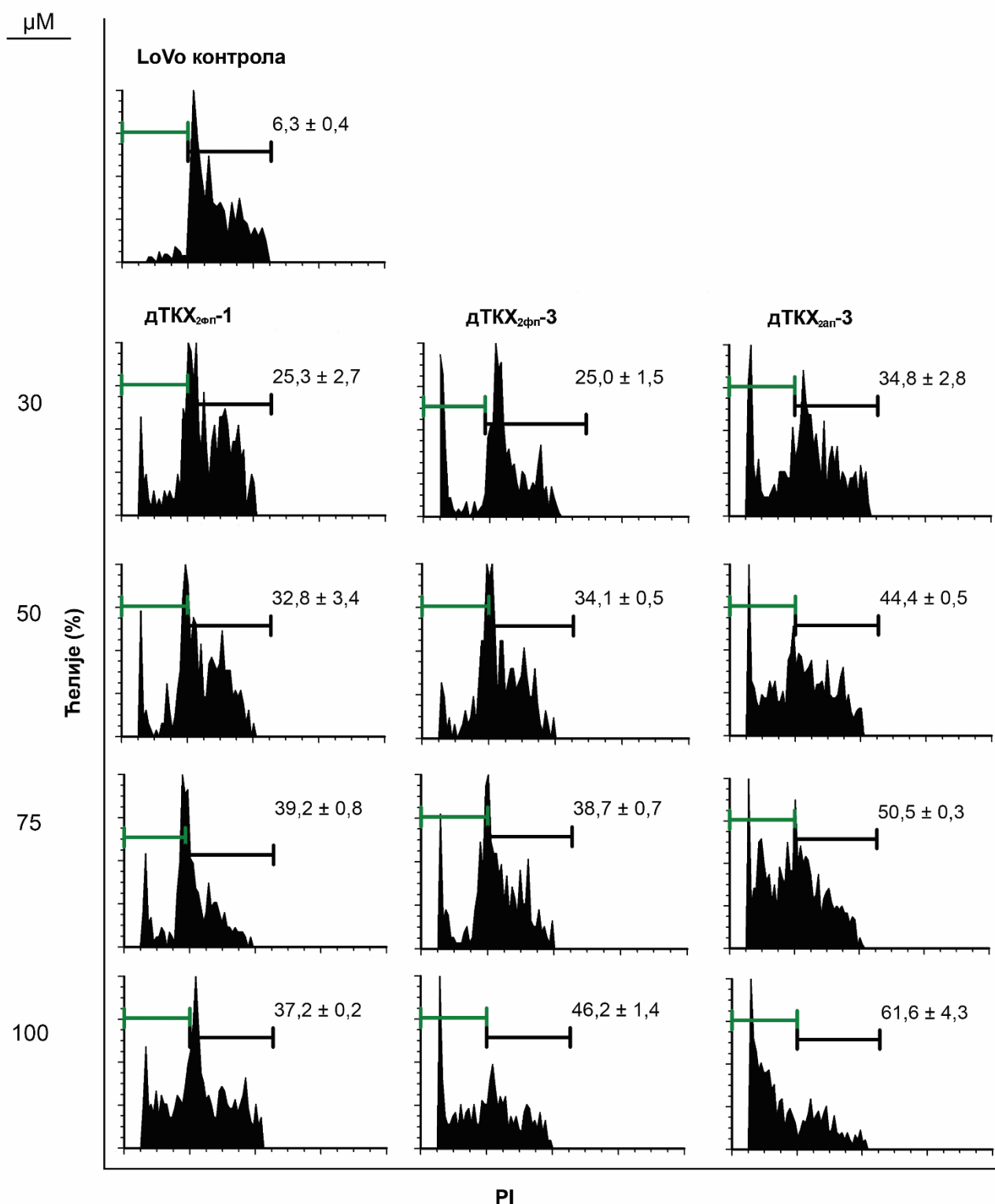
Обзиром на високу учесталост ране некрозе као неповољног исхода, једињење дТКХ<sub>2ап-2</sub> је повучено из даљег тестирања.

*Промене по фазама ћелијског циклуса указују да испитивана једињења таргетирају различите процесе у третираним ћелијама*

Утицај испитиваног једињења на распоред ћелија по фазама митотске деобе процењује се поређењем са нетретираном контролом (Слика 4.26). Након 24h инкубације, заступљеност

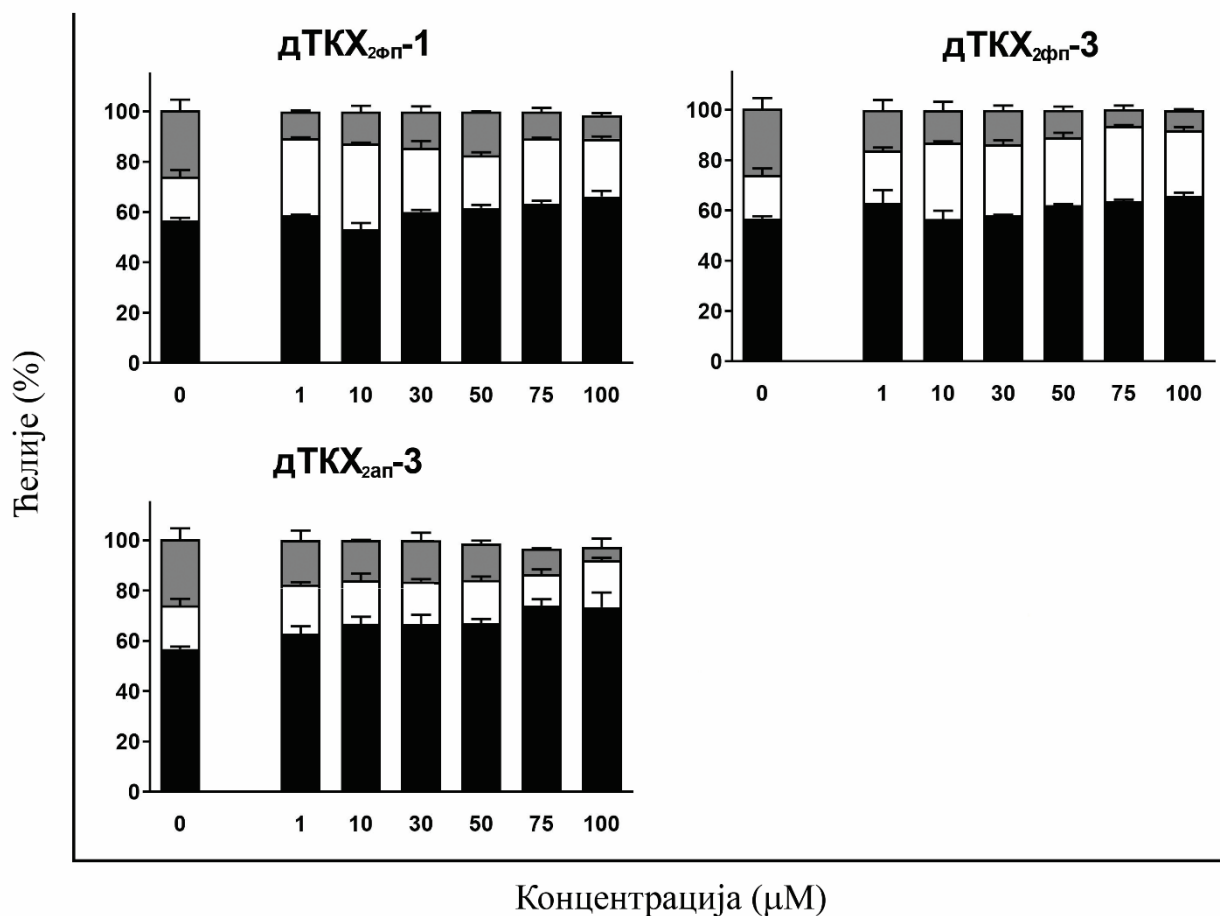


LoVo ћелија по фазама митотске деобе био је веома сличан у узорцима третираним са једињењима дТКХ<sub>2фп</sub>-1 и дТКХ<sub>2фп</sub>-3.



**Слика 4.26** Заступљеност ћелија у Sub-G0/G1 пику након 24 сата третмана LoVo ћелија са испитиваним једињењима. Нумеричке вредности представљају средњу вредност ± стандардна девијација добијену из два независна експеримента, и односе се на проценат хиподиплоидних ћелија у склопу лево дефинисаног оквира.

Као што може да се види на Слици 4.27 оба ова једињења су при концентрацијама од 1 и 10  $\mu\text{M}$  изазвала накупљање ћелија у S фази, које је са порастом концентрације транзитирало ка формирању блока у нивоу G1-to-S контролне тачке.

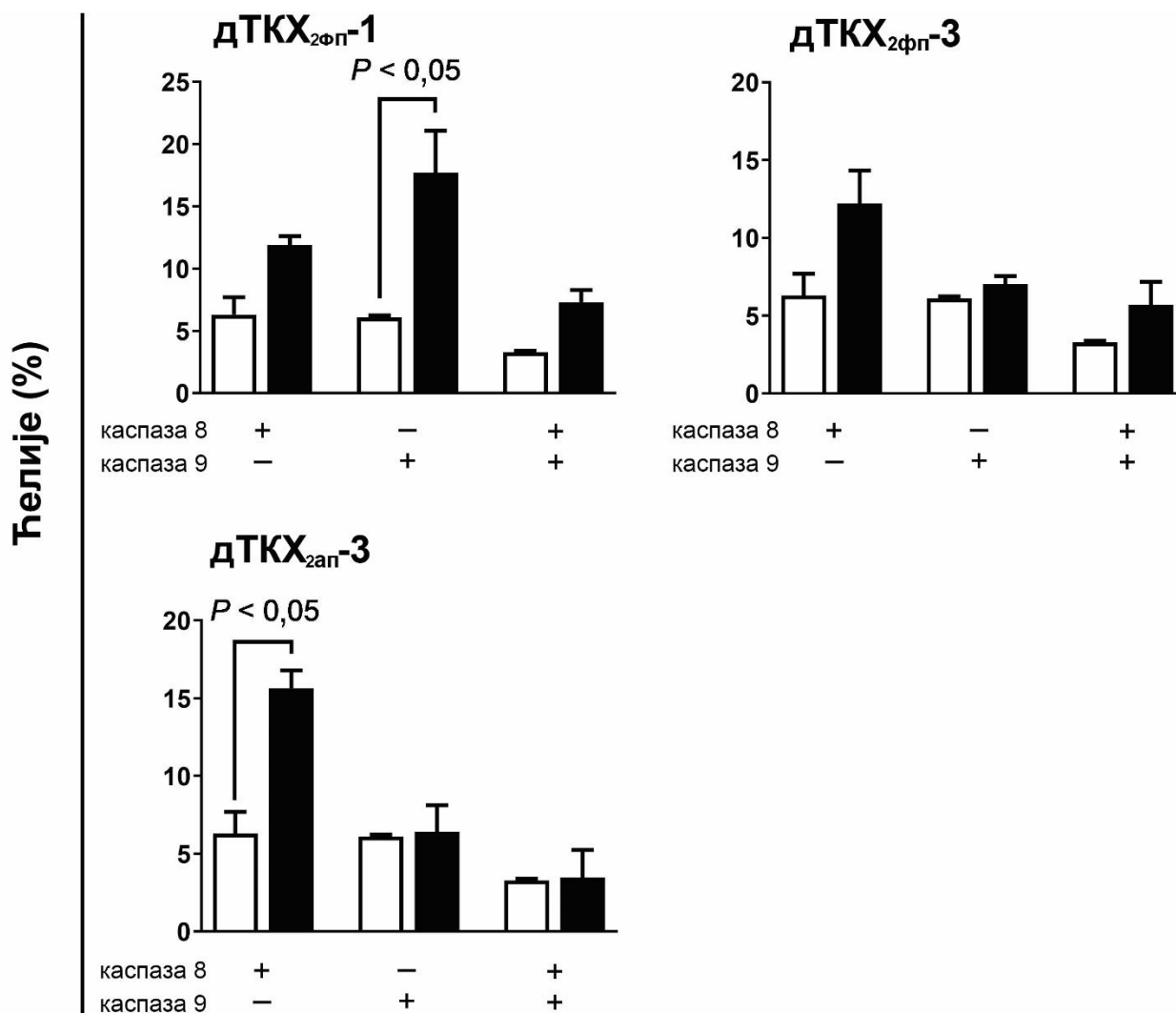


**Слика 4.27** Промене у заступљености LoVo ћелија по фазама митотске деобе након 12 сати инкубације са испитиваним једињењима у односу на нетретирану контролу. Резултати су приказани као аритметичка средина  $\pm$  стандардна девијација процента ћелија у G0/G1 (црни стубићи), S (бели стубићи), и G2/M (сиви стубићи) добијених из два независна експеримента.

За разлику од њих, у узорцима ћелија третираних једињењем дТКХ<sub>2ап</sub>-3 може се уочити концентрацијски-зависан раст процента ћелија у G0/G1 фази, док је заступљеност ћелија у S фази остао у нивоу нетретиране контроле. Заступљеност ћелија у G2/M фази опадао је пропорционално њиховој акумулацији у G0/G1 фази. Из овога се може закључити да једињење дТКХ<sub>2ап</sub>-3 није изазвало оштећења која су могла да доведу до отежане деобе хромозома, нити да успори окончавање деобе ћелије у њеној завршној фази. Постоје бројни начини на које једињење може да спречи ћелију да крене у митотску деобу, и откривање тачног механизма би захтевало додатна комплексна испитивања. Оно што у овој фази тестирања може поуздано да се тврди, обзиром да су промене по фазама деобе анализирани на истој ћелијској линији, јесте да једињење дТКХ<sub>2ап</sub>-3 има другачији механизам дејства у односу на једињења дТКХ<sub>2ФП</sub>-1 и дТКХ<sub>2ФП</sub>-3.

*Активација каспазе 8 је доказана као доминантан догађај у ћелијама третираних испитиваним једињењима.*

Начин утврђивања активирања каспаза 8 и 9 у третираним ћелијама који смо применили у нашем истраживању омогућио нам је да одредимо проценат ћелија са једном од ове две активираних каспазе у истом узорку, као и проценат ћелија са обе активираних каспазе. Овакав технички приступ омогућује који је од апоптозних путева био доминантно активиран као последица третмана ћелија испитиваним једињењем. Дужина инкубације ћелија у овом експерименту скраћена је на 6 сати са намером да се региструју иницијални унутарћелијски догађаји. Једињење дТКХ<sub>2ап</sub>-3 условило је активацију искључиво спољашњег апоптозног пута (Слика 4.28). Сличан резултат добијен је анализом узорка третираног са једињењем дТКХ<sub>2фп</sub>-3, где постоји јасно уочљив тренд у активацији каспазе 8 иако није постигнута статистичка значајност.

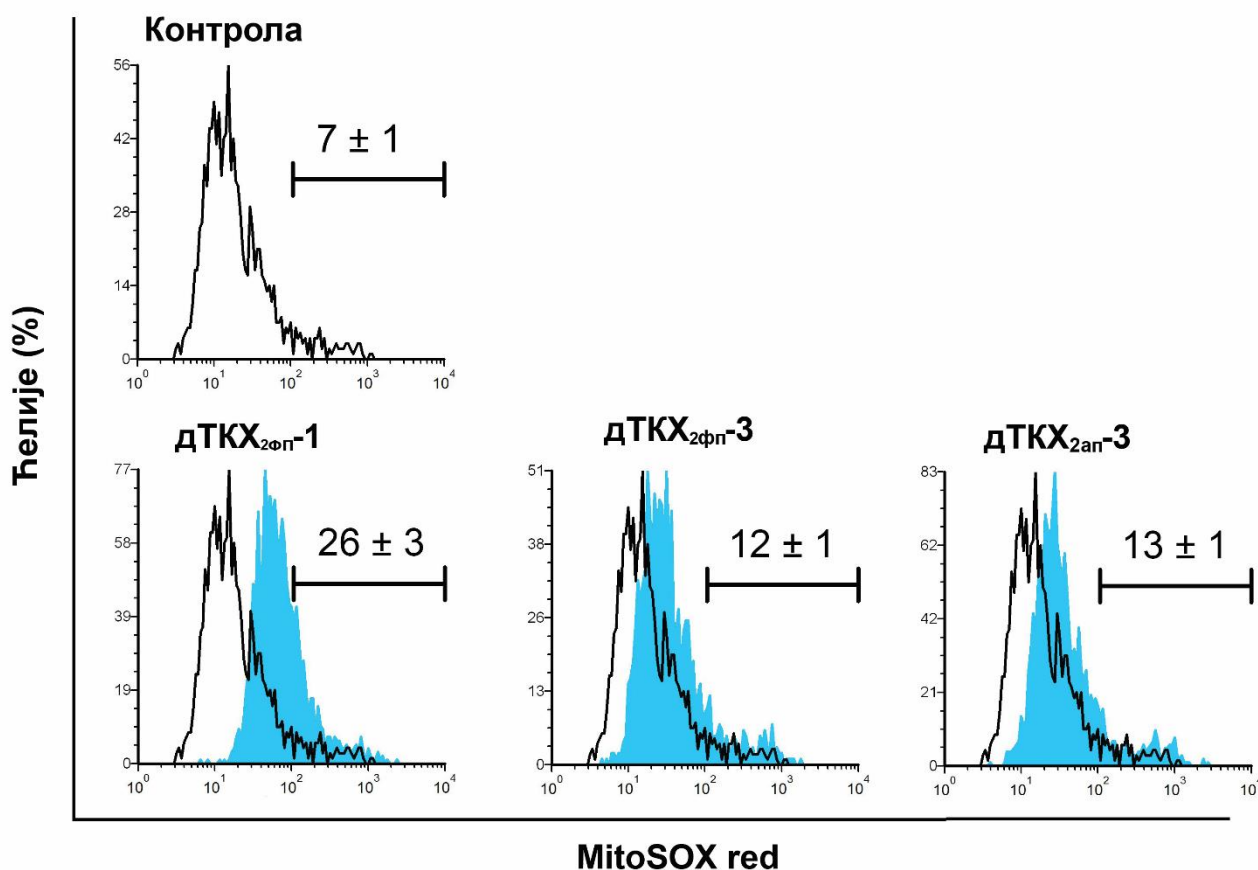


**Слика 4.28** Проценти LoVo ћелија позитивних на активiranу каспазу 8, 9 или обе, након 6 сати третмана са испитиваним једињењима у концентрацији од 50  $\mu$ M. Резултати су приказани као аритметичка средина  $\pm$  стандардна девијација процента ћелија добијених из три независна експеримента. Статистичка значајност је одређена t тестом са Welch-овом корекцијом поређењем нетретиране контроле (бели стубићи) и третираних ћелија (црни стубићи)

Насупрот њима, једињење дТКХ<sub>2фп-1</sub> изазвало је статистички значајно висок проценат ћелија са активираним каспазом 9, али и изванредан проценат ћелија са иницираним спољашњим каспазним путем. Овакав резултат указује да дТКХ<sub>2фп-1</sub> може да делује преко две независне унутарћелијске мете. Очекивало би се да једињење са оваквом особином јесте истовремено и високо ефикасно у контексту процента изазване ћелијске смрти, али као што је претходно утврђено, дТКХ<sub>2фп-1</sub> је имало највећу CdC<sub>50</sub> концентрацију у поређењу са преостала три једињења (Слика 4.25).

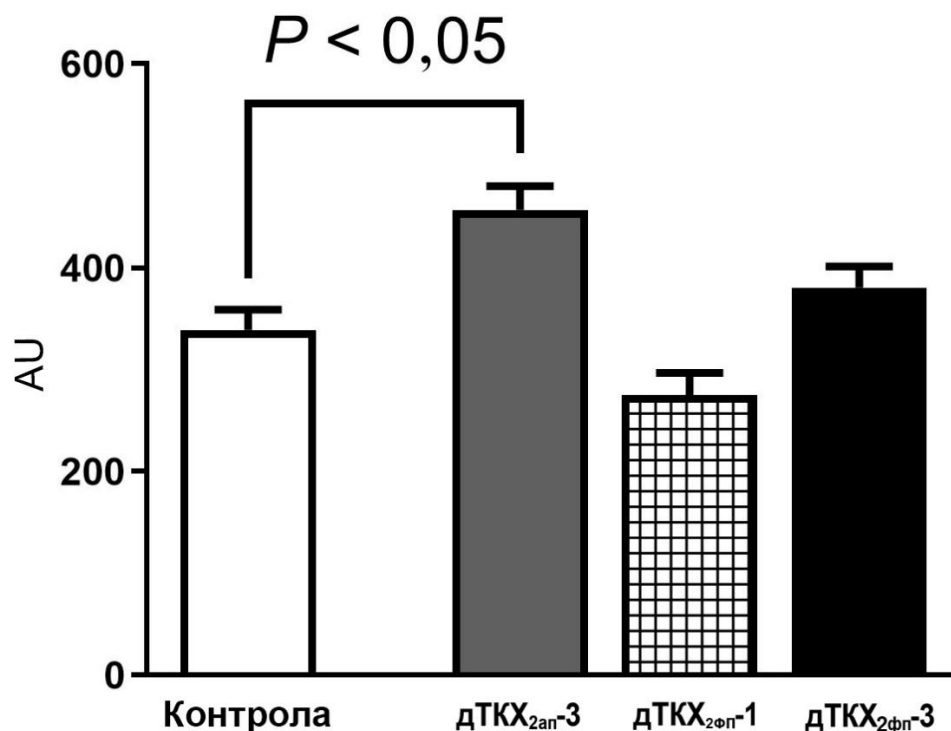
**Једињење дТКХ<sub>2фп-1</sub> је показало способност да стимулише продукцију супероксида у митохондријама третираних ћелија**

Полазећи од чињенице да је једињење дТКХ<sub>2фп-1</sub> изазвало накупљање ћелија током S фазе ћелијске деобе уз истовремену активацију каспазе 9, желели смо да испитамо да ли је акутни оксидативни стрес могући окидач апоптозног договора у ћелијама третираних овим једињењем. У склопу овог експеримента детектовали смо O<sub>2</sub><sup>-</sup> методом која специфично региструје присуство анјона само на нивоу митохондрија. Ћелије су третиране истом концентрацијом и током истог периода инкубације као и у експерименту за одређивање активације каспаза. Једињење дТКХ<sub>2фп-1</sub> повећало је проценат ћелија које производе O<sub>2</sub><sup>-</sup> за 3,7 пута у односу на нетретирану контролу (Слика 4.29).



**Слика 4.29** Процент LoVo ћелија позитивних на продукцију супероксидних радикала у митохондријама након 6 сати третмана са испитиваним једињењима у концентрацији од 50  $\mu$ M. Нумеричке вредности представљају аритметичку средину  $\pm$  стандардна девијација процента ћелија добијених из три независна експеримента.

Са друге стране, вредност просечног интензитета флуоресценције по ћелији (MFI) је био нижи у односу на контролне вредности ( $274 \pm 22$  AU у третираним ћелијама и  $338 \pm 20$  AU у нетретираној контроли). Овакав однос MFI вредности указује на два могућа сценарија: (1) да је  $O_2^{\cdot -}$  био генерисан у обиму који MnSOD може ефикасно да неутралише, или (2) да је  $O_2^{\cdot -}$  ослобођен у цитоплазму услед његове високе концентрације у митохондријама. Да бисмо имали бољи увид, анализирали смо и ћелије инкубиране са једињењима дТКХ<sub>2ап-3</sub> и дТКХ<sub>2фп-3</sub> иако код њих није детектована активација каспазе 9. Испоставило се да су ова два једињења изазвала генерисање  $O_2^{\cdot -}$  у знатно мањем проценту ћелија, али су при томе MFI вредности биле изнад оне детектоване у нетретираној контроли ( $456 \pm 23$  након третмана са дТКХ<sub>2ап-3</sub> и  $380 \pm 20$  након третмана са дТКХ<sub>2фп-3</sub>, Слика 4.30).



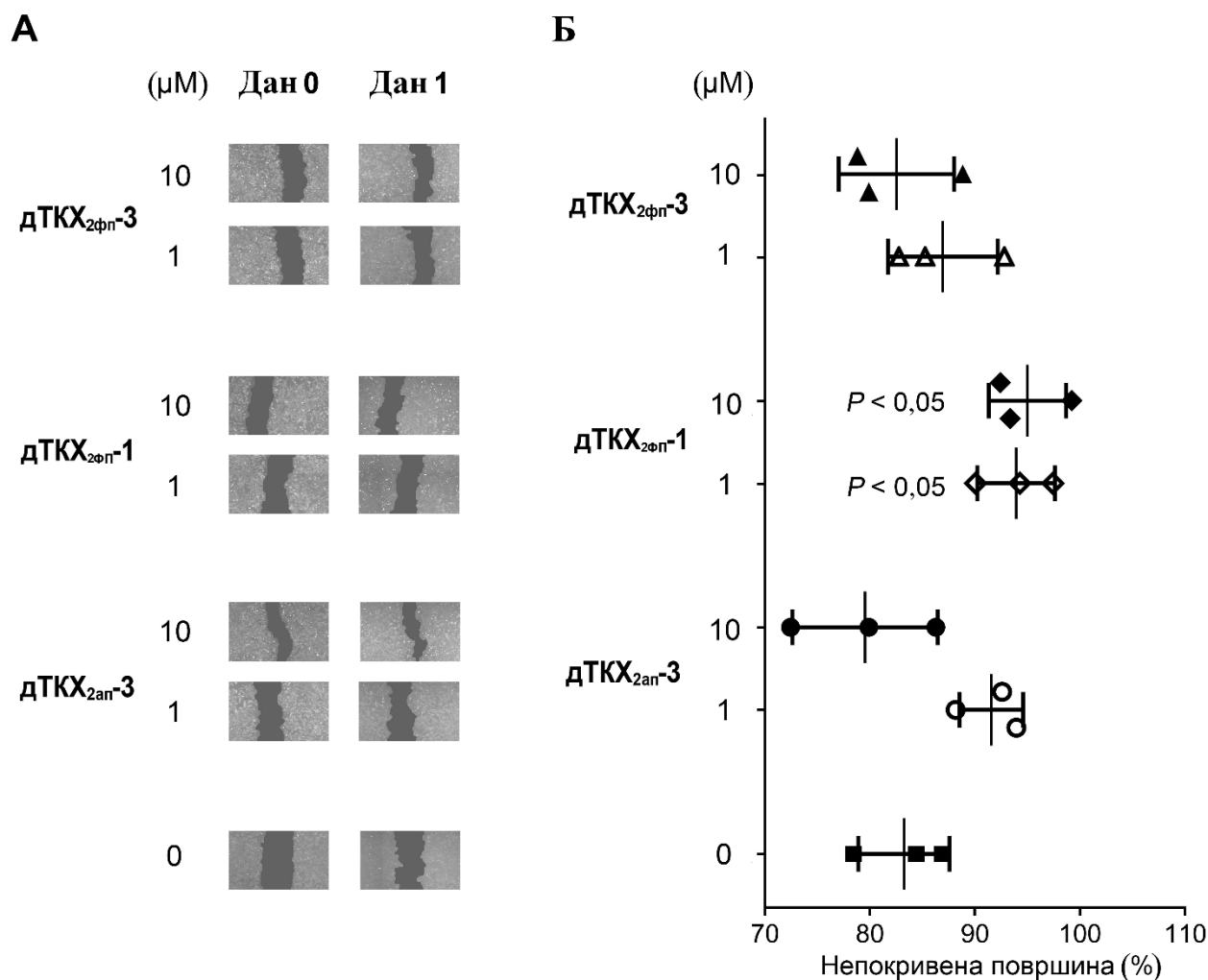
**Слика 4.30** Просечан интензитет флуоресценције (MFI) у LoVo ћелијама позитивним на продукцију супероксидних радикала у митохондријама након 6 сати третмана са испитиваним једињењима у концентрацији од 50  $\mu$ M. Резултати су приказани као аритметичка средина  $\pm$  стандардна девијација релативних јединица (AU) из три независна експеримента. Статистичка значајност је утврђена анализом варијансе (ANOVA) и t-тестом са Welch-овом корекцијом.

Овакав резултат додатно указује да стимулација  $O_2^{\cdot -}$  продукције у митохондријама јесте један од механизма деловања једињења дТКХ<sub>2фп-1</sub>, који није својствен једињењима дТКХ<sub>2ап-3</sub> и дТКХ<sub>2фп-3</sub>.

**Једињење дТКХ<sub>2фп-1</sub> је постигло значајну инхибицију цитоскелетне динамике третираних ћелија**

Под појмом антиканцерске активности не подразумева се искључиво индукција смрти малигне ћелије, већ и утицај на друге процесе који су непосредно повезани са прогресијом и дисеминацијом малигне болести. Из тих разлога, хтели смо да испитамо да ли наша једињења осим про-апоптотског деловања могу и да инхибирају миграцију малигнућ ћелија, која је у основи способности малигног тумора да метастазира у удаљена ткива и органе. Као

експериментални модел користили смо wound healing (scratch) esej<sup>218</sup>, у склопу којег смо пратили миграторну активност ћелија након 24 сата инкубације са испитиваним једињењима. Обзиром да LoVo ћелије расту делимично у монолејери а делимично у суспензији, због чега нису адекватан модел за овакву врсту тестирања, овај експеримент је изведен на култури SkoV3 ћелија, које су познате као једна од култура са високо инвазивним особинама.<sup>219</sup> Резултати су представљени кроз проценат непокривене површине у односу на иницијалну (Слика 4.31).

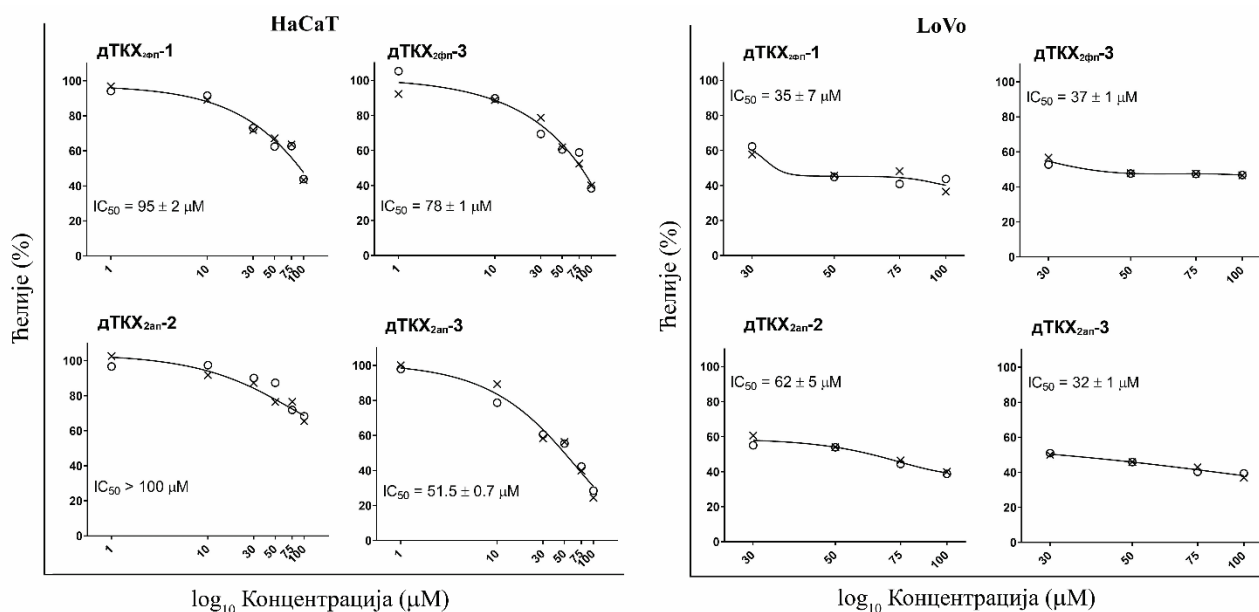


**Слика 4.31** Утицај испитиваних једињења на покретљивост SkoV3 ћелија утврђеног wound healing есејом. (А) Репрезентативне фотографије направљене непосредно пре почетка третмана испитиваним једињењима (дан 0) и 24 сата касније (дан 1). (Б) Проценти непокривене површине добијених из три независна експеримента приказаних као аритметичка средина  $\pm$  стандардна девијација. Статистичка значајност је утврђена анализом варијансе (ANOVA) и t тестом са Welch-овом корекцијом.

У нетретираној контроли су ћелије мигрирале тако да је остало непокривено  $83 \pm 4\%$  након 24 сата. Једињење дТКХ<sub>2Фп-3</sub> је у обе концентрације имало минималног утицаја на мобилност ћелија у односу на контролу ( $87 \pm 5\%$  на  $1 \mu\text{M}$ , и  $82 \pm 5\%$  на  $10 \mu\text{M}$ ). У ћелијама које су инкубирани са једињењем дТКХ<sub>2ап-3</sub> детектовано је  $79 \pm 7\%$  ( $10 \mu\text{M}$ ) и  $91 \pm 3\%$  ( $1 \mu\text{M}$ ) од првобитне површине. Само је дТКХ<sub>2Фп-1</sub> постигло статистички значајну инхибицију миграције са  $95 \pm 3\%$  и  $94 \pm 3\%$  непокривене површине након третмана ћелија са овим једињењем у концентрацијама од  $10$  и  $1 \mu\text{M}$ .

**Једињења дТКХ<sub>2ап-2</sub> и дТКХ<sub>2фп-1</sub> су демонстрирала најнижу активност на ћелијама кератиноцита коже**

У овом експерименту, НаСаТ ћелије су третиране испитиваним једињењима током 24 сата, а потом обојене са САМ/РІ. Флуоресценце су снимљене на Целиго цитометру, а потом анализирани на Целиго софтверу. Једињење дТКХ<sub>2ап-3</sub> показало је највећу активност на НаСаТ ћелијама, односно највећу токсичност (Слика 4.32). Једињење дТКХ<sub>2фп-3</sub> је забележило вишу IC<sub>50</sub> вредност у поређењу са дТКХ<sub>2ап-3</sub>, али не и задовољавајућу селективност. Знатно боље преживљавање НаСаТ ћелија постигнуто је са једињењем дТКХ<sub>2фп-1</sub>. Иако се ове IC<sub>50</sub> вредности не могу директно поредити са CdC<sub>50</sub> (Слика 4.25) јер су добијене различитим методама бојења, читавања и обраде података, може се лако уочити да постоји јасна корелација између нивоа активности ових једињења на малигним ћелијама и на НаСаТ кератиноцитима. Потпуно је, међутим, неочекивано да једињење дТКХ<sub>2ап-2</sub> није постигло IC<sub>50</sub> вредност на култури НаСаТ ћелија (Слика 4.32). Иако је ово једињење искључено из испитивања због високе учесталости некротичних ћелија, желели смо да тестирамо хоће ли и његов ефекат на здраву ћелијску културу бити у нивоу оне добијене на малигној линији (Слика 4.24). Овај резултат, заједно са податком да је дТКХ<sub>2ап-2</sub> испољило активност само на LoVo ћелијама од четири третиране линије (Табела 4.33, Слика 4.32), даје јаку индицију да би требало организовати додатна испитивања у којима би ово једињење било тестирано на другим културама колоректалног карцинома и малигним моделима гастроинтестиналног тракта.



**Слика 4.32** криве односа концентрације и ефекта за испитивање једињења на LoVo (вредности представљене у Табели 4.23) и НаСаТ ћелијама након 24 сата третмана. Резултати су представљени као проценат живих ћелија детектоване двоструким бојењем САМ и РІ очитаних из два независна експеримента (кружићи и крстићи) кривуља је дефинисана формулом за петопараметарску асиметричну криву, јединствену за оба репликата. IC<sub>50</sub> је аритметичка средина ± стандардна девијација концентрације која изазива смрт у 50% третираних ћелија. Уместо Log<sub>10</sub> вредности, на апциси су уписане егзактне концентрације да би се омогућила усклађеност са описом резултата у тексту.

## 5. ЗАКЉУЧАК

У оквиру дисертације синтетисане су три серије једињења винил и имино деривата пиридина, у циљу проучавања структуре, својстава и биолошке активности. Испитивана једињења све три серије су синтетисана реакцијом кондензације. У оквиру сваке серије једињења примењене су различите технике којима је потврђена структура једињења.

Чистоћа и структура синтетисаних једињења прве серије је потврђена температуром топљења, елементалном анализом и FTIR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR и UV-Vis спектроскопским методама. Сва једињења су добијена у приносу од 31 до 78 %. Оптимизацијом структуре у гасној фази за све *bis*(винил)пиридинијум-јодиде добијено је да постоје у *s-trans/s-trans* конформационом облику. Оптимизација геометрије је указала на утицај супституената на дужину винилне везе која спаја арил групу са централним пиридинским прстеном. Највећи утицај је примећен за електрон-донорске групе у *para*- положају које су утицале на смањење дужине ове везе услед високог доприноса проширене  $\pi$ -електронске делокализације.

У оквиру **БВПЈ** серије једињења испитивањем солватохромизма на вредности апсорпционих максимума ( $\nu_{\text{max}}$ ) дошло се од закључка да једињења са електрон-донорском групом у *para*-положају услед боље  $\pi$ -електронске коњугације показују већи батохромни померај. С друге стране, присуство електрон-донорске метил групе у *meta*- положају у једињењу **БВПЈ-4** ремети коњугацију и у поређењу са једињењем **БВПЈ-1** показује хипсохромни померај. Једињења са електрон-акцепторским групама су показала хипсохромно померање апсорпционих максимума ка мањим таласним дужинама. Солавохромизам је успешно проучаван применом LSER анализе, тј. корелацијом апсорпционих фреквенци са Камлет-Тафтовим и Каталановим једначинама користећи одговарајући сет параметара растварача. Корелациона анализа је показала да на померање апсорпционих максимума утичу и ефекти растварача и ефекти супституената. Резултати добијени Каталановим моделом показују боље корелације утицаја растварача и процену њиховог доприноса на померање апсорпционих максимума у UV-Vis спектрима. Главни фактор који утиче на померање UV спектра су диполарност и поларизабилност растварача, док су киселост и базност растварача од мањег значаја. Корелациони резултати указују да солватохромна својства зависе и од геометрије молекула. TD-DFT прорачунима UV-Vis апсорпционих спектра показано је да су вредности НОМО и LUMO орбитала и њихове разлике енергија  $E_{\text{gap}}$  мање за молекуле са електрон-донорским супституентима и повећавају се за једињења са електрон-акцепторским супституентима, у поређењу са несупституисаним једињењем **БВПЈ-1**. Веће вредности  $E_{\text{gap}}$  су добијене за једињења са нитро групом као јаким електрон-акцепторским супституентом, једињење **БВПЈ-12**, и код *orto*-халоген дисупституисаних једињења **БВПЈ-9** и **БВПЈ-10**, и последица је веће стабилизације НОМО орбитала. Интензивни прелази НОМО→LUMO из основног у прво побуђено стање учествују са више од 80% код свих једињења.

LFER анализа се показала као успешан метод за корелацију  $^{13}\text{C}$  NMR померања испитиваних **БВПЈ** једињења са  $\sigma$  константама супституената применом Хаметове једнопараметарске једначине. Висока статистичка поузданост корелација указује да разлике у хемијским померањима потичу од електронских ефеката супституената. *Orto*-супституисана једињења **БВПЈ-9** и **БВПЈ-10** показују највеће хемијско померање што указује на постојање стерног ефекта присутних супституената.

У оквиру ове серије једињења испитивана је њихова антиоксидативна активност применом DPPH и ABTS слободнорадикалских метода. Резултати указују на сличан тренд активности за обе методе. Једињења су показала умерена до добра антиоксидативна својства. Најбољу активност је показало једињење са хидроксилном групом **БВПЈ-5**.

Једињења друге серије *bis*(имино)пиридини добијена су у приносу 42-78%. Резултати HRMS, FTIR, ESR, и UV-Vis спектралних анализа заједно са температуром топљења и елементалном анализом потврдили су чистоћу и структуру испитиваних једињења. Из вредности  $g$ -фактора добијених снимањем ESR спектра свих шеснаест **БВПЈ** једињења,



откривено је да долази до формирања радикалског центра на атому угљеника пиридинске структуре свих испитиваних једињења.

Квантно-механичка израчунавања оптималне геометрије указала су на симетрију и планарност испитиваних једињења, што је потврђено на основу израчунатих вредности торзионих углова. Најмањи торзиони угао од  $10,64^\circ$  и најпланарнију структуру има једињење **БИП-6**, што је последица грађења интрамолекуларске водоничне везе између водоника хидроксилне групе у *orto*-положају на фенилном прстену и имино азота. Оваква структура и формирање псеудо-шесточланог прстена додатно стабилизује планарну структуру једињења **БИП-6**.

Резултати испитивања утицаја растварача на померање апсорпционих максимума указују да разлике у солватацији основног и побуђеног стања и разлике у коњугацији слободног електронског пара на атому азота са супституентима на ароматичном прстену доводе до негативног солватохромизма. Осим тога, највероватније долази и до преклапања трака  $n-\pi^*$  са  $\pi-\pi^*$  прелазом ароматичног система. Резултати LSER анализе указују на то да се електронски ефекти имино групе и пиридинског језгра разликују код једињења са електрон-донорским и електрон-акцепторским супституентима, као и да је утицај специфичних и неспецифичних ефеката растварача на померање апсорпционих максимума у UV-Vis спектрима испитиваних једињења веома сложен. Резултати TD-DFT израчунавања апсорпционих спектра показују да разлике у енергијама HOMO и LUMO орбитала као дескриптора интрамолекуларског трансфера наелектрисања из основног у побуђено стање, зависе од електронских својстава супституената и њиховог положаја у молекулу. Највећа разлика у енергији HOMO/LUMO орбитала добијена је за једињење са 2-пиридил групом, једињење **БИП-16**. Ниже вредности  $E_{\text{gap}}$  су добијене за једињења са електрон-донорским супституентима, а најмања вредност у поређењу са несупституисаним једињењем је добијена за дериват који садржи 8-хидрокси-хинолин као супституент, једињење **БИП-10**.

Антиоксидативна активност је испитивана на свих шеснаест **БИП** деривата. Сва једињења су показала добру антирадикалску активност, а једињења **БИП-8** и **БИП-10** су се показала као најактивнија у DPPH тесту, док су **БИП-8**, **БИП-10** и **БИП-14** најактивнији антиоксиданти у ABTS тесту. Добра антирадикалска активност једињења **БИП-10**, последица је продужене делокализације  $\pi$ -електрона хинолинске структуре и хидроксилне групе на хетероцикличном делу, што додатно стабилизује радикалске врсте. На основу добијених експерименталних резултата закључује се да је антиоксидативни капацитет **БИП** једињења са хидроксилним групама у корелацији са положајем -ОН групе на фенилном прстену са следећим редоследом активности: **БИП-10** >> **БИП-8** > **БИП-7** > **БИП-6**. Једињење **БИП-6** из ове групе показује најмањи антиоксидативни потенцијал услед присуства јаког ИНВ који отежава пренос атома водоника на реактивне радикалске врсте. Одређивањем антиоксидативног капацитета методом редукције помоћу CUPRAC теста утврђено је да једињења **БИП-10** и **БИП-14** са јаким електрон-донорским групама показују највеће редукционе капацитете, док електрон-акцепторски супституенти једињења од **БИП-11** до **БИП-13** и **БИП-15** утичу на смањење антиоксидативног капацитета. Укупни антиоксидативни капацитет (TAC) изведен фосфомолибденским тестом показује да је најактивније једињење **БИП-9**. Оно у свом саставу садржи 2-хинолил супституент, што указује на важност додатних координирајућих N-атома у комплексирању Mo(VI). На основу DFT прорачуна изведен је закључак о антиоксидативном механизму **БИП** једињења. Код једињења која у својој структури имају -ОН групу доминира НАТ механизам, док је са све остале деривате доминантнији SET-PT механизам.

Сва испитивана једињења из друге серије су показала слабу до умерену инхибиторну активност према ензиму AChE, при чему је најактивнији дериват **БИП-16**.

Резултати антимицробне активности указују да, међу испитиваним једињењима, једињење **БИП-16** показује најјаче дејство. Поред њега и дериват са 2-ОН групом (једињење **БИП-6**) показује значајну антимицробну активност. Бактеријска леуцил аминокептидаза показала се као могућа молекуларска мета за једињења **БИП-6**, **БИП-10** и **БИП-16** у студијама

случности са молекулима познатог механизма антимиembroног дејства, а ови резултати су додатно потврђени молекулским докингом.

Из ове серије, три синтетисана једињења (**БИП-9**, **БИП-14** и **БИП-16**) су се показала као добри инхибитори корозије. Спадају у мешовите типове инхибитора корозије, што је својствено органским једињењима. На основу електрохемијских испитивања као и термодинамичких и кинетичких прорачуна може се закључити да се ради о физисорпцији. Ефикасност испитиваних инхибитора је већа у агресивнијој средини (1M HCl) него у 0,5M NaCl. Ова једињења су бољи инхибитори за гвожђе него за цинк.

На основу експерименталних резултата за трећу серију једињења могу се извести следећи закључци:

Структура једињења треће серије потврђена је експерименталним и инструменталним техникама (FTIR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, 2D NMR). Сва једињења су добијена у приносу од 78 до 88 %. Анализа антиоксидативне активности указала је да у интеракцији са слободним DPPH<sup>•</sup> и ABTS<sup>•+</sup> радикалима једињења са присутном електрон-донорском групом показују највећи антиоксидативни капацитет код све три групе једињења из серије дТКХ (дТКХ<sub>2фп</sub>-2, дТКХ<sub>2ап</sub>-2 и дТКХ<sub>2сал</sub>-2). Једињења из групе дТКХ<sub>2сал</sub> услед присуства ИНВ ефекта који отежава пренос атома водоника имају смањен антиоксидативни капацитет. За разлику од дТКХ<sub>2сал</sub>, једињења из групе дТКХ<sub>2фп</sub> и дТКХ<sub>2ап</sub> су показале бољи антиоксидативни потенцијал. Анализом резултата добијених одређивањем антиоксидативног капацитета једињења дТКХ CUPRAC тестом утврђено је да сва једињења показују већу активност у поређењу са референтним стандардом тролоксом. Према добијеним резултатима, сва једињења треће серије показала су добру укупну антиоксидативну активност у ТАС тесту, где је 1mg једињења било еквивалентно 0,579 до 0,985 mg витамина Ц.

Сва испитивана једињења испољавају значајну активност према бактеријама *Escherichia coli* (MIC 0,08-5,00 mmol/L), *Enterococcus faecalis* (MIC 0,08-5,00 mmol/L), *Staphylococcus aureus* (MIC 0,08-2,50 mmol/L) и *Staphylococcus aureus MRSA* (MIC 0,08-1,25 mmol/L) и умерену антифунгалну активност према гљивици *Candida albicans* (MIC 0,08-0,31 mmol/L). Једињење дТКХ<sub>2ап</sub>-3. испољило је инхибиторно дејство према бактерији *Pseudomonas aeruginosa* које је упоредиво са амоксицилином.

Резултати испитивања антиканцер активности дТКХ<sub>2фп</sub> и дТКХ<sub>2ап</sub> показали су да тестирана једињења показују способност да изазову ћелијску смрт. Највећу осетљивост према испитиваним једињењима имале су ћелије LoVo, културе хуманог колоректалног карцинома. Једињења дТКХ<sub>2ап</sub>-2, дТКХ<sub>2ап</sub>-3, дТКХ<sub>2фп</sub>-1 и дТКХ<sub>2фп</sub>-3 су у два или више примењених концентрацијских нивоа редуковала број живих LoVo ћелија за више од 50%, што је било пресудно да се испитивање надаље фокусира на процену профила активности ова четири новосинтетисана молекула. На основу резултата ћелијске смрти, једињење дТКХ<sub>2ап</sub>-2 је елиминисано из даљег истраживања јер се испоставило да је у концентрацијско-зависном тренду индуковало пораст процента ћелија у раној некрози. Једињења дТКХ<sub>2фп</sub>-1 и дТКХ<sub>2фп</sub>-3 показала су аналогију у механизму деловања заустављајући ћелијску деобу у фази репликације хромозомског материјала, док се једињење дТКХ<sub>2ап</sub>-3 издвојило узрокујући блок у G0/G1 фази. Сва три једињења су изазвала активацију каспазе 8, што указује да је у третираним ћелијама апоптозна смрт пропагирана путем спољашње каспазне каскаде. Једињење дТКХ<sub>2фп</sub>-1 је истовремено, и независно од каспазе 8, активирало и каспазу 9, што је накнадно доведено у везу са његовом способношћу да стимулише генерисање супероксидних радикала у митохондријама. Једињења дТКХ<sub>2ап</sub>-3 и дТКХ<sub>2фп</sub>-3 нису показала значајну прооксидативну активност. Такође, једињење дТКХ<sub>2фп</sub>-1 је једино које је статистички значајно инхибирало цитокелетну динамику малигнућ ћелија, чиме је показано да његова антиканцерска активност, осим способности да иницира апоптозну смрт, подразумева и способност да инхибира метастатски потенцијал ћелија примарног тумора. Једињење дТКХ<sub>2фп</sub>-1 је демонстрирало задовољавајући степен селективности поредећи постигнуту активност на малигнућ и здравим ћелијама. Ипак, највеће изненађење је селективност једињења дТКХ<sub>2ап</sub>-2 које је имало изузетно ниску токсичност на моделу хуманих

кератиноцита у односу на ћелије колоректалног карцинома. Као коначан закључак наводимо да од новосинтетисаних структура, актуелни резултати снажно подстичу потребу за наставком истраживања на испитивању механизма активности у циљу профилисања антиканцерског деловања једињења дТКХ<sub>2ап</sub>-2 и дТКХ<sub>2фп</sub>-1.

## 6. ЛИТЕРАТУРА

1. R. S. Nair, M. E. Potti, R. Thankappan, S. K. Chandrika, M. R. P. Kurup, P. Srinivas, *Mol. Carcinog.* **56** (2017) 1501–1514.
2. A. Bacchi, M. Carcelli, P. Pelagatti, C. Pelizzi, G. Pelizzi, F. Zani, *J. Inorg. Biochem.* **75** (1999) 123–133.
3. G. G. Mohamed, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **64** (2006) 188–195.
4. A. R. Božić, S. K. Bjelogrić, I. T. Novaković, N. R. Filipović, P. M. Petrović, A. D. Marinković, T. R. Todorović, I. N. Cvijetić, *ChemistrySelect* **3** (2018) 2215–2221.
5. A. A. Shanty, P. V. Mohanan, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **192** (2018) 181–187.
6. B. Carlotti, E. Benassi, A. Spalletti, C. G. Fortuna, F. Elisei, V. Barone, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16** (2014) 13984–13994.
7. I. Kikaš, B. Carlotti, I. Škorić, M. Šindler-Kulyk, U. Mazzucato, A. Spalletti, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **244** (2012) 38–46.
8. A. Paşahan, S. Köytepe, E. Ekinci, *E-Polymers* **12** (2012).
9. F. Kurzer, M. Wilkinson, *Chem. Rev.* **70** (1970) 111–149.
10. M. A. Metwally, M. E. Khalifa, M. Koketsu, *Am. J. Chem.* **2** (2012) 38–51.
11. A. Božić, A. Marinković, S. Bjelogrić, T. R. Todorović, I. N. Cvijetić, I. Novaković, C. D. Muller, N. R. Filipović, *RSC Adv.* **6** (2016) 104763–104781.
12. I. Ahamad, R. Prasad, M. A. Quraishi, *Corros. Sci.* **52** (2010) 933–942.
13. S. Riaz, I. U. Khan, M. Bajda, M. Ashraf, Qurat-Ul-Ain, A. Shaukat, T. U. Rehman, S. Mutahir, S. Hussain, G. Mustafa, M. Yar, *Bioorg. Chem.* **63** (2015) 64–71.
14. R. Wang, Y. Chen, B. Yang, S. Yu, X. Zhao, C. Zhang, C. Hao, D. Zhao, M. Cheng, *Bioorg. Chem.* **94** (2020) 103474.
15. Y. Hamada, *Pyridine* (2018).
16. J. A. Bull, J. J. Mousseau, G. Pelletier, A. B. Charette, *Chem. Rev.* **112** (2012) 2642–2713.
17. S. Pal, *Pyridine* (2018).
18. R. C. Calhella, D. Peixoto, M. Vilas Boas, M. J. R. P. Queiroz, I. C. F. R. Ferreira, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **29** (2014) 311–316.
19. H. F. Abd El-Halim, M. M. Omar, G. G. Mohamed, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **78** (2011) 36–44.
20. V. G. Pivovarenko, A. V. Grygorovych, V. F. Valuk, A. O. Doroshenko, *J. Fluoresc.* **13** (2003) 479–487.
21. D. Li, J. Q. Hou, W. Long, Y. J. Lu, W. L. Wong, K. Zhang, *RSC Adv.* **8** (2018) 20222–20227.
22. A. I. Vokin, A. M. Shulunova, T. N. Aksamentova, G. V. Bozhenkov, V. K. Turchaninov, *Russ. J. Gen. Chem.* **76** (2006) 596–614.
23. S. Feng, Y. Kyung Kim, S. Yang, Y. T. Chang, *Chem. Commun.* **46** (2010) 436–438.
24. J. M. Marković, N. P. Trišović, D. Mutavdžić, K. Radotić, I. O. Juranić, B. J. Drakulić, A. D. Marinković, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **135** (2015) 435–446.
25. Y. Atalay, A. Başoğlu, D. Avci, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **69** (2008) 460–466.
26. S. Sowmiah, J. M. S. S. Esperança, L. P. N. Rebelo, C. A. M. Afonso, *Org. Chem. Front.* **5** (2018) 453–493.
27. C. G. Fortuna, V. Barresi, C. Bonaccorso, G. Consiglio, S. Failla, A. Trovato-Salinaro, G. Musumarra, *Eur. J. Med. Chem.* **47** (2012) 221–227.
28. H. Wang, R. Helgeson, B. Ma, F. Wudl, (2000) 5862–5867.
29. V. M. Chapela, M. J. Percino, C. Rodríguez-Barbarín, *J. Chem. Crystallogr.* **33** (2003) 77–83.
30. U. M. G. Bartocci, A. Spalletti, *Conformational Analysis of Molecules in Excited States*, in J. Waluk (Ed.), Wiley, New York, 2000, pp. 237–296.
31. P. R. Thorve, B. Maji, *Org. Lett.* (2021).
32. N. R. Penthala, J. Eldridge, T. R. Y. Reddy, S. Parkin, P. A. Crooks, *Acta Crystallogr. Sect. E*

- Struct. Reports Online* **66** (2010) 735–736.
33. X. Xu, W. Qiu, Q. Zhou, J. Tang, F. Yang, Z. Sun, P. Audebert, *J. Phys. Chem. B* **112** (2008) 4913–4917.
  34. W. Qin, S. Long, M. Panunzio, S. Biondi, *Molecules* **18** (2013) 12264–12289.
  35. K. Brodowska, E. Łodyga-Chruścińska, *Chemik* **68** (2014) 129–134.
  36. E. H. Anouar, S. Raweh, I. Bayach, M. Taha, M. S. Baharudin, F. Di Meo, M. H. Hasan, A. Adam, N. H. Ismail, J. F. F. Weber, P. Trouillas, *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **27** (2013) 951–964.
  37. Z. Cimerman, N. Galic, B. Bosner, *Anal. Chim. Acta* **343** (1997) 145–153.
  38. G. B. Hamideh Elmizadeh, Majid Soleimani, Farnoush Faridbod, (n.d.).
  39. K. V Martin, K. V Martin, **4188** (1957).
  40. N. Galić, D. Matković-Čalogović, Z. Cimerman, *J. Mol. Struct.* **406** (1997) 153–158.
  41. K. R. Reddy, A. V. Raghu, H. M. Jeong, Siddaramaiah, *Des. Monomers Polym.* **12** (2009) 109–118.
  42. R. De Vreese, K. Muylaert, C. Maton, L. Dereu, F. Taillieu, T. Harth, R. Van Deun, H. Vrielinck, C. V. Stevens, M. D’hooghe, *Tetrahedron Lett.* **58** (2017) 3803–3807.
  43. M. Misra, D. Das, K. B. Padhi, A. K. Panigrahi, A. K. Mohanty, *J. Macromol. Sci. - Pure Appl. Chem.* **35** (1998) 867–873.
  44. N. P. Belskaya, W. Dehaen, V. A. Bakulev, *Arkivoc* **2010** (2010) 275–332.
  45. J. Klenc, E. Raux, S. Barnes, S. Sullivan, B. Duszynska, A. J. Bojarski, L. Strekowski, *J. Heterocycl. Chem.* **46** (2009) 1259–1265.
  46. G. Verma, A. Marella, M. Shaquiquzaman, M. Akhtar, M. R. Ali, M. M. Alam, *J. Pharm. Bioallied Sci.* **6** (2014) 69–80.
  47. A. Hameed, M. al-Rashida, M. Uroos, S. Abid Ali, K. M. Khan, *Expert Opin. Ther. Pat.* **27** (2017) 63–79.
  48. A. Kajal, S. Bala, N. Sharma, S. Kamboj, V. Saini, *Int. J. Med. Chem.* **2014** (2014) 1–11.
  49. M. V. Angelusiu, G. L. Almajan, T. Rosu, M. Negoiu, E. R. Almajan, J. Roy, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 3323–3329.
  50. D. Maity, A. K. Manna, D. Karthigeyan, T. K. Kundu, S. K. Pati, T. Govindaraju, *Chem. - A Eur. J.* **17** (2011) 11152–11161.
  51. S. Nigam, S. Rutan, *Appl. Spectrosc.* **55** (2001) 362A.
  52. A. A. Edwards, B. D. Alexander, *UV-visible absorption spectroscopy, organic applications*, 3rd ed., Elsevier Ltd., 2016.
  53. M. J. Kamlet, J. L. M. Abboud, M. H. Abraham, R. W. Taft, *J. Org. Chem.* **48** (1983) 2877–2887.
  54. Mortimer J. Kamlet and R. W. Taft, **98** (1976) 377–383.
  55. R. W. Taft, M. J. Kamlet, *J. Am. Chem. Soc.* **98** (1976) 2886–2894.
  56. F. Riedel, S. Spange, *J. Phys. Org. Chem.* **25** (2012) 1261–1268.
  57. K. Hofmann, K. Schreiter, A. Seifert, T. Rüffer, H. Lang, S. Spange, *New J. Chem.* **32** (2008) 2180–2188.
  58. J. Catalán, *J. Phys. Chem. B* **113** (2009) 5951–5960.
  59. R. A. Y. Jones, *Physical and Mechanistic Organic Chemistry*, 2nd ed., Cambridge University Press, London, 1984.
  60. C. Hansch, A. Leo, R. W. Taft, *Chem. Rev.* **91** (1991) 165–195.
  61. A. Weissberger, S. Smith, W. Adam, A. Rios, M. Ball, J. Hoffman, W. H. Richardson, Y. Ogata, Y. Sawaki, Y. Ogata, Y. Sawaki, **737** (1987).
  62. C. Gardner Swain, E. C. Lupton, *J. Am. Chem. Soc.* **90** (1968) 4328–4337.
  63. C. D. Johnson, *CUP Arch.* (1973).
  64. K. N. Campbell, A. H. Sommers, B. K. Campbell, *J. Am. Chem. Soc.* **66** (1944) 82–84.
  65. Y. Zhao, D. G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.* **120** (2008) 215–241.
  66. Y. Zhao, D. G. Truhlar, *Acc. Chem. Res.* **41** (2008) 157–167.
  67. J. N. Harvey, *Annu. Reports Prog. Chem. - Sect. C* **102** (2006) 203–226.

68. M. Lundberg, P. E. M. Siegbahn, *J. Chem. Phys.* **122** (2005).
69. S. Grimme, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **45** (2006) 4460–4464.
70. S. Grimme, *J. Comput. Chem.* **25** (2004) 1463–1473.
71. W. K. P. Hohenberg, *Phys. Rev. Journals Arch.* **136** (1964) 864–871.
72. W. Kohn, L. J. Sham, *Phys. Rev.* **140** (1965).
73. J. P. Perdew, J. A. Chevary, S. H. Vosko, K. A. Jackson, M. R. Pederson, D. J. Singh, C. Fiolhais, *Phys. Rev. B* **46** (1992) 6671–6687.
74. J. P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof, *Phys. Rev. Lett.* **77** (1996) 3865–3868.
75. A. D. Becke, *Phys. Rev. A* **38** (1988) 3098–3100.
76. A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 1372–1377.
77. A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 5648–5652.
78. E. Van Lenthe, E. J. Baerends, J. G. Snijders, *J. Chem. Phys.* **101** (1994) 9783–9792.
79. M. Bühl, C. Reimann, D. A. Pantazis, T. Bredow, F. Neese, *J. Chem. Theory Comput.* **4** (2008) 1449–1459.
80. T. Hansch, Corwin, and Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* **5** (1963) 1616–1626.
81. J. W. Wilson, S. M. Free, J. W. Wilson, *J. Med. Chem.* **7** (1964) 395–399.
82. A. G. Dossetter, E. J. Griffen, A. G. Leach, *Drug Discov. Today* **18** (2013) 724–731.
83. M. Clark, R. D. Cramer, *Quant. Struct. Relationships* **12** (1993) 137–145.
84. H. Sies, (1996).
85. M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C. J. Rhodes, J. Telser, *Mol. Cell. Biochem.* **266** (2004) 37–56.
86. R. P. Patel, J. McAndrew, H. Sellak, C. R. White, H. Jo, B. A. Freeman, V. M. Darley-Usmar, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1411** (1999) 385–400.
87. M. Carochio, I. C. F. R. Ferreira, *Food Chem. Toxicol.* **51** (2013) 15–25.
88. N. Hermans, P. Cos, L. Maes, T. De Bruyne, D. Vanden Berghe, A. J. Vlietinck, L. Pieters, *Curr. Med. Chem.* **14** (2007) 417–430.
89. A. A. Shanty, P. V. Mohanan, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **192** (2018) 181–187.
90. M. A. Al-Omar, A. R. Sayed, M. M. Youssef, *Molecules* **20** (2015) 2591–2610.
91. J. S. Wright, E. R. Johnson, G. A. DiLabio, *J. Am. Chem. Soc.* **123** (2001) 1173–1183.
92. S. B. Nimse, D. Pal, *RSC Adv.* **5** (2015) 27986–28006.
93. C. C. Winterbourn, *Toxicol. Lett.* **82–83** (1995) 969–974.
94. E. Bendary, R. R. Francis, H. M. G. Ali, M. I. Sarwat, S. El Hady, *Ann. Agric. Sci.* **58** (2013) 173–181.
95. M. Özyürek, K. Güçlü, E. Tütem, K. S. Bakan, E. Erçağ, S. Esin Çelik, S. Baki, L. Yildiz, Ş. Karaman, R. Apak, *Anal. Methods* **3** (2011) 2439–2453.
96. M. N. Alam, N. J. Bristi, M. Rafiquzzaman, *Saudi Pharm. J.* **21** (2013) 143–152.
97. J. Ren, T. C. Jenkins, J. B. Chaires, *Biochemistry* **39** (2000) 8439–8447.
98. B. Campbell, *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* **95** (2013) 532–532.
99. T. Nasr, S. Bondock, S. Eid, *Eur. J. Med. Chem.* **84** (2014) 491–504.
100. Z. Shi, Z. Zhao, M. Liu, X. Wang, *Comptes Rendus Chim.* **16** (2013) 977–984.
101. K. H. M. Ebrahim Tehrani, F. Kobarfard, P. Azerang, M. Mehravar, Z. Soleimani, G. Ghavami, S. Sardari, *Iran. J. Pharm. Res.* **12** (2013) 331–346.
102. K. H. M. Ebrahim Tehrani, V. Mashayekhi, P. Azerang, S. Minaei, S. Sardari, F. Kobarfard, *Iran. J. Pharm. Res.* **14** (2015) 59–68.
103. I. Wiegand, K. Hilpert, R. E. W. Hancock, *Nat. Protoc.* **3** (2008) 163–175.
104. L. F. Joyce, J. Downes, K. Stockman, J. H. Andrew, *J. Clin. Microbiol.* **30** (1992) 2709–2713.
105. C. Nonhoff, S. Rottiers, M. J. Struelens, *Clin. Microbiol. Infect.* **11** (2005) 150–153.
106. K. C. Bible, S. H. Kaufmann, *Cancer Res.* **56** (1996) 4856–4861.
107. C. A. Kunos, T. Stefan, J. W. Jacobberger, *Front. Oncol.* **3 SEP** (2013) 1–10.
108. R. L. Sutherland, R. E. Hall, I. W. Taylor, *Cancer Res.* **43** (1983) 3998–4006.
109. C. Soranzo, G. Della Torre, A. Ingrosso, *Tumori* **72** (1986) 459–467.

110. S. L. Tran, A. Puhar, M. Ngo-Camus, N. Ramarao, *PLoS One* **6** (2011) 2–6.
111. F. Miles, J. Lynch, R. Sikes, *J. Biol. Methods* **2** (2015) e29.
112. H. Zhao, J. Oczos, P. Janowski, D. Trembecka, J. Dobrucki, Z. Darzynkiewicz, D. Wlodkowic, *Cytom. Part A* **77** (2010) 399–405.
113. H. Y. Chen, Y. M. Yang, B. M. Stevens, M. Noble, *EMBO Mol. Med.* **5** (2013) 723–736.
114. I. Lakshmanan, S. K. K. Batra, *Bio-Protocol* **3** (2013) e374.
115. L. Galluzzi, I. Vitale, S. A. Aaronson, J. M. Abrams, D. Adam, P. Agostinis, E. S. Alnemri, L. Altucci, I. Amelio, D. W. Andrews, M. Annicchiarico-Petruzzelli, A. V. Antonov, E. Arama, E. H. Baehrecke, N. A. Barlev, N. G. Bazan, F. Bernassola, M. J. M. Bertrand, K. Bianchi, M. V. Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, P. Boya, C. Brenner, M. Campanella, E. Candi, D. Carmona-Gutierrez, F. Cecconi, F. K. M. Chan, N. S. Chandel, E. H. Cheng, J. E. Chipuk, J. A. Cidlowski, A. Ciechanover, G. M. Cohen, M. Conrad, J. R. Cubillos-Ruiz, P. E. Czabotar, V. D'Angiolella, T. M. Dawson, V. L. Dawson, V. De Laurenzi, R. De Maria, K. M. Debatin, R. J. Deberardinis, M. Deshmukh, N. Di Daniele, F. Di Virgilio, V. M. Dixit, S. J. Dixon, C. S. Duckett, B. D. Dynlacht, W. S. El-Deiry, J. W. Elrod, G. M. Fimia, S. Fulda, A. J. García-Sáez, A. D. Garg, C. Garrido, E. Gavathiotis, P. Golstein, E. Gottlieb, D. R. Green, L. A. Greene, H. Gronemeyer, A. Gross, G. Hajnoczky, J. M. Hardwick, I. S. Harris, M. O. Hengartner, C. Hetz, H. Ichijo, M. Jäättelä, B. Joseph, P. J. Jost, P. P. Juin, W. J. Kaiser, M. Karin, T. Kaufmann, O. Kepp, A. Kimchi, R. N. Kitsis, D. J. Klionsky, R. A. Knight, S. Kumar, S. W. Lee, J. J. Lemasters, B. Levine, A. Linkermann, S. A. Lipton, R. A. Lockshin, C. López-Otín, S. W. Lowe, T. Luedde, E. Lugli, M. MacFarlane, F. Madeo, M. Malewicz, W. Malorni, G. Manic, J. C. Marine, S. J. Martin, J. C. Martinou, J. P. Medema, P. Mehlen, P. Meier, S. Melino, E. A. Miao, J. D. Molkentin, U. M. Moll, C. Muñoz-Pinedo, S. Nagata, G. Nuñez, A. Oberst, M. Oren, M. Overholtzer, M. Pagano, T. Panaretakis, M. Pasparakis, J. M. Penninger, D. M. Pereira, S. Pervaiz, M. E. Peter, M. Piacentini, P. Pinton, J. H. M. Prehn, H. Puthalakath, G. A. Rabinovich, M. Rehm, R. Rizzuto, C. M. P. Rodrigues, D. C. Rubinsztein, T. Rudel, K. M. Ryan, E. Sayan, L. Scorrano, F. Shao, Y. Shi, J. Silke, H. U. Simon, A. Sistigu, B. R. Stockwell, A. Strasser, G. Szabadkai, S. W. G. Tait, D. Tang, N. Tavernarakis, A. Thorburn, Y. Tsujimoto, B. Turk, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele, M. G. Vander Heiden, A. Villunger, H. W. Virgin, K. H. Vousden, D. Vucic, E. F. Wagner, H. Walczak, D. Wallach, Y. Wang, J. A. Wells, W. Wood, J. Yuan, Z. Zakeri, B. Zhivotovsky, L. Zitvogel, G. Melino, G. Kroemer, *Cell Death Differ.* **25** (2018) 486–541.
116. F. P. Wilson, J. S. Berns, *Adv. Chronic Kidney Dis.* **21** (2014) 18–26.
117. T. Otto, P. Sicinski, *Nat. Rev. Cancer* **17** (2017) 93–115.
118. J. J. Bower, L. D. Vance, M. Psioda, S. L. Smith-Roe, D. A. Simpson, J. G. Ibrahim, K. A. Hoadley, C. M. Perou, W. K. Kaufmann, *Npj Breast Cancer* **3** (2017) 1–9.
119. C. Riccardi, I. Nicoletti, *Nat. Protoc.* **1** (2006) 1458–1461.
120. D. R. McIlwain, T. Berger, T. W. Mak, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7** (2015).
121. X. Xu, Y. Lai, Z. C. Hua, *Biosci. Rep.* **39** (2019) 1–17.
122. P. Li, L. Zhou, T. Zhao, X. Liu, P. Zhang, Y. Liu, X. Zheng, Q. Li, *Oncotarget* **8** (2017) 23996–24008.
123. U. S. Srinivas, B. W. Q. Tan, B. A. Vellayappan, A. D. Jeyasekharan, *Redox Biol.* **25** (2019) 101084.
124. S. P. Jackson, J. Bartek, *Nature* **461** (2009) 1071–1078.
125. D. Munro, J. R. Treberg, *J. Exp. Biol.* **220** (2017) 1170–1180.
126. D. B. Zorov, M. Juhaszova, S. J. Sollott, *Physiol. Rev.* **94** (2014) 909–950.
127. C. Lennicke, J. Rahn, R. Lichtenfels, L. A. Wessjohann, B. Seliger, *Cell Commun. Signal.* **13** (2015) 39.
128. L. J. Marnett, *Carcinogenesis* **21** (2000) 361–370.
129. A. V. Snezhkina, A. V. Kudryavtseva, O. L. Kardymon, M. V. Savvateeva, N. V. Melnikova, G. S. Krasnov, A. A. Dmitriev, *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019** (2019) 6175804.
130. H. Piotrowska, M. Kucinska, M. Murias, *Mol. Cell. Biochem.* **383** (2013) 95–102.

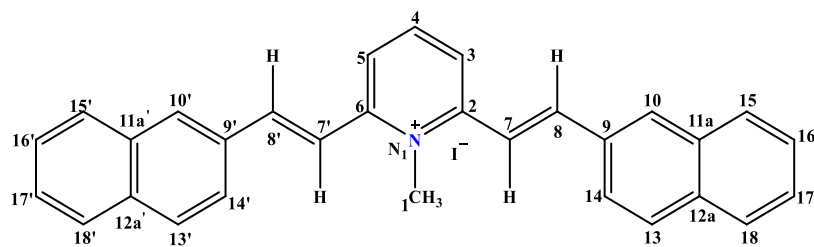
131. A. W. Lambert, D. R. Pattabiraman, R. A. Weinberg, *Cell* **168** (2017) 670–691.
132. J. Pijuan, C. Barceló, D. F. Moreno, O. Maiques, P. Sisó, R. M. Marti, A. Macià, A. Panosa, *Front. Cell Dev. Biol.* **7** (2019) 1–16.
133. C. Y. Ng, C.-B. Chen, M.-Y. Wu, J. Wu, C.-H. Yang, R. C.-Y. Hui, Y.-C. Chang, C.-W. Lu, *J. Immunol. Res.* **2018** (2018) 5376476.
134. M. G. Fontana, *Corrosion engineering (McGraw-Hill series in materials science and engineering)*, McGraw-Hill, 1978.
135. J. Wu, X. Zheng, W. Li, L. Yin, S. Zhang, *Res. Chem. Intermed.* **41** (2015) 8557–8570.
136. P. B. Raja, M. G. Sethuraman, *Mater. Lett.* **62** (2008) 113–116.
137. S. M. Abd El Haleem, S. Abd El Wanees, E. E. Abd El Aal, A. Farouk, *Corros. Sci.* **68** (2013) 1–13.
138. P. Dohare, M. A. Quraishi, I. B. Obot, *J. Chem. Sci.* **130** (2018) 1–19.
139. P. Silku, S. Özkinali, Z. Öztürk, A. Asan, D. A. Köse, *J. Mol. Struct.* **1116** (2016) 72–83.
140. A. Kosari, M. H. Moayed, A. Davoodi, R. Parvizi, M. Momeni, H. Eshghi, H. Moradi, *Corros. Sci.* **78** (2014) 138–150.
141. M. Abdallah, S. A. Ahmed, H. M. Altass, I. A. Zaafarany, M. Salem, A. I. Aly, E. M. Hussein, *Chem. Eng. Commun.* **206** (2019) 137–148.
142. Y. Tang, X. Yang, W. Yang, R. Wan, Y. Chen, X. Yin, *Corros. Sci.* **52** (2010) 1801–1808.
143. J. Tang, Y. Hu, Z. Han, H. Wang, Y. Zhu, Y. Wang, Z. Nie, Y. Wang, *Molecules* **23** (2018).
144. Michael C. Newman, *Fundamentals of Ecotoxicology The Science of Pollution*, in Fifth Edit, 2020, pp. 125–127.
145. European Parliament and the Council of the European Union, *Off. J. Eur. Union* **L 353/1** (2008) 1355.
146. P. Gans, B. O’Sullivan, *Talanta* **51** (2000) 33–37.
147. H. H. Hammud, A. Ghannoum, M. S. Masoud, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **63** (2006) 255–265.
148. M. D. Milošević, N. Prlainović, M. Milčić, V. Nikolić, A. Božić, M. Bigović, A. D. Marinković, *J. Iran. Chem. Soc.* **15** (2018) 2483–2501.
149. F. Weigend, R. Ahlrichs, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **7** (2005) 3297–3305.
150. T. Yanai, D. P. Tew, N. C. Handy, *Chem. Phys. Lett.* **393** (2004) 51–57.
151. J. Tomasi, *Theor. Chem. Acc.* **112** (2004) 184–203.
152. F. W. and J. E. E. R. N. and Z. V. Carpenter, *The Structure of Small Molecules and Ions*, 1988.
153. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, *Gaussian Inc.* (2009) Wallingford CT.
154. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, J. L. Izmaylov, A. F.; Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. Throssell, K; Montgomery, J. A, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J.



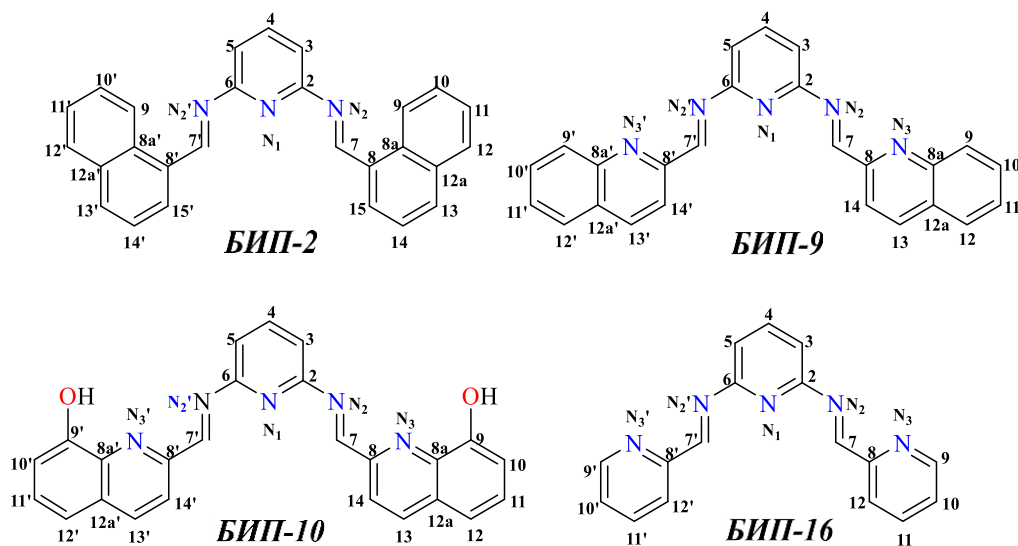
- Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, D. J. Fox, (2016).
155. T. A. Halgren, *J. Comput. Chem.* **20** (1999) 720–729.
  156. A. Pedretti, L. Villa, G. Vistoli, *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **18** (2004) 167–173.
  157. M. Leopoldini, T. Marino, N. Russo, M. Toscano, *J. Phys. Chem. A* **108** (2004) 4916–4922.
  158. E. Rezabal, J. M. Mercero, X. Lopez, J. M. Ugalde, *J. Inorg. Biochem.* **101** (2007) 1192–1200.
  159. Z. Marković, J. Tošović, D. Milenković, S. Marković, *Comput. Theor. Chem.* **1077** (2016) 11–17.
  160. T. Lu, F. Chen, *J. Comput. Chem.* **33** (2012) 580–592.
  161. E. R. Johnson, S. Keinan, P. Mori-Sánchez, J. Contreras-García, A. J. Cohen, W. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010) 6498–6506.
  162. W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *J. Mol. Graph.* **14** (1996) 33–38.
  163. Y. Bourne, H. C. Kolb, Z. Radić, K. B. Sharpless, P. Taylor, P. Marchot, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101** (2004) 1449 LP – 1454.
  164. O. Trott, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **31** (2009) NA-NA.
  165. M. J. Keiser, B. L. Roth, B. N. Armbruster, P. Ernsberger, J. J. Irwin, B. K. Shoichet, *Nat. Biotechnol.* **25** (2007) 197–206.
  166. C. C. De Paola, B. Bennett, R. C. Holz, D. Ringe, G. A. Petsko, *Biochemistry* **38** (1999) 9048–9053.
  167. C. R. Søndergaard, M. H. M. Olsson, M. Rostkowski, J. H. Jensen, *J. Chem. Theory Comput.* **7** (2011) 2284–2295.
  168. J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kalé, K. Schulten, *J. Comput. Chem.* **26** (2005) 1781–1802.
  169. D. Santos-Martins, S. Forli, M. J. Ramos, A. J. Olson, *J. Chem. Inf. Model.* **54** (2014) 2371–2379.
  170. B. P. Gaber, D. S. Goodsell, *J. Mol. Graph. Model.* **17** (1999) 335–336.
  171. G. Wolber, T. Langer, *J. Chem. Inf. Model.* **45** (2005) 160–169.
  172. T. Martin, (2016) 63.
  173. (2020) 1–16.
  174. R. L. Prior, X. Wu, K. Schaich, *J. Agric. Food Chem.* **53** (2005) 4290–4302.
  175. P. N, *J. Med. Plants Res.* **6** (2012) 4790–4795.
  176. M. Fadaeinasab, A. H. A. Hadi, Y. Kia, A. Basiri, V. Murugaiyah, *Molecules* **18** (2013) 3779–3788.
  177. P. Petrović, J. Vunduk, A. Klaus, M. Carević, M. Petković, N. Vuković, A. Cvetković, Žižak, B. Bugarski, *South African J. Bot.* **123** (2019) 152–160.
  178. A. Osmokrovic, I. Jancic, J. Vunduk, P. Petrovic, M. Milenkovic, B. Obradovic, *Carbohydr. Polym.* **196** (2018) 279–288.
  179. A. Klaus, M. Kozarski, J. Vunduk, N. Todorovic, D. Jakovljevic, Z. Zizak, V. Pavlovic, S. Levic, M. Niksic, L. J. L. D. Van Griensven, *Food Res. Int.* **67** (2015) 272–283.
  180. N. Kramer, A. Walzl, C. Unger, M. Rosner, G. Krupitza, M. Hengstschlager, H. Dolznig, *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **752** (2013) 10–24.
  181. I. Baraldi, G. Ginocchetti, U. Mazzucato, A. Spalletti, *Chem. Phys.* **337** (2007) 168–176.
  182. A. Spalletti, **59** (2003) 75–86.
  183. U. Perugia, U. Catania, A. July, (2000) 4005–4012.
  184. E. Kleinpeter, S. Klod, W. D. Rudolf, *J. Org. Chem.* **69** (2004) 4317–4329.
  185. E. Kleinpeter, B. A. Stamboliyska, *Tetrahedron* **65** (2009) 9211–9217.
  186. V. Nummert, M. Piirsalu, V. Mäemets, S. Vahur, I. A. Koppel, *J. Phys. Org. Chem.* **22** (2009) 1155–1165.
  187. J. Oszczapowicz, *Int. J. Mol. Sci.* **6** (2005) 11–17.
  188. A. T. William F. Reynolds, Aabela Gomes, Antonina Maron, Douglas W. MacIntyre, *Can. J. Chem.* **61** (1983) 2376–2384.
  189. R. Apak, M. Özyürek, K. Güçlü, E. Çapanoğlu, *J. Agric. Food Chem.* **64** (2016) 1028–1045.

190. A. R. Božić, N. R. Filipovic, I. T. Novakovic, S. K. Bjelogrić, J. B. Nikolic, S. Drmanic, A. D. Marinkovic, *J. Serbian Chem. Soc.* **82** (2017) 495–508.
191. M. A. Saleh, A. M. El-Gizawy, R. E. L. El-Bassiouny, H. M. Ali, *Ann. Agric. Sci.* **58** (2013) 239–245.
192. J. Pei, C. C. Hsu, R. Zhang, Y. Wang, K. Yu, G. Huang, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **28** (2017) 2454–2461.
193. M. Orhan Puskullu, B. Tekiner, S. Suzen, *Mini-Reviews Med. Chem.* **13** (2013) 365–372.
194. J. Devi, J. Yadav, N. Singh, *Res. Chem. Intermed.* **45** (2019) 3943–3968.
195. Z. Xu, B. Lu, Q. Xiang, Y. Li, S. Li, Y. Lin, J. Pang, *Acta Pharm. Sin. B* **3** (2013) 322–327.
196. E. Espinosa, E. Molins, C. Lecomte, *Chem. Phys. Lett.* (1998).
197. R. Parthasarathi, V. Subramanian, N. Sathyamurthy, *J. Phys. Chem. A* **109** (2005) 843–850.
198. M. Saqib, S. Iqbal, A. Mahmood, R. Akram, *Int. J. Food Prop.* **19** (2016) 745–751.
199. G. A. Dilabio, D. A. Pratt, J. S. Wright, *Chem. Phys. Lett.* **311** (1999) 215–220.
200. Y. Bourne, P. Taylor, Z. Radić, P. Marchot, *EMBO J.* **22** (2003) 1–12.
201. C. Fu, Y. Liu, M. Yu, J. Liu, S. Li, *Int. J. Electrochem. Sci.* **10** (2015) 2014–2025.
202. P. Rodič, I. Milošev, *J. Electrochem. Soc.* **163** (2016) C85–C93.
203. G. K. Gomma, M. H. Wahdan, *Mater. Chem. Phys.* **39** (1995) 209–213.
204. B. M. Prasanna, B. M. Praveen, N. Hebbar, T. V. Venkatesha, H. C. Tandon, *Int. J. Ind. Chem.* **7** (2016) 9–19.
205. T. K. Chaitra, K. N. Mohana, H. C. Tandon, *Int. J. Corros.* **2016** (2016).
206. B. G. Ateya, B. E. El-Anadoulı, F. M. El-Nizamy, *Corros. Sci.* **24** (1984) 509–515.
207. S. Martinez, *Mater. Chem. Phys.* **77** (2003) 97–102.
208. N. Kovačević, A. Kokalj, *Corros. Sci.* **53** (2011) 909–921.
209. A. Kokalj, *Electrochim. Acta* **56** (2010) 745–755.
210. S. K. Saha, A. Dutta, P. Ghosh, D. Sukul, P. Banerjee, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17** (2015) 5679–5690.
211. K. Fukui, T. Yonezawa, H. Shingu, *J. Chem. Phys.* **20** (1952) 722–725.
212. P. Fuentealba, P. Pérez, R. Contreras, *J. Chem. Phys.* **113** (2000) 2544–2551.
213. A. V. Marenich, C. J. Cramer, D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B* **113** (2009) 6378–6396.
214. C. N. R. Rao, R. Venkataraghavan, *Spectrochim. Acta* **18** (1962) 541–547.
215. A. D. Tiwari, A. K. Mishra, S. B. Mishra, B. B. Mamba, B. Maji, S. Bhattacharya, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **79** (2011) 1050–1056.
216. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta* **43** (1996) 1739–1753.
217. V. Calcaterra, Ó. López, J. G. Fernández-Bolaños, G. B. Plata, J. M. Padrón, *Eur. J. Med. Chem.* **94** (2015) 63–72.
218. J. H. Donroe, E. P. Bhatraju, J. I. Tsui, E. J. Edelman, *Curr. Psychiatry Rep.* **22** (2020).
219. S. Domcke, R. Sinha, D. A. Levine, C. Sander, N. Schultz, *Nat. Commun.* **4** (2013).

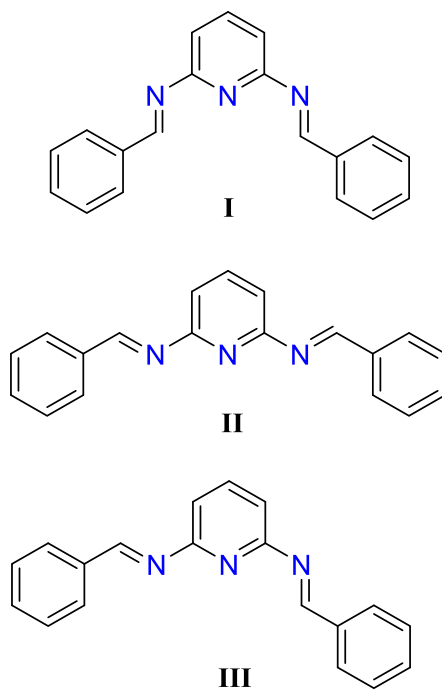
## 7. ПРИЛОГ



Слика П7.1 Нумерација атома једињења **БВПЈ-2**

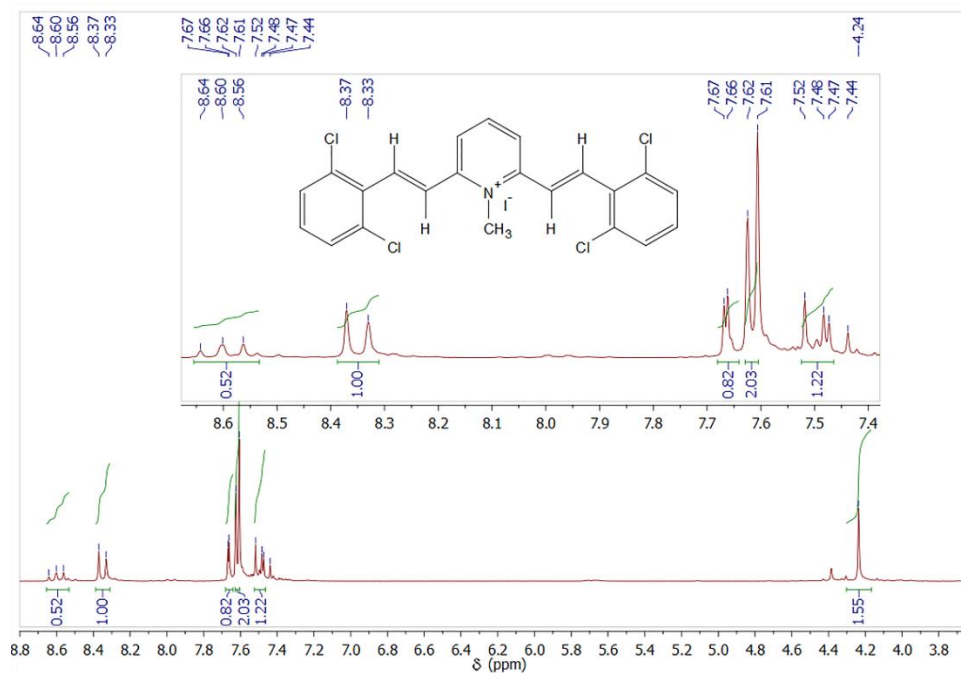


Слика П7.2 Нумерација атома једињења **БВП-2**, **БВП-9**, **БВП-10** и **БВП-16**

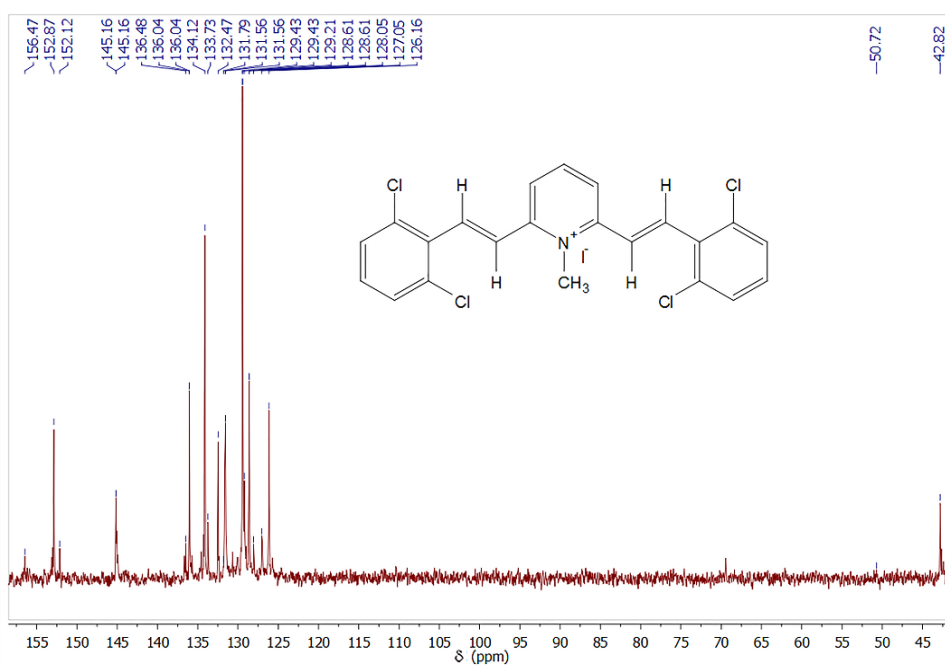


Слика П7.3 Структуре стабилних конформација **БВП-1**: *s-cis/s-cis* (I); *s-trans/s-trans* (II); *s-trans/s-cis* (III)

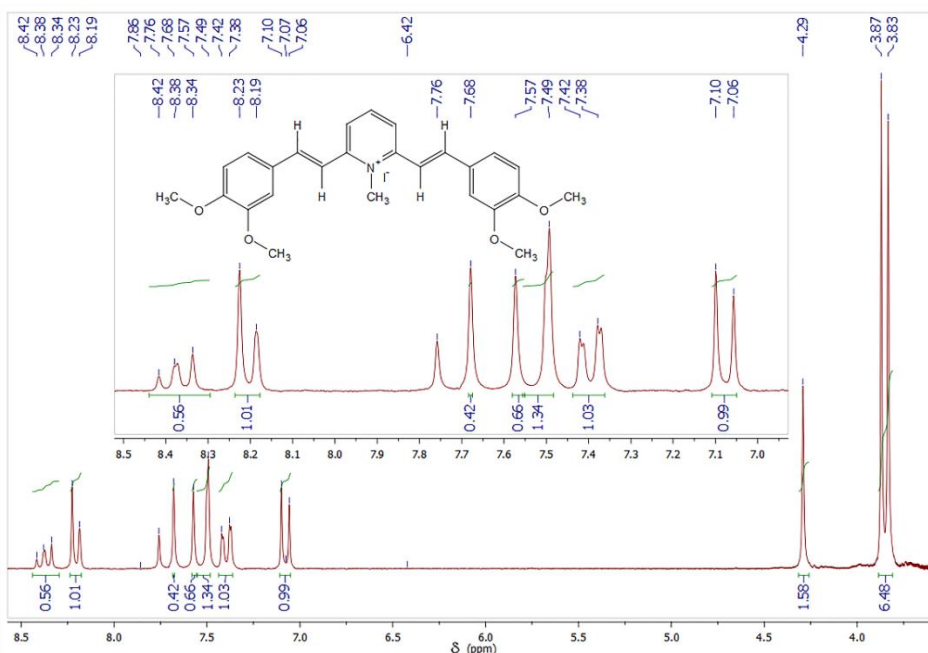
Одбрани  $^1\text{H}$  NMR и  $^{13}\text{C}$  NMR спектри *БВПЈ*



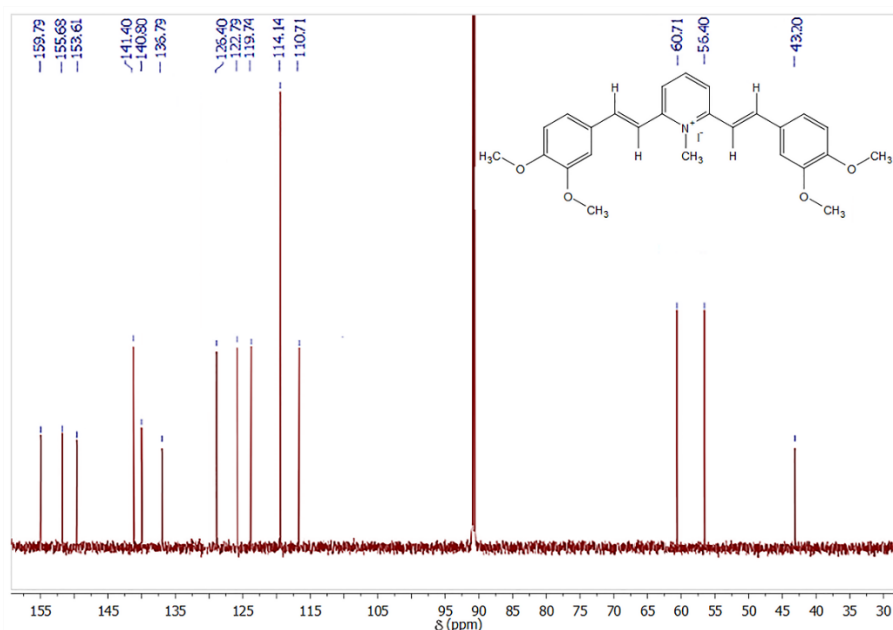
Слика П7.4.  $^1\text{H}$  NMR спектар једињења *БВПЈ-9* у  $\text{DMSO-d}_6$  снимљен на  $25\text{ }^\circ\text{C}$



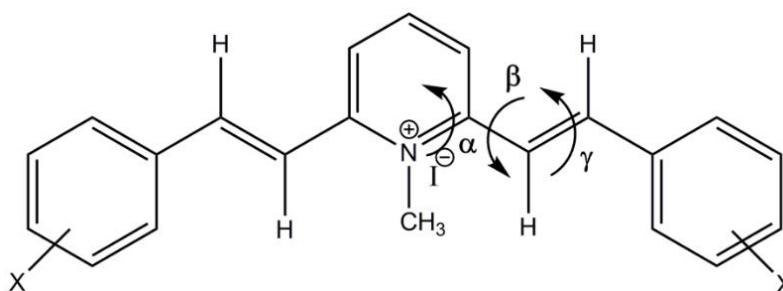
Слика П7.5.  $^{13}\text{C}$  NMR спектар једињења *БВПЈ-9* у  $\text{DMSO-d}_6$  снимљен на  $25\text{ }^\circ\text{C}$



Слика П7.6. <sup>1</sup>H NMR спектар једињења **BBPJ-14** у DMSO-d<sub>6</sub> снимљен на 25 °C



Слика П7.7. <sup>13</sup>C NMR спектар једињења **BBPJ-14** у DMSO-d<sub>6</sub> снимљен на 25 °C



Слика П7.8 Торзиони углови **BBPJ** коришћени у конформационој анализи

**Table П7.1** Геометријски подаци за стабилнији *s-trans/s-trans* изомер **БВПЈ**-а добијен В3LYP/Def2TZVP методом.

Једињења/Параметри	<i>БВПЈ</i> - 1	<i>БВПЈ</i> - 2	<i>БВПЈ</i> - 3	<i>БВПЈ</i> - 4	<i>БВПЈ</i> - 5	<i>БВПЈ</i> - 6	<i>БВПЈ</i> - 7	<i>БВПЈ</i> - 8	<i>БВПЈ</i> - 9	<i>БВПЈ</i> - 10	<i>БВПЈ</i> - 11	<i>БВПЈ</i> - 12	<i>БВПЈ</i> - 13	<i>БВПЈ</i> - 14	<i>БВПЈ</i> - 15
<b>Дужине веза (Å)</b>															
C1-N1	1,476	1,475	1,475	1,476	1,474	1,476	1,476	1,476	1,479	1,478	1,471	1,478	1,474	1,472	1,473
N1-C2(N1-C6)	1,378	1,380	1,379	1,378	1,381	1,378	1,379	1,379	1,375	1,376	1,384	1,376	1,381	1,382	1,381
C2-C7(C6-C7')	1,450	1,448	1,448	1,450	1,446	1,451	1,450	1,450	1,457	1,454	1,441	1,454	1,446	1,445	1,446
C7-C8(C7'-C8')	1,350	1,353	1,352	1,351	1,354	1,350	1,351	1,351	1,345	1,350	1,360	1,348	1,355	1,356	1,355
C8-C9(C8'-C9')	1,450	1,445	1,447	1,450	1,442	1,452	1,448	1,448	1,459	1,452	1,433	1,455	1,441	1,440	1,443
C12-C15(C12'-C15')			1,501												
C11-C15(C11'-C15')				1,505											
C11-O(C11'-O)						1,356								1,356	1,354
C12-O(C12'-O)					1,348								1,341	1,343	1,349
C13-O(C13'-O)															1,356
C12-F(C12'-F)							1,336								
C10-F(C10'-F)										1,346					
C10-Cl (C10'-Cl)									1,745						
C12-Cl(C12'-Cl)								1,729							
C14-Cl(C14'-Cl)									1,748	1,743					
C12-N2(C12'-N2')											1,359	1,483			
<b>Углови веза (<math>\theta</math>)</b>															
C1-N1-C2(C1-N1-C6)	118,8	118,7	118,7	118,7	118,7	118,8	118,8	118,8	118,8	118,8	118,6	118,8	118,7	118,7	118,7
N1-C2-C7(N1-C6-C7')	119,4	119,4	119,4	119,4	119,4	119,4	119,4	119,4	118,9	119,0	119,4	119,3	119,4	119,4	119,4
C2-C7-C8(C6-C7'-C8')	123,5	123,7	123,5	123,5	123,4	123,3	123,5	123,5	122,6	122,2	123,8	123,4	123,6	123,6	123,5
C7-C8-C9(C7'-C8'-C9')	127,6	127,4	127,7	127,5	128,0	127,4	127,7	127,6	129,0	130,9	128,1	127,3	128,0	128,2	128,0
<b>Торзиони углови</b>															
$\alpha$	10,7	11,2	11,0	10,8	11,2	10,7	10,9	10,9	9,9	10,3	11,9	10,4	11,3	11,8	11,6
$\beta$	152,6	154,5	153,5	152,7	154,4	152,2	152,9	153,0	151,1	151,5	157,4	151,0	154,7	155,3	154,8
$\gamma$	177,0	176,7	176,9	176,9	176,7	177,0	176,9	176,9	176,6	177,5	176,3	177,1	176,7	176,2	176,6

**Табела П7.2** Апсорциони максимуми **БВПЈ**-а у изабраним растварачима

Растварач/ Једињење	$\nu_{\max} \times 10^{-3} \text{ (cm}^{-1}\text{)}$														
	<b>БВПЈ</b> <b>-1</b>	<b>БВПЈ</b> <b>-2</b>	<b>БВПЈ</b> <b>-3</b>	<b>БВПЈ</b> <b>-4</b>	<b>БВПЈ</b> <b>-5</b>	<b>БВПЈ</b> <b>-6</b>	<b>БВПЈ</b> <b>-7</b>	<b>БВПЈ</b> <b>-8</b>	<b>БВПЈ</b> <b>-9</b>	<b>БВПЈ</b> <b>-10</b>	<b>БВПЈ</b> <b>-11</b>	<b>БВПЈ</b> <b>-12</b>	<b>БВПЈ</b> <b>-13</b>	<b>БВПЈ</b> <b>-14</b>	<b>БВПЈ</b> <b>15</b>
1-Метил-2-пиролидон (NMP)	26,52	27,35	26,62	27,05	24,86	25,67	21,64	26,44	29,64	30,98	19,99	27,91	24,88	23,87	24,47
1-Пропанол (1-PrOH)	26,66	27,68	26,29	26,83	24,25	25,67	21,22	26,98	29,37	31,28	19,36	28,54	25,17	23,83	24,66
2-Метил-1-пропанол (iBuOH)	26,63	27,42	26,20	26,84	24,38	25,94	21,19	26,94	29,48	31,21	19,34	28,39	25,26	23,79	24,67
2-Метил-2-бутанол (t-AmOH)	26,63	27,38	26,29	27,00	24,65	25,72	21,48	26,84	29,43	31,18	19,71	28,15	25,64	23,81	24,56
2-пропанол (iPrOH)	26,75	27,84	26,28	26,94	24,91	25,59	21,33	26,99	29,84	31,32	20,00	28,66	25,09	23,82	24,64
Ацетон	26,78	27,77	26,47	27,31	26,13	26,17	21,48	26,77	29,63	29,99	20,10	27,85	25,31	23,75	24,51
Ацетонитрил (AcN)	26,66	26,89	26,52	27,11	26,44	26,38	21,82	26,98	29,58	31,14	20,34	27,94	25,25	23,91	24,49
Анизол	26,47	26,66	25,92	26,69	25,68	26,78	21,13	26,61	29,61	29,79	18,98	28,64	24,85	22,80	24,26
1-Бутанол (1-BuOH)	26,61	27,47	26,26	26,89	24,46	25,98	21,16	26,89	29,40	31,29	19,12	28,58	25,50	23,81	24,55
1,4-Диоксан	26,01	27,28	26,52	27,25	24,86	26,47	21,79	26,52	29,64	30,84	20,07	27,99	25,37	23,71	24,53
<i>N,N</i> -Диметилформаид (DMF)	26,78	27,99	26,65	27,24	24,99	25,67	21,61	26,92	29,63	30,99	20,10	27,35	25,08	23,72	24,64
Диметил сулфоксид (DMSO)	26,88	27,92	26,59	27,13	24,95	26,25	21,58	26,89	29,59	31,04	20,02	27,58	25,04	23,73	24,69
Етанол (EtOH)	26,86	27,05	26,29	26,86	24,59	26,20	21,48	26,94	29,57	31,21	20,02	28,64	25,06	23,83	24,68
Етилацетат (EtAc)	26,03	27,67	26,51	27,25	24,30	25,59	21,80	26,75	29,80	30,02	19,99	27,75	25,31	23,74	24,52
Формаид (FA)	26,80	27,47	26,23	26,95	24,61	26,29	21,73	26,94	29,45	31,25	19,86	28,53	25,04	23,79	24,79
Хлороформ (TCM)	26,47	26,87	25,96	26,97	26,52	26,66	21,72	26,75	29,72	30,86	19,00	28,15	24,88	22,80	24,24
Метанол (MeOH)	26,81	27,66	26,11	26,95	24,84	26,07	21,39	26,99	29,70	31,16	20,16	28,55	25,05	23,77	24,69
<i>N,N</i> -Диметилацетаид (DMA)	26,65	27,16	26,55	27,05	24,72	26,21	21,58	26,43	29,64	30,89	19,62	28,72	24,90	23,86	24,51
<i>N</i> -Метилформаид (NMF)	26,80	27,32	26,38	26,93	24,58	25,85	21,55	26,96	29,69	31,58	19,94	28,64	24,96	23,82	24,71
Тетрахидрофуран (THF)	26,84	26,95	26,63	27,10	24,29	25,58	21,82	26,59	29,63	30,86	20,00	28,22	25,29	23,71	24,40

**Табела П7.3** Kamlet–Taft-ови и Catalán-ови параметри растварача

Растварач	Kamlet-Taft				Catalán			
	$\pi^*$	$\beta$	$\alpha$	SP	SdP	SA	SB	
1	1-Метил-2-пиролидон (NMP)	0,92	0,77	0,00	0,812	0,959	0,613	0,024
2	1-Пропанол (1-PrOH)	0,48	0,84	0,98	0,658	0,748	0,782	0,367
3	2-Метил-1-пропанол (iBuOH)	0,40	0,84	0,79	0,657	0,684	0,828	0,311
4	2-Метил-2-бутанол(t-AmOH) <sup>[a]</sup>	0,40	0,93	0,28	-	-	-	-
5	2-Пропанол (iPrOH)	0,48	0,95	0,76	0,633	0,808	0,830	0,283
6	Ацетон	0,71	0,43	0,08	0,651	0,907	0,475	0,000
7	Ацетонитрил (AcN)	0,75	0,40	0,19	0,645	0,974	0,286	0,044
8	Анизол	0,73	0,32	0,00	0,820	0,543	0,299	0,084
9	1-Бутанол (1-BuOH)	0,47	0,84	0,76	0,674	0,655	0,809	0,341
10	1,4-Диоксан	0,55	0,37	0,00	0,737	0,312	0,444	0,000
11	<i>N,N</i> -Диметилформаид (DMF)	0,88	0,69	0,00	0,759	0,977	0,613	0,031
12	Диметил сулфоксид (DMSO)	1,00	0,76	0,00	0,830	1,000	0,647	0,072
13	Етанол (EtOH)	0,54	0,75	0,86	0,633	0,783	0,658	0,400
14	Етил ацетат (EtAc)	0,55	0,45	0,00	0,656	0,603	0,542	0,000
15	Формаид (FA)	0,97	0,48	0,71	0,814	1,006	0,414	0,549
16	Хлороформ (ТСМ)	0,58	0,10	0,20	0,783	0,614	0,071	0,047
17	Метанол (MeOH)	0,60	0,66	0,98	0,608	0,904	0,545	0,605
18	<i>N,N</i> -Диметилацетаид (DMA)	0,88	0,76	0,00	0,763	0,987	0,650	0,028
19	<i>N</i> -Метилформаид (NMF)	0,90	0,80	0,62	0,814	1,007	0,414	0,549
20	Тетрахидрофуран (THF)	0,51	0,54	0,00	0,714	0,634	0,591	0,000
21	2-Пиролидон <sup>[б]</sup>	0,46	0,53	1,28	-	-	-	-
22	2-Бутанол (2-BuOH) <sup>[б]</sup>	0,40	0,80	0,69	-	-	-	-
23	Дихлорметан (DCM) <sup>[б]</sup>	0,82	0,10	0,13	-	-	-	-
24	Трихлоретилен (ТСЕ) <sup>[б]</sup>	0,00	0,005	0,53	-	-	-	-

[a] Catalán-ов параметар за 2-Метил-2-бутанол (t-AmOH) није познат

[б] Catalán-ови параметари нису коришћејни за анализу **БВП** једињења

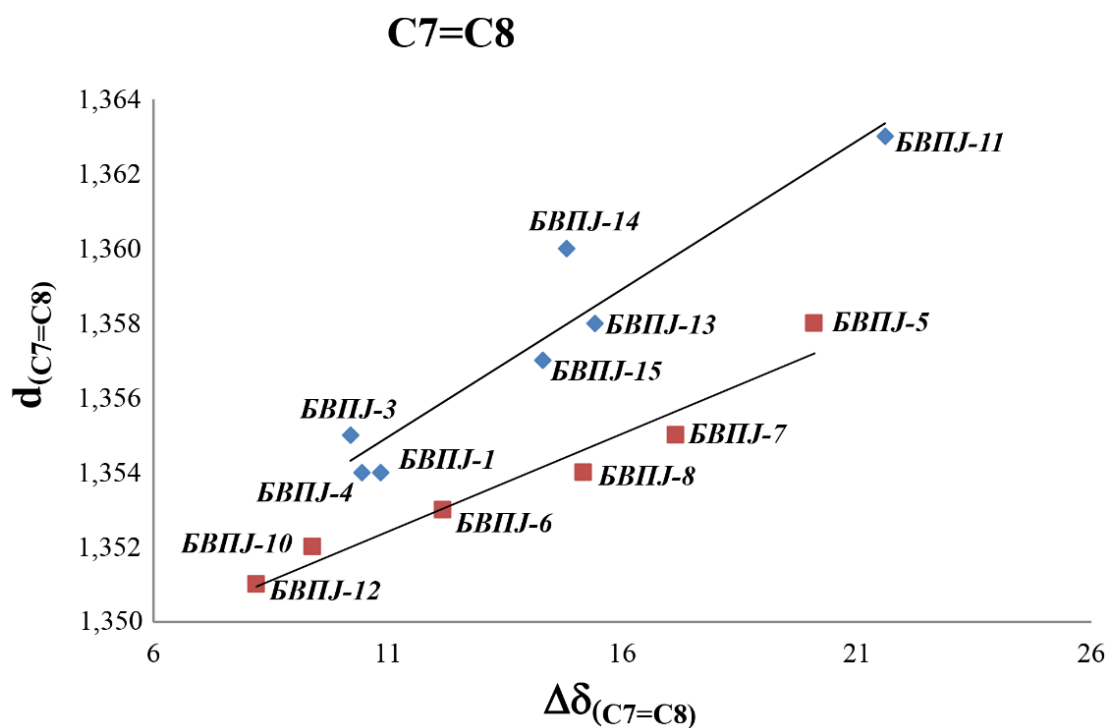
**Табела П7.4** Израчунате енергије НОМО и LUMO орбитала и  $E_{\text{gap}}$  за *s-trans/s-trans* изомер испитиваних **БВПЈ** једињења

Једињење	НОМО (eV)	LUMO (eV)	$E_{\text{gap}}$ (eV)
<b>БВПЈ-1</b>	-7,6987	-1,9657	5,7330
<b>БВПЈ-2</b>	-7,3667	-2,0199	5,3468
<b>БВПЈ-3</b>	-7,5002	-1,9135	5,5866
<b>БВПЈ-4</b>	-7,6484	-1,9436	5,7048
<b>БВПЈ-5</b>	-7,2515	-1,8441	5,4074
<b>БВПЈ-6</b>	-7,6626	-1,9775	5,6851
<b>БВПЈ-7</b>	-7,6414	-1,9597	5,6817
<b>БВПЈ-8</b>	-7,6663	-2,0440	5,6223
<b>БВПЈ-9</b>	-8,0700	-2,0936	5,9764
<b>БВПЈ-10</b>	-7,9354	-2,1096	5,8258
<b>БВПЈ-11</b>	-6,5176	-1,6938	4,8239
<b>БВПЈ-12</b>	-8,1247	-2,4459	5,6788
<b>БВПЈ-13</b>	-7,1859	-1,8420	5,3439
<b>БВПЈ-14</b>	-7,0743	-1,8838	5,1904
<b>БВПЈ-15</b>	-7,1792	-1,9174	5,2618

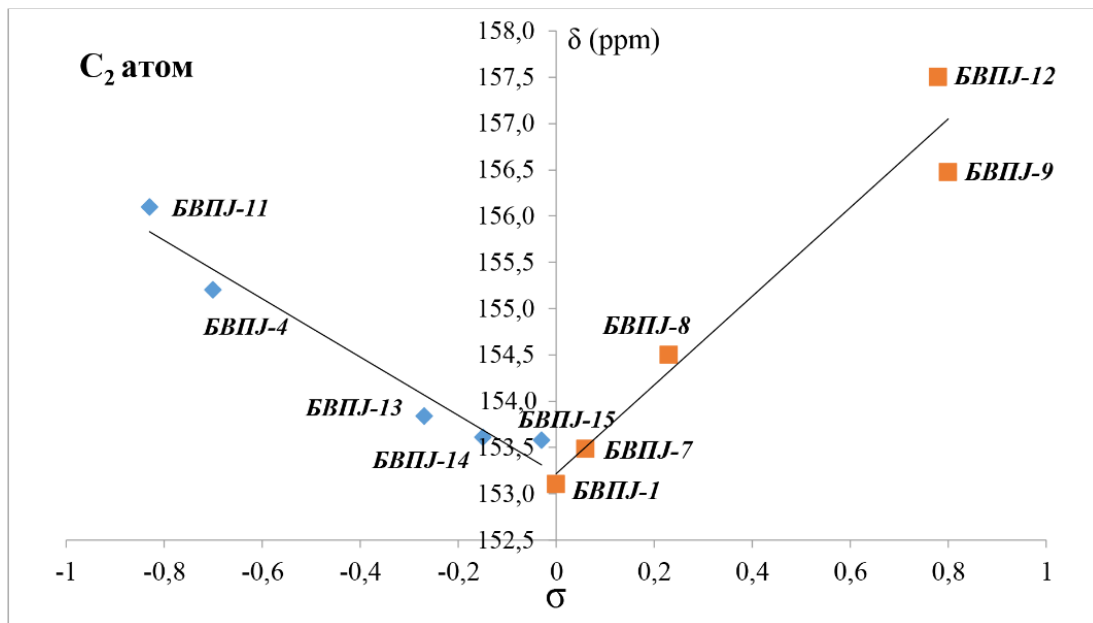


**Table П7.5** Изабрана  $^{13}\text{C}$  NMR хемијска померања ( $\delta$ , ppm) и вредности  $\Delta\delta_{\text{C7=C8}}$  **БВПЈ** једињења

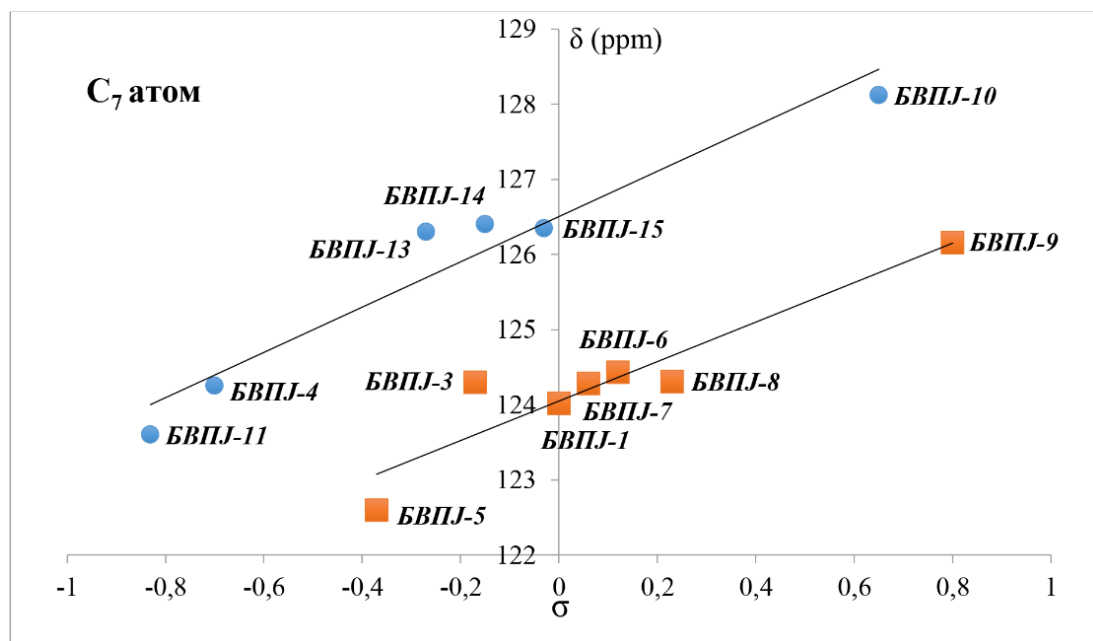
Једињење	$\delta_{\text{C7}}$	$\delta_{\text{C8}}$	$\Delta\delta_{\text{C7=C8}}$
<b>БВПЈ-1</b>	124,02	134,87	10,85
<b>БВПЈ-2</b>	124,50	134,60	10,10
<b>БВПЈ-3</b>	124,30	134,50	10,20
<b>БВПЈ-4</b>	124,25	134,70	10,45
<b>БВПЈ-5</b>	122,60	142,70	20,10
<b>БВПЈ-6</b>	124,43	136,61	12,18
<b>БВПЈ-7</b>	124,28	141,43	17,15
<b>БВПЈ-8</b>	124,31	139,48	15,17
<b>БВПЈ-9</b>	126,16	136,48	10,32
<b>БВПЈ-10</b>	128,12	137,52	9,40
<b>БВПЈ-11</b>	123,60	145,20	21,60
<b>БВПЈ-12</b>	124,60	132,80	8,20
<b>БВПЈ-13</b>	126,30	141,71	15,41
<b>БВПЈ-14</b>	126,40	141,21	14,81
<b>БВПЈ-15</b>	126,35	140,65	14,30



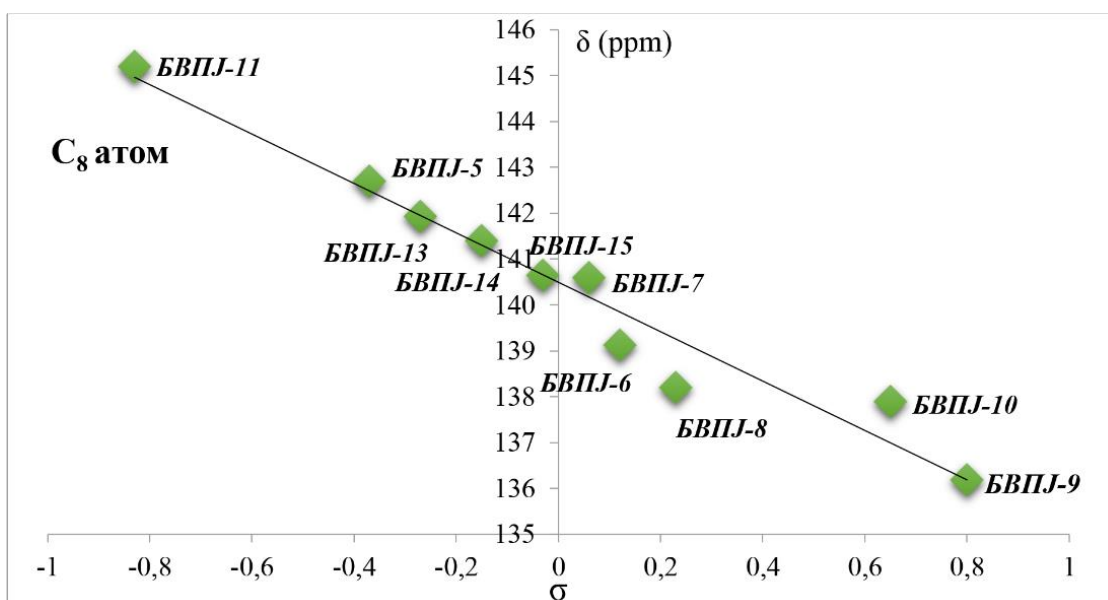
**Слика П7.9** Корелациони резултати дужине двоструке везе  $d_{\text{(C7=C8)}}$  у односу на хемијске помаке  $\Delta\delta_{\text{(C7=C8)}}$  који се користе за процену „push-pull” ефекта



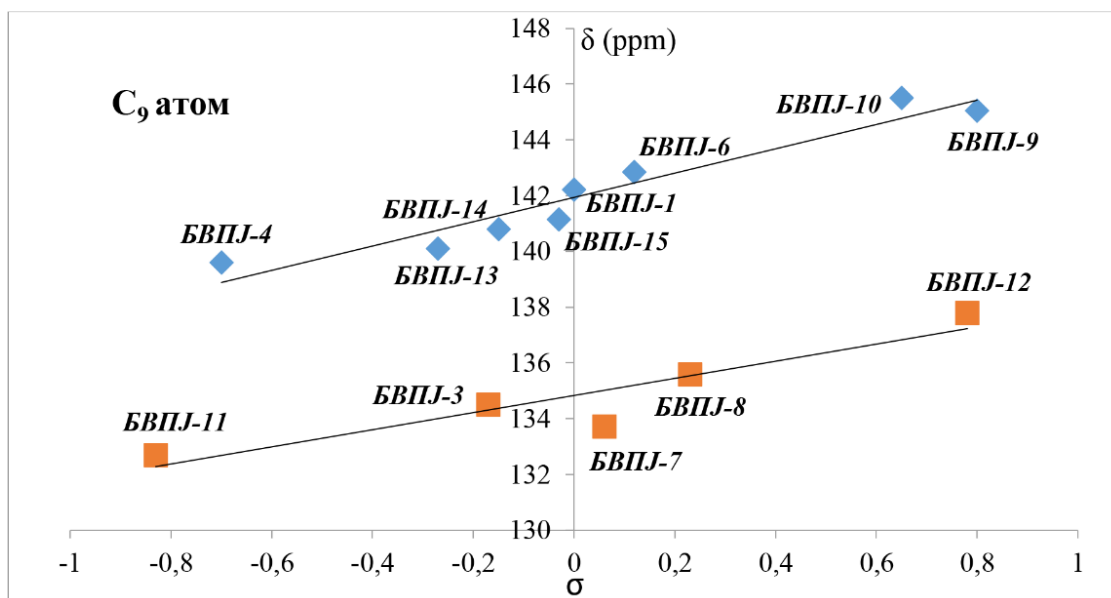
Слика П7.10 Корелације <sup>13</sup>C NMR хемијских померања атома угљеника C<sub>2</sub> за испитивана једињења



Слика П7.11 Корелације <sup>13</sup>C NMR хемијских померања атома угљеника C<sub>7</sub> за испитивана једињења



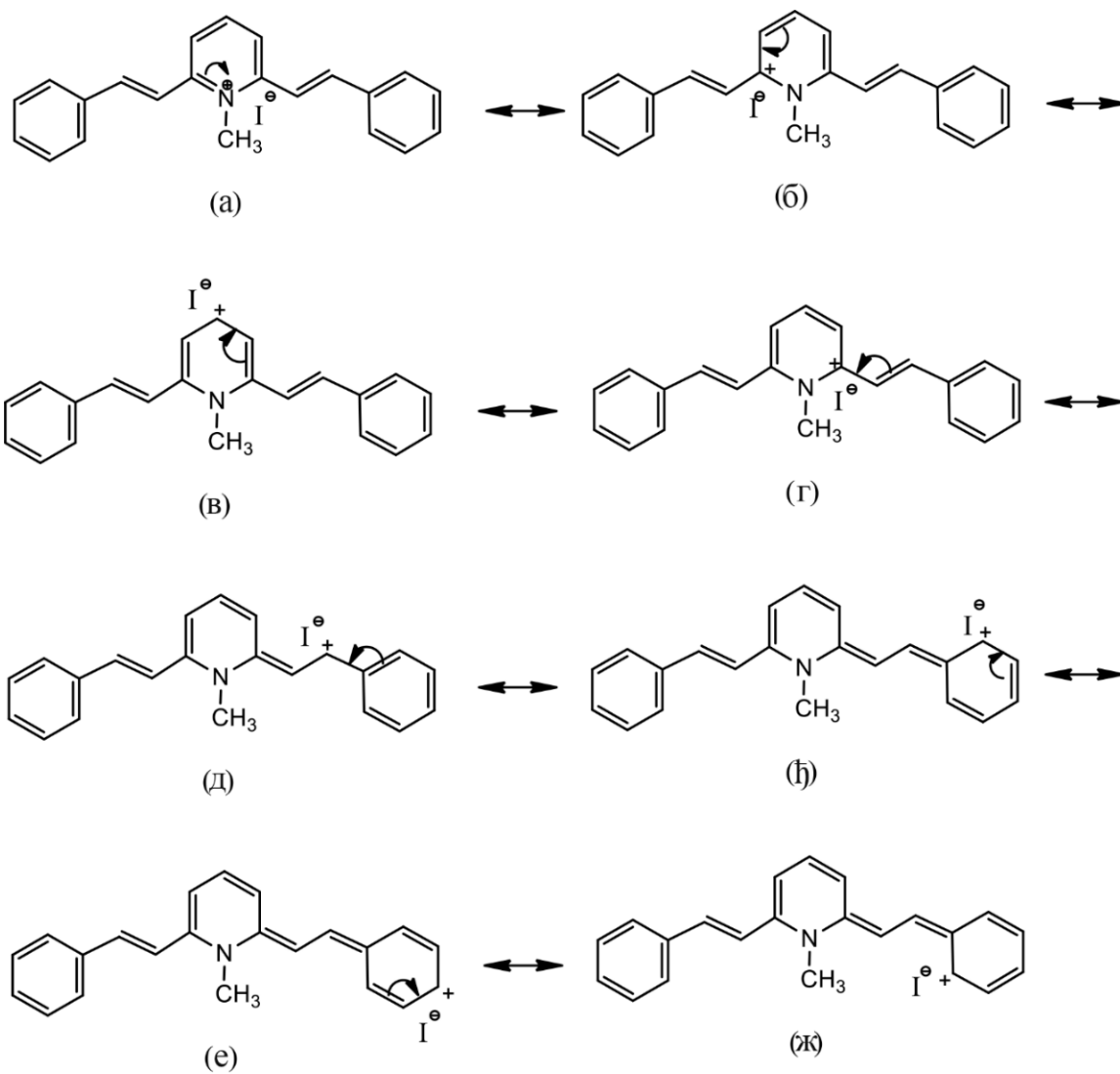
Слика П7.12 Корелације  $^{13}\text{C}$  NMR хемијских померања атома угљеника  $\text{C}_8$  за испитивана једињења



Слика П7.13 Корелације  $^{13}\text{C}$  NMR хемијских померања атома угљеника  $\text{C}_9$  за испитивана једињења

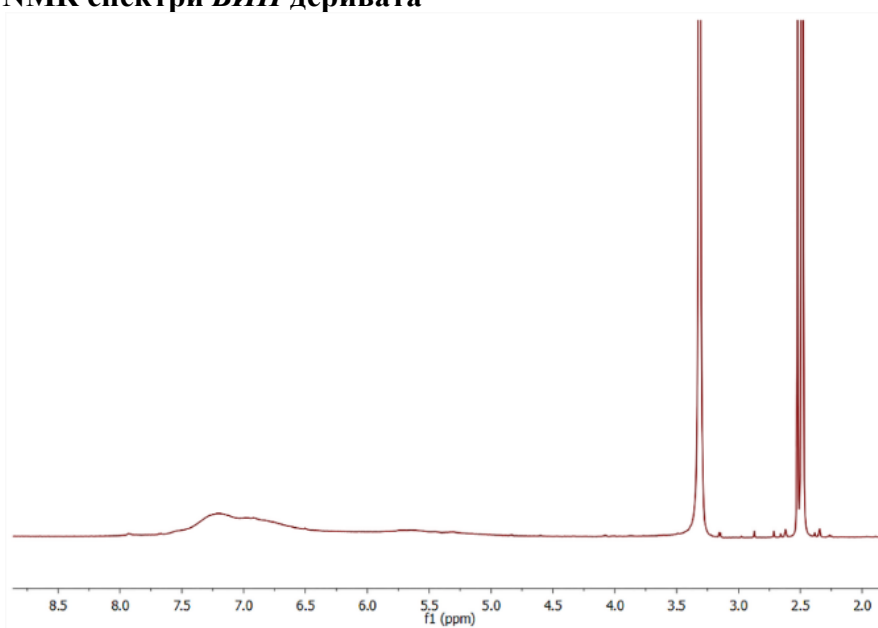
Табела П7.6 Hammett- ови параметри супституената

Супституент	$\sigma_p$	Супституент	$\sigma_p$	Супституент	$\sigma_p$
H	0	2-OH	-0,20	4-NO <sub>2</sub>	0,78
1-нафтил	-	4-F	0,06	4-OCH <sub>3</sub>	-0,27
2-нафтил	-	4-Cl	0,23	3,4-(OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-0,15
4-CH <sub>3</sub>	-0,17	2,6-diCl	0,80	3,4,5-(OCH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	-0,03
3-CH <sub>3</sub>	-0,7	2-Cl, 6-F	0,65	2-хинолил	0,75
4-OH	-0,37	4-Br	0,23	8-хидрокси-2-хинолил	-
3-OH	0,12	4-N,N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-0,83	2-пиридил	-

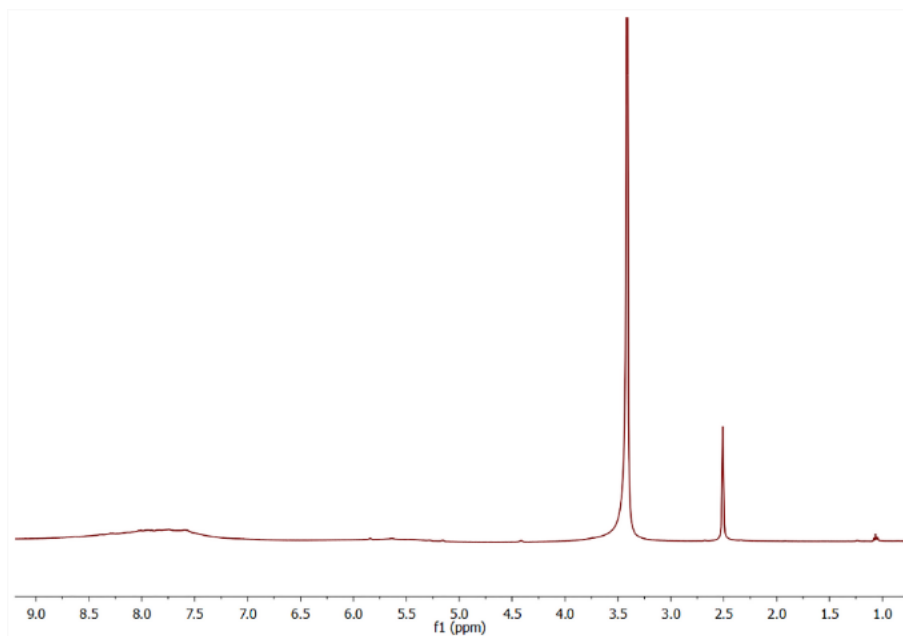


Слика П7.14 Резонанционе структуре за несупституисано једињење **БВПЈ-1**

Одабрани  $^1\text{H}$  NMR спектри **БВП** деривата



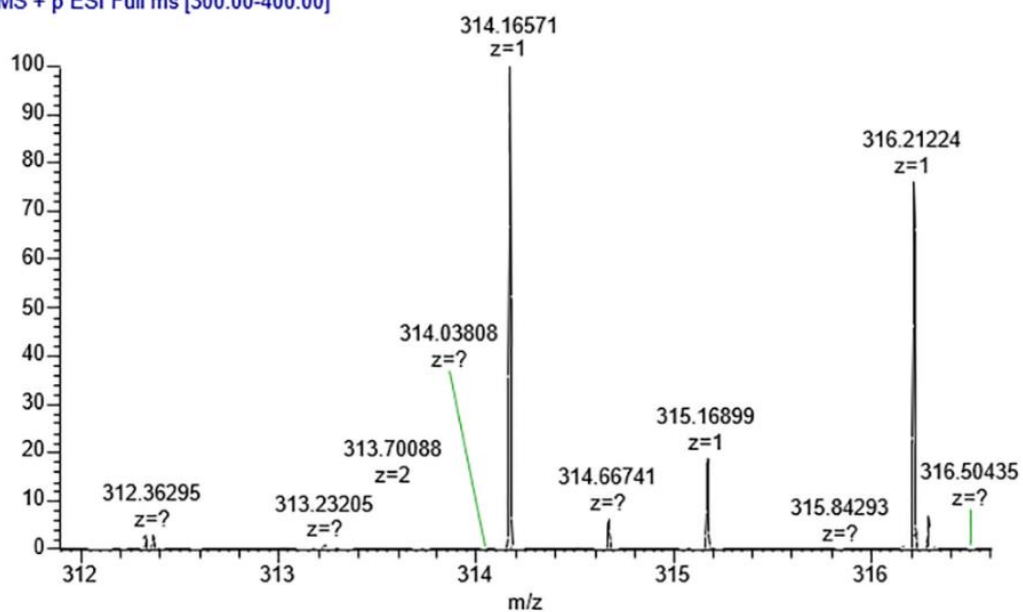
Слика П7.15  $^1\text{H}$  NMR спектар једињења **БВП-11**



Слика П7.16  $^1\text{H}$  NMR спектар једињења **БИП-14**

Одабрани HRMS спектри **БИП**

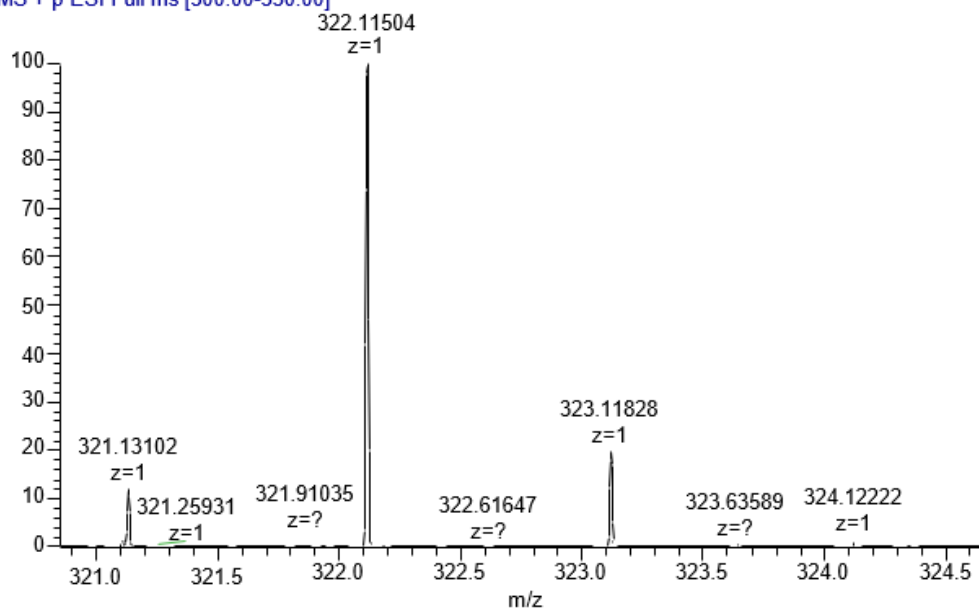
OB6618 #1-44 RT: 0.00-0.49 AV: 44 NL: 2.02E5 T:  
FTMS + p ESI Full ms [300.00-400.00]



Exact mass	Observed m/z	Error (ppm)
$[\text{M}+\text{H}]^+$ 314.16572	314.16571	0.04

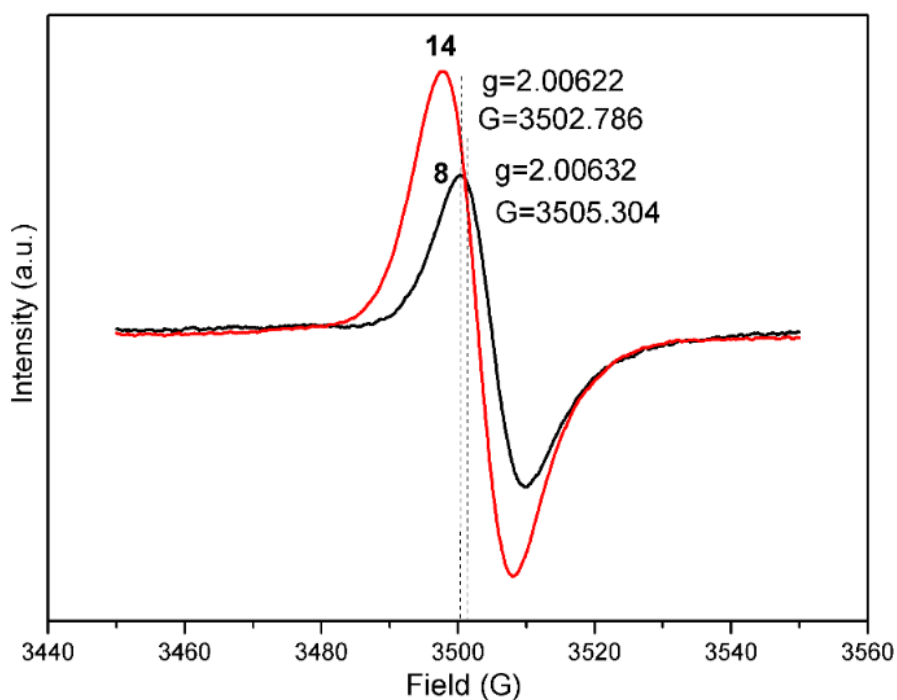
Слика П7.17 HRMS спектар једињења **БИП-3**

OB6617 #1-42 RT: 0.00-0.50 AV: 42 NL: 3.55E5 T:  
 FTMS + p ESI Full ms [300.00-350.00]



Exact mass	Observed m/z	Error (ppm)
[M+H] <sup>+</sup> 322.11558	322.11504	1.67

Слика П7.18. HRMS спектар једињења *БИП-12*



Слика П7.19 ESR спектар *БИП-8* и *БИП-14*

**Табела П7.7** Геометријски подаци **БИП** добијени геометријском оптимизацијом на нивоу DFT користећи  $\omega$ B97XD/6-311++g(d,p)

Једињења/Параметри	БИП- 1	БИП- 2	БИП- 3	БИП- 4	БИП- 5	БИП- 6	БИП- 7	БИП- 8	БИП- 9	БИП- 10	БИП- 11	БИП- 12	БИП- 13	БИП- 14	БИП- 15	БИП- 16
<b>Дужине веза (Å°)</b>																
C <sub>2</sub> -N <sub>1</sub> (C <sub>6</sub> -N <sub>1</sub> )	1,331	1,330	1,331	1,332	1,331	1,329	1,331	1,331	1,330	1,330	1,331	1,331	1,331	1,332	1,330	1,331
C <sub>2</sub> -N <sub>2</sub> (C <sub>6</sub> -N <sub>2</sub> )	1,408	1,409	1,407	1,406	1,407	1,408	1,407	1,407	1,411	1,411	1,408	1,408	1,408	1,405	1,409	1,408
N <sub>2</sub> -C <sub>7</sub> (N <sub>2</sub> '-C <sub>7</sub> ')	1,272	1,272	1,273	1,274	1,272	1,285	1,272	1,274	1,268	1,268	1,272	1,272	1,272	1,276	1,271	1,268
C <sub>7</sub> -C <sub>8</sub> (C <sub>7</sub> '-C <sub>8</sub> ')	1,468	1,467	1,465	1,462	1,466	1,447	1,469	1,462	1,480	1,479	1,467	1,466	1,467	1,457	1,471	1,478
C <sub>11</sub> -CH <sub>3</sub> (C <sub>11</sub> '-CH <sub>3</sub> ')			1,505													
C <sub>9</sub> -O(C <sub>9</sub> '-O')						1,331										
C <sub>10</sub> -O(C <sub>10</sub> '-O')					1,357		1,357									
C <sub>11</sub> -O(C <sub>11</sub> '-O')				1,351	1,365			1,354								
C <sub>12</sub> -O(C <sub>12</sub> '-O')					1,370											
C <sub>11</sub> -Cl (C <sub>11</sub> '-Cl')											1,746					
C <sub>11</sub> -F(C <sub>11</sub> '-F')												1,340				
C <sub>11</sub> -Br(C <sub>11</sub> '-Br')													1,467			
C <sub>11</sub> -N <sub>3</sub> (C <sub>11</sub> '-N <sub>3</sub> ')														1,373	1,477	
<b>Углови веза (θ)</b>																
C <sub>2</sub> -N <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	118,7	118,9	118,7	118,7	118,7	118,8	118,7	118,8	118,6	118,7	118,6	118,7	118,6	118,9	118,5	118,5
N <sub>1</sub> -C <sub>2</sub> -N <sub>2</sub> (N <sub>1</sub> -C <sub>6</sub> -N <sub>2</sub> )	119,9	120,5	119,9	119,9	119,9	119,9	119,8	120,0	120,8	120,8	119,8	119,8	119,8	119,9	119,7	120,1
C <sub>2</sub> -N <sub>2</sub> -C <sub>7</sub> (C <sub>6</sub> -N <sub>2</sub> '-C <sub>7</sub> ')	118,2	118,6	118,1	118,1	118,1	119,6	118,1	118,2	118,4	118,4	118,2	118,2	118,2	117,9	118,3	118,0
N <sub>2</sub> -C <sub>7</sub> -C <sub>8</sub> (N <sub>2</sub> '-C <sub>7</sub> '-C <sub>8</sub> ')	122,1	122,1	122,3	122,3	122,2	122,0	122,2	122,3	122,4	122,6	122,0	122,1	121,9	122,7	121,6	122,5
<b>Торзиони углови (θ)</b>																
α	-24,6	14,2	-24,8	25,4	25,2	10,7	-25,8	24,3	16,1	-16,5	24,6	-24,9	24,7	25,7	24,5	25,8
β	178,9	-178,9	178,9	-178,8	-178,9	-179,3	178,7	-178,8	-179,7	179,7	-179,0	178,8	-179,0	-178,5	-179,0	-179,1
χ	178,4	177,3	178,1	-177,6	-178,1	179,8	178,4	-178,5	178,6	-178,4	-178,1	178,2	-178,1	-177,5	-178,3	-178,6

**Табела П7.8** Апсорциони максимуми **БИП**-а у изабраним растварачима

Растварач/ Једињење	$\nu_{\max} \times 10^{-3} \text{ (cm}^{-1}\text{)}$															
	<b>БИП</b> <b>-1</b>	<b>БИП</b> <b>-2</b>	<b>БИП</b> <b>-3</b>	<b>БИП</b> <b>-4</b>	<b>БИП</b> <b>-5</b>	<b>БИП</b> <b>-6</b>	<b>БИП</b> <b>-7</b>	<b>БИП</b> <b>-8</b>	<b>БИП</b> <b>-9</b>	<b>БИП</b> <b>-10</b>	<b>БИП</b> <b>-11</b>	<b>БИП</b> <b>-12</b>	<b>БИП</b> <b>-13</b>	<b>БИП</b> <b>-14</b>	<b>БИП</b> <b>-15</b>	<b>БИП</b> <b>-16</b>
1-Метил-2-пиролидон (NMP)	30,43	30,96	30,67	30,58	31,15	31,25	30,93	31,36	31,65	31,55	30,39	30,30	30,88	30,77	30,74	30,71
2-Пиролидон	29,42	30,67	30,67	30,86	31,25	31,55	31,61	31,65	31,65	31,55	25,71	30,21	32,67	30,67	31,05	30,24
1-Пропанол (1-PrOH)	29,36	30,17	29,41	31,28	32,55	30,77	30,71	31,73	30,93	30,85	28,16	29,94	30,55	29,52	30,70	30,32
2-Пропанол (iPrOH)	29,43	29,94	28,65	31,06	32,22	30,35	30,22	31,66	30,49	30,51	28,49	29,41	30,06	29,76	30,30	30,15
2-Метил-1-пропанол (iBuOH)	29,49	30,12	28,99	30,30	31,65	30,35	30,23	31,51	30,67	30,61	27,10	29,12	30,77	29,33	30,58	30,06
1-Бутанол (1-BuOH)	29,54	30,15	29,43	30,67	32,45	30,15	30,40	31,55	30,83	30,84	28,49	29,87	30,22	29,50	30,53	30,03
2-Бутанол (2-BuOH)	29,62	30,49	28,90	30,96	32,95	30,25	30,18	31,40	30,77	30,67	28,57	29,59	30,67	29,94	30,77	30,96
Етанол (EtOH)	29,41	30,40	30,77	31,45	31,95	30,35	30,96	31,65	31,35	31,36	28,65	29,67	30,96	29,94	30,76	30,86
Метанол (MeOH)	29,76	30,44	29,78	32,26	32,02	30,30	31,35	31,65	31,24	31,32	27,91	29,94	30,30	29,67	30,99	30,18
Анизол	30,83	31,35	30,86	31,25	30,35	31,33	31,21	30,77	31,65	31,60	30,67	30,49	29,96	29,46	29,13	29,57
Ацетонитрил (AcN)	30,40	30,88	31,06	31,85	31,45	31,55	31,45	31,06	31,45	31,32	25,71	30,58	26,46	30,49	30,79	27,25
Ацетон	30,86	30,96	29,85	29,94	30,86	30,96	30,96	30,86	31,15	31,20	26,38	29,96	29,85	29,94	29,74	30,25
1,4-Диоксан	30,71	31,25	30,77	31,06	30,17	31,45	30,57	30,64	31,65	31,62	30,67	29,58	29,75	31,06	29,75	30,62
Тетрахидрофуран (THF)	30,52	30,50	29,95	29,24	30,48	30,40	30,13	30,76	30,77	30,70	29,16	29,70	29,55	30,42	29,19	30,82
Етилацетат (EtAc)	30,63	28,49	28,25	28,25	30,33	31,06	30,42	30,72	28,90	28,81	29,24	29,01	26,65	29,76	29,41	30,86
<i>N,N</i> -Диметилформаид (DMF)	30,49	30,96	30,67	30,96	31,25	31,35	30,96	31,25	31,65	31,65	30,49	30,30	30,67	30,86	30,71	30,95
Диметил сулфоксид (DMSO)	30,50	30,49	30,49	30,58	30,96	31,49	31,20	31,43	31,55	31,62	30,12	30,03	30,30	30,21	30,87	30,58
Формаид (F)	30,15	30,21	28,74	35,21	31,35	31,55	32,52	31,67	30,86	30,76	29,41	30,41	32,96	28,74	31,48	30,15
<i>N,N</i> -Диметилацетаид (DMA)	30,43	30,96	30,67	30,96	31,35	31,35	30,83	31,32	31,65	31,64	30,48	30,30	29,39	30,77	30,68	31,15
Хлороформ (TCM)	30,83	31,45	30,96	31,15	30,45	31,55	31,42	30,57	31,55	31,65	29,76	30,58	30,06	30,77	29,25	31,70
Дихлорметан (DCM)	30,96	31,50	30,72	31,35	30,86	31,65	32,06	30,75	31,65	31,75	27,85	30,77	30,15	30,86	29,15	31,50
Трихлоретилен (TCE)	30,43	30,64	29,87	28,82	30,75	31,65	30,26	30,17	30,39	31,39	26,39	27,62	30,11	30,12	29,86	31,64

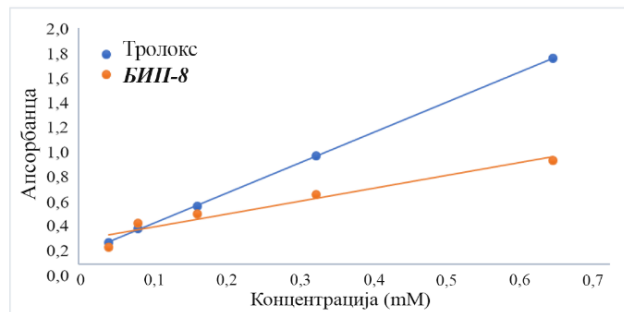
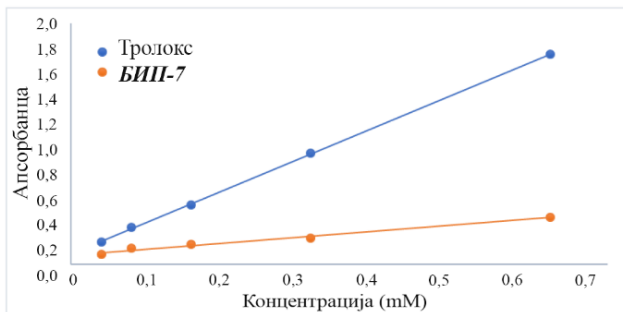
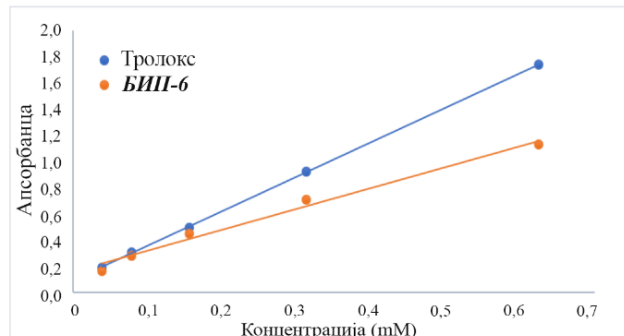
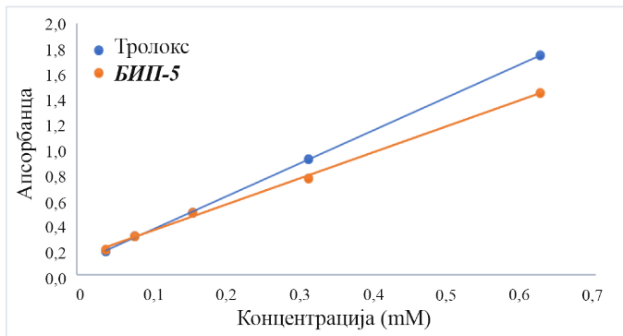
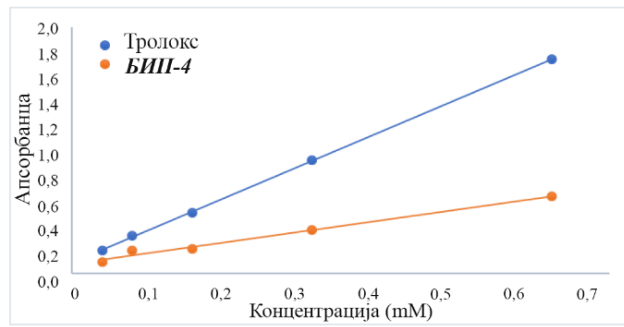
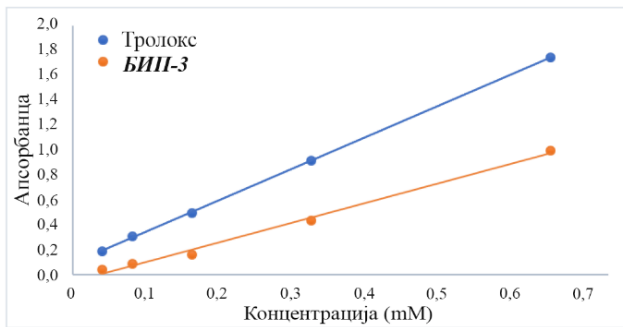
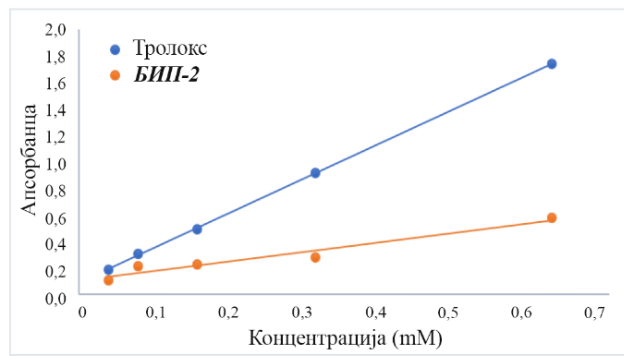
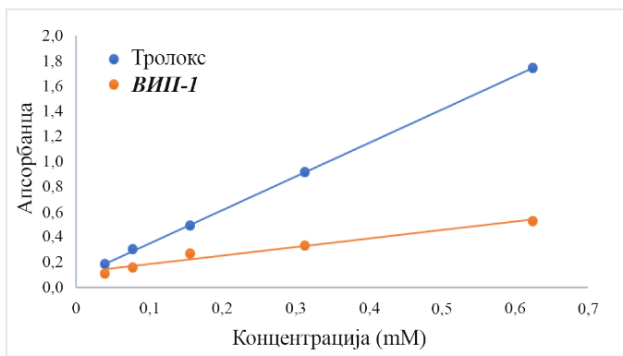


**Табела П7.9** Израчунате енергије НОМО и LUMO орбитала и  $E_{\text{gap}}$  за **БИП** једињења

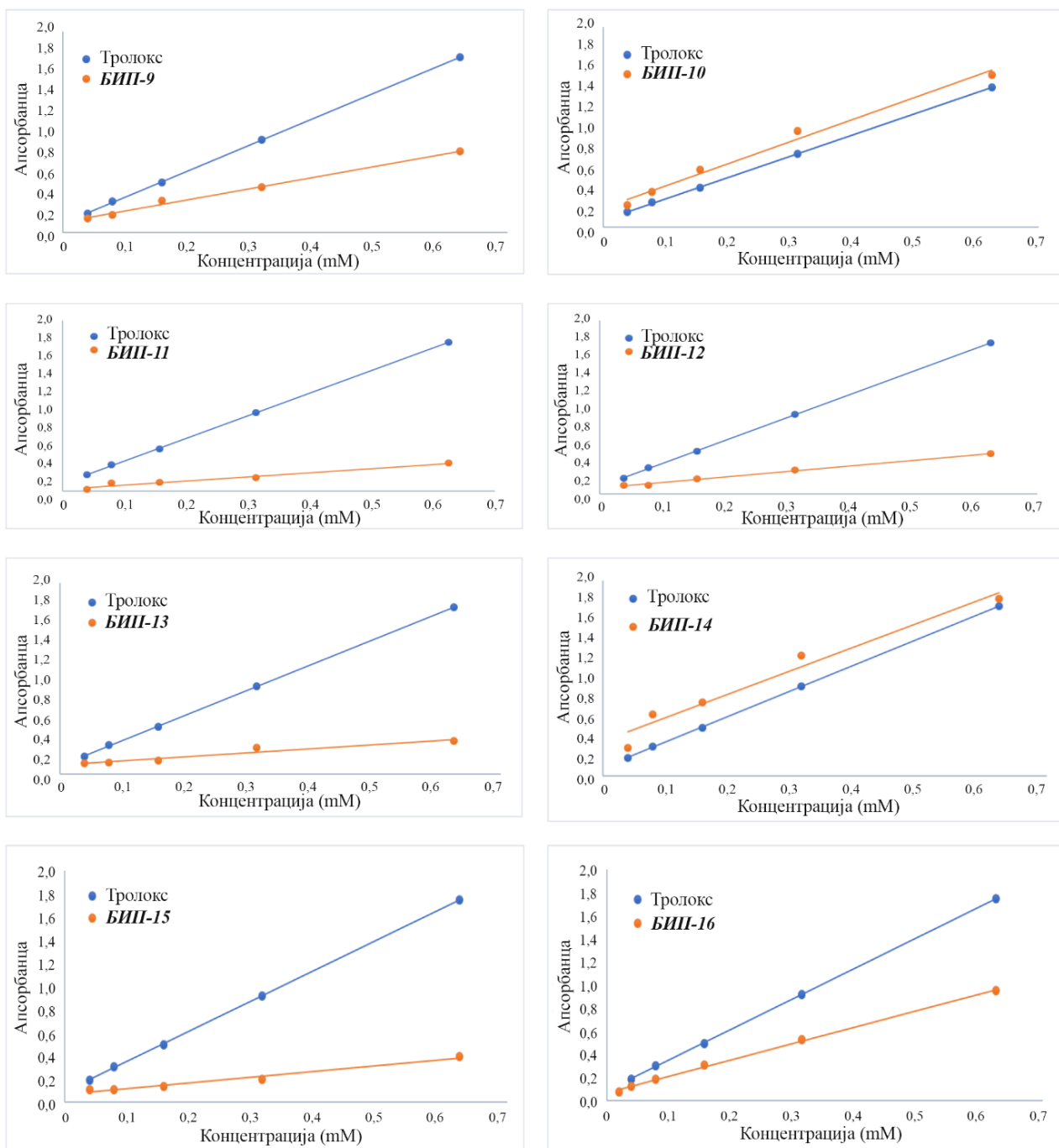
Молекул	НОМО (eV)	LUMO (eV)	$E_{\text{gap}}$ (eV)
<b>БИП-1</b>	-8,05784	-0,33742	7,72042
<b>БИП-2</b>	-7,79579	-0,60899	7,18680
<b>БИП-3</b>	-7,88233	-0,21497	7,66736
<b>БИП-4</b>	-7,65021	-0,07048	7,57974
<b>БИП-5</b>	-7,87280	-0,25824	7,61457
<b>БИП-6</b>	-8,06083	-0,73770	7,32313
<b>БИП-7</b>	-8,06491	-0,36763	7,69729
<b>БИП-8</b>	-7,74273	-0,15483	7,58790
<b>БИП-9</b>	-8,12396	-0,83403	7,28993
<b>БИП-10</b>	-7,93457	-0,95104	6,98353
<b>БИП-11</b>	-8,21240	-0,59239	7,62001
<b>БИП-12</b>	-8,15308	-0,44327	7,70981
<b>БИП-13</b>	-8,20641	-0,61471	7,59171
<b>БИП-14</b>	-6,98952	0,23239	7,22191
<b>БИП-15</b>	-8,77404	-1,54561	7,22844
<b>БИП-16</b>	-8,17512	0,48844	8,66357

**Табела П7.10** Једначине калибрационе криве, Пирсонов (*eng.* Pearson's) корелациони коефицијент (R) и моларна апсорптивност ( $\epsilon$ ) испитиваних једињења

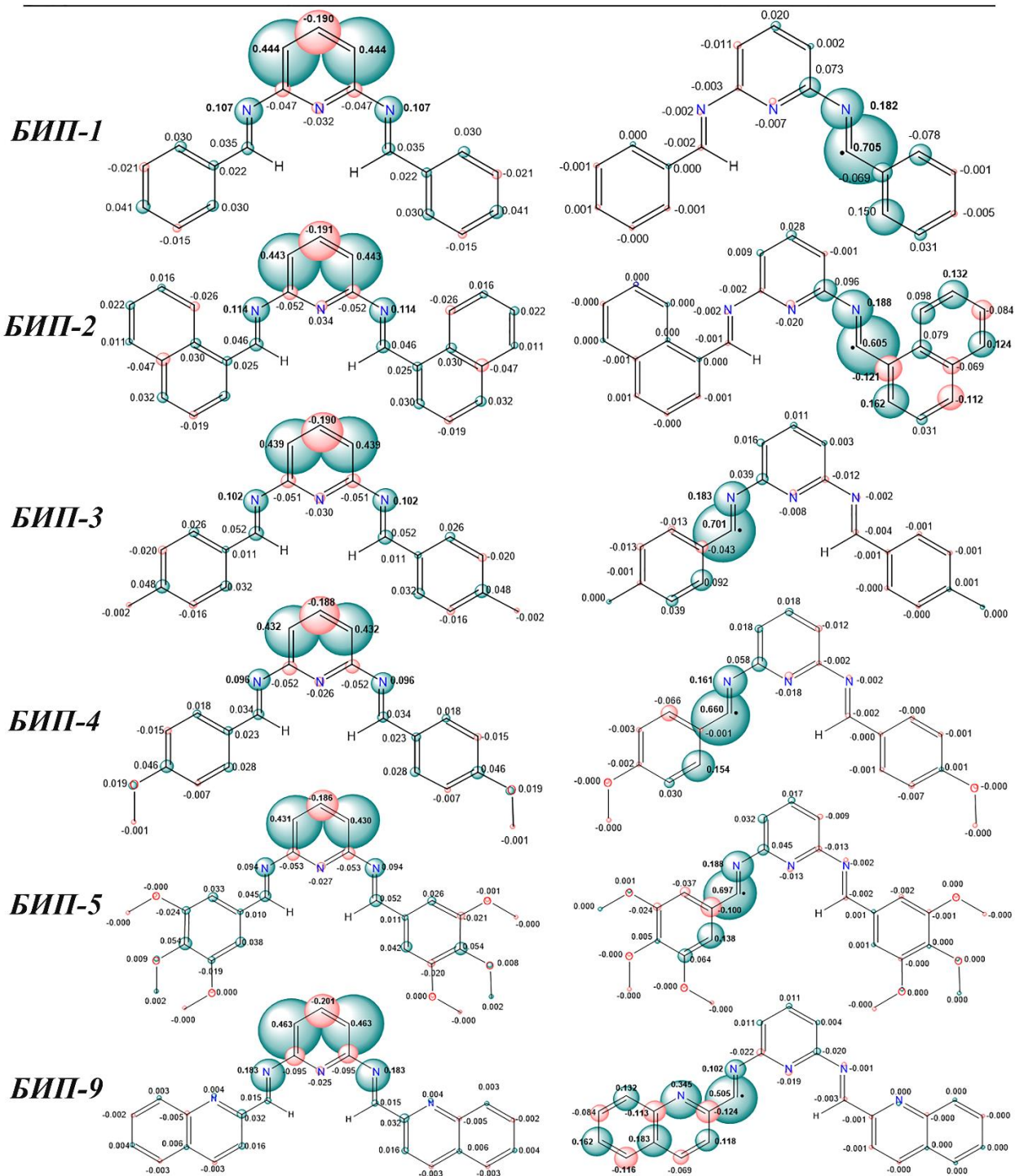
Једињење/ Стандард	Калибрациона једначина	R	$\epsilon$ (L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
<b>БИП-1</b>	$y = 0,6808x + 0,1189$	0,970	0,681
<b>БИП-2</b>	$y = 0,7265x + 0,1073$	0,949	0,727
<b>БИП-3</b>	$y = 1,6524x + 0,0556$	0,994	1,652
<b>БИП-4</b>	$y = 0,8724x + 0,0827$	0,989	0,872
<b>БИП-5</b>	$y = 2,0908x + 0,1380$	0,998	2,091
<b>БИП-6</b>	$y = 1,6031x + 0,1580$	0,985	1,603
<b>БИП-7</b>	$y = 0,4944x + 0,0793$	0,985	0,494
<b>БИП-8</b>	$y = 1,1241x + 0,2078$	0,943	1,124
<b>БИП-9</b>	$y = 1,1285x + 0,1031$	0,993	1,129
<b>БИП-10</b>	$y = 2,7516x + 0,2396$	0,988	2,752
<b>БИП-11</b>	$y = 0,4818x + 0,0231$	0,957	0,481
<b>БИП-12</b>	$y = 0,6379x + 0,0719$	0,996	0,638
<b>БИП-13</b>	$y = 0,4264x + 0,0981$	0,930	0,426
<b>БИП-14</b>	$y = 2,4341x + 0,3581$	0,963	2,434
<b>БИП-15</b>	$y = 0,5022x + 0,0656$	0,974	0,502
<b>БИП-16</b>	$y = 1,3297x + 0,0871$	0,998	1,330
Тролокс	$y = 2,4914x + 0,1201$	0,999	2,491



Слика П7.20а Калибрационе криве **БИП** једињења и тролокса за одређивање моларне апсорптивности и ТЕАС

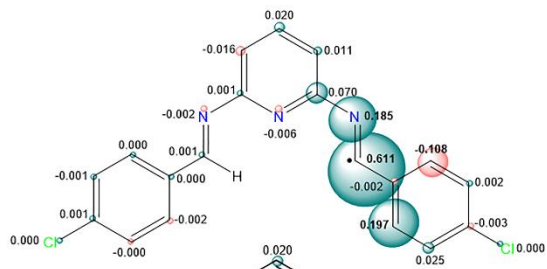
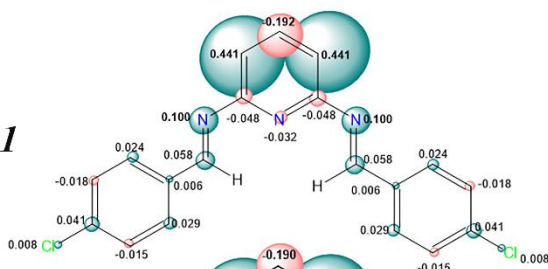


Слика П7.206 . Калибрационе криве **БHP** једињења и тролокса за одређивање моларне апсорптивности и ТЕАС

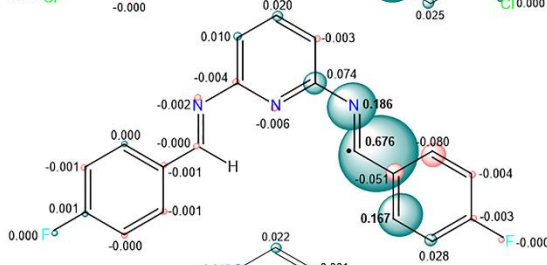
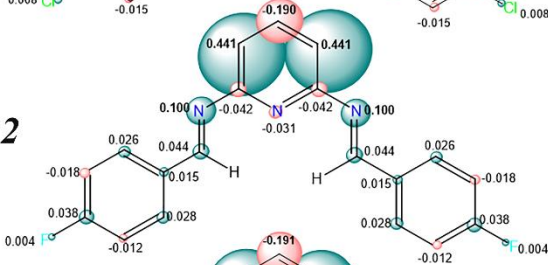


Слика П7.21а Расподела густине спина од БИП-1 до БИП-5, БИП-9 и од БИП-11 од БИП-16 израчуната у гасној фази

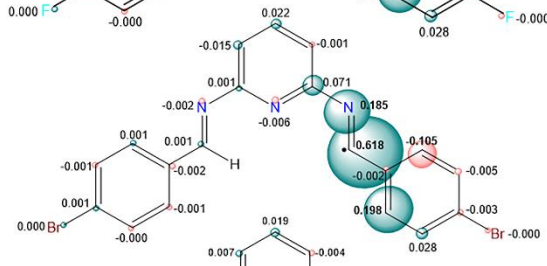
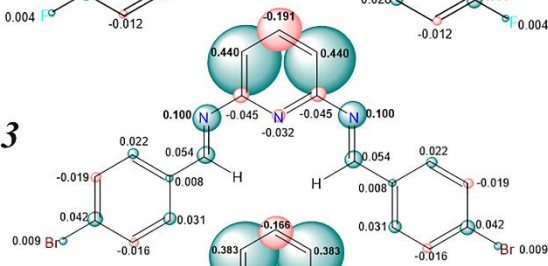
**БИП-11**



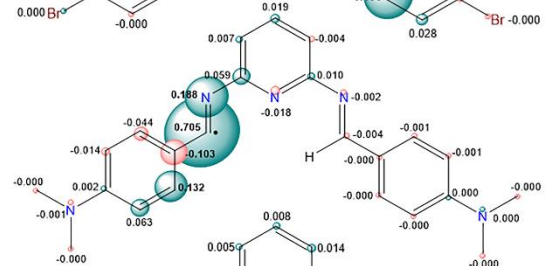
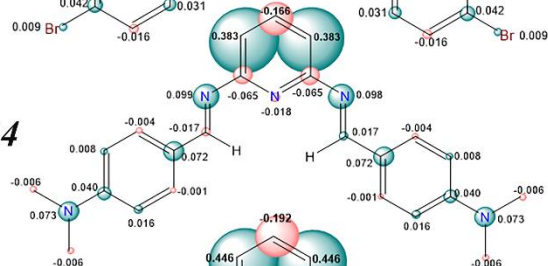
**БИП-12**



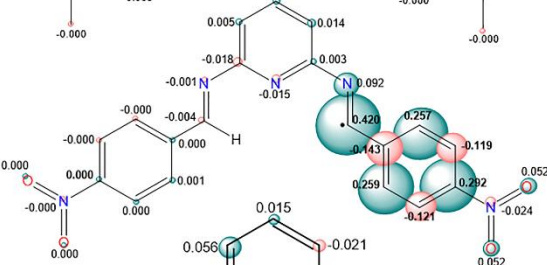
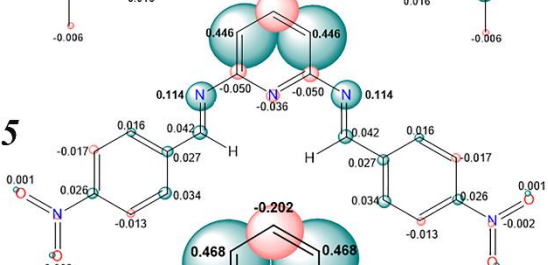
**БИП-13**



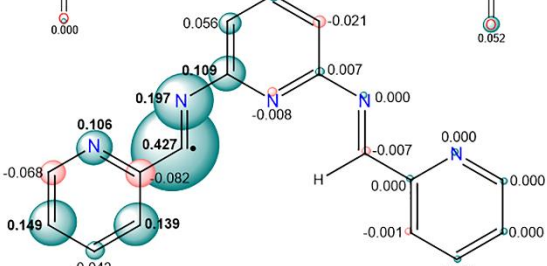
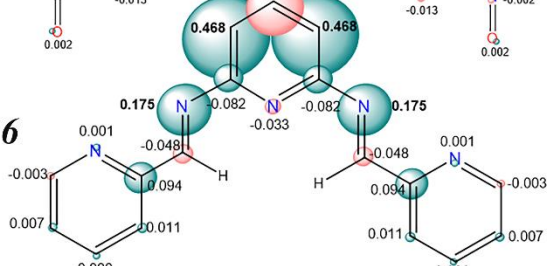
**БИП-14**



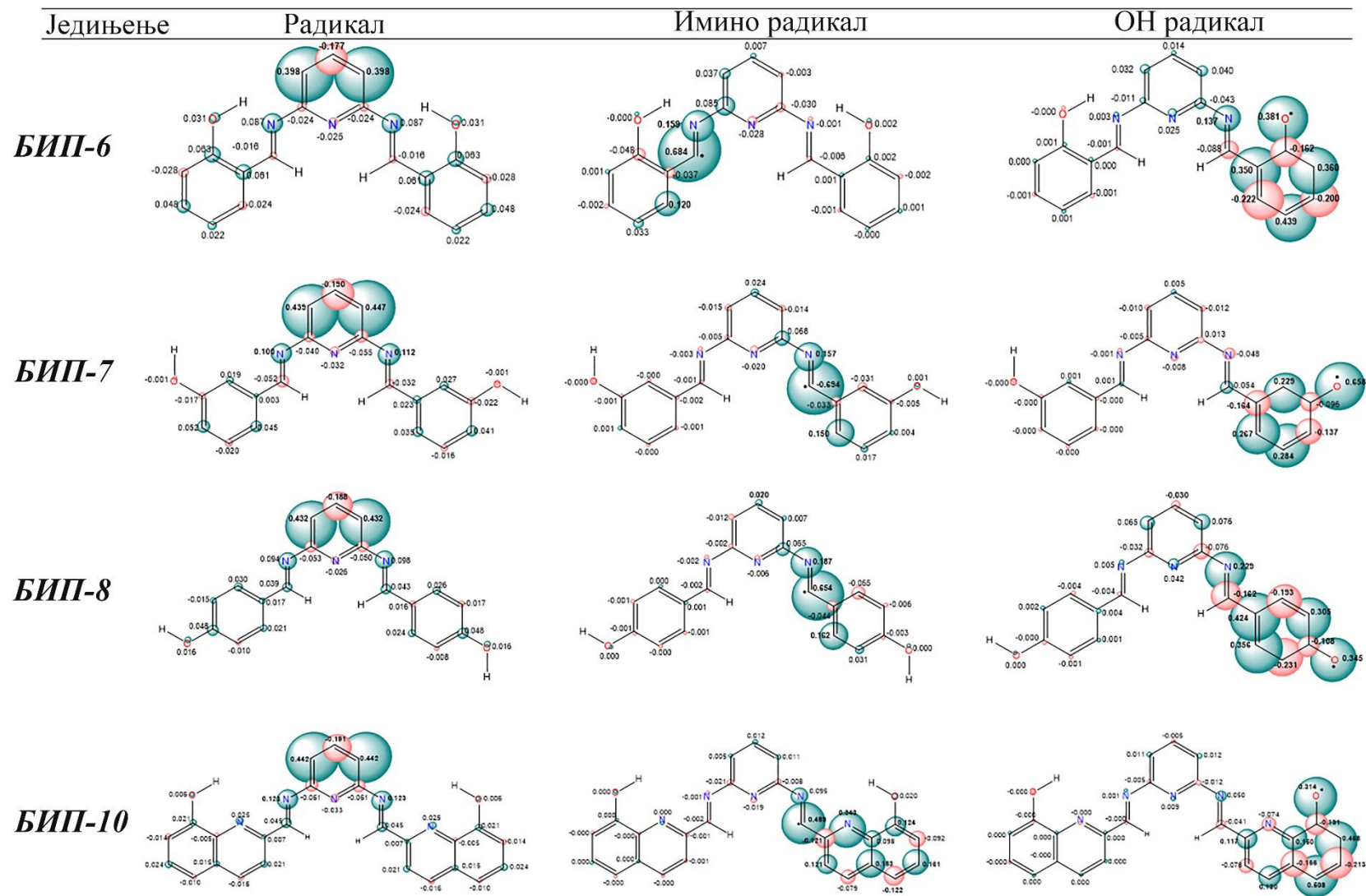
**БИП-15**



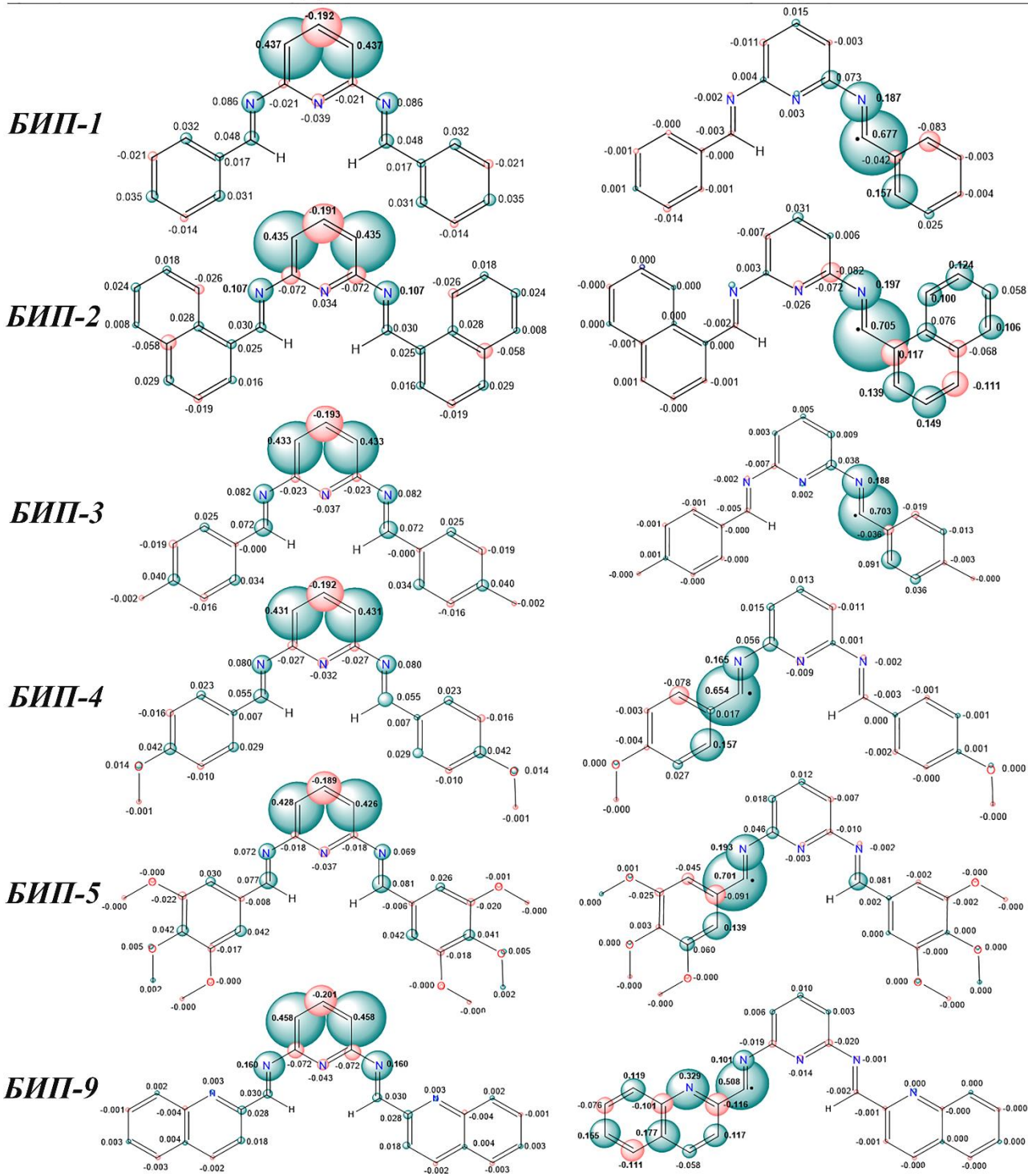
**БИП-16**



Слика П7.216 Распoдела густине спина од **БИП-1** до **БИП-5**, **БИП-9** и од **БИП-11** од **БИП-16** израчуната у гасној фази

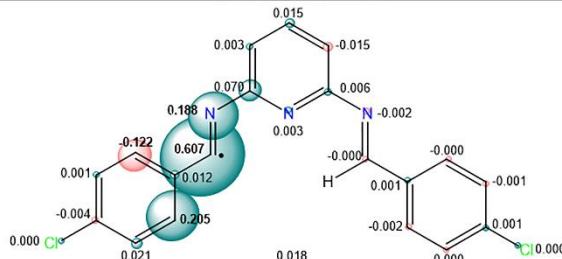
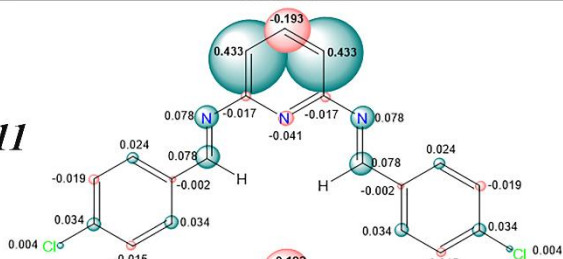


Слика П7.22 Расподела густине спина једињења од **БИП-6** од **БИП-8** и **БИП-10** израчуната у гасној фази

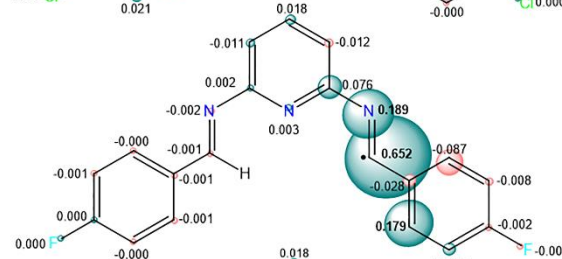
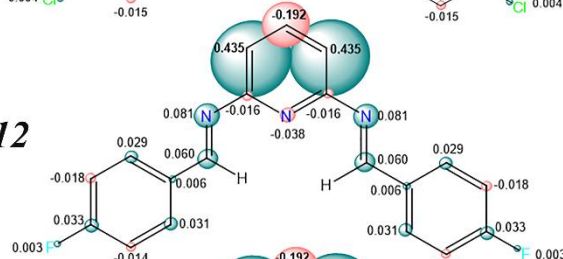


Слика П7.23а Распореда густине спина од *БИП-1* до *БИП-5*, *БИП-9* и од *БИП-11* од *БИП-16* израчуната у води

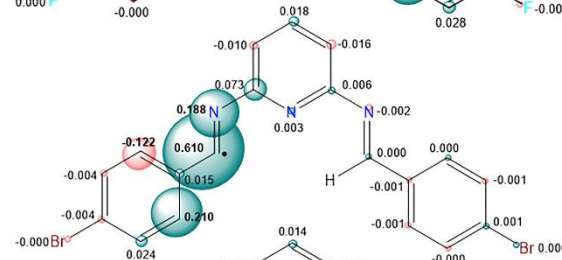
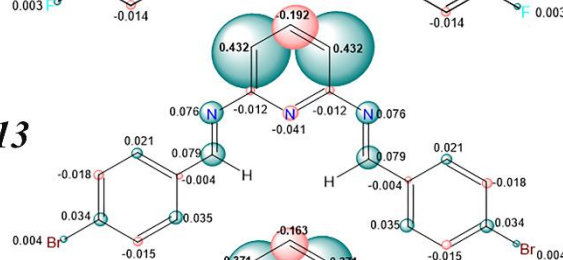
**БИП-11**



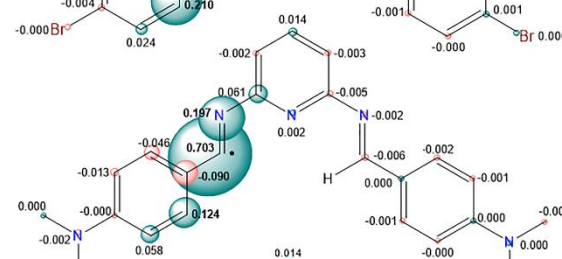
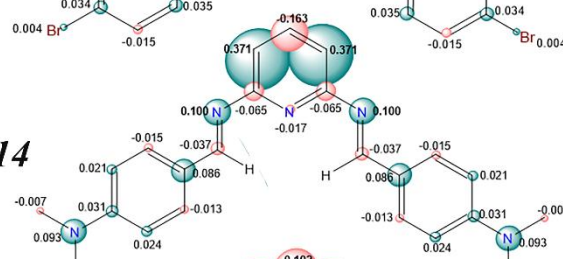
**БИП-12**



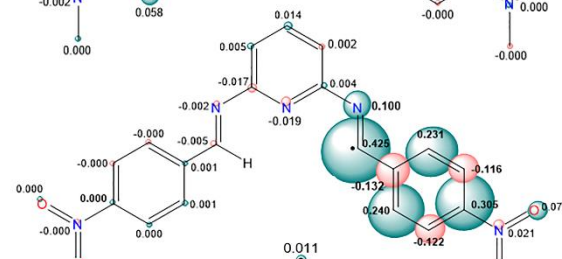
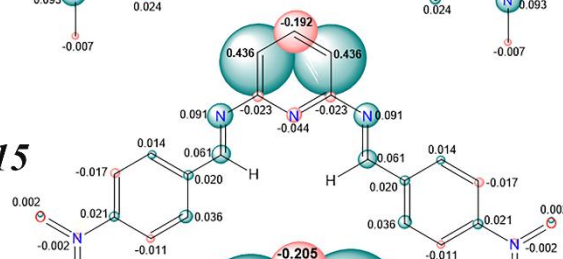
**БИП-13**



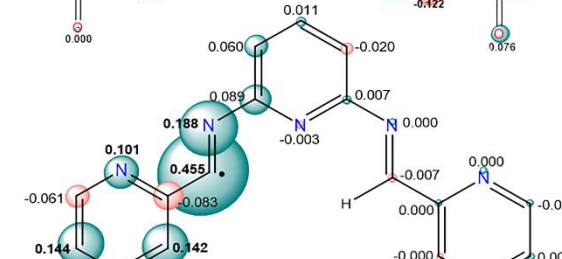
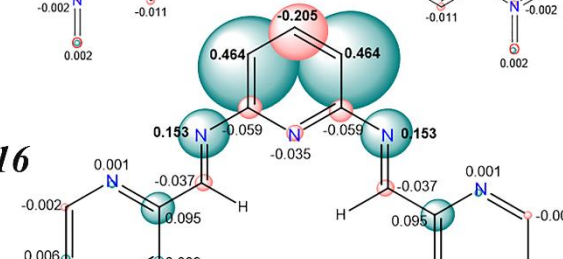
**БИП-14**



**БИП-15**



**БИП-16**



Слика П7.236 Расподела густине спина од **БИП-1** до **БИП-5**, **БИП-9** и од **БИП-11** од **БИП-16** израчуната у води



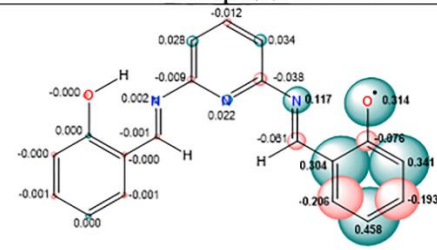
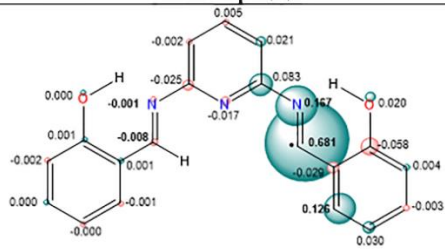
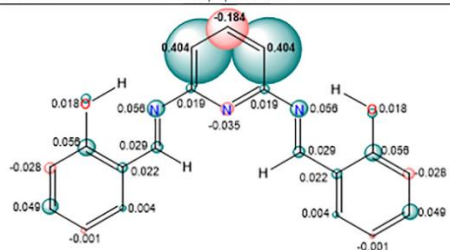
Једињење

Радикал

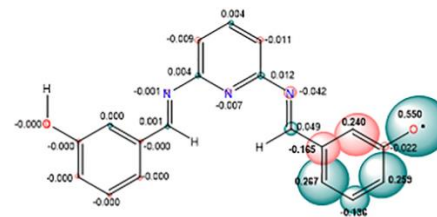
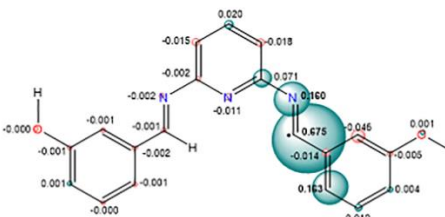
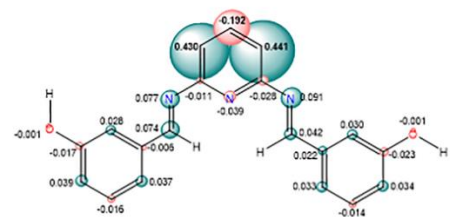
Имино радикал

ОН радикал

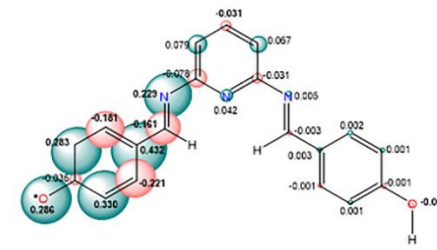
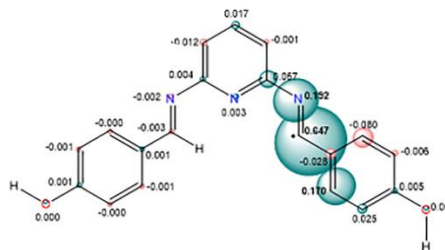
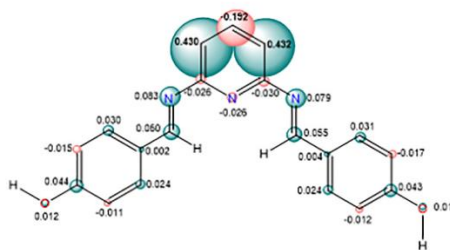
**БИП-6**



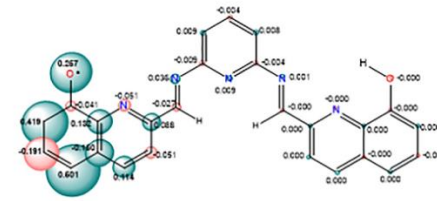
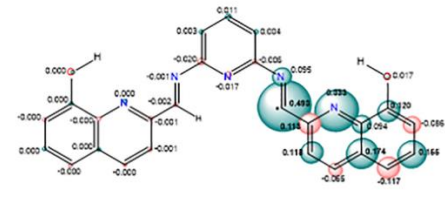
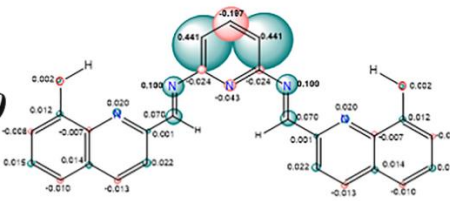
**БИП-7**



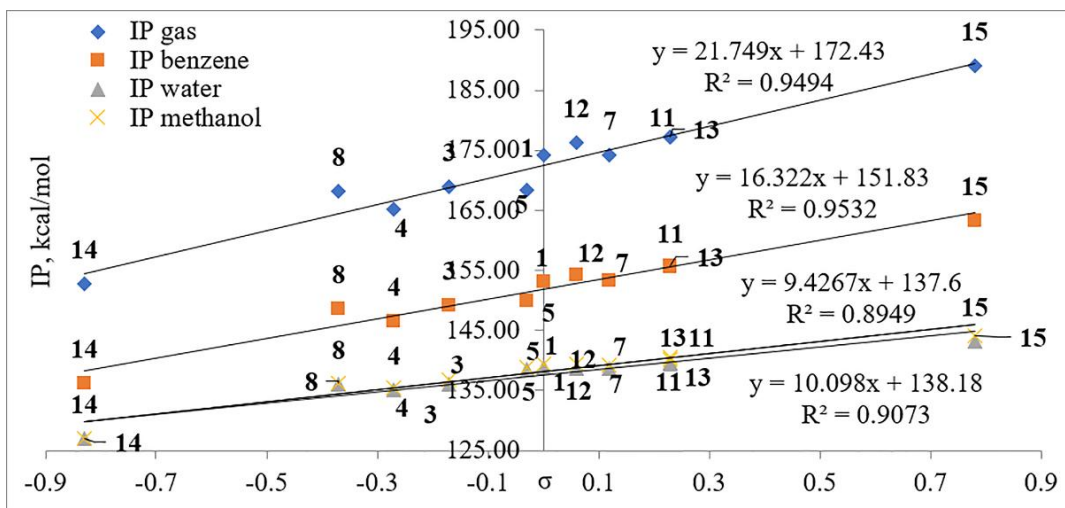
**БИП-8**



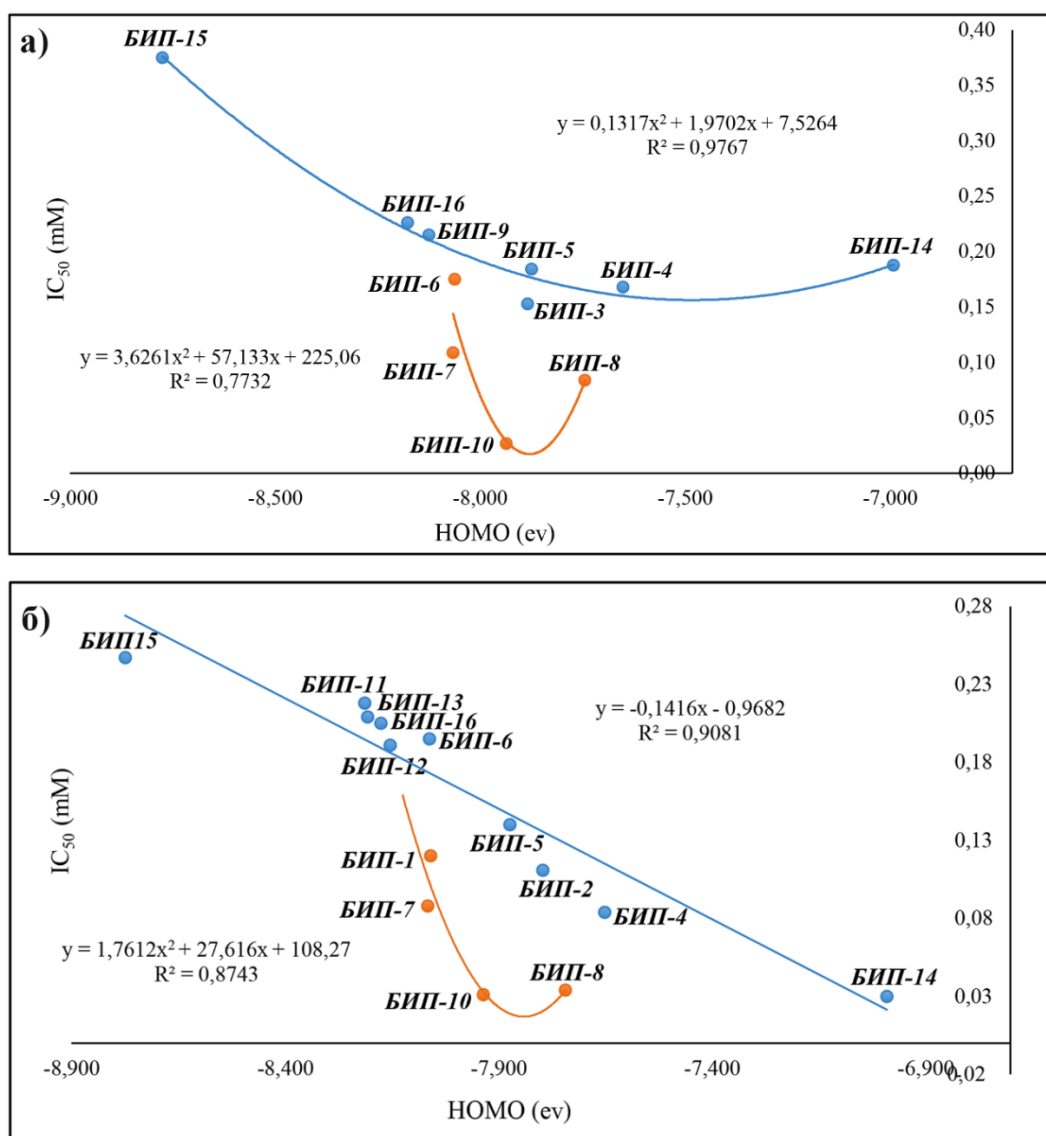
**БИП-10**



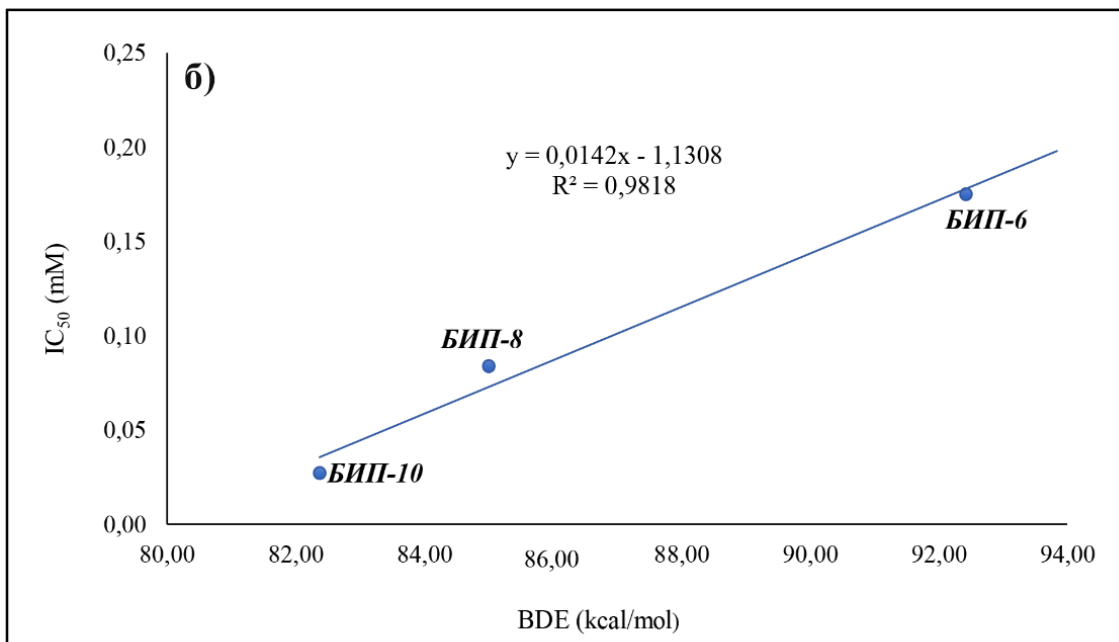
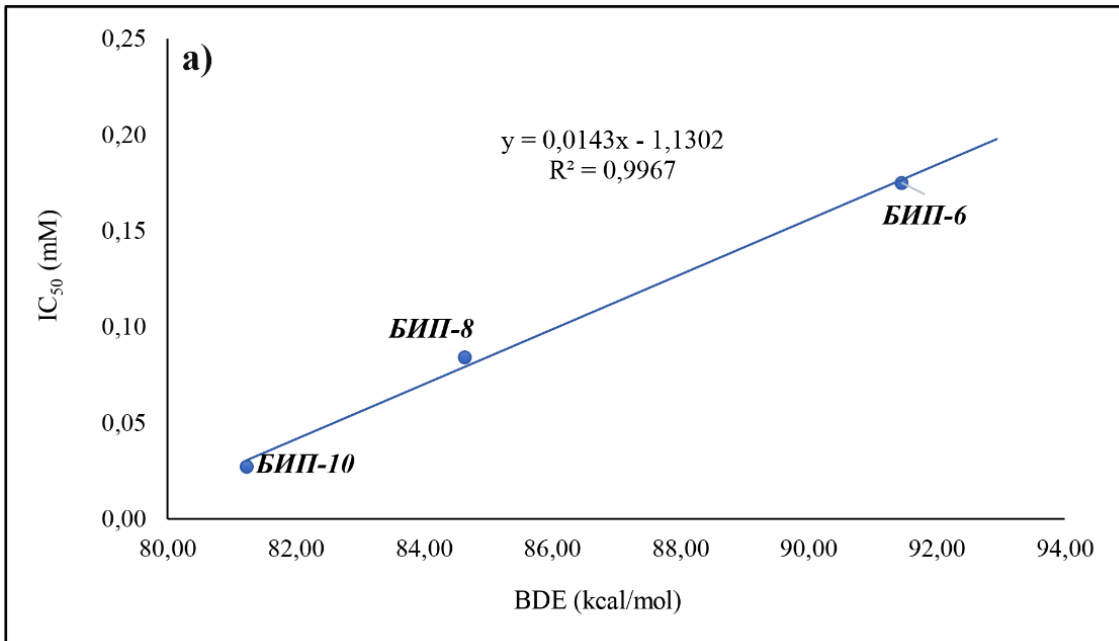
Слика П7.24 Распдела густине спина једињења од **БИП-6** од **БИП-8** и **БИП-10** израчуната у води



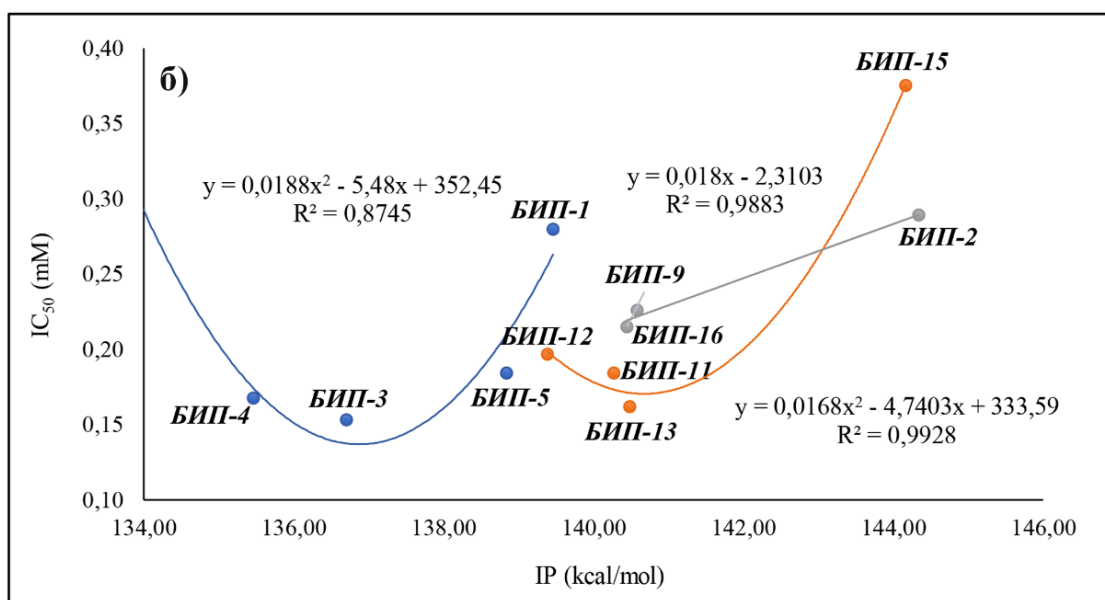
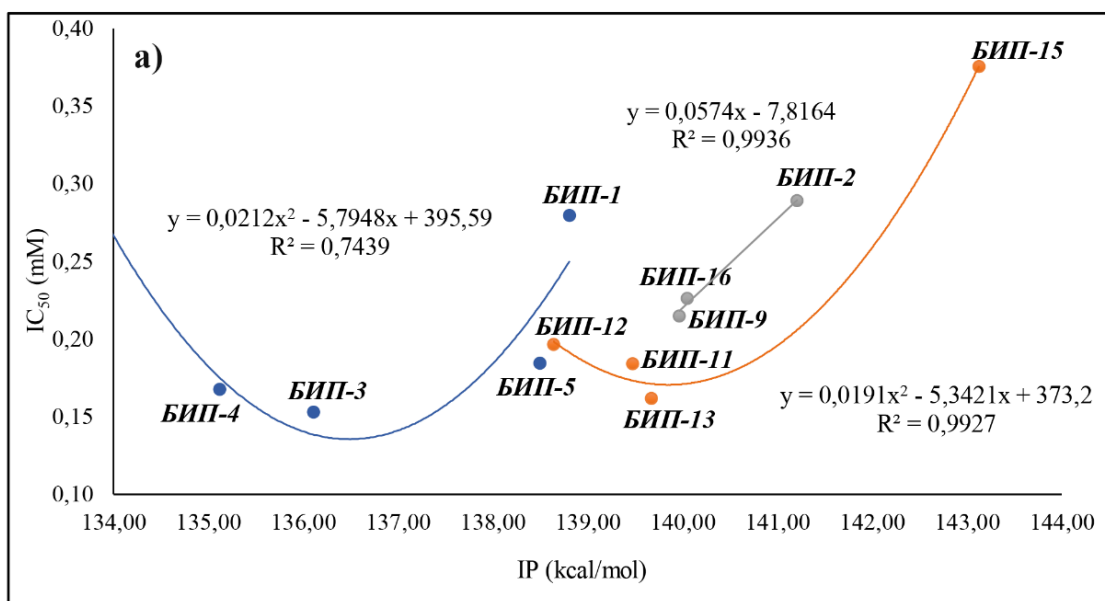
Слика П7.25 Корелације између IP у различитим растарачима и Hammett-ових константи



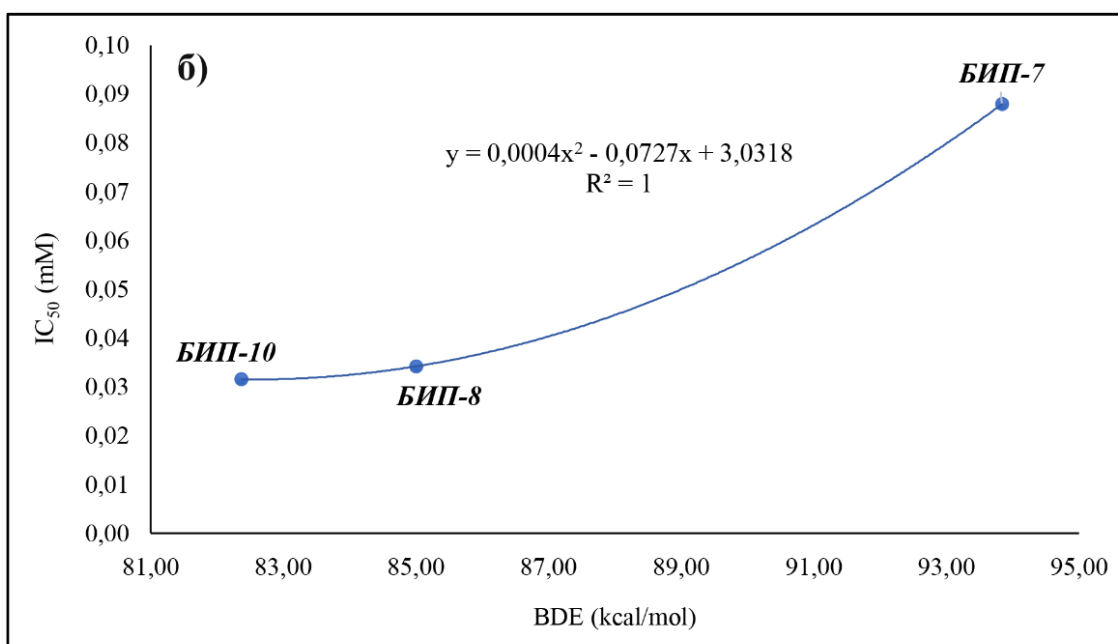
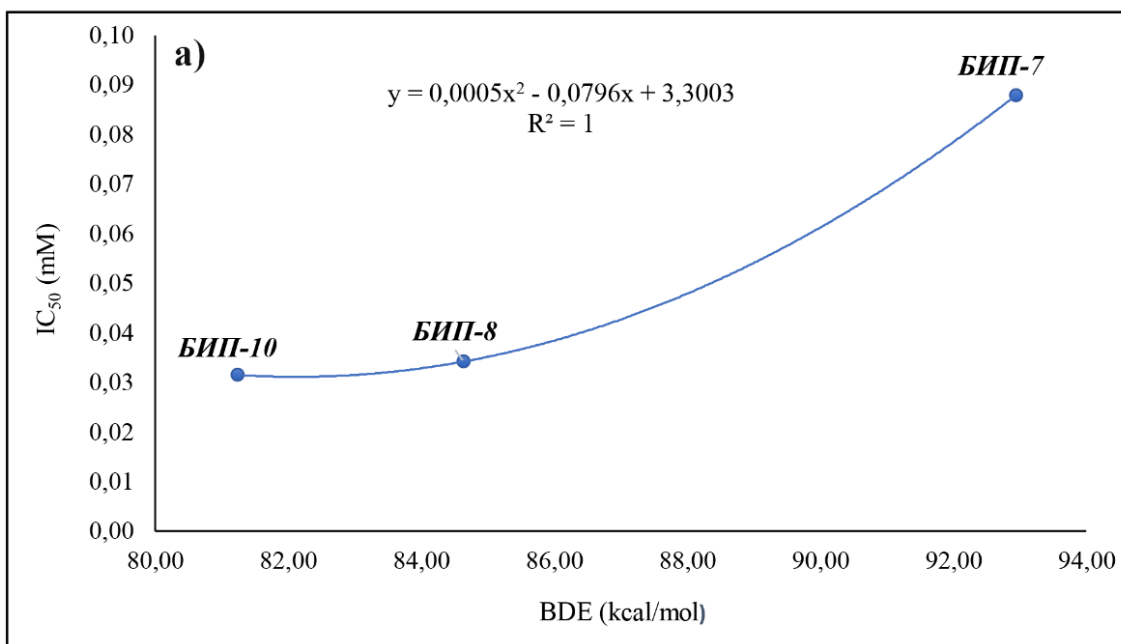
Слика П7.26 Корелација између а) IC<sub>50</sub> (DPPH), б) IC<sub>50</sub> (ABTS) и HOMO енергије



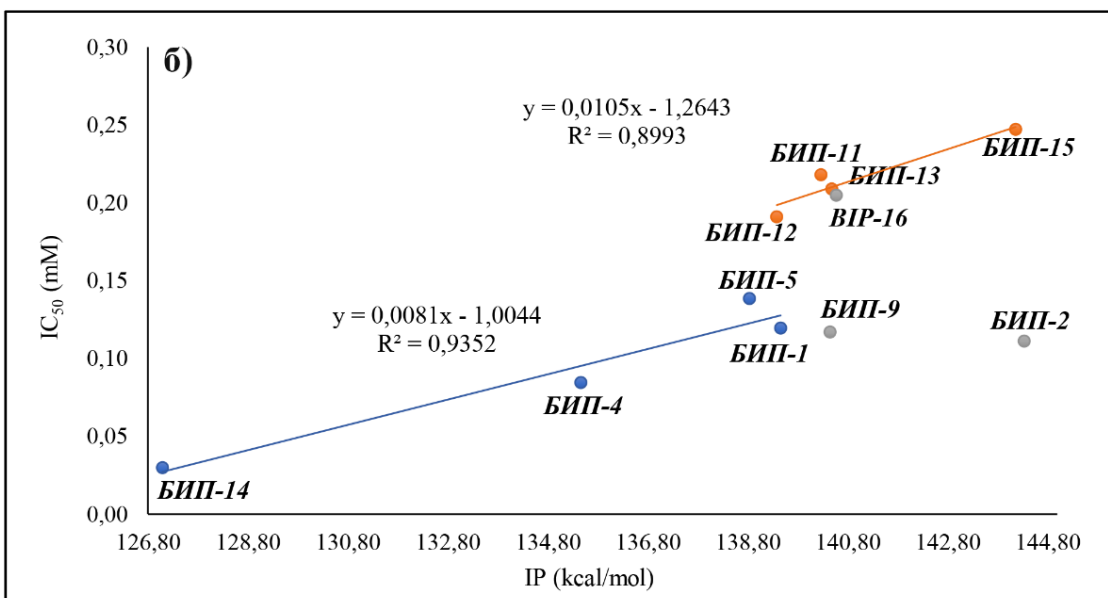
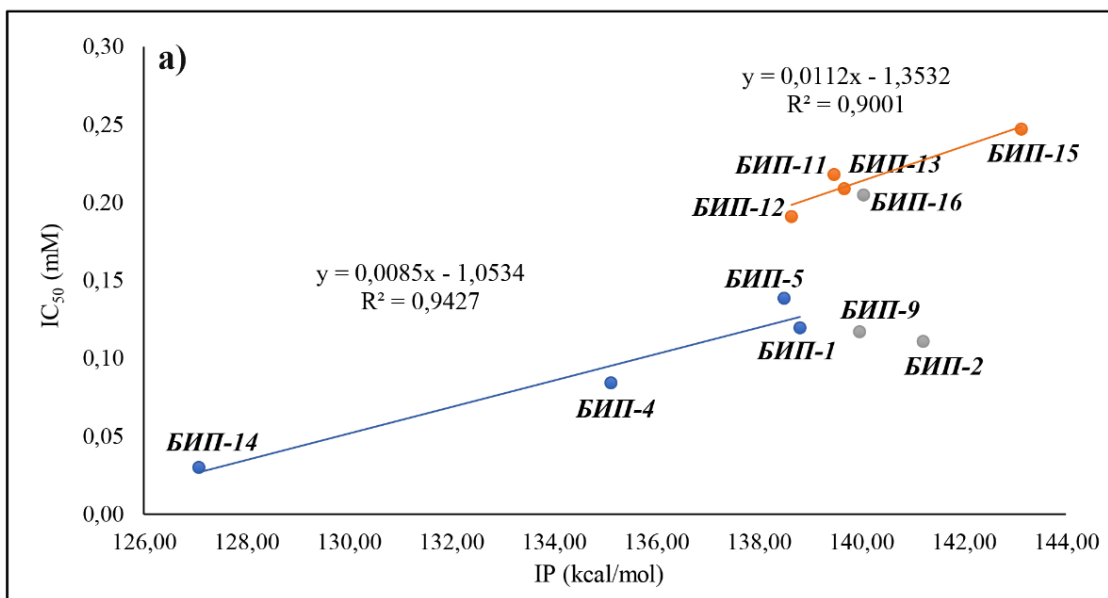
Слика П7.27 Корелација IC<sub>50</sub> (DPPH) и BDE за хидрокси радикале **БИП-6**, **БИП-8** и **БИП-10** у а) води и б) метанолу



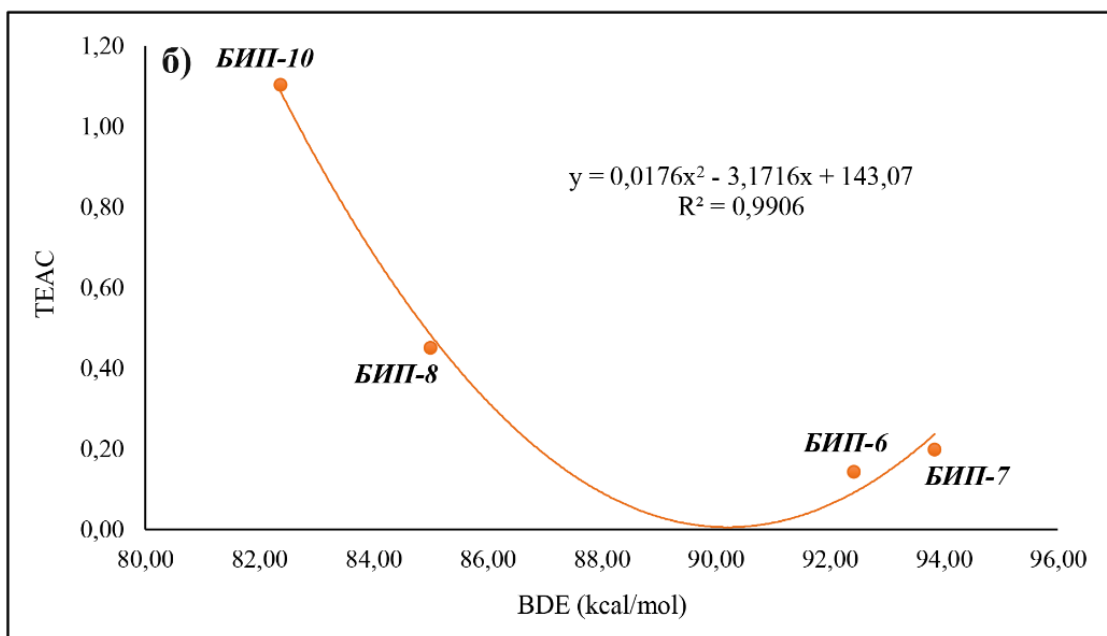
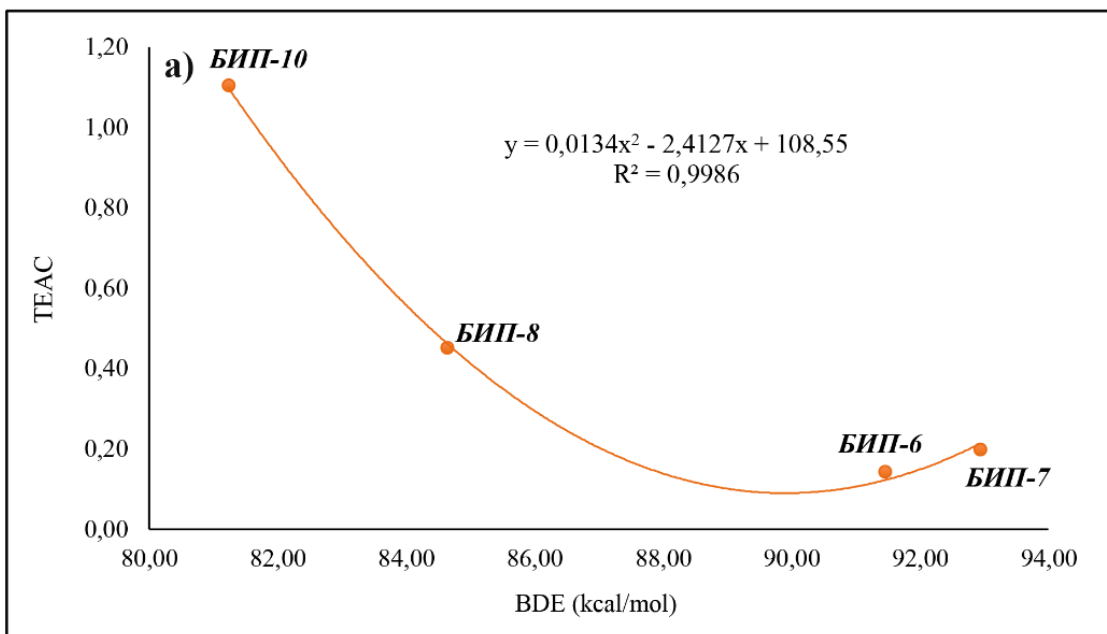
**Слика П7.28** Корелација IC<sub>50</sub> (DPPH) и IP вредности за за имино радикале од **БИП-1** до **БИП-5**, **БИП-9**, од **БИП-11** до **БИП-13** и **БИП-15** и **БИП-16** у а) води и б) метанолу



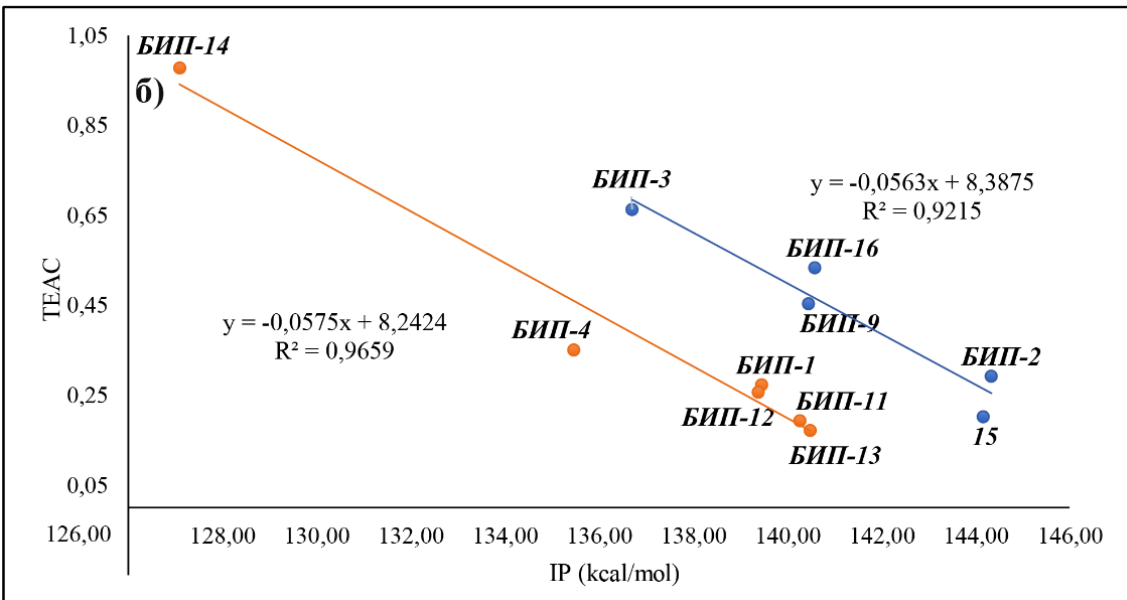
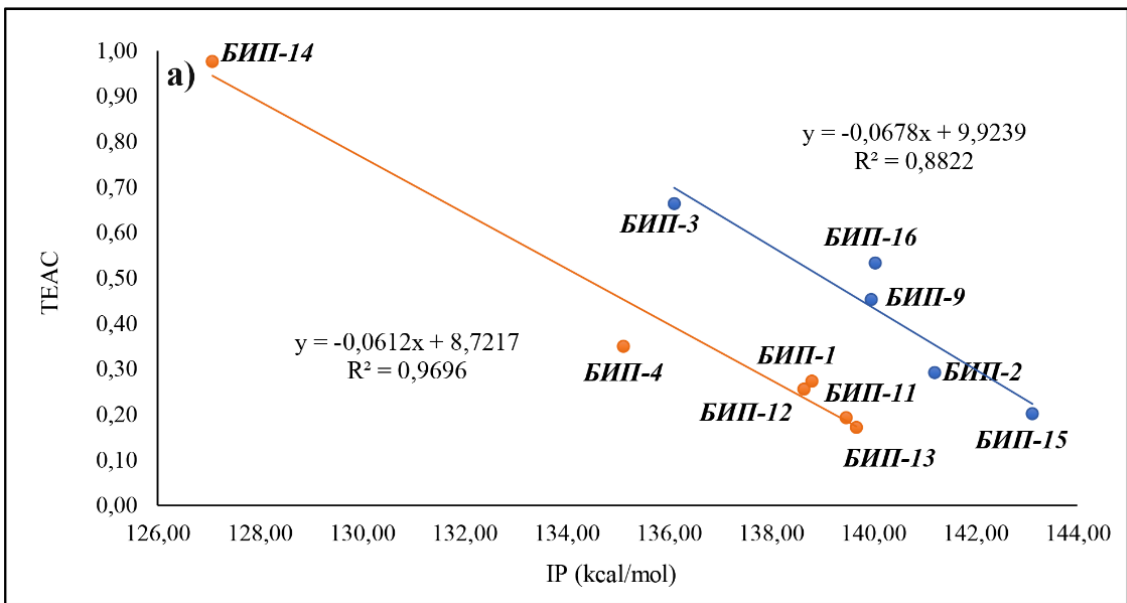
**Слика П7.29** Корелација IC<sub>50</sub> (ABTS) и BDE за хидрокси радикале *БИП-7*, *БИП-8* и *БИП-10* у а) води и б) метанолу



**Слика П7.30** Корелација IC<sub>50</sub> (ABTS) и IP вредности за имино радикале **БИП-1**, **БИП-2**, **БИП-4**, **БИП-5**, **БИП-9** и од **БИП-11** до **БИП-16** у а) води и б) метанолу

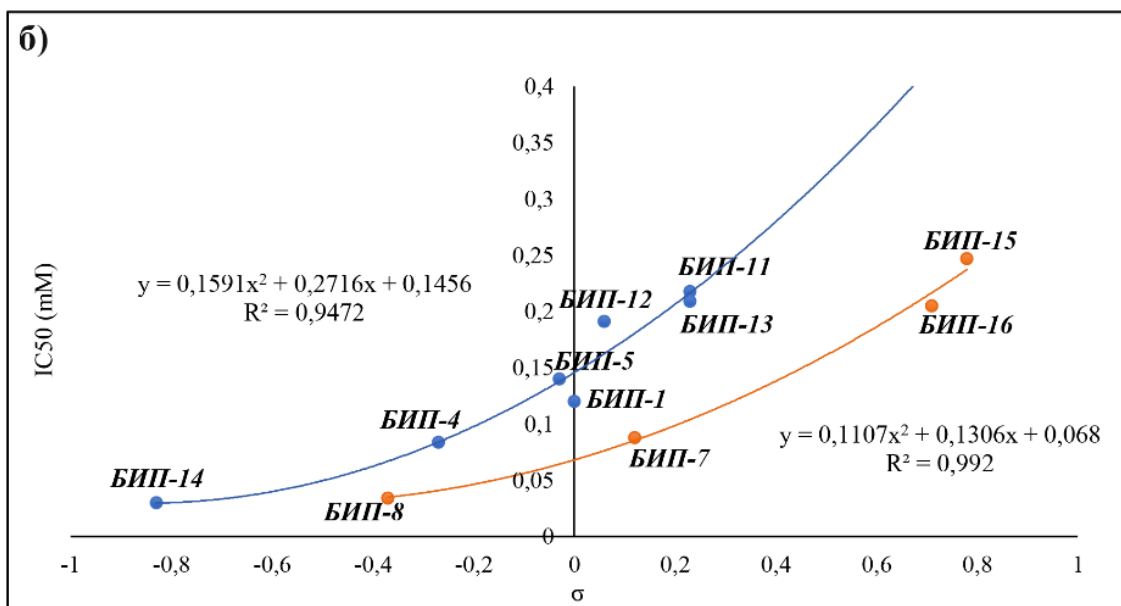
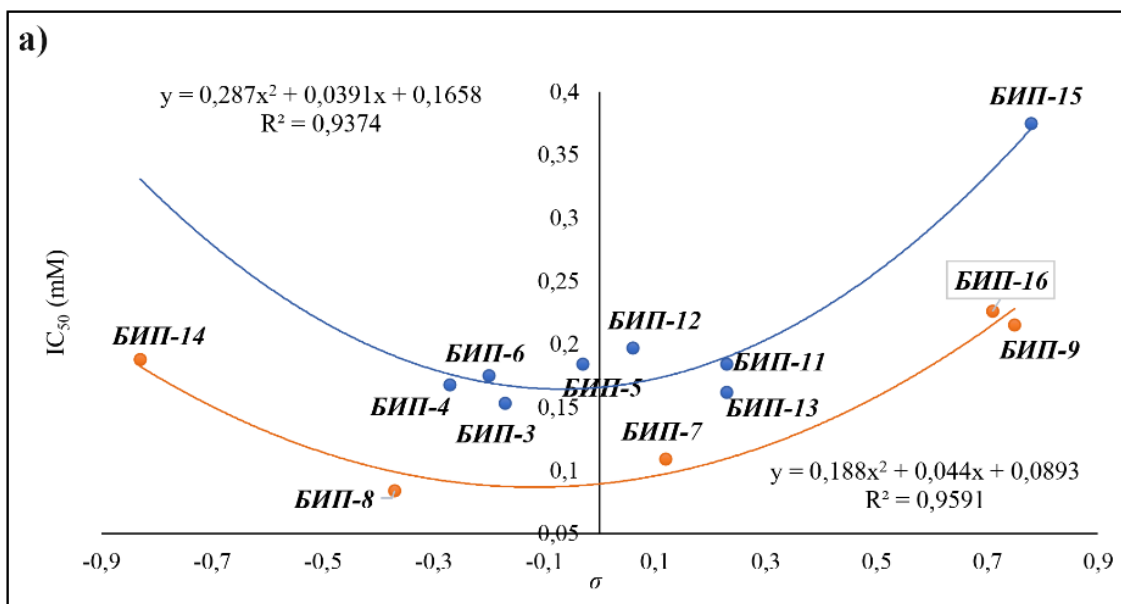


**Слика П7.31** Корелација ТЕАС из CUPRAC теста и BDE за хидрокси супституисане деривате **БИП-6**, **БИП-7**, **БИП-8** и **БИП-10** у а) води и б) метанолу

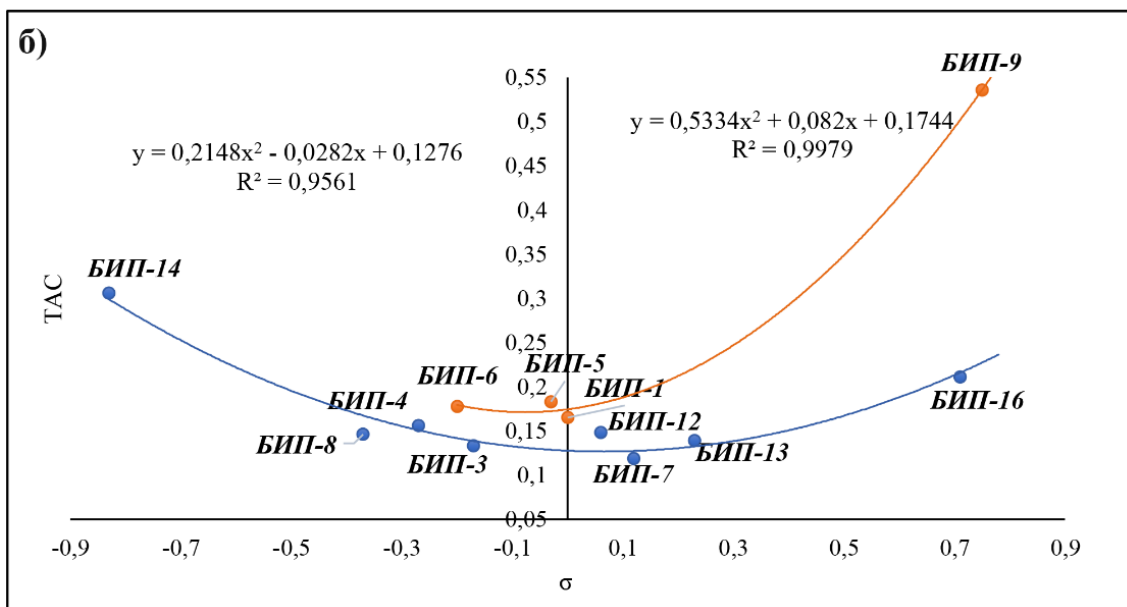
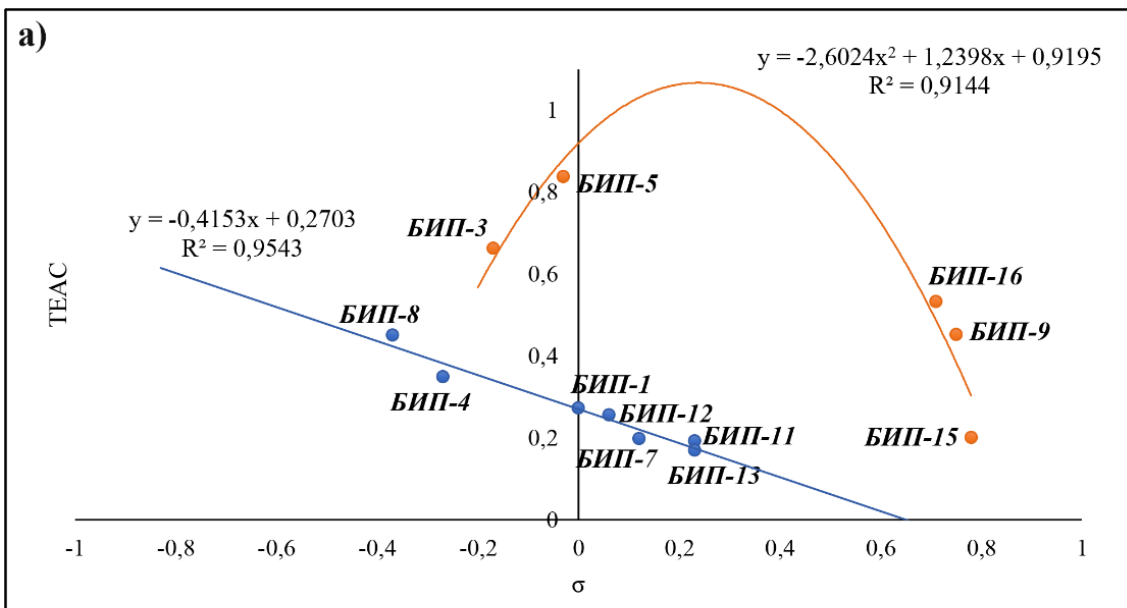


Слика П7.32 Корелација ТЕАС из CUPRAC теста и IP вредности за једињења од **БИП-1** до **БИП-5**, **БИП-9** и од **БИП-11** до **БИП-16** у а) води и б) метанолу





Слика П7.33 Корелација између IC<sub>50</sub> вредности а) DPPH и б) ABTS и Хаметове константе



Слика П.34 Корелација између а) TEAC (CUPRAC) и б) TAC и Хаметове константе

**Табела П7.11** Три најбоље рангиране молекуларне мете које је предложио критеријум сличности за јеињења од **БИП-1** до **БИП-5**, од **БИП-7** до **БИП-9** и од **БИП-11** до **БИП-15**. Укупни ранг је комбинација неколико параметара као што су удаљеност од средње вредности (*Z*-score) и Танимото индекс сличности (Max TC).

Једињење	Предложена мета	Z-score	Max TC
<b>БИП-1</b>	Retinal dehydrogenase 1	31,9228	0,2857
	Glucose-6-phosphatase	30,8367	0,3529
	Cell division protein FtsZ	20,6646	0,2903
<b>БИП-2</b>	Choline O-acetyltransferase	128,6909	0,3750
	Cysteine protease falcipain-3	18,7251	0,3784
	Gag polyprotein	16,5219	0,5000
<b>БИП-3</b>	Histone acetyltransferase GCN5	17,4869	0,3095
	Protective antigen	14,1736	0,3721
	N1L	10,2685	0,2821
<b>БИП-4</b>	Aryl hydrocarbon receptor	103,7589	0,4000
	Cytochrome P450 1B1	41,2918	0,3784
	Inward rectifier potassium channel 2	36,1263	0,3182
<b>БИП-5</b>	Tubulin beta-1 chain	129,3228	0,4615
	cAMP and cAMP-inhibited cGMP 3'.5'-cyclic phosphodiesterase 10A	106,6315	0,4068
	Ribosomal protein S6 kinase alpha-2	94,7382	0,3774
<b>БИП-7</b>	4-aminobutyrate aminotransferase. mitochondrial	24,2138	0,2821
	Macrophage migration inhibitory factor	24,126	0,2917
	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 1	20,7963	0,3429
<b>БИП-8</b>	Lignostilbene alpha. beta-dioxygenase	68,7819	0,3243
	Sterol carrier protein 2	42,3333	0,3784
	Macrophage migration inhibitory factor	35,0899	0,4167
<b>БИП-9</b>	Endothelin-converting enzyme 2	75,2685	0,4359
	Cysteinyl leukotriene receptor 1	11,908	0,3051
	C-C chemokine receptor type 6	10,8627	0,2979
<b>БИП-11</b>	Aryl hydrocarbon receptor	14,3363	0,3333
	Glucose-6-phosphatase	12,6298	0,3846
	Transient receptor potential cation channel subfamily A member 1	10,3082	0,3158
<b>БИП-12</b>	Aryl hydrocarbon receptor	26,8346	0,3333
	Intermediate conductance calcium-activated potassium channel protein 4	25,7654	0,2857
	Renilla-luciferin 2-monooxygenase	10,3167	0,2833
<b>БИП-13</b>	Calcium-dependent protein kinase 4	26,144	0,3043
	Protective antigen	23,1371	0,3953
	N1L	10,2685	0,2821
<b>БИП-14</b>	Amyloid beta A4 protein	38,5839	0,4242
	Microtubule-associated protein tau	37,1893	0,375
	Protein Rev	31,2767	0,3636
<b>БИП-15</b>	Trypanothione reductase	55,255	0,3158
	Arylsulfatase	49,4348	0,2826
	Cathepsin B	41,9376	0,3529

**Табела П7.12** Параметри корозије добијени електрохемијским мерењем (LPR методом) на гвожђу или цинку у 0,5М NaCl (pH 3 или pH 7) при промени концентрације церијум(III)-ацетатата

Једињење	$c$ ( $\times 10^{-6}$ mol dm $^{-3}$ )	$E_{\text{corr}}$ (mV)	$R_p$ ( $\Omega$ cm $^2$ )	$E$ (%)
Церијум(III) ацетат на цинку (pH 7)	0,0	-1038	1901	/
	3,5	-1045	1266	/[a]
	6,9	-1051	2158	13,5
	13,9	-1053	2636	27,9
	20,5	-1055	2783	31,7
	27,1	-1054	2638	27,9
	33,7	-1053	2638	27,9
	46,6	-1053	2145	11,4
Церијум(III) ацетат на цинку (pH 3)	0,0	-1093	771	/
	3,5	-1095	689	/[a]
	6,9	-1092	669	/[a]
	13,9	-1091	662	/[a]
	33,7	-1096	868	11,2
	46,6	-1099	985	21,7
	65,3	-1100	1059	27,2
	0,0	-569	2039	/
Церијум(III) ацетат на гвожђу (pH 7)	3,5	-608	2349	13,2
	6,9	-630	2126	4,1
	13,9	-641	1977	/[a]
	20,5	-652	2105	3,1
	33,7	-639	1469	/[a]
	46,6	-651	1894	/[a]
	0,0	-720	467	/
	3,5	-714	988	52,7
Церијум(III) ацетат на гвожђу (pH 3)	6,9	-720	738	36,7
	13,9	-709	1031	54,7
	20,5	-702	1452	67,8
	27,1	-706	1409	66,9
	33,7	-706	1695	72,4
	46,6	-702	1417	67

[a] Не показује инхибиторну активност

**Табела П7.13** Параметри корозије добијени EIS методом за гвожђе или цинк у 0.5 М NaCl на рН 3 или рН 7 при промени концентрације церијум(III)-ацетат

Једињење	$c (\times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3})$	$E_{\text{corr}} (\text{mV})$	$R_p (\Omega \text{ cm}^2)$	$E (\%)$
Церијум(III)ацетат на цинку (рН 7)	0,0	-1040	935	/
	3,5	-1046	1096	14,7
	6,9	-1050	1576	40,6
	13,9	-1054	2083	55,1
	20,5	-1056	2350	60,2
	27,1	-1054	2041	54,2
	33,7	-1056	2364	60,4
	46,6	-1054	1804	48,1
Церијум(III)ацетат на цинку (рН 3)	0,0	-1093	462	/
	3,5	-1095	340	/[a]
	6,9	-1092	346	/[a]
	13,9	-1090	352	/[a]
	33,7	-1097	478	3,3
	46,6	-1099	537	14
	20,7	-1100	558	17,2
Церијум(III)ацетат на гвожђу (рН 7)	0,0	-577	2091	/
	3,5	-612	2203	5,1
	6,9	-637	2565	18,5
	13,9	-646	2312	9,6
	20,5	-654	2391	12,5
	33,7	-648	2262	7,6
Церијум(III)ацетат на гвожђу (рН 3)	46,6	-654	2380	12,1
	0,0	-720	732	/
	3,5	-714	1561	53,1
	6,9	-719	1517	51,7
	13,9	-708	1969	62,8
	20,5	-703	2527	71
	27,1	-706	2610	71,9
	33,7	-708	2855	74,3
46,6	-703	2447	70,1	

[a] Не показује инхибиторну активност

**Табела П7.14.** Параметри корозије **БИП-16** добијени електрохемијским мерењима (EIS методом), на гвожђу и цинку у 0,5М NaCl при различитим рН вредностима, у зависности од температуре.

Једињење	Слепа проба 0.5М NaCl			Са инхибитором у 0.5М NaCl			
	t (°C)	$E_{\text{corr}}$ (mV)	$R_p$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ )	E (%)	$E_{\text{corr}}$ (mV)	$R_p$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ )	E (%)
<b>БИП-16</b> 151,4×10 <sup>-6</sup> mol dm <sup>-3</sup> цинк (рН 3)	25	-1067	239	-	-1046	1312	81,8
	30	-1064	187	-	-1033	836	77,6
	35	-1069	152	-	-1033	667	77,2
	40	-1073	127	-	-1036	589	78,4
	45	-1075	120	-	-1038	494	75,7
<b>БИП-16</b> 151,4×10 <sup>-6</sup> mol dm <sup>-3</sup> гвожђе (рН 3)	25	-667	428	-	-318	628	31,8
	30	-660	383	-	-310	523	26,8
	35	-658	340	-	-609	457	25,6
	40	-657	319	-	-613	415	23,1
	45	-655	307	-	-616	386	20,5
Ce <sup>3+</sup> 65,3×10 <sup>-6</sup> mol dm <sup>-3</sup>	25	-1033	1700	-	-1063	1023	/[a]
	30	-1057	1002	-	-1080	706.5	/[a]
<b>БИП-16</b> 151,4×10 <sup>-6</sup> mol dm <sup>-3</sup> цинк (рН 7)	35	-1077	600	-	-1077	530	/[a]
	40	-1091	521	-	-1085	371	/[a]
	45	-1087	527	-	-1093	215	/[a]
Ce <sup>3+</sup> 30,3×10 <sup>-6</sup> mol dm <sup>-3</sup> + <b>БИП-16</b> 151,4×10 <sup>-6</sup> mol dm <sup>-3</sup> гвожђе (рН 3)	25	-709	681	-	-587	1270	46,4
	30	-696	679	-	-663	898	24,4
	35	-682	663	-	-675	801	17,2
	40	-665	643	-	-674	628	/[a]
	45	-656	611	-	-681	597	/[a]

[a] Не показује инхибиторну активност

**Табела П7.15** Параметри корозије **БИП-9**, **БИП-14** и **БИП-16** добијени електрохемијским мерењима (EIS методом), на гвожђу 1М НСl у зависности од температуре.

Једињење		EIS			Једињење		EIS	
	t (°C)	$E_{\text{corr}}$ (mV)	$R_p$ ( $\Omega$ $\text{cm}^2$ )	E (%)		$E_{\text{corr}}$ (mV)	$R_p$ ( $\Omega$ $\text{cm}^2$ )	E (%)
Слепа проба 1М НСl	20	-472	358	-	<b>БИП-14</b> $28,8 \times 10^{-6}$ $\text{mol dm}^{-3}$ гвожђе	-496	366	2,2
	25	-473	407	-		-502	391	/[a]
	30	-477	424	-		-496	528	19,7
	35	-482	389	-		-483	550	29,3
	40	-488	294	-		-485	491	39,3
<b>БИП-9</b> $27,6 \times 10^{-6}$ $\text{mol dm}^{-3}$ гвожђе	20	-470	1773	79,8	<b>БИП-16</b> $37,2 \times 10^{-6}$ $\text{mol dm}^{-3}$ гвожђе	-467	926	61,3
	25	-457	1615	74,8		-459	738	44,9
	30	-448	1181	64,1		-457	636	33,3
	35	-444	962	59,6		-462	545	28,6
	40	-452	833	64,7		-467	453	35,1

[a] Не показује инхибиторну активност

**Табела П7.16** Вредности фукуи параметара:  $q(N)$ ,  $q(N+1)$ ,  $q(N-1)$ ,  $f^-$ ,  $f^+$ ,  $f^0$  и кондензовани дуални дескриптор ( $\Delta f$ ) испитиваних једињења

Atom	$q(N)$	$q(N+1)$	$q(N-1)$	$f^-$	$f^+$	$f^0$	$\Delta f$
<b>VIP-1</b>							
N <sub>1</sub>	-0.1602	-0.2120	-0.151	0.0091	0.0518	0.0304	0.0428
C <sub>2</sub>	0.0916	0.0632	0.140	0.0489	0.0284	0.0386	-0.0205
C <sub>3</sub>	-0.056	-0.0790	0.0363	0.0923	0.0230	0.0577	-0.0693
C <sub>4</sub>	-0.0221	-0.0762	0.0097	0.0318	0.0542	0.043	0.0224
C <sub>5</sub>	-0.056	-0.0790	0.0363	0.0923	0.0230	0.0577	-0.0693
C <sub>6</sub>	0.0916	0.0632	0.140	0.0489	0.0284	0.0386	-0.0205
N <sub>2</sub>	-0.1545	-0.196	-0.127	0.0279	0.0414	0.0346	0.0134
N <sub>2</sub> '	-0.1545	-0.196	-0.127	0.0279	0.0414	0.0346	0.0134
C <sub>7</sub>	0.0594	-0.0102	0.104	0.0446	0.0696	0.0571	0.0249
C <sub>7</sub> '	0.0594	-0.0102	0.104	0.0446	0.0696	0.0571	0.0249
C <sub>8</sub>	-0.0121	-0.0182	-0.0073	0.0047	0.0061	0.0054	0.0014
C <sub>8</sub> '	-0.0121	-0.0182	-0.0073	0.0047	0.0061	0.0054	0.0013
C <sub>9</sub>	-0.0285	-0.0534	-0.0093	0.0192	0.0250	0.0221	0.0057
C <sub>9</sub> '	-0.0285	-0.0534	-0.0093	0.0192	0.0249	0.0221	0.0057
C <sub>10</sub>	-0.039	-0.0614	-0.0196	0.0194	0.0224	0.0209	0.0029
C <sub>10</sub> '	-0.0390	-0.0614	-0.0196	0.0194	0.0224	0.0209	0.0029
C <sub>11</sub>	-0.0338	-0.0791	0.0074	0.0412	0.0454	0.0433	0.0042
C <sub>11</sub> '	-0.0338	-0.0791	0.0074	0.0412	0.0454	0.0433	0.0042
C <sub>12</sub>	-0.0422	-0.0646	-0.0222	0.0200	0.0224	0.0212	0.0023
C <sub>12</sub> '	-0.0422	-0.0646	-0.0222	0.0200	0.0224	0.0212	0.0023
C <sub>13</sub>	-0.0352	-0.0577	-0.0131	0.0221	0.0226	0.0223	0.0004
C <sub>13</sub> '	-0.0352	-0.0577	-0.0131	0.0221	0.0226	0.0223	0.0004
<b>VIP-2</b>							
N <sub>1</sub>	-0.1633	-0.2076	-0.1601	0.0032	0.0443	0.0238	0.0412
C <sub>2</sub>	0.0898	0.0670	0.1177	0.0279	0.0229	0.0254	-0.0051
C <sub>3</sub>	-0.0534	-0.0707	0.0145	0.0679	0.0173	0.0426	-0.0506
C <sub>4</sub>	-0.0220	-0.0649	0.0026	0.0246	0.0429	0.0337	0.0183
C <sub>5</sub>	-0.0538	-0.0705	0.0170	0.0708	0.0167	0.0438	-0.0541
C <sub>6</sub>	0.0905	0.0682	0.1227	0.0323	0.0223	0.0273	-0.0099
N <sub>2</sub>	-0.1552	-0.1915	-0.1244	0.0308	0.0363	0.0335	0.0055
N <sub>2</sub> '	-0.1429	-0.1793	-0.1292	0.0137	0.0364	0.025	0.0227
C <sub>7</sub>	0.0582	-0.0015	0.0861	0.0278	0.0597	0.0438	0.0319
C <sub>7</sub> '	0.0584	0.0002	0.0827	0.0243	0.0582	0.0413	0.0339
C <sub>8</sub>	-0.0129	-0.0194	0.0116	0.0245	0.0065	0.0155	-0.0180
C <sub>8</sub> '	-0.0092	-0.0174	-0.0014	0.0078	0.0081	0.008	0.0003
C <sub>9</sub>	-0.0439	-0.0444	-0.0289	0.0149	0.0005	0.0077	-0.0145
C <sub>9</sub> '	-0.0425	-0.0461	-0.0374	0.0051	0.0036	0.0043	-0.0016
C <sub>10</sub>	-0.0395	-0.0609	-0.0111	0.0284	0.0213	0.0249	-0.0071
C <sub>10</sub> '	-0.0385	-0.0647	-0.0175	0.0210	0.0263	0.0236	0.0053
C <sub>11</sub>	-0.0435	-0.0626	-0.0178	0.0256	0.0191	0.0224	-0.0065
C <sub>11</sub> '	-0.0421	-0.0629	-0.0242	0.0179	0.0208	0.0194	0.0029
C <sub>12</sub>	-0.0391	-0.0579	-0.0122	0.0269	0.0188	0.0229	-0.0081
C <sub>12</sub> '	-0.0424	-0.0627	-0.0229	0.0195	0.0202	0.0199	0.0007
C <sub>13</sub>	-0.0307	-0.0757	0.0227	0.0534	0.0449	0.0492	-0.0085
C <sub>13</sub> '	-0.0274	-0.0750	0.0091	0.0365	0.0476	0.042	0.0111



C <sub>14</sub>	-0.0414	-0.0588	-0.0198	0.0216	0.0174	0.0195	-0.0042
C <sub>14</sub> '	-0.0466	-0.0635	-0.0335	0.0130	0.0170	0.015	0.0039
C <sub>15</sub>	-0.0414	-0.0588	-0.0198	0.0216	0.0174	0.0195	-0.0042
C <sub>15</sub> '	-0.0296	-0.0611	-0.0062	0.0234	0.0315	0.0274	0.0081

### BIP-3

N <sub>1</sub>	-0.1600	-0.2127	-0.1523	0.0077	0.0527	0.0302	0.0451
C <sub>2</sub>	0.0913	0.0622	0.1358	0.0445	0.0291	0.0368	-0.0155
C <sub>3</sub>	-0.0570	-0.0794	0.0311	0.0881	0.0225	0.0553	-0.0657
C <sub>4</sub>	-0.0229	-0.0776	0.0073	0.0302	0.0547	0.0424	0.0245
C <sub>5</sub>	-0.0570	-0.0797	0.0311	0.0881	0.0227	0.0554	-0.0654
C <sub>6</sub>	0.0913	0.0622	0.1359	0.0446	0.0291	0.0369	-0.0155
N <sub>2</sub>	-0.1571	-0.1973	-0.1304	0.0267	0.0402	0.0335	0.0135
N <sub>2</sub> '	-0.1571	-0.1965	-0.1302	0.0269	0.0394	0.0332	0.0125
C <sub>7</sub>	0.0583	-0.0117	0.0985	0.0401	0.0700	0.0551	0.0299
C <sub>7</sub> '	0.0584	-0.0109	0.0987	0.0403	0.0692	0.0548	0.0289
C <sub>8</sub>	-0.0172	-0.0213	-0.0099	0.0073	0.0042	0.0057	-0.0031
C <sub>8</sub> '	-0.0172	-0.0211	-0.0097	0.0075	0.0039	0.0057	-0.0036
C <sub>9</sub>	-0.0289	-0.0518	-0.0100	0.0189	0.0229	0.0209	0.0040
C <sub>9</sub> '	-0.0289	-0.0522	-0.0100	0.0189	0.0234	0.0211	0.0045
C <sub>10</sub>	-0.0454	-0.0645	-0.0276	0.0178	0.0191	0.0185	0.0013
C <sub>10</sub> '	-0.0454	-0.0643	-0.0275	0.0179	0.0189	0.0184	0.0011
C <sub>11</sub>	0.0130	-0.0240	0.0483	0.0352	0.0370	0.0361	0.0018
C <sub>11</sub> '	0.0130	-0.0235	0.0484	0.0354	0.0365	0.036	0.0011
C <sub>12</sub>	0.0495	-0.0683	-0.0310	0.0185	0.0188	0.0186	0.0003
C <sub>12</sub> '	-0.0495	-0.0681	-0.0309	0.0186	0.0185	0.0186	-0.0001
C <sub>13</sub>	-0.0356	-0.0580	-0.0132	0.0223	0.0224	0.0224	0.0001
C <sub>13</sub> '	-0.0356	-0.0577	-0.0132	0.0225	0.0221	0.0223	-0.0004
CH <sub>3</sub>	-0.0840	-0.0947	-0.0737	0.0103	0.0107	0.0105	0.0005
CH <sub>3</sub> '	-0.0840	-0.0946	-0.0736	0.0103	0.0106	0.0105	0.0003

### BIP-4

N <sub>1</sub>	-0.1620	-0.2167	-0.1558	0.0062	0.0547	0.0305	0.0485
C <sub>2</sub>	0.0908	0.0602	0.1284	0.0376	0.0306	0.0341	-0.0070
C <sub>3</sub>	-0.0588	-0.0814	0.0223	0.0811	0.0225	0.0518	-0.0586
C <sub>4</sub>	-0.0241	-0.0810	0.0039	0.0280	0.0569	0.0425	0.0288
C <sub>5</sub>	-0.0588	-0.0824	0.0223	0.0811	0.0236	0.0524	-0.0575
C <sub>6</sub>	0.0908	0.0603	0.1283	0.0376	0.0304	0.034	-0.0071
N <sub>2</sub>	-0.1609	0.2004	-0.1336	0.0273	0.0394	0.0334	0.0121
N <sub>2</sub> '	-0.1610	-0.1981	-0.1335	0.0275	0.0371	0.0323	0.0096
C <sub>7</sub>	0.0562	-0.0155	0.0885	0.0323	0.0717	0.052	0.0394
C <sub>7</sub> '	0.0562	-0.0128	0.0886	0.0324	0.0690	0.0507	0.0366
C <sub>8</sub>	-0.0266	-0.0287	-0.0136	0.0131	0.0021	0.0076	-0.0110
C <sub>8</sub> '	-0.0267	-0.0282	-0.0135	0.0132	0.0015	0.0073	-0.0117
C <sub>9</sub>	-0.0248	-0.0463	-0.0081	0.0166	0.0215	0.0191	0.0049
C <sub>9</sub> '	-0.0247	-0.0452	-0.0080	0.0167	0.0205	0.0186	0.0039
C <sub>10</sub>	-0.0561	-0.0755	-0.0351	0.0209	0.0195	0.0202	-0.0015
C <sub>10</sub> '	-0.0561	-0.0750	-0.0350	0.0210	0.0190	0.02	-0.0020
C <sub>11</sub>	0.0831	0.0474	0.1162	0.0331	0.0357	0.0344	0.0026
C <sub>11</sub> '	0.0831	0.0487	0.1163	0.0332	0.0345	0.0338	0.0013
C <sub>12</sub>	-0.0742	-0.0911	-0.0534	0.0208	0.0169	0.0188	-0.0039

C <sub>12</sub> '	-0.0742	-0.0906	-0.0534	0.0209	0.0164	0.0186	-0.0045
C <sub>13</sub>	-0.0325	-0.0568	-0.0086	0.0239	0.0243	0.0241	0.0004
C <sub>13</sub> '	-0.0323	-0.0556	-0.0083	0.0240	0.0233	0.0236	-0.0007
CH <sub>3</sub> O	-0.1279	-0.1474	-0.0998	0.0281	0.0196	0.0238	-0.0085
CH <sub>3</sub> O'	-0.1279	-0.1470	-0.0997	0.0282	0.0190	0.0236	-0.0091

### BIP-5

N <sub>1</sub>	-0.1593	-0.1958	-0.1523	0.0070	0.0366	0.0218	0.0295
C <sub>2</sub>	0.0921	0.0676	0.1326	0.0406	0.0245	0.0325	-0.0161
C <sub>3</sub>	-0.0557	-0.1039	0.0273	0.0830	0.0482	0.0656	-0.0347
C <sub>4</sub>	-0.0226	-0.0669	0.0060	0.0286	0.0443	0.0364	0.0157
C <sub>5</sub>	-0.0563	-0.0739	0.0274	0.0837	0.0176	0.0506	-0.0661
C <sub>6</sub>	0.0912	0.0654	0.1330	0.0418	0.0257	0.0338	-0.0161
N <sub>2</sub>	-0.1545	-0.1550	-0.1263	0.0282	0.0005	0.0143	-0.0276
N <sub>2</sub> '	-0.1550	-0.2333	-0.1316	0.0234	0.0782	0.0508	0.0548
C <sub>7</sub>	0.0599	0.0360	0.0968	0.0369	0.0239	0.0304	-0.0130
C <sub>7</sub> '	0.0589	-0.0498	0.0961	0.0372	0.1087	0.073	0.0715
C <sub>8</sub>	-0.0167	-0.0099	-0.0070	0.0097	-0.0068	0.0015	-0.0165
C <sub>8</sub> '	-0.0154	-0.0348	-0.0087	0.0067	0.0194	0.0131	0.0127
C <sub>9</sub>	-0.0510	-0.0568	-0.0340	0.0170	0.0058	0.0114	-0.0112
C <sub>9</sub> '	-0.0500	-0.0868	-0.0334	0.0166	0.0368	0.0267	0.0202
C <sub>10</sub>	0.0653	0.0576	0.0794	0.0141	0.0077	0.0109	-0.0065
C <sub>10</sub> '	0.0607	0.0383	0.0734	0.0127	0.0224	0.0175	0.0098
C <sub>11</sub>	0.0480	0.0335	0.0843	0.0363	0.0145	0.0254	-0.0219
C <sub>11</sub> '	0.0500	-0.0022	0.0835	0.0336	0.0522	0.0429	0.0186
C <sub>12</sub>	0.0556	0.0496	0.0700	0.0144	0.0060	0.0102	-0.0084
C <sub>12</sub> '	0.0592	0.0349	0.0726	0.0135	0.0243	0.0189	0.0108
C <sub>13</sub>	-0.0590	-0.0622	-0.0387	0.0203	0.0032	0.0118	-0.0171
C <sub>13</sub> '	-0.0548	-0.0911	-0.0366	0.0182	0.0363	0.0272	0.0181

### BIP-6

N <sub>1</sub>	-0.1577	-0.2136	-0.1528	0.0050	0.0559	0.0304	0.0509
C <sub>2</sub>	0.0939	0.0624	0.1243	0.0304	0.0315	0.0309	0.0011
C <sub>3</sub>	-0.0545	-0.0772	0.0163	0.0708	0.0226	0.0467	-0.0481
C <sub>4</sub>	-0.0170	-0.0754	0.0088	0.0259	0.0583	0.0421	0.0325
C <sub>5</sub>	-0.0545	-0.0771	0.0163	0.0708	0.0226	0.0467	-0.0482
C <sub>6</sub>	0.0939	0.0624	0.1243	0.0304	0.0315	0.0309	0.0011
N <sub>2</sub>	-0.1272	-0.1565	-0.1053	0.0218	0.0293	0.0256	0.0075
N <sub>2</sub> '	-0.1272	-0.1565	-0.1053	0.0218	0.0293	0.0256	0.0075
C <sub>7</sub>	0.0662	-0.0034	0.0859	0.0197	0.0696	0.0446	0.0499
C <sub>7</sub> '	0.0662	-0.0033	0.0859	0.0197	0.0695	0.0446	0.0499
C <sub>8</sub>	-0.0430	-0.0436	-0.0162	0.0268	0.0006	0.0137	-0.0262
C <sub>8</sub> '	-0.0430	-0.0436	-0.0162	0.0268	0.0006	0.0137	-0.0262
C <sub>9</sub>	0.0980	0.0767	0.1277	0.0297	0.0213	0.0255	-0.0085
C <sub>9</sub> '	0.0980	0.0767	0.1277	0.0298	0.0213	0.0255	-0.0085
C <sub>9</sub> -O	0.1937	-0.2190	-0.1525	0.0412	0.0253	0.0332	-0.0159
C <sub>9</sub> '-O	0.1937	-0.2190	-0.1525	0.0412	0.0253	0.0332	-0.0159
C <sub>10</sub>	-0.0605	-0.0830	-0.0391	0.0214	0.0224	0.0219	0.0010
C <sub>10</sub> '	-0.0605	-0.0830	-0.0391	0.0214	0.0224	0.0219	0.0010
C <sub>11</sub>	-0.0251	-0.0679	0.0142	0.0393	0.0428	0.0411	0.0035
C <sub>11</sub> '	-0.0251	-0.0679	0.0142	0.0393	0.0429	0.0411	0.0035

C <sub>12</sub>	-0.0623	-0.0835	-0.0245	0.0378	0.0212	0.0295	-0.0166
C <sub>12</sub> '	-0.0623	-0.0835	-0.0245	0.0378	0.0212	0.0295	-0.0166
C <sub>13</sub>	-0.0325	-0.0554	-0.0182	0.0143	0.0229	0.0186	0.0086
C <sub>13</sub> '	-0.0325	-0.0554	-0.0182	0.0143	0.0229	0.0186	0.0086

### BIP-7

N <sub>1</sub>	-0.1591	-0.2107	-0.1503	0.0088	0.0516	0.0302	0.0428
C <sub>2</sub>	0.0925	0.0640	0.1398	0.0474	0.0284	0.0379	-0.0190
C <sub>3</sub>	-0.0549	-0.0768	0.0353	0.0902	0.0219	0.0561	-0.0684
C <sub>4</sub>	-0.0217	-0.0757	0.0094	0.0311	0.0540	0.0425	0.0229
C <sub>5</sub>	-0.0564	-0.0802	0.0332	0.0896	0.0238	0.0567	-0.0658
C <sub>6</sub>	0.0913	0.0631	0.1382	0.0469	0.0281	0.0375	-0.0188
N <sub>2</sub>	-0.1516	-0.1951	-0.1250	0.0266	0.0435	0.035	0.0169
N <sub>2</sub> '	-0.1551	-0.1940	-0.1267	0.0285	0.0388	0.0336	0.0103
C <sub>7</sub>	0.0608	-0.0115	0.1039	0.0430	0.0723	0.0577	0.0293
C <sub>7</sub> '	0.0604	-0.0070	0.1021	0.0417	0.0674	0.0546	0.0257
C <sub>8</sub>	-0.0087	-0.0160	-0.0047	0.0040	0.0073	0.0056	0.0033
C <sub>8</sub> '	-0.0108	-0.0160	-0.0040	0.0068	0.0052	0.006	-0.0015
C <sub>9</sub>	-0.0485	-0.0753	-0.0336	0.0149	0.0268	0.0208	0.0118
C <sub>9</sub> '	-0.0632	-0.0856	-0.0502	0.0358	0.0224	0.0177	0.0094
C <sub>10</sub>	0.0781	0.0594	0.0928	0.0148	0.0187	0.0167	0.0039
C <sub>10</sub> '	0.0780	0.0605	0.0948	0.0207	0.0175	0.0172	0.0007
C <sub>10</sub> -O	-0.1896	-0.2068	-0.1733	0.0163	0.0172	0.0168	0.0009
C <sub>10</sub> '-O	-0.1906	-0.2095	-0.1699	0.0093	0.0189	0.0198	-0.0018
C <sub>11</sub>	-0.0647	-0.1084	-0.0245	0.0402	0.0437	0.042	0.0035
C <sub>11</sub> '	-0.0510	-0.0934	-0.0054	0.0168	0.0424	0.044	-0.0032
C <sub>12</sub>	-0.0396	-0.0632	-0.0211	0.0185	0.0237	0.0211	0.0052
C <sub>12</sub> '	-0.0375	-0.0591	-0.0181	0.0456	0.0217	0.0205	0.0023
C <sub>13</sub>	-0.0521	-0.0724	-0.0284	0.0237	0.0203	0.022	-0.0034
C <sub>13</sub> '	-0.0510	-0.0716	-0.0215	0.0194	0.0206	0.025	-0.0089

### BIP-8

N <sub>1</sub>	-0.1619	-0.2168	-0.1552	0.0068	0.0548	0.0308	0.0481
C <sub>2</sub>	0.0910	0.0602	0.1304	0.0394	0.0307	0.0351	-0.0087
C <sub>3</sub>	-0.0585	-0.0819	0.0251	0.0836	0.0234	0.0535	-0.0602
C <sub>4</sub>	-0.0238	-0.0811	0.0052	0.0290	0.0573	0.0432	0.0283
C <sub>5</sub>	-0.0590	-0.0827	0.0246	0.0836	0.0237	0.0537	-0.0598
C <sub>6</sub>	0.0907	0.0602	0.1304	0.0396	0.0305	0.0351	-0.0091
N <sub>2</sub>	-0.1611	-0.2003	-0.1323	0.0288	0.0391	0.034	0.0103
N <sub>2</sub> '	-0.1617	-0.2001	-0.1342	0.0276	0.0384	0.033	0.0108
C <sub>7</sub>	0.0564	-0.0147	0.0909	0.0345	0.0711	0.0528	0.0366
C <sub>7</sub> '	0.0565	-0.0138	0.0909	0.0344	0.0703	0.0523	0.0359
C <sub>8</sub>	-0.0265	-0.0291	-0.0136	0.0129	0.0027	0.0078	-0.0102
C <sub>8</sub> '	-0.0267	-0.0292	-0.0144	0.0123	0.0025	0.0074	-0.0098
C <sub>9</sub>	-0.0219	-0.0456	-0.0034	0.0186	0.0236	0.0211	0.0051
C <sub>9</sub> '	-0.0239	-0.0488	-0.0039	0.0200	0.0249	0.0225	0.0049
C <sub>10</sub>	-0.0561	-0.0763	-0.0345	0.0216	0.0202	0.0209	-0.0014
C <sub>10</sub> '	-0.0689	-0.0882	-0.0481	0.0208	0.0193	0.0201	-0.0015
C <sub>11</sub>	0.0848	0.0484	0.1195	0.0346	0.0364	0.0355	0.0018
C <sub>11</sub> '	0.0845	0.0486	0.1186	0.0341	0.0359	0.035	0.0018
C <sub>11</sub> -O	-0.1855	-0.2134	-0.1502	0.0353	0.0279	0.0316	-0.0074

C <sub>11</sub> '-O	-0.1859	-0.2135	-0.1513	0.0347	0.0276	0.0311	-0.0071
C <sub>12</sub>	-0.0740	-0.0927	-0.0517	0.0224	0.0186	0.0205	-0.0037
C <sub>12</sub> '	-0.0611	-0.0804	-0.0387	0.0224	0.0193	0.0209	-0.0031
C <sub>13</sub>	-0.0310	-0.0538	-0.0078	0.0232	0.0228	0.023	-0.0004
C <sub>13</sub> '	-0.0293	-0.0502	-0.0084	0.0208	0.0209	0.0209	0.0001

### BIP-9

N <sub>1</sub>	-0.1552	-0.1938	-0.1468	0.0083	0.0387	0.0235	0.0303
C <sub>2</sub>	0.0928	0.0731	0.1430	0.0502	0.0197	0.0349	-0.0304
C <sub>3</sub>	-0.0477	-0.0652	0.0399	0.0876	0.0175	0.0526	-0.0701
C <sub>4</sub>	-0.0201	-0.0594	0.0104	0.0304	0.0394	0.0349	0.0089
C <sub>5</sub>	-0.0477	-0.0653	0.0399	0.0876	0.0176	0.0526	-0.0700
C <sub>6</sub>	0.0928	0.0731	0.1430	0.0501	0.0198	0.0350	-0.0304
N <sub>2</sub>	-0.1432	-0.1851	-0.1189	0.0243	0.0419	0.0331	0.0176
N <sub>2</sub> '	-0.1432	-0.1847	-0.1189	0.0243	0.0416	0.0329	0.0173
C <sub>7</sub>	0.0485	-0.0082	0.0990	0.0505	0.0567	0.0536	0.0062
C <sub>7</sub> '	0.0486	-0.0079	0.0991	0.0505	0.0565	0.0535	0.0060
C <sub>8</sub>	0.0522	0.0352	0.0501	-0.0021	0.0170	0.0075	0.0191
C <sub>8</sub> '	0.0522	0.0354	0.0501	-0.0021	0.0168	0.0074	0.0189
N <sub>3</sub>	-0.1390	-0.1741	-0.1228	0.0163	0.0351	0.0257	0.0188
N <sub>3</sub> '	-0.1390	-0.1739	-0.1227	0.0163	0.0349	0.0256	0.0186
C <sub>9</sub>	-0.0360	-0.0539	-0.0234	0.0126	0.0179	0.0153	0.0053
C <sub>9</sub> '	-0.0360	-0.0538	-0.0233	0.0127	0.0179	0.0153	0.0052
C <sub>10</sub>	-0.0366	-0.0587	-0.0186	0.0180	0.0220	0.02	0.0040
C <sub>10</sub> '	-0.0366	-0.0586	-0.0186	0.0180	0.0219	0.0200	0.0039
C <sub>11</sub>	-0.0382	-0.0707	-0.0084	0.0298	0.0325	0.0311	0.0027
C <sub>11</sub> '	-0.0383	-0.0706	-0.0085	0.0298	0.0323	0.0310	0.0025
C <sub>12</sub>	-0.0415	-0.0584	-0.0294	0.0122	0.0168	0.0145	0.0047
C <sub>12</sub> '	-0.0415	-0.0583	-0.0293	0.0122	0.0168	0.0145	0.0046
C <sub>13</sub>	-0.0216	-0.0503	-0.0070	0.0146	0.0287	0.0217	0.0141
C <sub>13</sub> '	-0.0216	-0.0502	-0.0070	0.0146	0.0286	0.0216	0.0140
C <sub>14</sub>	-0.0482	-0.0535	-0.0389	0.0093	0.0053	0.0073	-0.0041
C <sub>14</sub> '	0.0485	0.0414	0.0577	0.0092	0.0071	0.0082	-0.0021

### BIP-10

N <sub>1</sub>	-0.1596	-0.1944	-0.1559	0.0036	0.0348	0.0192	0.0312
C <sub>2</sub>	0.0926	0.0751	0.1043	0.0118	0.0175	0.0146	0.0057
C <sub>3</sub>	-0.0502	-0.0672	-0.0161	0.0341	0.0170	0.0256	-0.0171
C <sub>4</sub>	-0.0191	-0.0560	-0.0026	0.0165	0.0370	0.0267	0.0205
C <sub>5</sub>	-0.0502	-0.0673	-0.0161	0.0341	0.0171	0.0256	-0.0170
C <sub>6</sub>	0.0925	0.0751	0.1042	0.0117	0.0175	0.0146	0.0058
N <sub>2</sub> '	-0.1458	-0.1877	-0.1287	0.0171	0.0419	0.0295	0.0247
N <sub>2</sub>	-0.1458	-0.1877	-0.1288	0.0170	0.0418	0.0294	0.0248
C <sub>7</sub>	0.0503	-0.0054	0.0611	0.0108	0.0557	0.0333	0.0449
C <sub>7</sub> '	0.0502	-0.0055	0.0610	0.0108	0.0557	0.0333	0.0449
C <sub>8</sub>	0.0508	0.0334	0.0676	0.0168	0.0174	0.0171	0.0005
C <sub>8</sub> '	0.0508	0.0335	0.0677	0.0169	0.0173	0.0171	0.0003
N <sub>3</sub>	-0.1265	-0.1603	-0.1094	0.0171	0.0338	0.0254	0.0166
N <sub>3</sub>	-0.1265	-0.1603	-0.1093	0.0172	0.0337	0.0255	0.0165
C <sub>9</sub>	0.0825	0.0683	0.1172	0.0347	0.0142	0.0245	-0.0205
C <sub>9</sub> '	0.0825	0.0683	0.1175	0.0350	0.0141	0.0246	-0.0208

C <sub>9</sub> -O	-0.1857	-0.2023	-0.1380	0.0476	0.0166	0.0321	-0.0310
C <sub>9</sub> '-O	-0.1856	-0.2022	-0.1377	0.0480	0.0166	0.0323	-0.0314
C <sub>10</sub>	-0.0650	-0.0852	-0.0315	0.0335	0.0202	0.0269	-0.0133
C <sub>10</sub> '	-0.0649	-0.0851	-0.0312	0.0337	0.0202	0.027	-0.0135
C <sub>11</sub>	-0.0322	-0.0640	0.0011	0.0333	0.0318	0.0325	-0.0014
C <sub>11</sub> '	-0.0323	-0.0640	0.0010	0.0333	0.0317	0.0325	-0.0017
C <sub>12</sub>	-0.0642	-0.0788	-0.0149	0.0493	0.0146	0.032	-0.0348
C <sub>12</sub> '	-0.0642	-0.0788	-0.0146	0.0497	0.0146	0.0321	-0.0351
C <sub>13</sub>	-0.0169	-0.0465	0.0036	0.0205	0.0296	0.0251	0.0091
C <sub>13</sub> '	-0.0168	-0.0464	0.0038	0.0206	0.0296	0.0251	0.0090
C <sub>14</sub>	-0.0454	-0.0522	-0.0324	0.0130	0.0068	0.0099	-0.0062
C <sub>14</sub> '	0.0454	-0.0521	-0.0323	0.0131	0.0067	0.0099	-0.0064

### BIP-11

N <sub>1</sub>	-0.1590	-0.2082	-0.1506	0.0084	0.0492	0.0288	0.0408
C <sub>2</sub>	0.0920	0.0654	0.1391	0.0471	0.0266	0.0369	-0.0204
C <sub>3</sub>	-0.0535	-0.0750	0.0352	0.0887	0.0215	0.0551	-0.0673
C <sub>4</sub>	-0.0200	-0.0710	0.0105	0.0304	0.0510	0.0407	0.0206
C <sub>5</sub>	-0.0535	-0.0749	0.0352	0.0887	0.0215	0.0551	-0.0673
C <sub>6</sub>	0.0920	0.0654	0.1391	0.0471	0.0266	0.0369	-0.0204
N <sub>2</sub>	-0.1522	-0.1935	-0.1270	0.0252	0.0413	0.0333	0.0161
N <sub>2</sub> '	-0.1522	-0.1936	-0.1270	0.0252	0.0413	0.0333	0.0161
C <sub>7</sub>	0.0591	-0.0088	0.1011	0.0420	0.0679	0.0549	0.0259
C <sub>7</sub> '	0.0591	-0.0088	0.1011	0.0420	0.0679	0.0549	0.0259
C <sub>8</sub>	-0.0116	-0.0177	-0.0065	0.0050	0.0061	0.0056	0.0011
C <sub>8</sub> '	-0.0116	-0.0177	-0.0065	0.0050	0.0061	0.0056	0.0011
C <sub>9</sub>	-0.0209	-0.0454	-0.0028	0.0181	0.0245	0.0213	0.0064
C <sub>9</sub> '	-0.0209	-0.0454	-0.0028	0.0181	0.0245	0.0213	0.0064
C <sub>10</sub>	-0.0428	-0.0625	-0.0261	0.0167	0.0197	0.0182	0.0029
C <sub>10</sub> '	-0.0428	-0.0625	-0.0261	0.0167	0.0197	0.0182	0.0029
C <sub>11</sub>	0.0316	-0.0038	0.0623	0.0306	0.0355	0.033	0.0048
C <sub>11</sub> '	0.0317	-0.0038	0.0623	0.0306	0.0355	0.0331	0.0048
C <sub>11</sub> -Cl	-0.0578	-0.1136	0.0007	0.0586	0.0558	0.0572	-0.0028
C <sub>11</sub> '-Cl	-0.0578	-0.1136	0.0008	0.0586	0.0558	0.0572	-0.0028
C <sub>12</sub>	-0.0462	-0.0660	-0.0288	0.0174	0.0197	0.0186	0.0023
C <sub>12</sub> '	-0.0462	-0.0660	-0.0288	0.0174	0.0198	0.0186	0.0024
C <sub>13</sub>	-0.0280	-0.0499	-0.0070	0.0210	0.0219	0.0214	0.0009
C <sub>13</sub> '	-0.0280	-0.0499	-0.0070	0.0210	0.0219	0.0214	0.0009

### BIP-12

N <sub>1</sub>	-0.1600	-0.2135	-0.1515	0.0085	0.0535	0.031	0.0450
C <sub>2</sub>	0.0915	0.0620	0.1389	0.0473	0.0295	0.0384	-0.0178
C <sub>3</sub>	-0.0553	-0.0787	0.0350	0.0903	0.0234	0.0568	-0.0669
C <sub>4</sub>	-0.0211	-0.0770	0.0101	0.0312	0.0559	0.0435	0.0247
C <sub>5</sub>	-0.0553	-0.0787	0.0350	0.0903	0.0234	0.0568	-0.0669
C <sub>6</sub>	0.0915	0.0620	0.1389	0.0473	0.0295	0.0384	-0.0178
N <sub>2</sub>	-0.1554	-0.1964	-0.1287	0.0267	0.0409	0.0338	0.0142
N <sub>2</sub> '	-0.1554	-0.1964	-0.1287	0.0267	0.0409	0.0338	0.0142
C <sub>7</sub>	0.0582	-0.0128	0.1005	0.0423	0.0710	0.0566	0.0287
C <sub>7</sub> '	0.0582	-0.0128	0.1005	0.0423	0.0710	0.0566	0.0287
C <sub>8</sub>	-0.0182	-0.0232	-0.0110	0.0072	0.0049	0.0061	-0.0023

C <sub>8</sub> '	-0.0182	-0.0232	-0.0110	0.0072	0.0049	0.0061	-0.0023
C <sub>9</sub>	-0.0204	-0.0454	-0.0012	0.0192	0.0250	0.0221	0.0059
C <sub>9</sub> '	-0.0204	-0.0454	-0.0012	0.0192	0.0250	0.0221	0.0059
C <sub>10</sub>	-0.0521	-0.0739	-0.0316	0.0204	0.0219	0.0211	0.0014
C <sub>10</sub> '	-0.0521	-0.0739	-0.0316	0.0204	0.0219	0.0211	0.0014
C <sub>11</sub>	0.1048	0.0660	0.1404	0.0356	0.0387	0.0372	0.0031
C <sub>11</sub> '	0.1048	0.0660	0.1404	0.0356	0.0387	0.0372	0.0031
C <sub>11</sub> -F	-0.1024	-0.1310	-0.0726	0.0297	0.0286	0.0292	-0.0011
C <sub>11</sub> '-F	-0.1024	-0.1310	-0.0726	0.0297	0.0286	0.0292	-0.0011
C <sub>12</sub>	-0.0563	-0.0778	-0.0349	0.0214	0.0215	0.0214	0.0002
C <sub>12</sub> '	-0.0563	-0.0778	-0.0349	0.0214	0.0215	0.0214	0.0002
C <sub>13</sub>	-0.0276	-0.0502	-0.0054	0.0222	0.0225	0.0224	0.0003
C <sub>13</sub> '	-0.0276	-0.0502	-0.0054	0.0222	0.0225	0.0224	0.0003

### BIP-13

N <sub>1</sub>	-0.1591	-0.2076	-0.1510	0.0081	0.0485	0.0283	0.0404
C <sub>2</sub>	0.0919	0.0658	0.1380	0.0461	0.0261	0.0361	-0.0200
C <sub>3</sub>	-0.0535	-0.0744	0.0341	0.0875	0.0210	0.0542	-0.0666
C <sub>4</sub>	-0.0201	-0.0702	0.0099	0.0300	0.0501	0.04	0.0201
C <sub>5</sub>	-0.0535	-0.0745	0.0341	0.0875	0.0210	0.0543	-0.0666
C <sub>6</sub>	0.0919	0.0658	0.1380	0.0461	0.0261	0.0361	0.0200
N <sub>2</sub>	-0.1520	-0.1933	-0.1271	0.0248	0.0413	0.0331	0.0165
N <sub>2</sub> '	-0.1520	-0.1932	-0.1271	0.0249	0.0413	0.0331	0.0164
C <sub>7</sub>	0.0593	-0.0084	0.1006	0.0413	0.0677	0.0545	0.0264
C <sub>7</sub> '	0.0593	-0.0083	0.1006	0.0413	0.0676	0.0545	0.0263
C <sub>8</sub>	-0.0107	-0.0168	-0.0058	0.0050	0.0060	0.0055	0.0011
C <sub>8</sub> '	-0.0107	-0.0168	-0.0058	0.0050	0.0060	0.0055	0.0011
C <sub>9</sub>	-0.0213	-0.0455	-0.0035	0.0178	0.0242	0.021	0.0065
C <sub>9</sub> '	-0.0213	-0.0455	-0.0035	0.0178	0.0242	0.021	0.0064
C <sub>10</sub>	-0.0415	-0.0605	-0.0256	0.0159	0.0190	0.0175	0.0031
C <sub>10</sub> '	-0.0415	-0.0605	-0.0256	0.0159	0.0190	0.0175	0.0031
C <sub>11</sub>	0.0094	-0.0240	0.0379	0.0286	0.0333	0.0309	0.0048
C <sub>11</sub> '	0.0094	-0.0239	0.0379	0.0286	0.0333	0.0309	0.0047
C <sub>11</sub> -Br	-0.0368	-0.1014	0.0326	0.0694	0.0646	0.067	-0.0048
C <sub>11</sub> '-Br	-0.0368	-0.1014	0.0326	0.0694	0.0646	0.067	-0.0048
C <sub>12</sub>	-0.0448	-0.0639	-0.0282	0.0166	0.0191	0.0178	0.0026
C <sub>12</sub> '	-0.0448	-0.0639	-0.0282	0.0166	0.0191	0.0178	0.0026
C <sub>13</sub>	-0.0283	-0.0499	-0.0077	0.0206	0.0216	0.0211	0.0010
C <sub>13</sub> '	-0.0283	-0.0499	-0.0077	0.0206	0.0216	0.0211	0.0009

### BIP-14

N <sub>1</sub>	-0.1633	-0.2177	-0.1603	0.0030	0.0544	0.0287	0.0514
C <sub>2</sub>	0.0899	0.0593	0.1092	0.0193	0.0306	0.0250	0.0113
C <sub>3</sub>	-0.0625	-0.0846	-0.0051	0.0574	0.0221	0.0397	-0.0353
C <sub>4</sub>	-0.0268	-0.0833	-0.0050	0.0218	0.0565	0.0391	0.0347
C <sub>5</sub>	-0.0625	-0.0846	-0.0051	0.0574	0.0221	0.0397	-0.0353
C <sub>6</sub>	0.0899	0.0592	0.1092	0.0193	0.0306	0.0250	0.0113
N <sub>2</sub>	-0.1680	-0.2032	-0.1407	0.0273	0.0351	0.0312	0.0079
N <sub>2</sub> '	-0.1680	-0.2032	-0.1408	0.0272	0.0352	0.0312	0.0079
C <sub>7</sub>	0.0539	-0.0151	0.0691	0.0152	0.0690	0.0421	0.0539
C <sub>7</sub> '	0.0539	-0.0151	0.0691	0.0152	0.0691	0.0421	0.0539

C <sub>8</sub>	-0.0350	-0.0338	-0.0094	0.0256	-0.0012	0.0122	-0.0267
C <sub>8</sub> '	-0.0350	-0.0338	-0.0095	0.0255	-0.0012	0.0122	-0.0267
C <sub>9</sub>	-0.0276	-0.0500	-0.0102	0.0174	0.0224	0.0199	0.0051
C <sub>9</sub> '	-0.0276	-0.0500	-0.0102	0.0173	0.0224	0.0199	0.0051
C <sub>10</sub>	-0.0704	-0.0857	-0.0470	0.0234	0.0152	0.0193	-0.0082
C <sub>10</sub> '	-0.0704	-0.0857	-0.0470	0.0234	0.0152	0.0193	-0.0082
C <sub>11</sub>	0.0519	0.0208	0.0756	0.0237	0.0311	0.0274	0.0074
C <sub>11</sub> '	0.0519	0.0207	0.0755	0.0237	0.0311	0.0274	0.0075
C <sub>11</sub> -N	-0.0514	-0.0670	-0.0101	0.0413	0.0156	0.0285	-0.0257
C <sub>11</sub> '-N	-0.0514	-0.0670	-0.0101	0.0413	0.0156	0.0284	-0.0257
C <sub>12</sub>	-0.0763	-0.0902	-0.0509	0.0253	0.0140	0.0196	-0.0114
C <sub>12</sub> '	-0.0763	-0.0902	-0.0510	0.0253	0.0140	0.0196	-0.0113
C <sub>13</sub>	-0.0347	-0.0547	-0.0164	0.0183	0.0200	0.0192	0.0017
C <sub>13</sub> '	-0.0347	-0.0547	-0.0164	0.0183	0.0200	0.0192	0.0018

### BIP-15

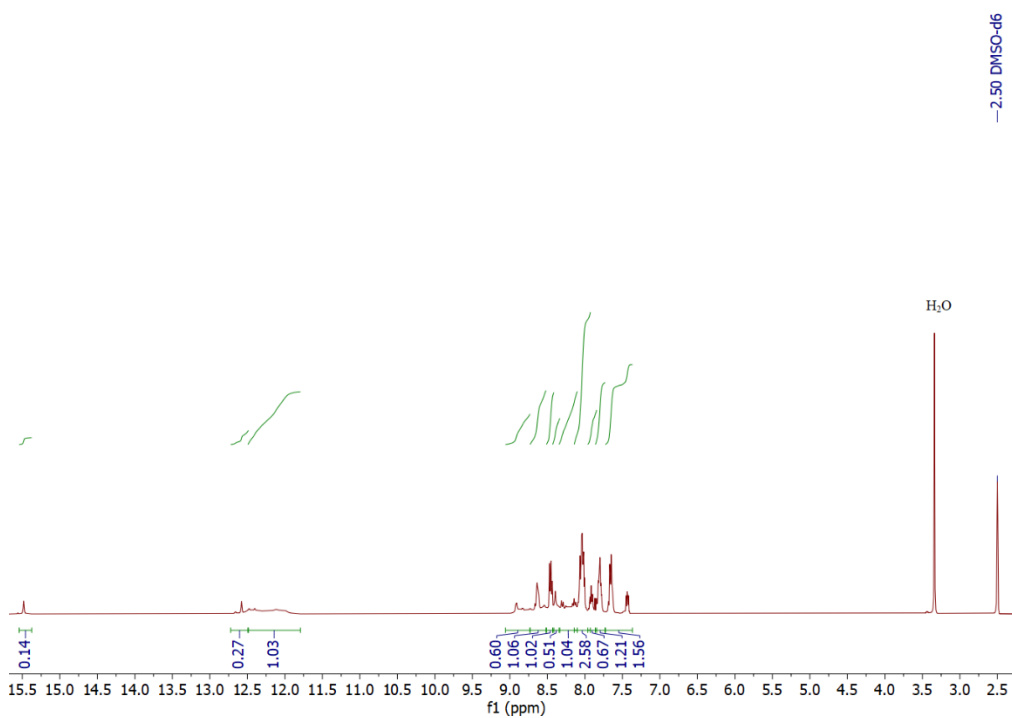
N <sub>1</sub>	-0.1579	-0.1860	-0.1476	0.0103	0.0281	0.0192	0.0178
C <sub>2</sub>	0.0927	0.0788	0.1476	0.0548	0.0139	0.0344	-0.0409
C <sub>3</sub>	-0.0491	-0.0663	0.0451	0.0942	0.0172	0.0557	-0.0770
C <sub>4</sub>	-0.0165	-0.0483	0.0158	0.0323	0.0318	0.0321	-0.0005
C <sub>5</sub>	-0.0491	-0.0663	0.0451	0.0942	0.0172	0.0557	-0.0770
C <sub>6</sub>	0.0927	0.0788	0.1476	0.0548	0.0139	0.0344	0.0409
N <sub>2</sub>	-0.1440	-0.1826	-0.1197	0.0242	0.0386	0.0314	0.0144
N <sub>2</sub> '	-0.1440	-0.1826	-0.1197	0.0242	0.0386	0.0314	0.0144
C <sub>7</sub>	0.0609	0.0173	0.1107	0.0498	0.0436	0.0467	-0.0062
C <sub>7</sub> '	0.0609	0.0173	0.1107	0.0498	0.0436	0.0467	-0.0062
C <sub>8</sub>	0.0030	-0.0155	0.0011	-0.0019	0.0186	0.0083	0.0205
C <sub>8</sub> '	0.0030	-0.0155	0.0011	-0.0019	0.0186	0.0083	0.0205
C <sub>9</sub>	-0.0196	-0.0434	-0.0025	0.0171	0.0238	0.0204	0.0067
C <sub>9</sub> '	-0.0196	-0.0434	-0.0025	0.0171	0.0238	0.0204	0.0067
C <sub>10</sub>	-0.0275	-0.0496	-0.0127	0.0148	0.0221	0.0185	0.0073
C <sub>10</sub> '	-0.0275	-0.0496	-0.0127	0.0148	0.0221	0.0185	0.0073
C <sub>11</sub>	0.0264	-0.0045	0.0566	0.0302	0.0308	0.0305	0.0006
C <sub>11</sub> '	0.0264	-0.0045	0.0566	0.0302	0.0308	0.0305	0.0006
C <sub>11</sub> -N	0.2604	0.2369	0.2650	0.0046	0.0235	0.014	0.0188
C <sub>11</sub> '-N	0.2604	0.2369	0.2650	0.0046	0.0235	0.014	0.0188
C <sub>11</sub> -NO	-0.1999	-0.2499	-0.1770	0.0229	0.0500	0.0364	0.0271
C <sub>11</sub> '-NO	-0.2020	-0.2508	-0.1790	0.0231	0.0488	0.0359	0.0257
C <sub>11</sub> '-NO	-0.2020	-0.2508	-0.1790	0.0231	0.0488	0.0359	0.0257
C <sub>11</sub> '-NO	-0.1999	-0.2499	-0.1770	0.0229	0.0500	0.0364	0.0271
C <sub>12</sub>	-0.0294	-0.0529	-0.0144	0.0150	0.0236	0.0193	0.0086
C <sub>12</sub> '	-0.0294	-0.0529	-0.0144	0.0150	0.0236	0.0193	0.0086
C <sub>13</sub>	-0.0264	-0.0473	-0.0061	0.0203	0.0209	0.0206	0.0006
C <sub>13</sub> '	-0.0264	-0.0473	-0.0061	0.0203	0.0209	0.0206	0.0006

### BIP-16

N <sub>1</sub>	-0.1593	-0.2060	-0.1484	0.0109	0.0468	0.0288	0.0359
C <sub>2</sub>	0.0924	0.0676	0.1485	0.0561	0.0248	0.0404	-0.0313
C <sub>3</sub>	-0.0508	-0.0727	0.0456	0.0964	0.0219	0.0591	-0.0746
C <sub>4</sub>	-0.0208	-0.0697	0.0129	0.0337	0.0489	0.0413	0.0153
C <sub>5</sub>	-0.0508	-0.0727	0.0456	0.0964	0.0218	0.0591	-0.0746

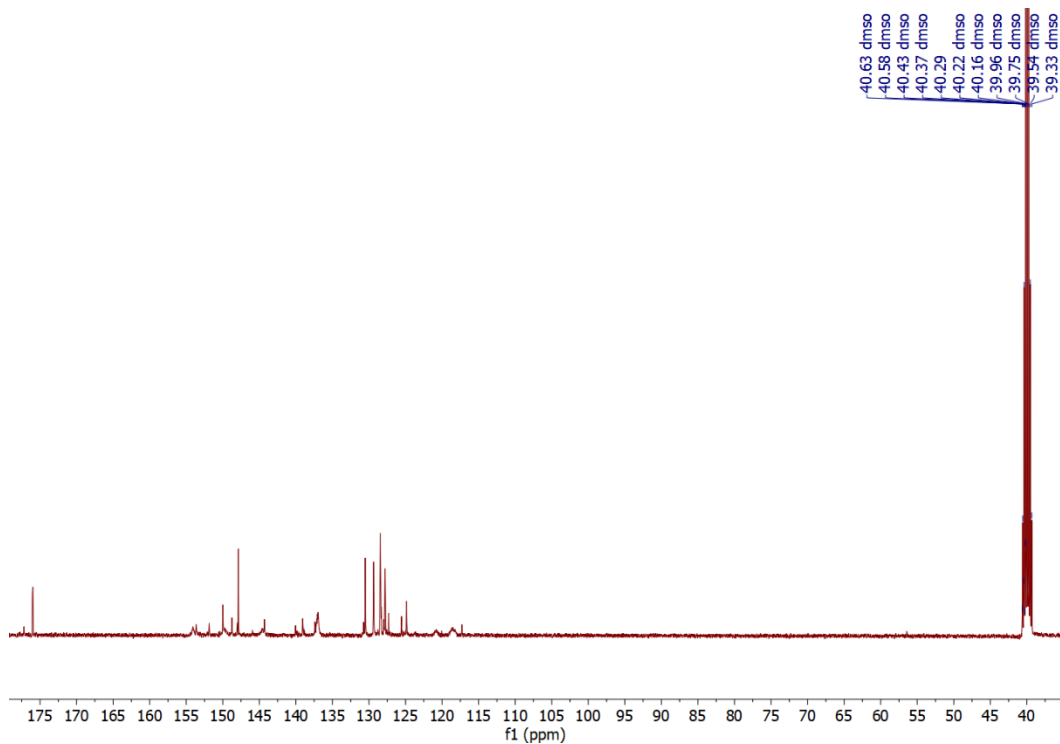
C <sub>6</sub>	0.0924	0.0676	0.1485	0.0561	0.0248	0.0404	-0.0313
N <sub>2</sub>	-0.1433	-0.1897	-0.1144	0.0290	0.0464	0.0377	0.0174
N <sub>2</sub> '	-0.1433	-0.1898	-0.1144	0.0290	0.0464	0.0377	0.0175
C <sub>7</sub>	0.0490	-0.0170	0.1036	0.0546	0.0660	0.0603	0.0115
C <sub>7</sub> '	0.0490	-0.0170	0.1036	0.0546	0.0661	0.0603	0.0115
C <sub>8</sub>	0.0479	0.0333	0.0455	-0.0025	0.0146	0.0061	0.0171
C <sub>8</sub> '	0.0479	0.0333	0.0455	-0.0025	0.0146	0.0061	0.0171
N <sub>3</sub>	-0.1424	-0.1695	-0.1318	0.0106	0.0272	0.0189	0.0166
N <sub>3</sub> '	-0.1423	-0.1695	-0.1318	0.0106	0.0272	0.0189	0.0166
C <sub>10</sub>	0.0275	0.0038	0.0483	0.0208	0.0237	0.0223	0.0029
C <sub>10</sub> '	0.0275	0.0038	0.0483	0.0208	0.0237	0.0223	0.0029
C <sub>11</sub>	-0.0412	-0.0891	-0.0028	0.0384	0.0479	0.0431	0.0095
C <sub>11</sub> '	-0.0412	-0.0891	-0.0028	0.0384	0.0479	0.0431	0.0095
C <sub>12</sub>	-0.0223	-0.0508	-0.0037	0.0185	0.0285	0.0235	0.0100
C <sub>12</sub> '	-0.0223	-0.0508	-0.0038	0.0185	0.0285	0.0235	0.0100
C <sub>13</sub>	-0.0421	-0.0632	-0.0188	0.0233	0.0211	0.0222	-0.0022
C <sub>13</sub> '	-0.0421	-0.0632	-0.0188	0.0233	0.0211	0.0222	-0.0022

Одабрани <sup>1</sup>H NMR и <sup>13</sup>C NMR и 2D спектри дТКХ



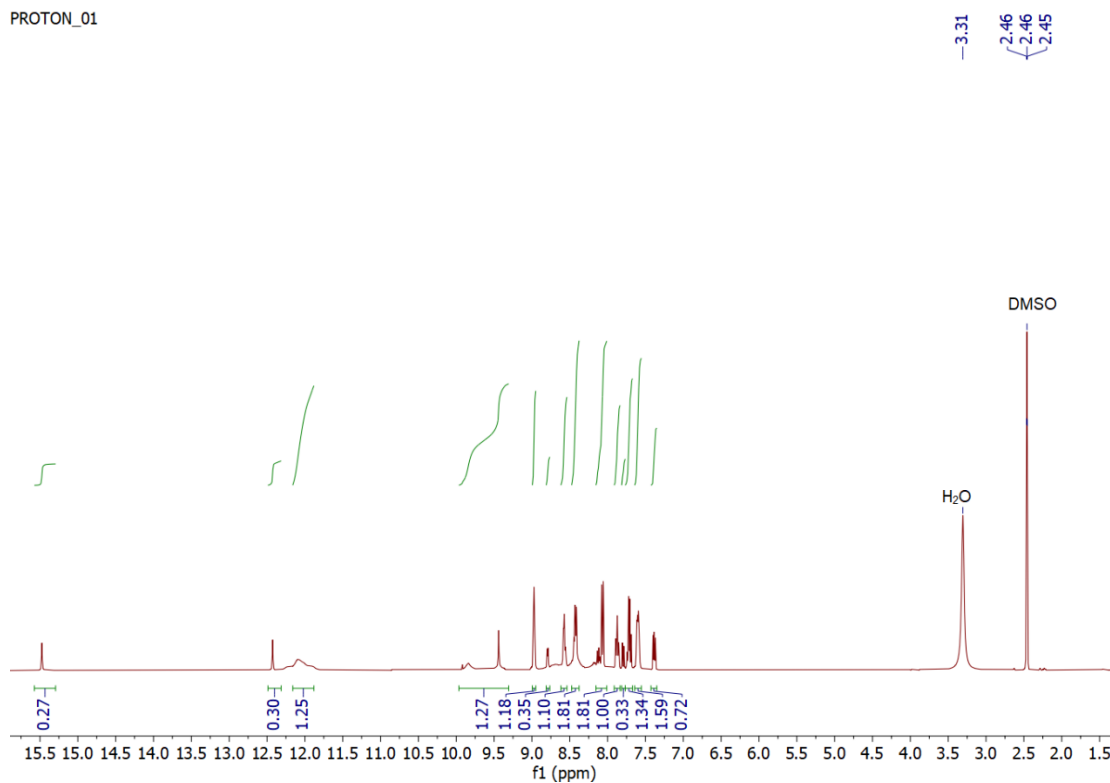
Слика П7.35. <sup>1</sup>H NMR спектар једињења дТКХ2<sub>фп-1</sub> у DMSO-d<sub>6</sub>





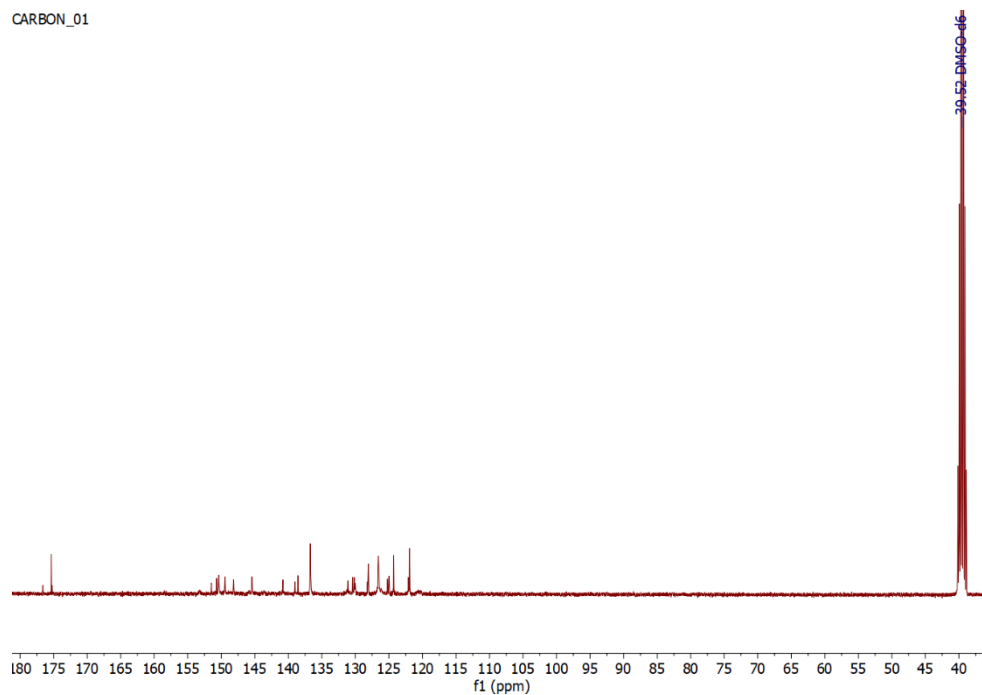
Слика П7.36.  $^{13}\text{C}$  NMR спектар једињења дТКХ2 $_{\phi\text{п}}$ -1 у DMSO-d $_6$

PROTON\_01

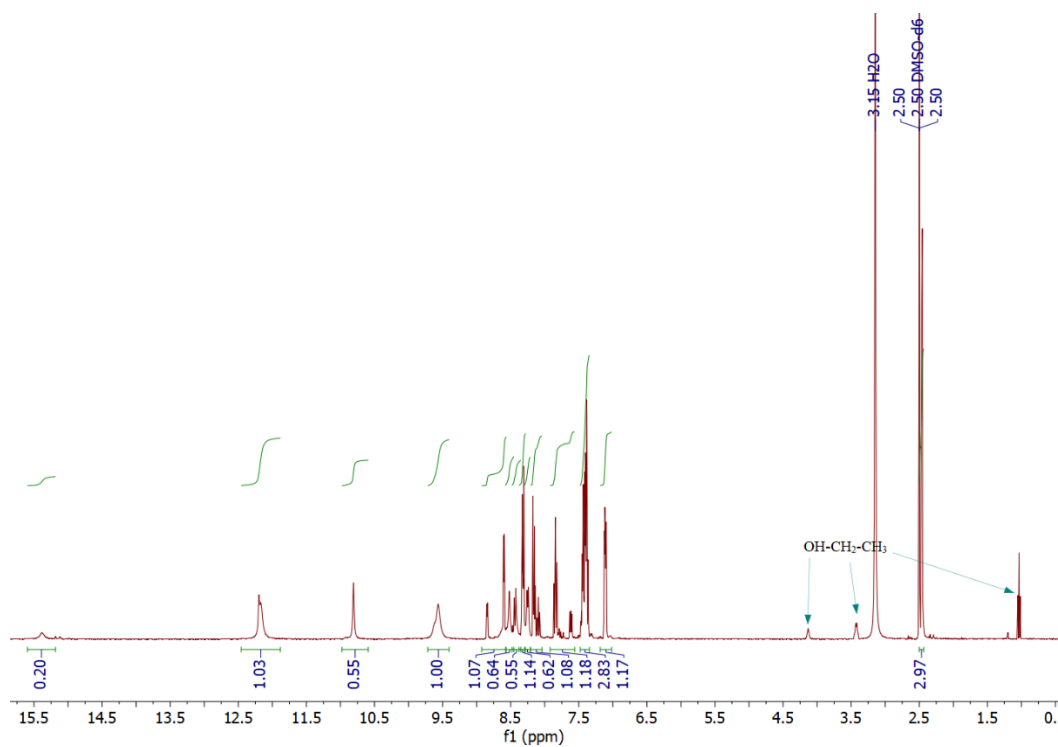


Слика П7.37.  $^1\text{H}$  NMR спектар једињења дТКХ2 $_{\phi\text{п}}$ -3 у DMSO-d $_6$

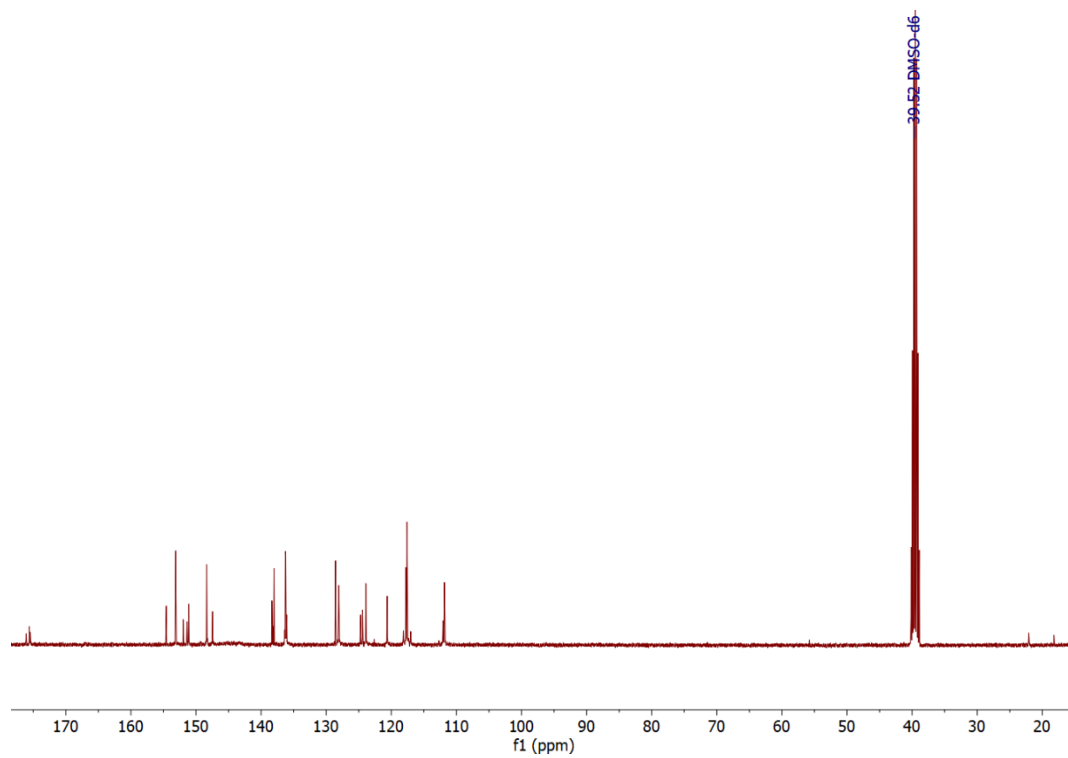
CARBON\_01



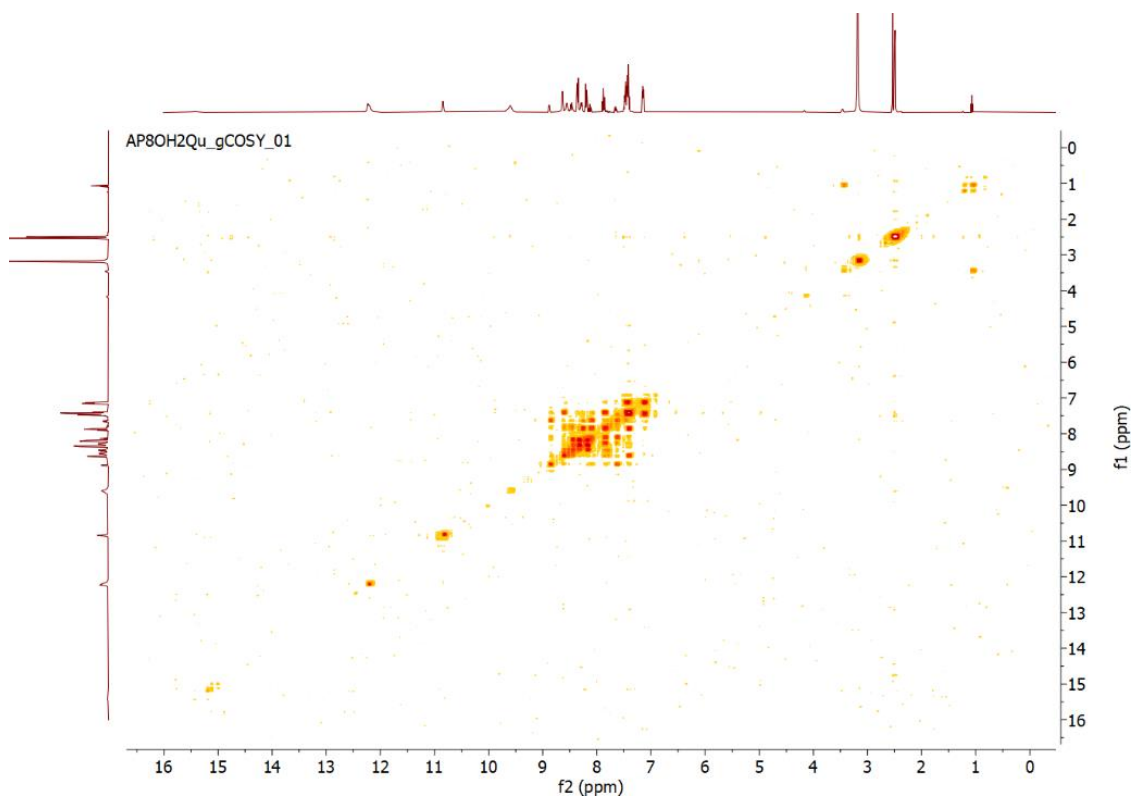
Слика П7.38.  $^{13}\text{C}$  NMR спектар једињења дТКХ $_{2\text{фп-3}}$  у DMSO- $d_6$



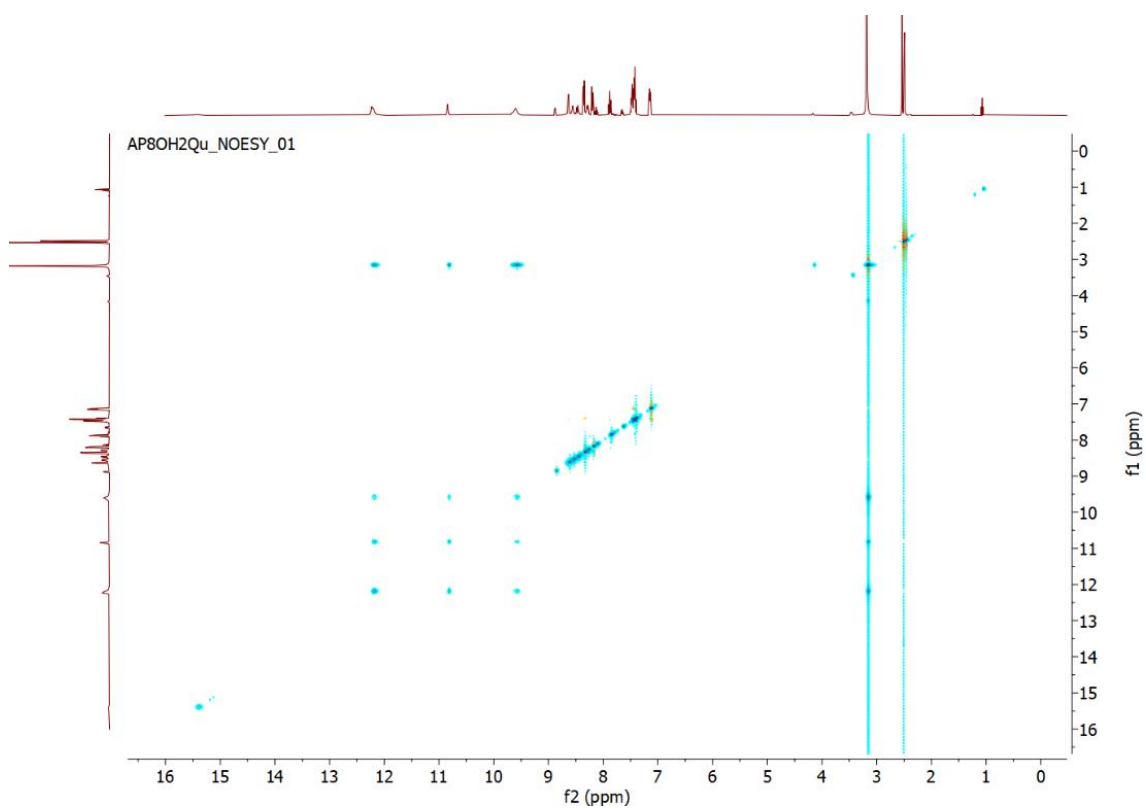
Слика П7.39.  $^{13}\text{C}$  NMR спектар једињења дТКХ $_{2\text{ап-2}}$  у DMSO- $d_6$



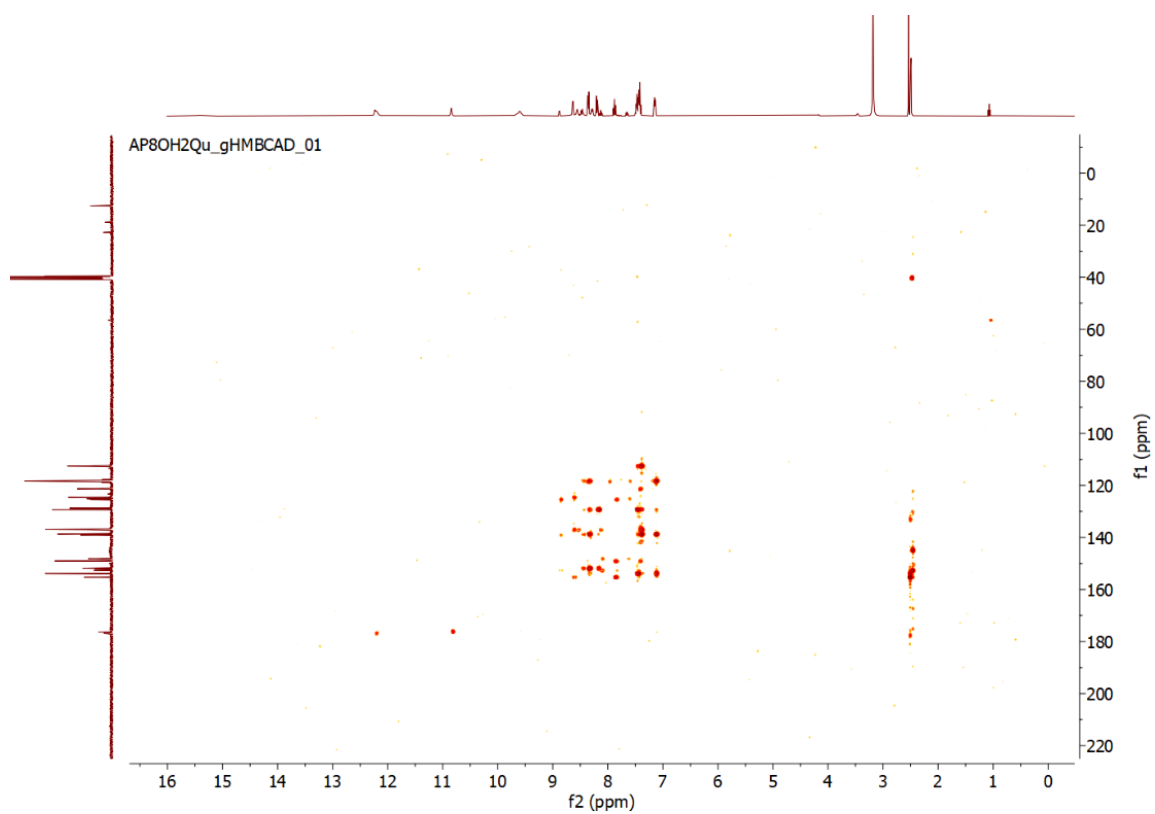
Слика П7.40.  $^{13}\text{C}$  NMR спектар једињења дТКХ2<sub>ап</sub>-2у DMSO-d<sub>6</sub>



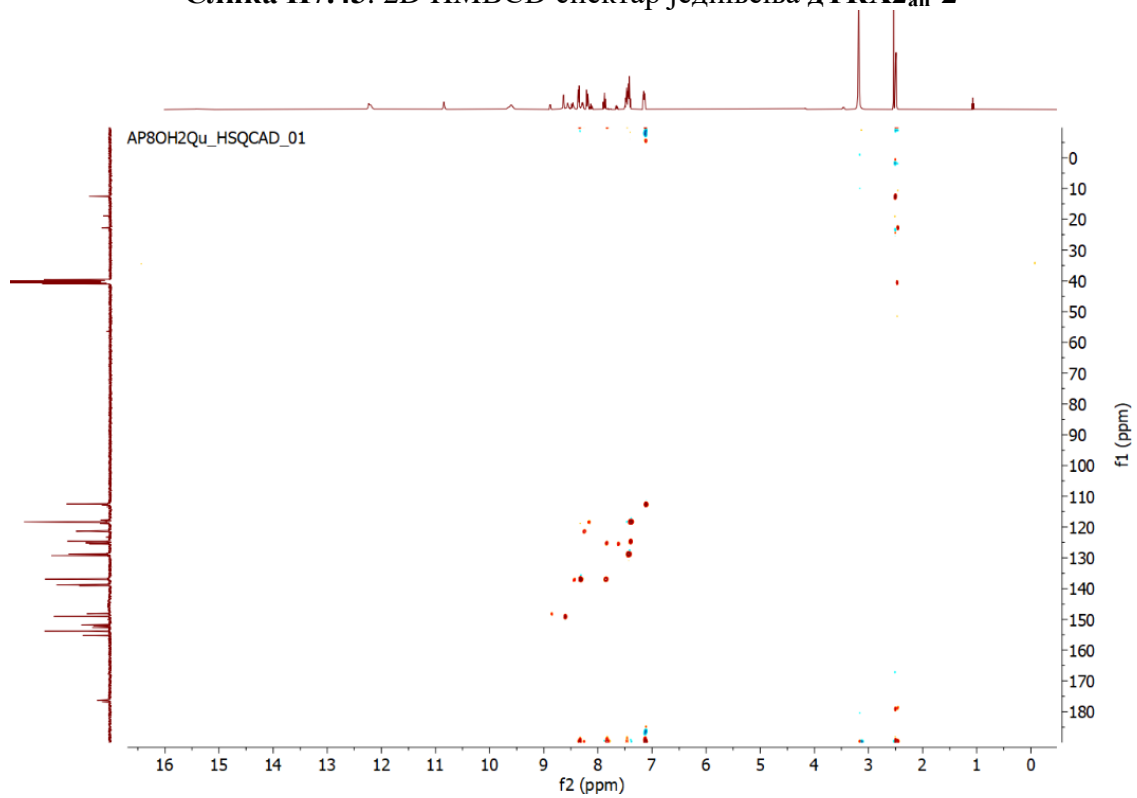
Слика П7.41. 2D COSY спектар једињења дТКХ2<sub>ап</sub>-2



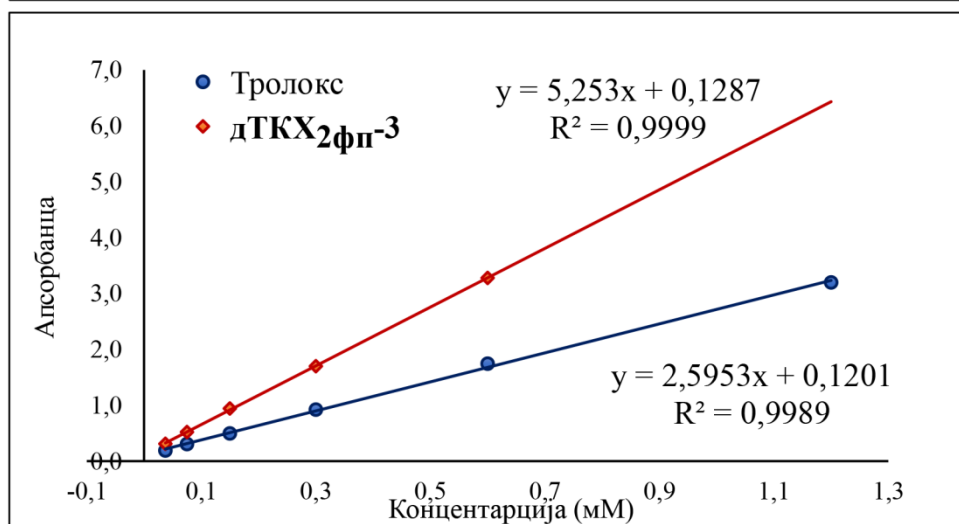
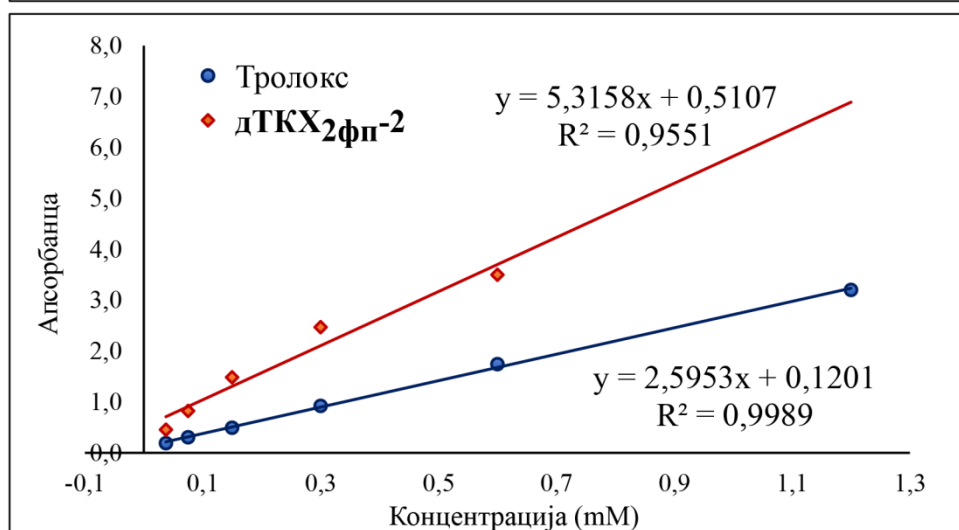
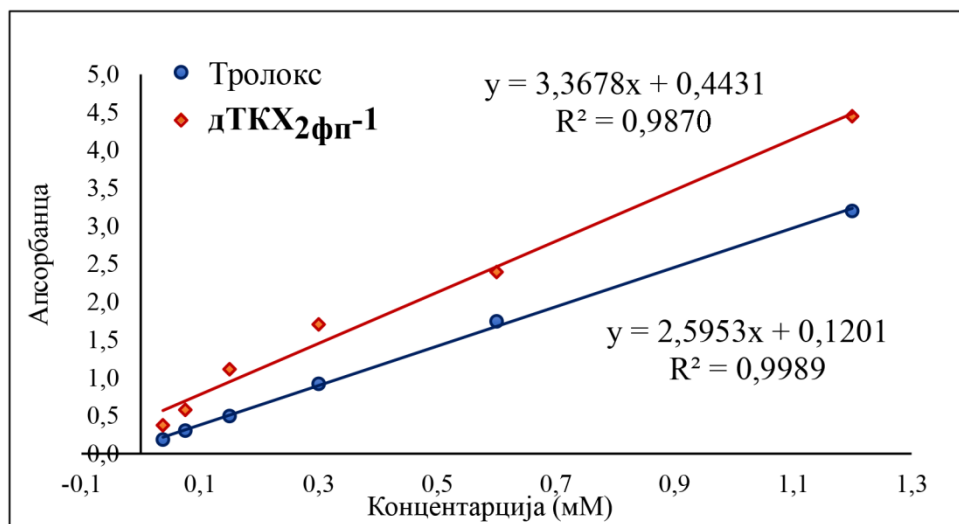
Слика П7.42. 2D NOESY спектар једињења дТКХ2<sub>ап</sub>-2



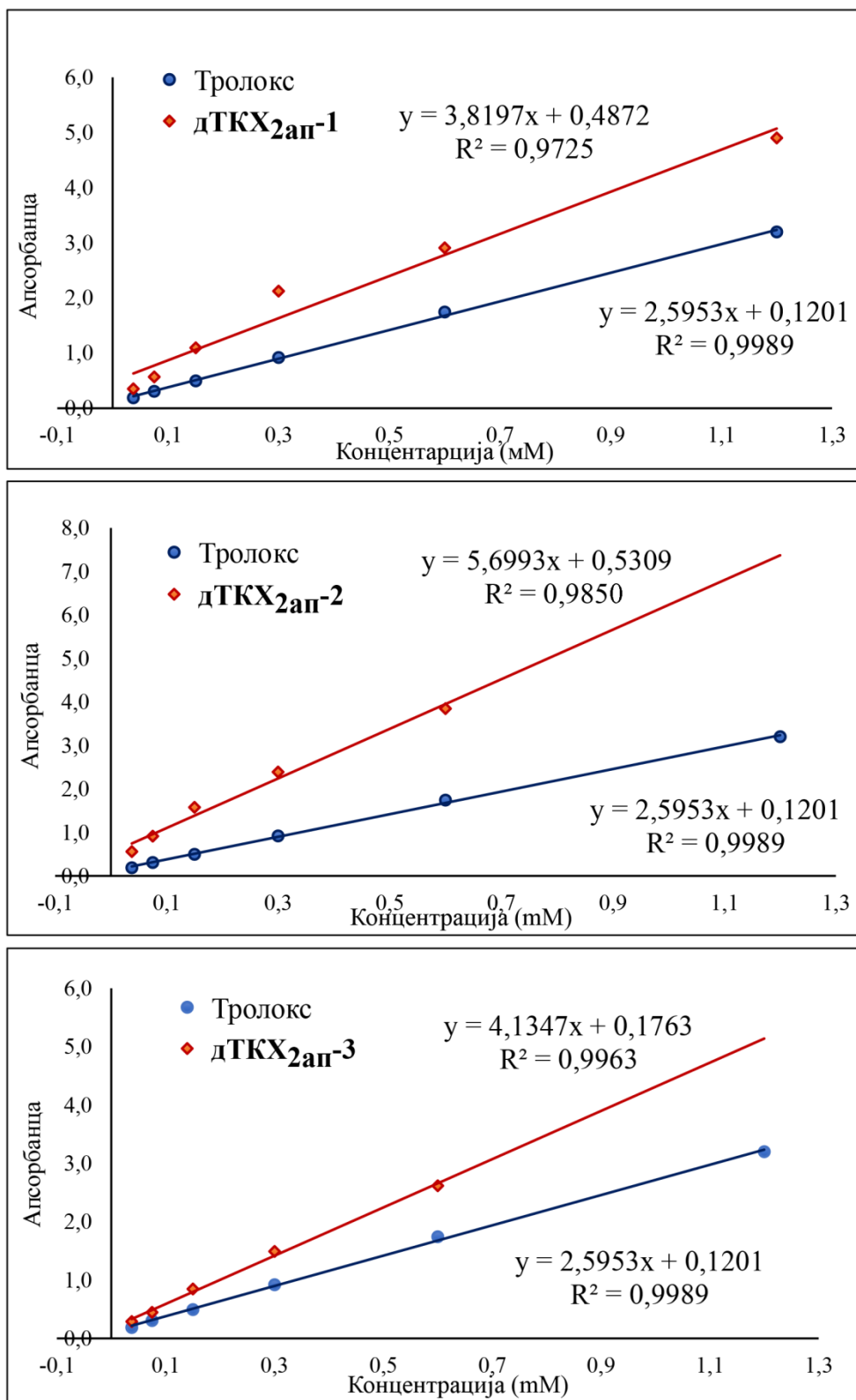
Слика П7.43. 2D HMBCAD спектар једињења дТКХ2<sub>ап</sub>-2



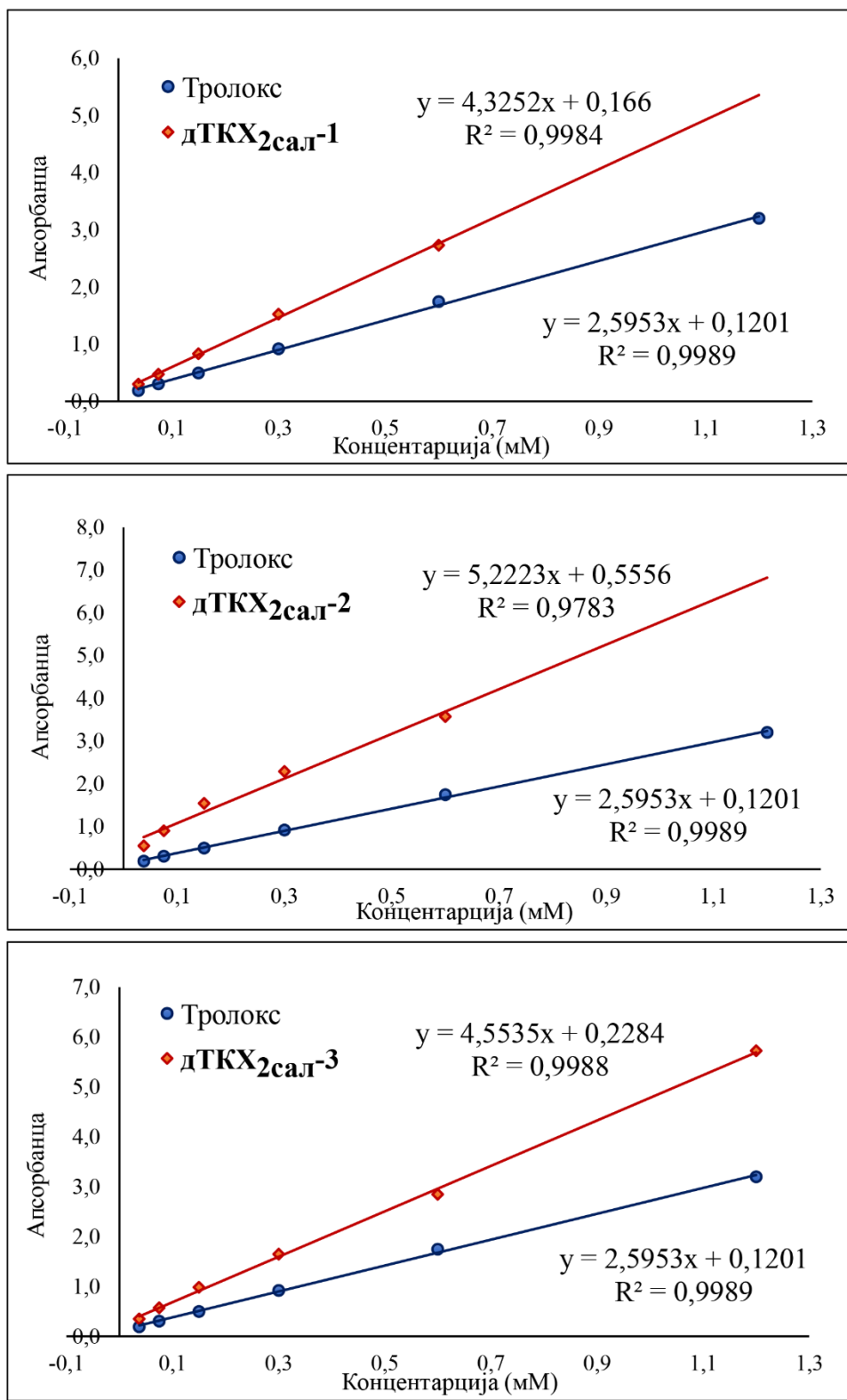
Слика П7.44. 2D HSQCAD спектар једињења дТКХ2<sub>ап</sub>-2



Слика П7.45 Калибрационе криве дТКХ<sub>2</sub>фп групе једињења и тролокса за одређивање моларне апсорптивности и ТЕАС



Слика П7.46 Калибрационе криве дТКХ<sub>2ап</sub> групе једињења и тролокса за одређивање моларне апсорптивности и ТЕАС



Слика П7.47 Калибрационе криве дТКХ<sub>2саг</sub> групе једињења и тролокса за одређивање моларне апсорптивности и ТЕАС



## 8. БИОГРАФИЈА АУТОРА

Милена (Драгослав) Милошевић дипломирани инжењер технологије, рођена је 29.06.1984. године у Крушевцу. Основну школу завршила је у Горњем Степошу, а средњу Хемијско-технолошку школу у Крушевцу. Године 2003. уписала је студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, студијски програм Органска хемијска технологија и полимерно инжењерство и дипломирала је 2012. године, са темом „Проучавање солватохромизма, ацидохромизма и халохромизма 2,6-bis[(E)-2-(3-етокси-4-хидроксифенил)етенил]пиридина“. Докторске студије уписала је школске 2014/2015. године на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, студијски програм Хемија, на Катедри за органску хемију.

Милена Милошевић је од марта 2014. до јануара 2018. године била запослена у Interhem Company d.o.o. Београд. На Институту за хемију, технологију и металургију, Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду запослена је од јануара 2018. године као истраживач приправник у оквиру пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије: ОИ 176018 „Геолошка и екотоксиколошка истраживања у идентификацији геопатогених зона токсичних елемената у акумулацијама воде за пиће - истраживање метода и поступака смањивања утицаја биогеохемијских аномалија“. Од маја 2019. године стиче звање истраживач сарадник. Такође је учествовала у реализацији два иновациона пројекта: „Технологије производње композитних материјала базираних на незасићеним полиестарским смолама/еластомерима и неметалној фракцији отпадних штампаних плоча са додатком адитива за отпорност према горењу“ под евиденционим бројем 391-00-16/2017-16/11 (2017.-2018.) и „Производња еколошки прихватљивих антикорозивних и других помоћних средстава за производњу индустријских премаза“, под евиденционим бројем 391-00-16/2016-16/18 (2016.-2017.). У периоду од 2017. до 2019. године, у оквиру истраживачке групе, била је ангажована на међународном пројекту у оквиру Кост акције (CMST CM1407): „*Challenging organic synthesis inspired by nature: from natural product chemistry to drug discovery*“. У периоду 2018-2019. године била је ангажована као сарадник на два иновациона ваучера „Производња еколошких компонената премазних средстава за заштиту од корозије“, ID пројекта 295 и „Производња паметних система пешачких прелаза са побољшаним физичким и механичким својствима“, ID пројекта 284. Такође, од 2019. па до данас ангажована је на билатералном пројекту: „Синтеза Шифових база и испитивање њихових антимикуробних и антиоксидативних активности“, реализован сарадњом између Републике Србије и Црне горе под евиденционим бројем 451-03-02263/2018-09/16.

Поред наведеног Милена Милошевић је добитник: 1) три (3) златне медаље са ликом Николе Тесле на Међународној изложби проналазака, нових технологија и индустријског дизајна у 2018. и 2020. години, Београд, Република Србија, 2) једне (1) златне медаље на Међународној изложби проналазака и нових технологија одржаној 2020. године у Севастопољу, Руска Федерација, 3) једне (1) златне медаље на међународној изложби иновација у 2020. години у Загребу, Хрватска, 4) једне (1) златне медаље на Међународном сајму патената, изума, иновација и нових технологија, у 2020 години, одржаној у Скопљу, Република Северна Македонија и 5) једне (1) бронзане медаље на Међународном сајму иновација и предузетништва у 2020. години, одржаној у Сарајеву, Босна и Херцеговина. Такође била је учесник такмичења за најбољу технолошку иновацију за студенте 2019. и 2020. године где је као члан тима освојила једну сребрну и једну златну медаљу.

Област интересовања Милене Д. Милошевић је синтеза, физичко-хемијска карактеризација и теоријска проучавања својстава и структуре потенцијално биолошки активних органских једињења примењивих у медицинској хемији. Такође, један део интересовања је везан за област хемијске технологије и представља развој нових метода за синтезу биоразградивих једињења, као и њихову карактеризацију и испитивање као органских корозивних агенаса.

Милена Д. Милошевић је као коаутор и аутор до сада учествовала у изради и публикацији укупно тридесет седам радова у категоријама: шест радова категорије М21, један рад категорије М22, два рада категорије М23, десет радова категорије М33, осам радова категорије М34 и по четири рада из категорија М63 и М64, као и једно техничко решење категорије М82 и пријављене две патентне пријаве категорије М87.

Из области истраживања којој припада тема докторске дисертације, кандидат је аутор два научна рада публикована у међународним часописима (категорије: М21 и М23) и четири саопштења (категорије: М34 и М64).

## 9. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА И САОПШТЕЊА

### Категорија М21:

1. **Milošević, M. D.**, Marinković, A. D., Petrović, P., Klaus, K., Nikolić, M. G., Prlainović, N. Ž., Cvijetić, I. N.: Synthesis, characterization and SAR studies of *bis(imino)pyridines* as antioxidants, acetylcholinesterase inhibitors and antimicrobial agents - *Bioorganic Chemistry*, vol. 102, 104073, 2020 (**IF<sub>2019</sub>=4,831**) (ISSN: 0045-2068) <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104073>.

### Категорија М23:

2. **Milošević, M. D.**, Prlainović, N. Ž. Milčić, M., Nikolić, V., Božić, A., Bigović, M., Marinković, A. D.: Solvent, structural, quantum chemical study and antioxidative activity of symmetrical 1-methyl-2,6-*bis*[2-(substituted phenyl)ethenyl]pyridinium iodides - *Journal of the Iranian Chemical Society*, vol. 15, no. 11, pp. 2483–2501, 2018 (**IF<sub>2018</sub>=1,742**) (ISSN: 1735-2428), <https://doi.org/10.1007/s13738-018-1437-5>.

### Категорија М34:

1. **Milošević, M.**, Milošević, D., Popović, M., Božić, A., Assaleh, H. M., Marinković, A., Cvijetić, I., Prlainović, N.: “Synthesis, characterization and antioxidant activity of new imino derivatives of pyridine”, *13<sup>th</sup> International Symposium Novel Technologies and Economic Development 2019*, Leskovac, Republic of Serbia, 2019., pp. 97 (ISBN: 978-86-89429-35-0).
2. Cvijetić I., **Milošević M.**, Božić A., Prlainović N., Bjelogrić S., Marinković A.: Design, synthesis, antioxidant and anticancer activity of assymmetrically substituted bis-(thiocarbohydrazones) bearing 2-pyridine and quinoline moiety, *8<sup>th</sup> IAPC Meeting Eighth World Conference on Physico-Chemical Methods in Drug Discovery & Fifth World Conference on ADMET and DMPK 2019*, Split, Croatia, 2019, pp. 67.
3. **Milošević, M.**, Cvijetić, I., Božić, A., Prlainović, N., Bjelogrić, S., Popović, M., Marinković, A.: Experimental study of antioxidant and anticancer activity of new asymmetrically substituted thiocarbohydrazones, *18<sup>th</sup> Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry 2021*, on-line, Greece, 2021 (<https://helmedchem2020.gr/>).

### Категорија М64:

1. **Milošević M.**, Perendija J., Božić A., Marinković A.: Synthesis and characterization of new Schiff base for application in biology and medicine, *Sixt Conference of the Young Chemists of Serbia, Chemical Synthesis 2018*, Belgrade, Republic of Serbia, 2018., pp. 59 (ISBN: 978-86-7132-072-6).

## 10. ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Име и презиме аутора Милена Милошевић

Број индекса 4020/2014

---

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Винил и имино деривати пиридина: синтеза, физичко-хемијска карактеризација, биолошка активност и теоријске студије електронске структуре**

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

У Београду,

23.06.2021.

Потпис аутора

Милошевић Милена

---

## 11. ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКОГ РАДА

Име и презиме аутора Милена Милошевић

Број индекса 4020/2014

Студијски програм Хемија

Наслов рада **Винил и имино деривати пиридина: синтеза, физичко-хемијска карактеризација, биолошка активност и теоријске студије електронске структуре**

Ментор Невена Пралиновић и Илија Цвијетић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 23.06.2021.

Потпис аутора

Милошевић Милена

## 12. ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Винил и имино деривати пиридина: синтеза, физичко-хемијска карактеризација, биолошка активност и теоријске студије електронске структуре**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду,

23.06.2021.

Потпис аутора

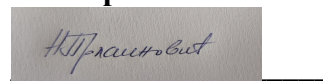
*Милошевић Милена*

## ПРОВЕРА ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, коришћењем програма iThenticate извршена је провера оригиналности докторске дисертације кандидата Милене Д. Милошевић дипломираног инжењера технологије, под називом „**Винил и имино деривати пиридина: синтеза, физичко-хемијска карактеризација, биолошка активност и теоријске студије електронске структуре**“. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио дана 18.05.2021. Утврђени проценат подударности је 10%. Овај проценат је последица употребе стручних термина и назива коришћених метода и њихових скраћеница, личних имена, цитата и инструмената који се налазе у наведеној тези. Део подударности се односи на претходно публиковане резултате докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника. На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујемо да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити (позитивна оцена)

У Београду, 23.06.2021.

**Ментори:**



Др Невена Ж. Прлаиновић, доцент Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет



Др Илија Н. Цвијетић, научни сарадник  
Универзитета у Београду, Хемијски факултет