



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Јелена Петронијевић

**СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА, БИОЛОШКО
И DFT ИСПИТИВАЊЕ ХИНОКСАЛИНОНА И
БЕНЗОКСАЗИНОНА**

Докторска дисертација

Ментор: др Ненад Јанковић

Крагујевац, 2020.

I Аутор

Име и презиме: **Јелена Петронијевић**

Датум и место рођења: **22. 03. 1991., Крагујевац**

Садашње запослење: **Природно-математички факултет, Крагујевац**

II Докторска дисертација

Наслов: **Синтеза, карактеризација, биолошко и DFT испитивање хиноксалинона и бензоксазинона**

Број страница: **152**

Број слика: **61**, Број схема: **22**; Број табела: **15**;

Број библиографских јединица: **170**

Установа и место где је рад израђен: **Природно-математички факултет, Крагујевац**

Научна област (УДК): **Органска хемија (547)**

Ментор: **др Ненад Јанковић**

III Оцена и одбрана

Датум пријаве теме: 29.08.2018. године

Комисија за оцену подобности теме и кандидата:

1. **Др Ненад Јанковић, ментор, научни сарадник, Институт за информационе технологије Крагујевац, Крагујевац,
Научна област: Хемија**
2. **Др Зорица Бугарчић, редовни професор, ПМФ, Крагујевац,
Ужа научна област: Органска хемија**
3. **Др Зоран Ратковић, ванредни професор, ПМФ, Крагујевац,
Ужа научна област: Органска хемија**
4. **Др Милан Вранеш, ванредни професор, ПМФ, Нови Сад,
Ужа научна област: Аналитичка хемија**
5. **Др Марина Костић, научни сарадник, ПМФ, Крагујевац,
Научна област: Хемија**

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:

1. **Др Зорица Бугарчић, редовни професор, ПМФ, Крагујевац,
Ужа научна област: Органска хемија**
2. **Др Зоран Ратковић, ванредни професор, ПМФ, Крагујевац,
Ужа научна област: Органска хемија**
3. **Др Милан Вранеш, ванредни професор, ПМФ, Нови Сад,
Ужа научна област: Аналитичка хемија**

Датум одбране докторске дисертације:

ЗАХВАЛНИЦА

Ова докторска дисертација рађена је у Институту за хемију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу у оквиру пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (бр. пројекта 172011), под менторским руководством научног сарадника, др Ненада Јанковића, који је и предложио тему за овај рад. Захваљујем се ментору на указаном поверењу, идејама, саветима и подршци током свих година докторских студија. Такође, велику захвалност дугујем професорки Зорици Бугарчић, не само као члану комисије већ као бившем ментору.

Захваљујем се и осталим члановима комисије проф. др Зорану Ратковићу и проф. др Милану Вранешу који су допринели бољем квалитету ове тезе својим сугестијама и саветима. Такође се захваљујем др Татјани Станојковић са Института за онкологију и радиологију Србије на урађеним и интерпретираним резултатима биолошких испитивања.

Захваљујем се свим колегама Института за хемију на подршци и пријатељству. Посебну захвалност дугујем другу и колеги Ненаду Јоксимовићу који је својим присуством олакшао мој рад у лабораторији и учествовао у решавању свих мојих недоумица и проблема. Такође, желим да захвалим и новом члану лабораторије, Емилији Миловић, на пријатељству и сарадњи.

И на крају, људи којима дугујем неизмерну захвалност за све што су учинили за мене и извели ме на прави пут, јесу моји родитељи. Хвала им за пружену љубав, подршку, помоћ и поверење, јер без свега тога ја не бих била овде где сам сада. Наравно, огромну захвалност дугујем и својој браћи, Марку и Дарку, за несебичну љубав, критике, стрпљење и подршку и знам да није лако бити брат, нарочито некое као што сам ја. Хвала им од срца што су увек ту и што увек имам на кога да се ослоним. Још једна особа која заслужује Нобелову награду за “Како преживети Јелену” јесте мој вереник Филип коме желим да се захвалим на свему, а посебно на указаном разумевању и стрпљењу.

САДРЖАЈ

СПИСАК СЛИКА, ШЕМА И ТАБЕЛА

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

ИЗВОД

SUMMARY

1. ОПШТИ ДЕО

1.1	Значај деривата хиноксалина и бензоксазина.....	1
1.2	Методе за синтезу хиноксалинона.....	4
1.3	Методе за синтезу бензоксазинона.....	12
1.4	Биолошка активност деривата хиноксалина.....	17
1.4.1	Антитуморска активност деривата хиноксалина.....	17
1.4.2	Антивирусна активност деривата хиноксалина.....	24
1.4.3	Анти-инфламаторна активност деривата хиноксалина.....	26
1.4.4	Антикоагулантна активност.....	27
1.4.5	Антимикробна активност.....	28
1.5	Биолошка активност деривата оксазина.....	31

2. НАШИ РАДОВИ

2.1	Увод.....	36
2.2	Синтеза 3,4-дихидро-2(1 <i>H</i>)-хиноксалинона и 3,4-дихидро-1,4-бензоксазин-2-она.....	38
2.2.1	Постсинтетичка анализа.....	41
2.2.2	Кристалографска анализа.....	44
2.3	Биолошка активност 3,4-дихидро-2(1 <i>H</i>)-хиноксалинона и 3,4-дихидро-1,4-бензоксазин-2-она.....	48
2.3.1	Антитуморска активност	48
2.3.2	Механизам антитуморске активности	49
2.3.2.1	Анализа фаза ћелијског циклуса.....	49
2.3.2.2	Интеракција са биомакромолекулима (ДНК и БСА).....	51
2.3.2.3	Мерење вискозности.....	57

2.3.2.4	Молекулски докинг.....	59
2.3.3	Анти α -глюкозидазна активност.....	64
2.3.4	Утицај на ангиогенезу.....	65
2.4	Теоријско испитивање одабраних 3,4-дихидро-2(1 <i>H</i>)-хиноксалинона и 3,4-дихидро-1,4-бензоксазин-2-она	66
2.4.1	Молекулска геометрија	67
2.4.2	Вибрациона анализа.....	69
2.4.2.1	С-Н вибрације.....	74
2.4.2.2	С-С вибрације.....	74
2.4.2.3	Н-Н вибрације.....	74
2.4.2.4	С=О вибрације.....	75
2.4.3	Рамански спектри.....	75
2.4.4	UV-Vis спектри и израчунавање електронских параметара.....	78
2.4.5	^1H и ^{13}C NMR спектри.....	83
3.	ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	
3.1	Опште напомене.....	86
3.2	Компјутерске методе за докинг и симулирање.....	88
3.3	Припремање лимуновог сока.....	89
3.4	Генерална процедура за добијање 3,4-дихидро-2(1 <i>H</i>)-хиноксалинона (5а-т) и 3,4-дихидро-1,4-бензоксазин-2-она (6а, 6б, 6ф, 6к-о).....	90
3.5	Спектроскопски подаци хиноксалинона и бензоксазинона.....	90
4.	ЗАКЉУЧАК	97
5.	ЛИТЕРАТУРА	99
6.	БИОГРАФИЈА	108
7.	ПРИЛОГ	
	Спектри синтетисаних једињења	
	Научни радови	

Списак слика, схема и табела:

Слика 1. Структура ехиномицина

Слика 2. Структуре хинохеманина и 1-метил-2(Н)-хиноксалин-2-она

Слика 3. Представници хиноксалина укључени у клиничка испитивања

Слика 4. Изомери оксазина

Слика 5. Структуре бензоксазинона и биљне врсте у којима се они налазе

Слика 6. Структура актиномицина

Слика 7. Структуре једињења 21-24

Слика 8. Структуре испитиваних пиридохиноксалинона 25-32

Слика 9. Структуре једињења 33 и 34

Слика 10. Структуре једињења 35 и 36

Слика 11. Структуре једињења 37-40

Слика 12. Структуре једињења 41a и 41b

Слика 13. Структуре једињења 42-45

Слика 14. Структуре једињења 46 и 47

Слика 15. Структуре једињења 48-59

Слика 16. Структуре једињења 60-62

Слика 17. Структуре једињења 63a-j

Слика 18. Структуре једињења 64-66

Слика 19. Структуре једињења 67-70

Слика 20. Структуре једињења 71-73

Слика 21. Структура једињења 74

Слика 22. Структуре једињења 75-79

Слика 23. Структуре једињења 80a-r

Слика 24. Структуре једињења 81a-l

Слика 25. Структуре једињења 82a и 82b

Слика 26. Структуре једињења 83a-e

- Слика 27. Структуре једињења **84** и **85**
- Слика 28. Структуре једињења **86** и **87**
- Слика 29. Структура једињења **88**
- Слика 30. Структуре једињења **89** и **90**
- Слика 31. Структура једињења **91**
- Слика 32. Структуре једињења **92** и **93**
- Слика 33. Структуре и приноси (%) једињења **5(a-m)** и **6a, 6b, 6f, 6k-o**; у загради се налазе приноси остварени применом методе **B**
- Слика 34. Предложени механизам реакције добијања 3,4-дихидро-2(1H)-хиноксалинона
- Слика 35. Утицај рециклираног лимуновог сока на приносе производа
- Слика 36. Графички приказ фактора **AE** и **RME** за методу **A** и **B** (горе) и Екоскала за обе методе (доле)
- Слика 37. Графички приказ **E**-фактора ($g\ g^{-1}$) за две зелене методе
- Слика 38. Кристална структура и шема нумерисања атома једињења **6b**
- Слика 39. Формирање двоструког низа у кристалном паковању једињења **6b**.
Интермолекулске водоничне везе су приказане испрекиданим плавим линијама.
- Слика 40. Концентрације испитиваних једињења које доводе до 50% инхибиције преживљавања ћелије (IC_{50}) изражене у $\mu g/ml$
- Слика 41. Хистограми добијени анализом ћелијског циклуса на проточном цитометру
- Слика 42. На горњим сликама приказани су емисиони спектри **ЕБ** везаног за ДНК у одсуству (црвене линије) и присуству једињења **5c, 5g, 5h** и **5i**. Црвена линија одговара раствору пуфер + испитивано једињење. $[EB] = 100\ \mu M$, $[ДНК] = 100\ \mu M$; $[5c]$, $[5g]$, $[5h]$ and $[5i] = 0-100\ \mu M$; $pH = 7,4$; $\lambda_{ex} = 520\ nm$. Стрелицама је приказана промена интензитета емисије са повећањем концентрације испитиваних једињења. Доле: графици зависности I_0/I у функцији од $[Q]$.
- Слика 43. На горњим сликама приказани су емисиони спектри **БСА** у одсуству (црвене линије) и присуству једињења **5c, 5g, 5h** и **5i**. Црвена линија одговара раствору пуфер + испитивано једињење. $[БСА] = 10\ \mu M$, $[5c]$, $[5g]$, $[5h]$ and $[5i] = 0,0, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0$ и $8,0$; μM ; $pH = 7,4$; $\lambda_{ex} = 280\ nm$. Доле: графици зависности I_0/I у функцији од $[Q]$.
- Слика 44. Релативна вискозност $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ ДНК ($0,01\ mM$) у раствору пуфера ($50\ mM\ NaCl$ и $5\ mM\ tris\ HCl$ на $pH\ 7,4$) по додатку лиганда **5h** (црвено) и лиганда **5i** (црно) са повећањем односа **R**

Слика 45. Резултати докинг студије лиганада **5c** и **5g** са ДНК

Слика 46. Резултати докинг студије цисплатине са ДНК

Слика 47. Резултати докинг студије лиганада **5c** и **5g** са БСА

Слика 48. Резултати докинг студије цисплатине са БСА

Слика 49. Утицај испитиваних једињења **5c**, **5g**, **5h** и **5i** на ангиогенезу ендотелних ћелија

Слика 50. Оптимизоване структуре једињења **5g**, **5c**, **5k** и **6l**

Слика 51. Експериментални (a), израчунати IR (b) и израчунати Рамански (c) спектри за једињење **5g**

Слика 52. Експериментални (a), израчунати IR (b) и израчунати Рамански (c) спектри за једињења **5c**

Слика 53. Експериментални (лево) и израчунати (десно) Рамански спектри једињења **5g** и **5c**

Слика 54. Експериментални (лево) и израчунати (десно) Рамански спектри једињења **5k** и **6l**

Слика 55. Микроскопски снимци добијени приликом снимања Раманских спектра

Слика 56. Експериментални UV-Vis спектри једињења **5g**, **5c**, **5k** и **6l**

Слика 57. Граничне молекулске орбитале (HOMO и LUMO) једињења **5g**, **5c**, **5k** и **6l**

Слика П1. Резултати докинг студије лиганада **5h** и **5i** са ДНК

Слика П2. Резултати докинг студије лиганада **5h** и **5i** са БСА

Слика П3. Експериментални (a), израчунати IR (b) и израчунати Рамански (c) спектри за једињење **5k**

Слика П4. Експериментални (a), израчунати IR (b) и израчунати Рамански (c) спектри за једињење **6l**

- Схема 1. *Hinsberg*-ова реакција за синтезу хиноксалинона
- Схема 2. Добијање хиноксалинона помоћу α -халогенестара
- Схема 3. Добијање хиноксалинона термичком изомеризацијом
- Схема 4. Добијање хиноксалинона из 2-арилиден-метилоксазолин-5-она
- Схема 5. Синтеза хиноксалинона помоћу дехидроаскорбинске киселине
- Схема 6. Добијање хиноксалинона озрачивањем 1,4-бензодиазепина
- Схема 7. Синтеза хиноксалинона помоћу 4-хетероарил-2,4-диоксобутанске киселине
- Схема 8. Функционализација хиноксалинона
- Схема 9. Синтеза хиноксалинона полазећи од дикето киселина
- Схема 10. Добијање хиноксалинона употребом $Ru(phen)_3Cl_2$ као катализатора
- Схема 11. Синтеза хиноксалинона помоћу аминокиселина и халогенанилина
- Схема 12. Синтеза индоло[1,2-*a*]-хиноксалинона
- Схема 13. Реакција добијања хиноксалинона помоћу $Pd_2(dba)_3$
- Схема 14. Синтеза пироло[1,2-*a*:2', 1'-*c*]/пиридо[2,1-*c*]пироло-[1,2-*a*]-хиноксалинона
- Схема 15. Синтеза хиноксалинона помоћу метил-триметоксиацетата
- Схема 16. Добијање бензоксазинона помоћу одговарајућих етил-2-бромоалканоата
- Схема 17. Асиметрична синтеза 1,4-бензоксазинона у присуству BQd катализатора
- Схема 18. Синтеза 1,4-бензоксазинона у којој долази до *Smiles*-овог премештања
- Схема 19. Добијање изоиндоло[1,4]-бензоксазинона
- Схема 20. Синтеза 3-(2-оксо-2*H*-бензо[*b*][1,4]оксазин-3-ил)пропаноата
- Схема 21. Синтеза бензоксазинона помоћу супституисаног 2-нитрофенола
- Схема 22. Синтеза 3,4-дихидро-2(1*H*)-хиноксалинона 5(*a-m*) и 3,4-дихидро-1,4-бензоксазин-2-она (**6a**, **6b**, **6f**, **6k-o**)

Табела 1. Синтеза одабраних једињење на грамској скали и зелени параметри (Е-фактор и Екоскала)

Табела 2. Дужине веза (\AA) у кристалној структури једињења **6b**

Табела 3. Индекс селективности

Табела 4. Бимолекулска константа гашења k_q , Stern-Volmer-ова константа K_{SV} и фактор корелације R за једињења **5c**, **5g**, **5h** и **5i**

Табела 5. Параметри K_a и n и коефицијент корелације R за једињења **5c**, **5g**, **5h** и **5i**

Табела 6. Параметри добијени анализом докинг студије за **5c**, **5g**, **5h** и **5i**

Табела 7. IC_{50} вредности испитиваних једињења **5c**, **5g**, **5h** и **5i** за анти α -глукозидазну активност

Табела 8. Израчунати геометријски параметри за једињење **5c** у поређењу са експериментално доступним подацима структурно сличног једињења

Табела 9. Експерименталне и израчунате вредности вибрационих модова као и додељена вибрациона померања добијена помоћу TED-а

Табела 10. Експерименталне и израчунате вредности електронских параметара (λ , E и f) добијене помоћу TD-DFT/ B3LYP/6-311+G(d,p) методе

Табела 11. Вредности електронских параметара једињења **5g**, **5c**, **5k** и **6l** (ΔE , A , I , χ , η , σ и ΔN)

Табела 12. Експерименталне и израчунате вредности 1H и ^{13}C померања једињења **5g**

Табела П1. Експерименталне и израчунате вредности 1H и ^{13}C померања једињења **5c**

Табела П2. Експерименталне и израчунате вредности 1H и ^{13}C померања једињења **5k**

Табела П3. Експерименталне и израчунате вредности 1H и ^{13}C померања једињења **6l**

Листа скраћеница

A549	-	хумани карцином плућа
AIDS	-	синдром стечене имунодефицијенције
AE	-	атомска ефикасност
bnmim	-	бензил-имидазолијум
BQd	-	бензоилхинидин
ⁱ Bu	-	изобутил
^t Bu	-	терцијарни бутил
dba	-	добензилиденацетон
DME	-	диметоксиетан
DMF	-	диметилформаид
DMSO	-	диметилсулфоксид
ЕБ	-	етидијум-броид
<i>E. coli</i>	-	Ешерихија коли
E faktor	-	однос масе отпада и масе производа
Glu	-	глукоза
HeLa	-	хумани карцином грлића материце
HIV	-	вирус хумане имунодефицијенције
IC ₅₀	-	концентрација испитиваног агенса која доводи до 50% инхибиције ћелијског раста у односу на контролу
IC ₂₀	-	концентрација испитиваног агенса која доводи до 20% инхибиције ћелијског раста у односу на контролу
LS174	-	хумани карцином дебелог црева
Me	-	метил група
MRC-5	-	нормална неканцерогена ћелијска линија
MTT	-	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум броид
MW	-	микроталасно зрачење
phen	-	1,10-фенантролин
L-Pro	-	L-пролин
RME	-	ефикасност реакционе масе

THF - тетраhydroфуран
VEGFR-2 - рецептор васкуларног ендотелног фактора раста 2

ИЗВОД

Једињења која садрже хиноксалинске и бензоксазинске фрагменте представљају групу веома важних хетероцикличних фармакофора. Ова врста једињења окупира је пажњу многих научника последњих неколико деценија. Њихови хетероциклични фрагменти су део биолошки активних молекула са анти-инфламаторним, антикоагулантним, антидијабетским, антитуберкулозним, антимикробним, антивирусним и антитуморским активностима. Познато је да хиноксалини, бензоксазини и њихови деривати имају широку примену и велики потенцијал за употребу у клиничкој пракси. Користе се за синтезу лекова који се већ употребљавају у терапији, као органски полупроводници и средстава за денатурацију ДНК.

Узимајући у обзир поменуте чињенице, развили смо једноставну, “зелену” и ефикасну методу за синтезу двадесет и једног новог 3,4-дихидро-2(1*H*)-хиноксалинона и 3,4-дихидро-1,4-бензоксазин-2-она од различитих етил 2-хидрокси-4-алкил(арил)-4-оксо-2-бутеноата и *o*-фенилендиамини или *o*-аминофенола. Сва једињења су окарактерисана спектроскопским методама (IR и NMR) и масеном спектрометријом. Једно од синтетисаних једињења било је погодно за рендгенску структурну анализу. Поменута метода синтезе подразумева употребу лимуновог сока који се понаша и као растварач и као катализатор. Такође, услови реакције у лимуновом соку омогућавају чист и једноставан поступак, при чему се испуњавају критеријуми зелене хемије. Новоразвијена методологија има одличне вредности параметара зелене хемије, што представља врло важну чињеницу за примену синтетичких метода у фармацеутској индустрији.

Сва синтетисана једињења су тестирана на потенцијалну цитотоксичну активност на ћелијским линијама аденокарцинома грлића материце (HeLa), карцинома дебелог црева (LS174), карцинома плућа (A549) и ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5). Четири једињења су показала значајну цитотоксичну активност према свим тестираним малигним ћелијским линијама. Резултати ДНК интеракције, односно вредности добијених константи, показују да се ова једињења снажно везују за ДНК интеркалацијом што је у складу са вредностима константи добијених за потенцијалне лекове који садрже метал. Испитивана је и могућност везивања синтетисаних једињења за транспортне протеине. Добијени

резултати показују да ова једињења имају одговарајући афинитет према транспортним протеинима. Поред цитотоксичне активности, испитивана је и инхибиција α -глюкозидазе ових једињења. Резултати указују на то да се два једињења могу даље анализирати као потенцијална контролна једињења постпрандијалне хипергликемије.

За боље разумевање електронских особина ових једињења урађена је експериментална и теоријска студија (DFT прорачуни). Добијени резултати указују на то да испитивани молекули поседују способност преноса наелектрисања, што значи да поменута једињења имају способност да инхибирају корозију. Вибрационе фреквенције испитиваних молекула идентификоване су у Рамановим спектрима у њиховим карактеристичним областима и израчунате су вредности пикова које се врло добро подударају са експерименталним вредностима. Вредности израчунатих вибрација и хемијских померања угљеника и водоника се одлично подударају са експерименталним вредностима, скоро у свим случајевима.

SUMMARY

Compounds that contain quinoxaline and benzoxazine scaffolds present a group of very important heterocyclic pharmacophores. In the last few decades, this type of compounds occupied the attention of many scientists. Their ring moieties are part of biologically active molecules with anti-inflammatory, anticoagulant, antidiabetic, antituberculosis, antimicrobial, antiviral and anticancer activities. It is known that quinoxalines, benzoxazines and their derivatives have wide application and possess great potential for use in clinical practice. They have been used for the synthesis of therapeutically usable drugs, as organic semiconductors and DNA cleaving agents.

Regarding to this, we developed a simple, green and efficient method for the synthesis of twenty one novel 3,4-dihydro-2(1H)-quinoxalinones and 3,4-dihydro-1,4-benzoxazin-2-ones from different ethyl 2-hydroxy-4-alkyl(aryl)-4-oxo-2-butenate and o-phenylenediamine or o-aminophenol. All compounds were characterized by spectroscopic techniques (IR and NMR) and mass spectrometry. One of synthesized compounds was suitable for X-ray analysis. Mentioned synthetic route considerate usage of lemon juice as a biocatalytic system. Also, reaction conditions in lemon juice provide a clean and simple procedure, achieving the criteria of green chemistry. The presented methodology has excellent values of green chemistry metrics, that are very important facts for method applicability in pharmaceutical industry.

All synthesized compounds were tested on potential cytotoxic activity against human cervix adenocarcinoma (HeLa), human colon carcinoma (LS174), non-small cell lung carcinoma (A549), and normal human fetal lung fibroblast cell line (MRC-5). Four compounds showed a significant cytotoxic activity against all tested malignant cell lines. Results of DNA interactions indicate that these compounds bind strongly with DNA through intercalation that is in order with the constants obtained for potential metal-drugs. Protein binding experiments were also performed. The obtained results indicate that these compounds have appropriate affinity for binding to transport proteins. Beside this, the inhibition of the α -glucosidase of these compounds was also evaluated. The results suggest that two compounds could be further analyzed as new potential control postprandial hyperglycemia compounds.

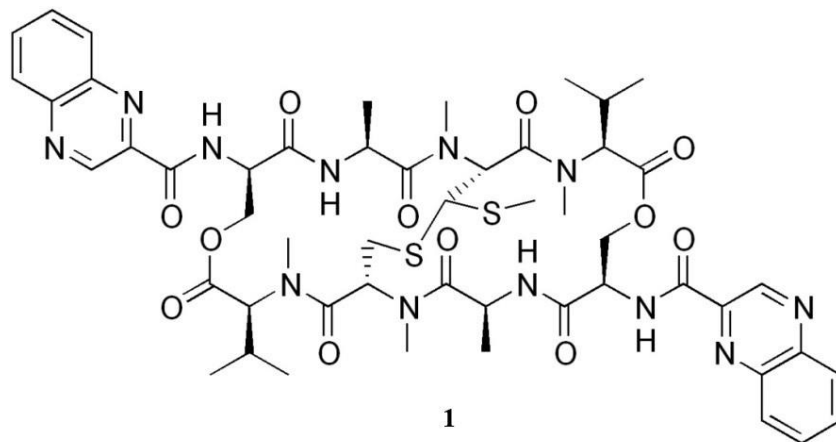
For better understanding of the electronic properties of these compounds, theoretical study (DFT calculations) have been done. Obtained results suggests that investigated molecules possess

charge transfer abilities, meaning that the mentioned compounds have corrosion inhibition properties. The vibrations of the analyzed molecules are well identified in the collected Raman spectra within their characteristic regions and their calculated peak values match very well with the experimental values. The values of the calculated vibrations and chemical shifts are in excellent agreement with the experimental values, almost in all cases.

1. ОПШТИ ДЕО

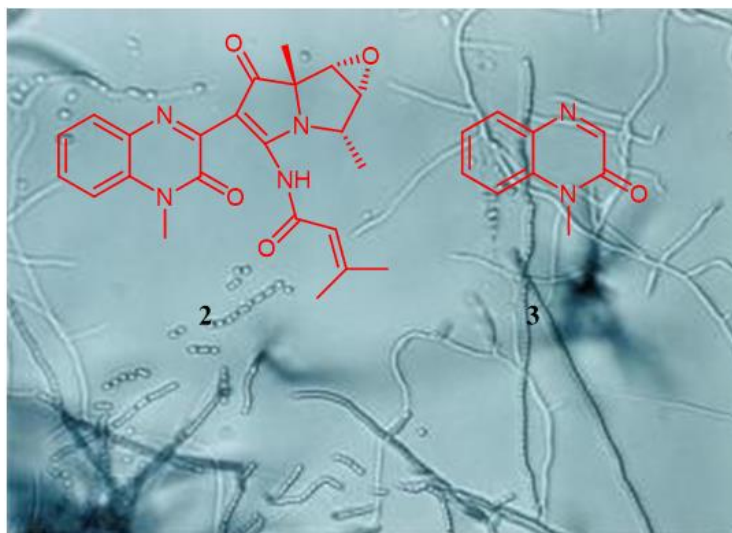
1.1 Значај деривата хиноксалина и бензоксазина

Последње две деценије деривати хиноксалина окупирају пажњу великог броја научника како због своје примене тако и због широког спектра биолошких активности. Ова једињења се ретко налазе у природи где су најчешћи представници ехиномицин (Слика 1) и триостин-А, тако да се већина деривата добија синтетичким путем.



Слика 1. Структура ехиномицина

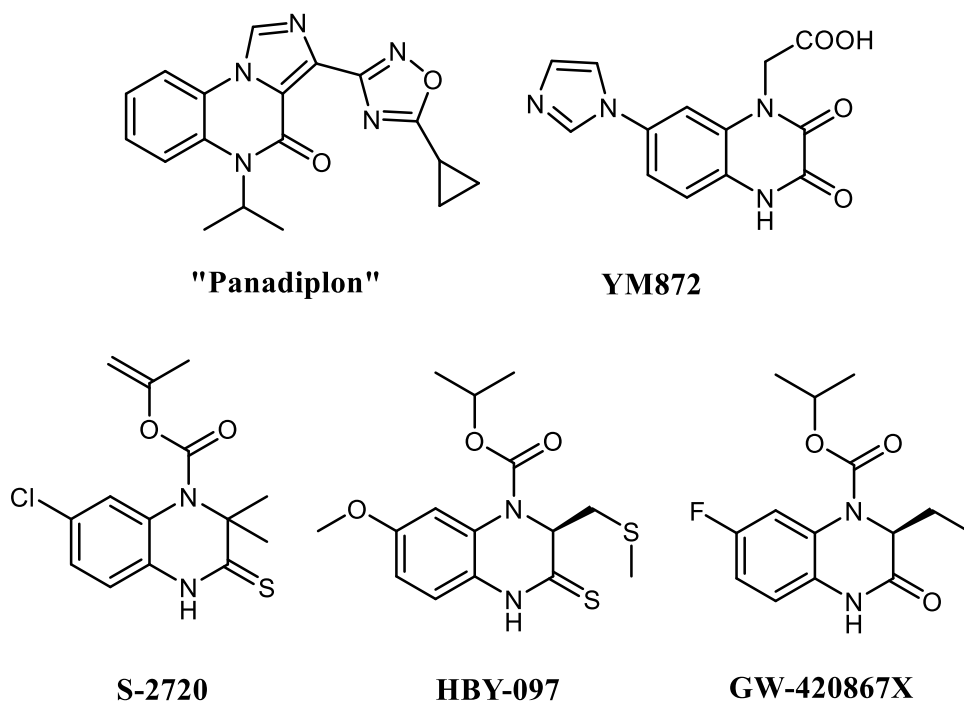
Поред ехиномицина и триостина-А, који у својој структури садрже хиноксалин, скорије је из бактерија рода *Streptomyces* изолован хинохеманин **2** и 1-метил-2(*H*)-хиноксалин-2-он **3**, једињења од којих настају хиномицини (Слика 2).¹



Слика 2. Структуре хинохеманина и 1-метил-2(*H*)-хиноксалин-2-она

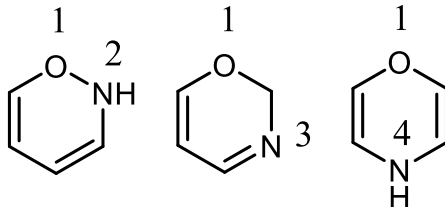
Хиномицини поседују јаку цитотоксичну активност јер хиноксалин, хромофора хиномицина, може да интеркалира у ДНК (дезоксирибонуклеинска киселина) туморских ћелија и на тај начин спречава нормалну транскрипцију и репликацију ДНК. За разлику од хиномицина, хинохеманин показује умерену цитотоксичну активност.

Деривати хиноксалина, због своје структуре и присуства азота у прстену, показују антитуморску^{2,3}, антивирусну⁴, анти-инфламаторну⁵, антимикробну⁶, антитуберкулозну⁷, антидијабетску⁸, антифунгалну⁹ као и многе друге биолошке активности. Неки од представника хиноксалинона који су укључени у клиничка испитивања приказана су на Слици 3. Због широке примене, ова група једињења која садрже веома битан хетероциклични систем интезивно се испитује и синтетише. Осим што се користе за синтезу биолошки активних једињења, ова једињења су значајна и у индустрији. Користе се као заштита од корозије^{10,11}, затим за синтезу порфирина јер је њихова структура слична хромофорима из природних производа¹² и улазе у састав електролуминесцентних материјала.¹³



Слика 3. Представници хиноксалина укључени у клиничка испитивања

Више од 70% комерцијалних лекова који се данас користе су хетероциклична једињења.¹⁴ Широко су распрострањени у природи и кључни су интермедијери у многим биолошким процесима.^{15,16} Оксазини и њихови деривати, као и хиноксалини, веома су важна група хетероцикличних једињења због широког спектра биолошких активности. Оксазини се формално могу добити из бензена и његових редукционих производа супституцијом атома угљеника и водоника атомима азота и кисеоника. Постоје три изомера оксазина у зависности од положаја хетероатома и двоструких веза. 1,2-, 1,3- и 1,4-оксазини су *O*-аналози три изомера диазина. Када се у прстену налазе атоми кисеоника и азота њихов назив се одређује тако што се пише број (положај) хетероатома и у наставку оксазин (Слика 4).¹⁷ Ароматичне оксазине први пут су синтетисали Holly и Core 1994. године помоћу Mannich-ове реакције. Најважнији представник 1,4-оксазина је морфолин или тетраhydro-1,4-оксазин, безбојна течност која се меша са водом.¹⁸ Ова једињења су од посебног значаја јер улазе у састав важних природних и синтетичких производа и показују биолошке активности као што су седативна, аналгетска, антипиретска, антиепилептична, антитуберкулозна, антитуморска, антималаријска и антимикуробна.¹⁹



Слика 4. Изомери оксазина

Постоје разне методе за добијање деривата хиноксалина а једна од најпознатијих је кондензација *o*-фенилендиамин са α -дикарбонилним једињењима.²⁰ Хиноксалинонски деривати могу се добити кондензацијом 1,2-диамин са α -дикетонима²¹, циклизацијом-оксидацијом фенацил-бромида²², оксидативним купловањем епоксида са 1,2-диаминима²³ итд. Због еколошки неприхватљивих и неодрживих метода последњих година научници покушавају да развију нове, одрживе методе за синтезу хиноксалинона које подразумевају употребу катализатора који се могу рециклирати, присуство микроталасног зрачења или синтезу у воденој средини.

1.2 Методе за синтезу хиноксалинона

У литератури постоји већи број процедура за синтезу хиноксалинона. Једна од најстаријих процедура је Hinsberg-ова синтеза где долази до кондензације *o*-фенилендиамина са α -кетокиселинама или кетоестрима (Схема 1).²⁴ Ова реакција је позната више од једног века и још увек се користи за синтезу овог типа једињења. Међутим, принос добијених хиноксалинона у овој реакцији није био већи од 65%. Сходно овоме, било је потребно кориговати реакционе услове као нпр. температуру, растварач и катализатор.²⁵ Како компјутерским тако и експерименталним запажањима утврђено је да већи број фактора утиче на принос ове реакције. Један од фактора је постојање већег броја интермедијера који егзистирају у реакцији. Сходно томе, Hinsberg-ова реакција је модификована тако да се синтеза одвија у присуству микроталасног зрачења или у присуству ензима као катализатора.²⁶ Помоћу ове реакције могу се добити и хиноксалинони и бензоксазинони.

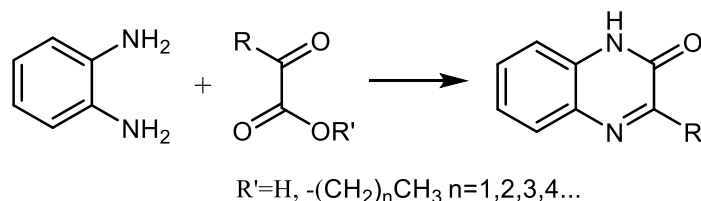


Схема 1. Hinsberg-ова реакција за синтезу хиноксалинона

Хиноксалинони се могу добити и у реакцији између α -халогенестара и *o*-фенилендиамина при чему се добија 2,3-диаминохиноксалинон који у присуству водоник-пероксида прелази у 3-аминохиноксалинон (Схема 2).²⁷

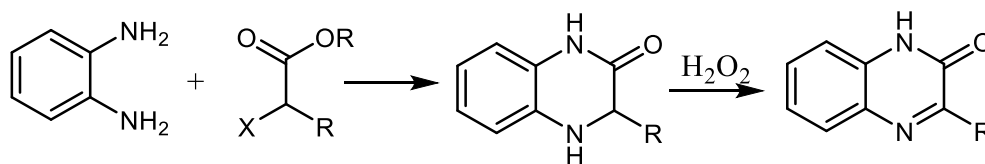


Схема 2. Добијање хиноксалинона помоћу α -халогенестара

Термичком изомеризацијом 3-азидо-3-метил-2-индолинона (**4**) на температури кључања ксилена долази до формирања 3-метил-2(1*H*)-хиноксалинона (**5**) у

квантитативном приносу при чему се петочлани прстен изомеризује у шесточлани (Схема 3).²⁸

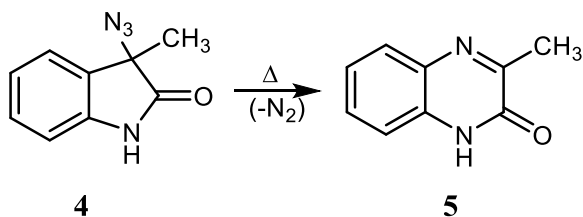


Схема 3. Добијање хиноксалинона термичком изомеризацијом

У реакцији *o*-фенилендиамина и 2-арилиден-метилоксазолин-5-она такође настају хиноксалинони, и то 3-арилметил-хиноксалин-2(1*H*)-они. Ова реакција се одвија на температури кључања *n*-бутанола (Схема 4).²⁹

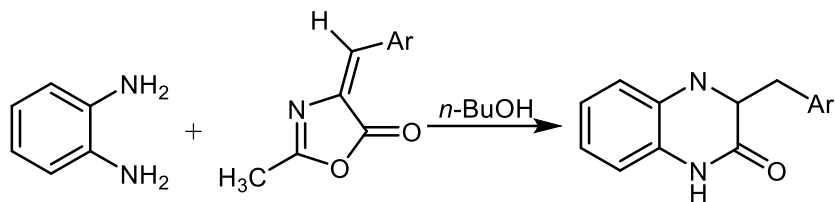


Схема 4. Добијање хиноксалинона из 2-арилиден-метилоксазолин-5-она

Још један од могућих начина добијања ових једињења је кондензација дехидроаскорбинске киселине и *o*-фенилендиамина у присуству арилхидразина (Схема 5). На тај начин настаје једињење које врло лако може да се трансформише у пирозолилхиноксалинон.

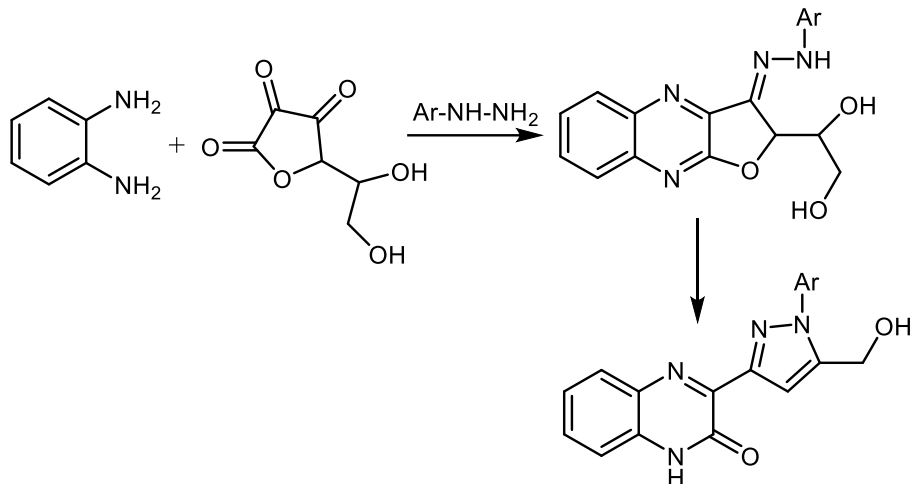


Схема 5. Синтеза хиноксалинона помоћу дехидроаскорбинске киселине

Хиноксалинони се могу добити преко хетероцикличних система, односно превођењем седмочланог прстена у шесточлани. Озрачивањем 1,4-бензодиазепина (**6**) добијају се хиноксалинони (**7**) (Схема 6).

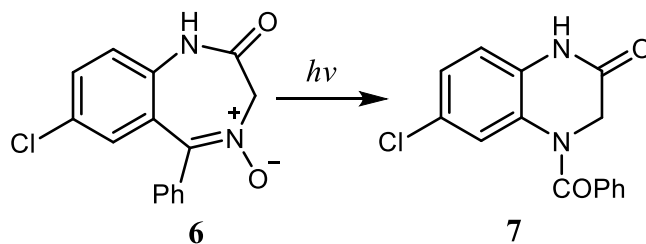


Схема 6. Добијање хиноксалинона озрачивањем 1,4-бензодиазепина

При загревању еквимоларних количина 4-хетероарил-2,4-диоксобутанске киселине (**8**) и *o*-фенилендиаминa (**9**) у DMSO-у настају (*Z*)-3-хетероарил-1,2,3,4-тетрахидро-2-хиноксалинони (**10**) (Схема 7).³⁰

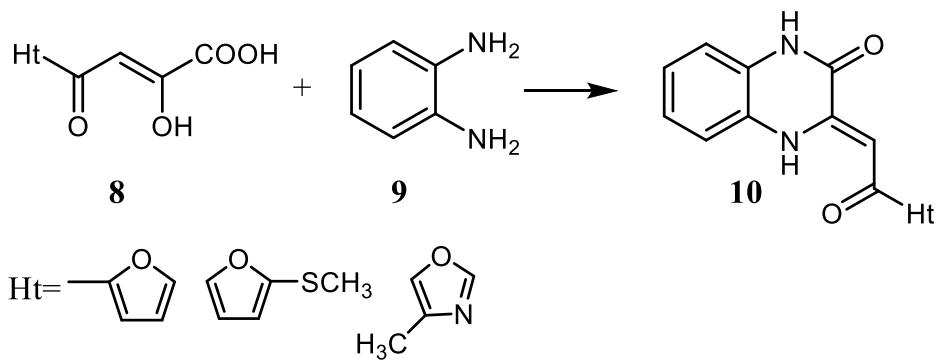


Схема 7. Синтеза хиноксалинона помоћу 4-хетероарил-2,4-диоксобутанске киселине

Vozdyreva и сарадници синтетисали су хиноксалиноне по претходно познатој процедури, а затим су добијена једињења третирали оксалил-хлоридом.³¹ На овај начин настаје нова серија 3-ароил и 3-хетероил-5-фенил-1,2,3,4-тетрахидро-пироло[1,2-*a*]хиноксалин-1,2,4-триона (**12**). Загревањем ових једињења у инертном апротичном растварачу настају 4-ацил-3-ацилокси-2-(3-оксо-4-фенил-3,4-дихидрохиноксалин-2-ил)-6-фенил-5,6-дихидро-1*H*-пиридо[1,2-*a*]хиноксалин-1,5-диони (**13**) (Схема 8). Сличну реакцију, неколико година касније, публиковао је Mashevskaya и сарадници само што се у овом случају као крајњи производ добијају 3-ароил и 3-пивалоилфуоро[3,2-*b*]хиноксалин-2(4*H*)-они.³²

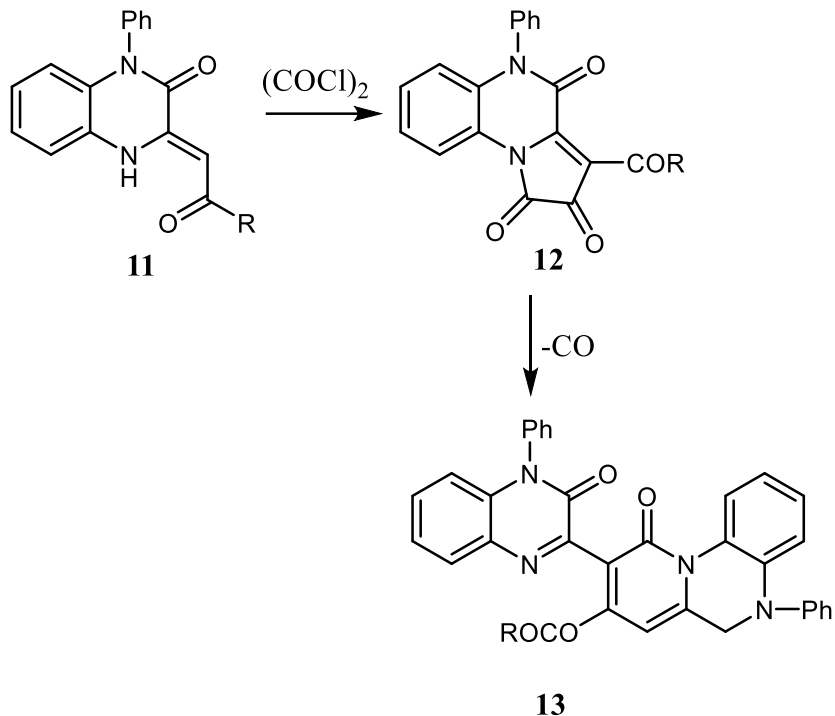


Схема 8. Функционализација хиноксалинона

Кондензацијом одговарајућих дикето киселина са *o*-фенилендиамином на температури кључања смеше DMF-а и воде добијају се 3,4-дихидро-2-хиноксалин-2-они (Схема 9). Ова реакција је веома погодна за добијање ових једињења у високим приносима, а чистији производ се може добити прекристализацијом из DMF-а.³³

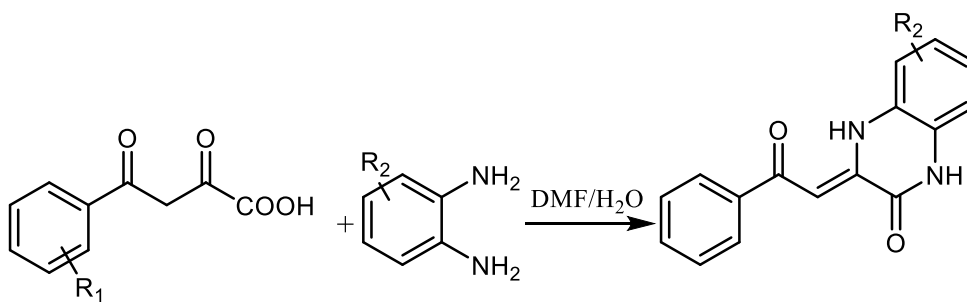


Схема 9. Синтеза хиноксалинона полазећи од дикето киселина

Публикован је велики број метода које подразумевају употребу катализатора који поспешују циклизацију и формирање хиноксалинона. Једна од тих метода подразумева употребу $\text{Ru}(\text{phen})_3\text{Cl}_2$ као катализатора у присуству натријум-карбоната у MeCN као растварачу. Реакција је приказана на Схеми 10.³⁴

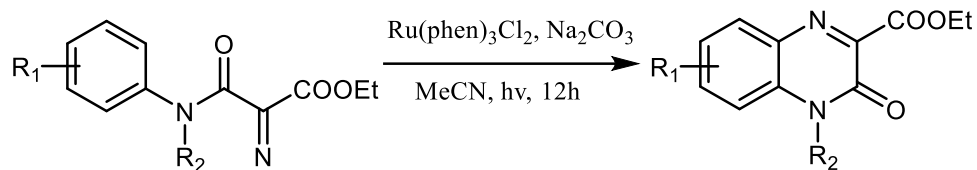


Схема 10. Добијање хиноксалинона употребом $Ru(phen)_3Cl_2$ као катализатора

На Схеми 11 је приказана општа реакција између 2-халогенанилина и аминокиселина која се одиграва у присуству соли бабра као катализатора при чему настају хирални хиноксалинони. Ова реакција се одиграва у једном кораку при чему се формирају С-Н везе. Имајући у виду да може доћи до стварања С-Н везе испитивана је реакција 2-броманилина са фенилаланином у присуству $CuCl$, K_3PO_4 и $DMSO$ -а.³⁵ Као производ настају хиноксалинони и то у одличном приносу.

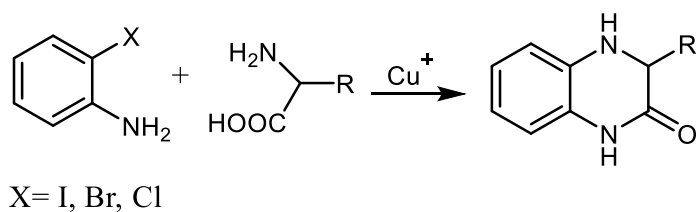


Схема 11. Синтеза хиноксалинона помоћу аминокиселина и халогенанилина

У четворокомпонентној реакцији у којој учествују различити алдехиди (**14**), 2-јодоанилин (**15**), 2-индолкарбоксилна киселина (**16**) и изоцијаниди (**17**) добија се интермедијер (Ugi производ)³⁶ (**18**) који у присуству каталитичких количина CuI , L -пролина и калијум-карбоната прелази у индоло[1,2-*a*]-хиноксалиноне (**19**) у јако добром приносу (Схема 12). Ово је синтеза у једном кораку и при благим реакционим условима. Приликом ове синтезе формира се једна С-С веза, једна С-О веза и чак три С-Н везе са високом селективношћу.

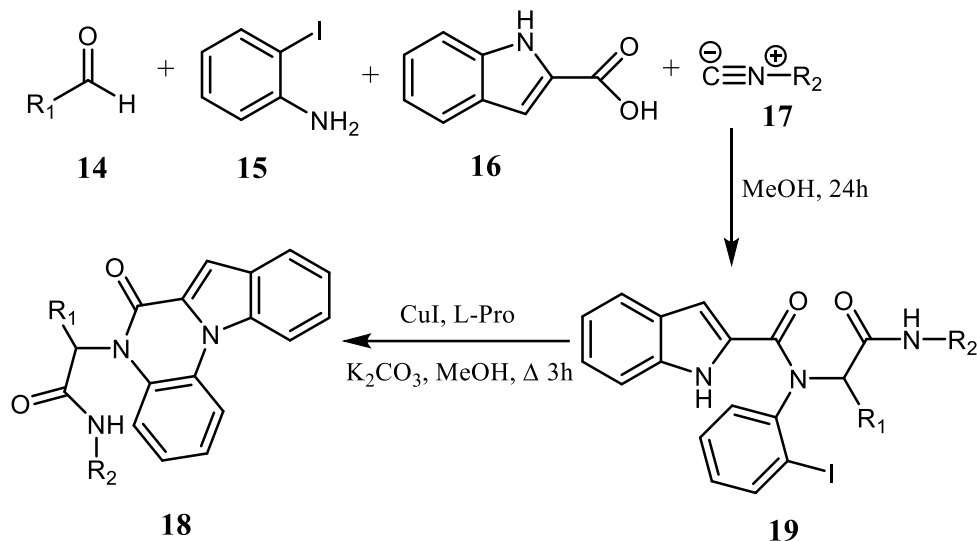


Схема 12. Синтеза индоло[1,2-*a*]-хиноксалинона

У циљу да се синтетишу хиноксалинони који улазе у састав биолошки активних једињења и без добијања споредних производа развијена је нова метода синтезе истих.³⁷ Заправо, у том периоду су реакције *N*-ариловања, које су катализоване прелазним металима, привукле велику пажњу научника. Развијена метода синтезе хиноксалинона катализована је $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ комплексом и одвија се у присуству микроталасног зрачења (Схема 13). На овај начин се могу добити како бициклични тако и полициклични хиноксалинони у високом приносу.

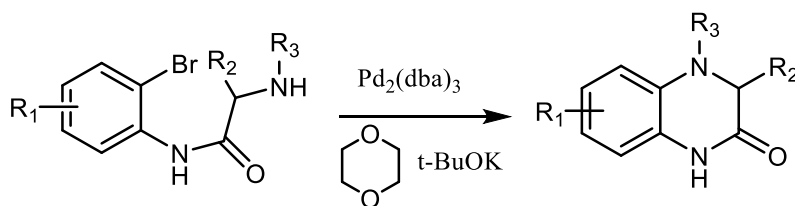


Схема 13. Реакција добијања хиноксалинона помоћу $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$

Познато је да се прелазни метали користе као катализатори у синтези хетероцикала и да су комплекси злата јако популарни у реакцијама циклизације јер имају ту способност да активирају различите функционалне групе под благим реакционим условима. Сходно томе, развијена је синтетичка метода у једном кораку за добијање пироло[1,2-*a*:2', 1'-*c*]-/пиридо[2,1-*c*]пироло-[1,2-*a*]-хиноксалинона.³⁸ У овој синтези као катализатор користи се

[Au{P(*t*-Bu)₂(*o*-бифенил)}-{CH₃CN}]SbF₆ са додатком трифлуоросирћетне киселине у води као растварачу и на температури од 80°C. На овај начин добијају се жељени производи у високом приносу (Схема 14).

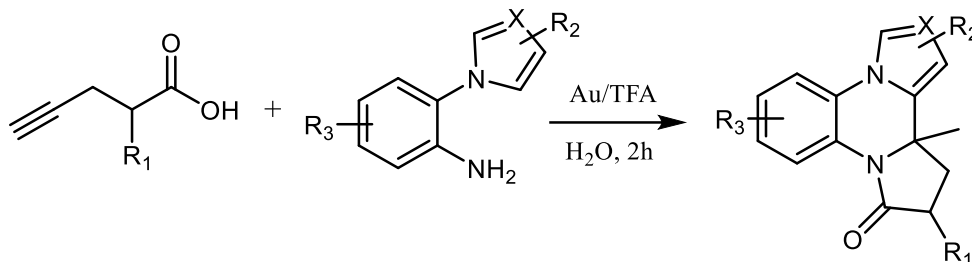


Схема 14. Синтеза пироло[1,2-*a*:2', 1'-*c*]-/пиридо[2,1-*c*]пироло-[1,2-*a*]-хиноксалинона

У реакцији између супституисаног *o*-фенилендиамина и 2 еквивалента метил-триметоксиацетата у кључалом толуену након 12 сати настају хиноксалинони у приносу од 35%. Међутим, при истим условима, уколико се додају каталитичке количине итербијум-трифлата након 4 сата настаје хиноксалинон у приносу од чак 72% (Схема 15).³⁹

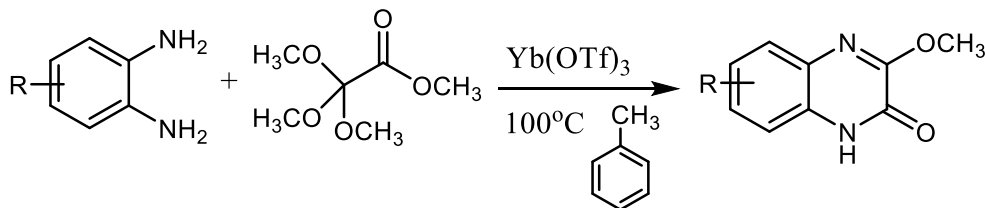


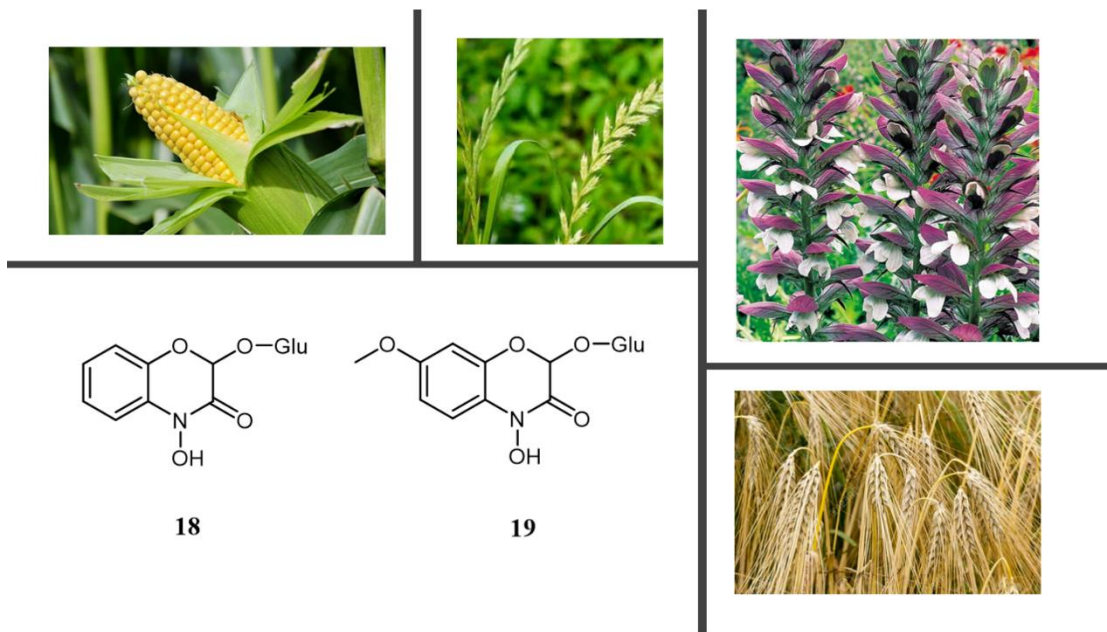
Схема 15. Синтеза хиноксалинона помоћу метил-триметоксиацетата

До сада поменуте методе синтезе деривата хиноксалина, односно хиноксалинона, подразумевају употребу различитих токсичних растварача и катализатора који садрже метале. Како би се испунили захтеви које поставља одржива хемија, све већи број научника се залаже за развијање метода без коришћења токсичних растварача и катализатора. Jesus Morales-Castellanos и сарадници развили су једну такву методу за синтезу 6-супституисаних хиноксалина.⁴⁰ Ова синтеза се одвија без присуства растварача (*solvent-free*) у присуству микроталасног зрачења. Реакције у којима је један од реагенаса у течном агрегатном стању одвијају се брже од оних код којих су оба реагенаса у чврстом стању. Принос добијених производа је у опсегу од 80-90%. Ова реакција се може одвијати

под истим условима, само уз додатак $\text{TiO}_2\text{-P25-SO}_4^{2-}$ као катализатора при чему долази до кисело-катализоване кондензације.⁴¹

1.3 Методе за синтезу бензоксазинона

Једињења као што су 1,4-бензоксазинони нису честа у природи, али се могу наћи у неким биљкама у облику глукозида. Могу се наћи у неким врстама кукуруза, пшенице, ражи и цвећу *Acanthus spinosus*.^{42,43} Бензоксазинони и њихови деривати који настају деградацијом у биљкама имају веома значајну улогу у путевима детоксикације и одбрамбеном механизму биљака. Из ових разлога постоји тенденција да се развију природни модели хербицида који у својој структури садрже ова једињења. На овај начин би се могла боље појаснити еколошка улога производа деградације бензоксазинона. На Слици 5 се налазе структуре 1,4-бензоксазинона у облику глукозида као и биљне врсте у којима се могу наћи.⁴⁴

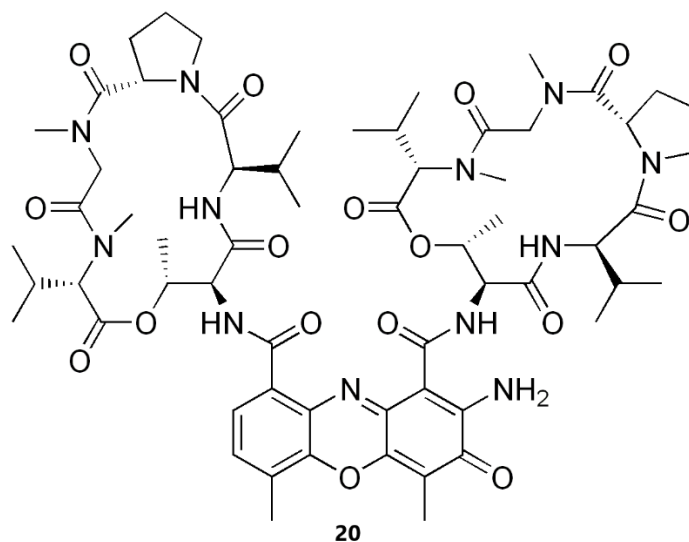


Слика 5. Структуре бензоксазинона у облику глукозида и биљне врсте у којима се они налазе

Показало се да ова једињења представљају секундарне метаболите који учествују у заштити биљака јер поседују фунгицидну, антимицробну и инсектицидну активност. Доказано је да 1,4-бензоксазинони представљају биохемијске факторе који су повезани са

отпорношћу кукуруза на мољце⁴⁵, отпорношћу на неке групе хербицида⁴⁶ и спречавају труљење стабљике.⁴⁷

Такође је познато да актиномицин-D (Слика 6), антитуморски агенс, који је изолован из бактерије рода *Streptomyces*, у својој структури као део хромофоре садржи бензоксазинов прстен. Због важности ових једињења и широког спектра биолошких активности које показују постоји тенденција за проналажењем нових метода за добијање 1,4-бензоксазинона.



Слика 6. Структура актиномицина

У реакцији између различитих *N*-арилметиллованих 2-аминофенола и етил-2-бромоалканоата настају 3,4-дихидро-3-оксо-2*H*-1,4-бензоксазини (Схема 16).⁴⁸ У реакцији прво долази до брзог *N*-арилметиловања 2-аминофенола у присуству микроталасног зрачења након чега долази до региоселективне анелације са 2-бромоалканоатима у воденом раствору DMF-а и у присуству калијум-карбоната. Код полазних једињења која садрже електрон-привлачне групе потребно је загревање на 180°C и више како би се постигао виши принос производа.

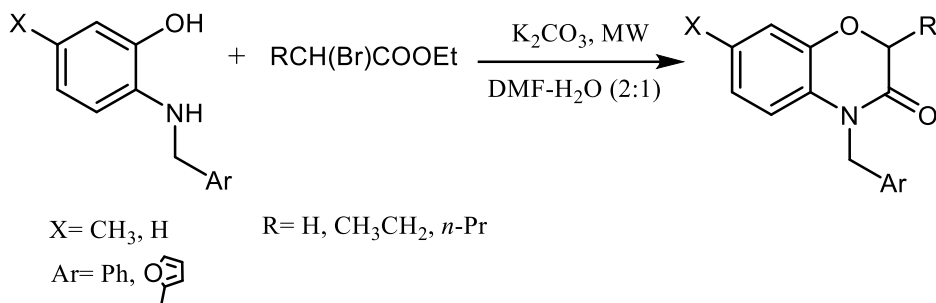


Схема 16. Добијање бензоксазинона помоћу одговарајућих етил-2-бромоалканоата

Wolfer и сарадници су по први пут представили каталитичку, асиметричну синтезу 1,4-бензоксазинона приликом које долази до енантиселективне циклоадиције *o*-бензохинонимиди са киселинским хлоридима.⁴⁹ Ова метода подразумева коришћење BQd катализатора и Hünig-ове базе (*N,N*-диизопропилетиламин) у THF-у на -78°C (Схема 17).

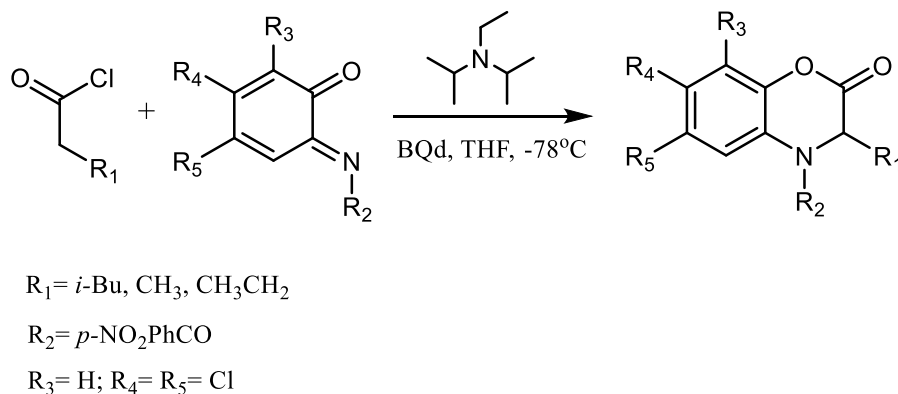


Схема 17. Асиметрична синтеза 1,4-бензоксазинона у присуству BQd катализатора

Имајући на уму претходно публиковане синтезе 1,4-бензоксазинона где се користе скупи реагенси, тешко изолују производи или је принос производа низак, Kang и сарадници су развили нову методу синтезе 1,4-бензоксазинона полазећи од 2-хлорофенола који су лако доступни и нису скупи.⁵⁰ Помоћу ове методе, која је врло применљива и корисна, може се врло лако добити велики број супституисаних 1,4-бензоксазинона. У овој реакцији долази до Smiles-овог премештања које даје бензоксазине у високом приносу, чак до 92% (Схема 18).

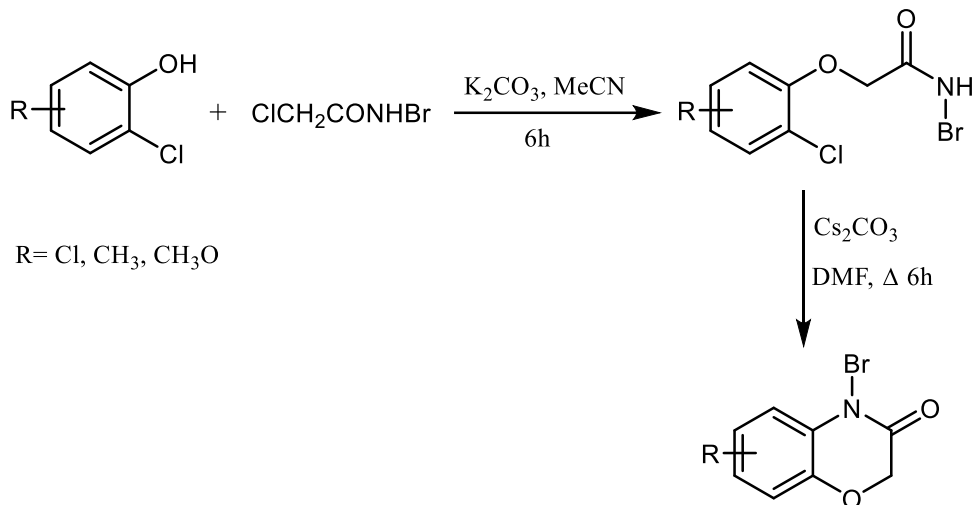


Схема 18. Синтеза 1,4-бензоксазинона у којој долази до Smiles-овог премештања

Серија изоиндоло[1,4]-бензоксазинона синтетисана је преко интермеђијера 2-(2-хидроксифенил)-2*H*-изоиндола-1-карбонитрила који настаје у реакцији између 2-аминофенола и *o*-фталдиалдехида у присуству натријум-хидрогенсулфита и калијум-цијанида (Схема 19).⁵¹ Принос добијених производа креће се од 68-79%.

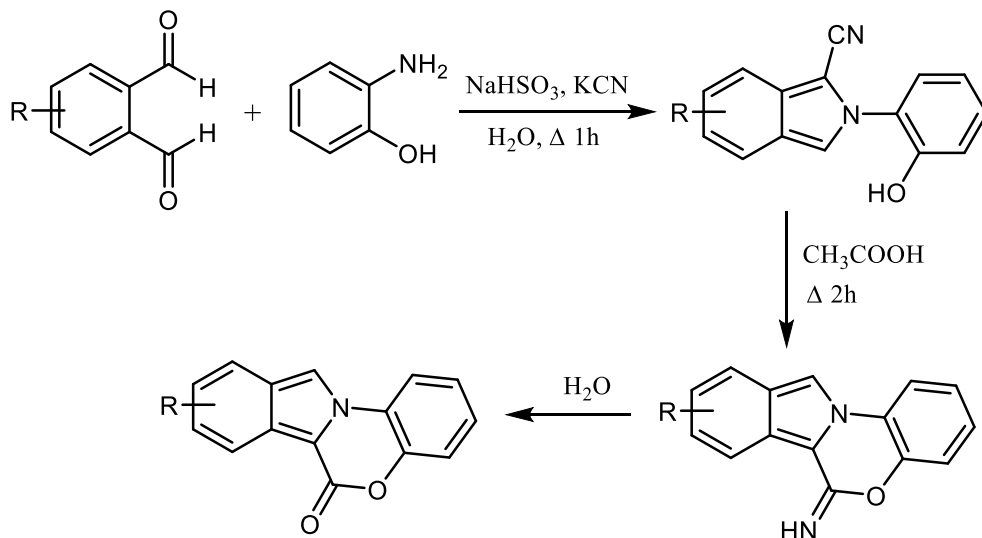


Схема 19. Добијање изоиндоло[1,4]-бензоксазинона

Још једна од метода за добијање ових једињења је реакција између 2-аминофенола са диметил-2-оксоглутаратом под благим реакционим условима, на собној температури при чему настају 3-(2-оксо-2*H*-бензо[*b*][1,4]оксазин-3-ил)пропаноати (Схема 20). Ова

реакција се одвија без присуства катализатора, али недостатак ове методе јесу ниски приноси (40-60%).⁵²

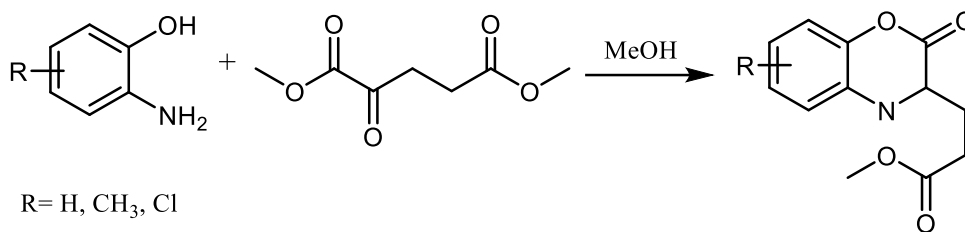


Схема 20. Синтеза 3-(2-оксо-2H-бензо[b][1,4]оксазин-3-ил)пропаноата

Након разматрања постојећих метода синтезе и доступности полазних једињења, развијена је нова метода за добијање 2-алкил-2H-1,4-бензоксазин-3-(4H)-она у два корака.⁵³ У првом кораку реакције долази до *O*-алкиловања 2-нитрофенола са метил-2-бромоалканоатима где се као растварач користи *N,N*-диметилформамид на температури од 92°C у присуству калијум-карбоната при чему настају 2-(2-нитрофенокси)алканоати. У другом кораку се врши редукција нитро естара помоћу водоника и паладијума у метанолу или смеси метанола и DME-а на собној температури. У овој реакцији је драстично смањена количина реакционог отпада. Као производ настају 2-алкил-2H-1,4-бензоксазин-3-(4H)-они у приносу од 80-95% (Схема 21).

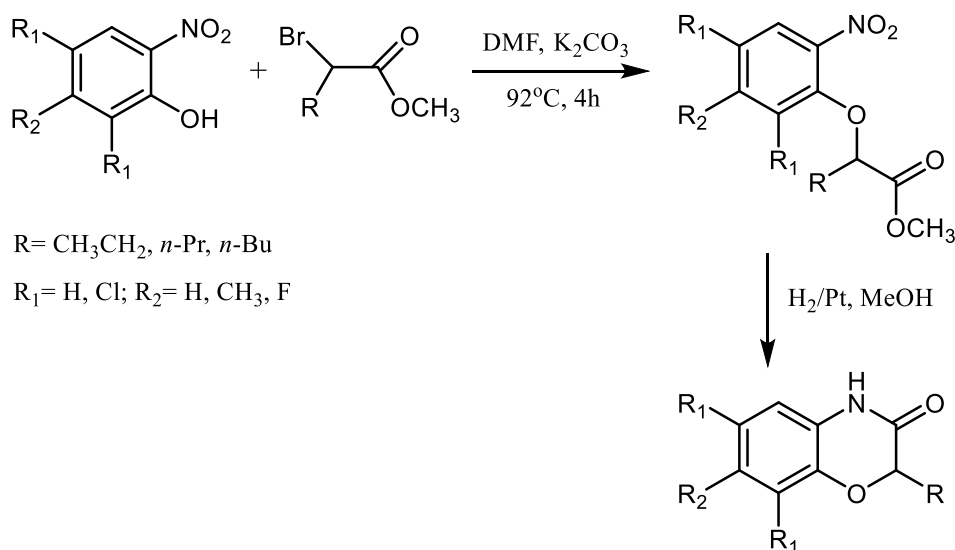
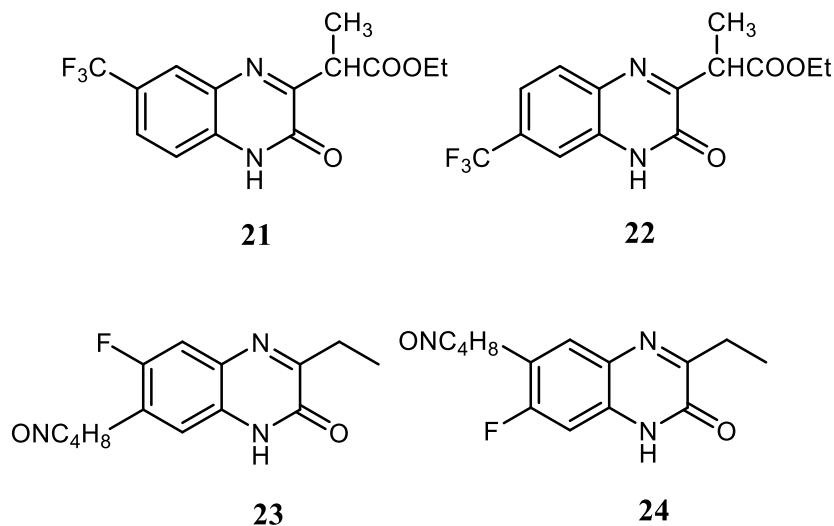


Схема 21. Синтеза бензоксазинона помоћу супституисаног 2-нитрофенола

1.4 Биолошка активност деривата хиноксалина

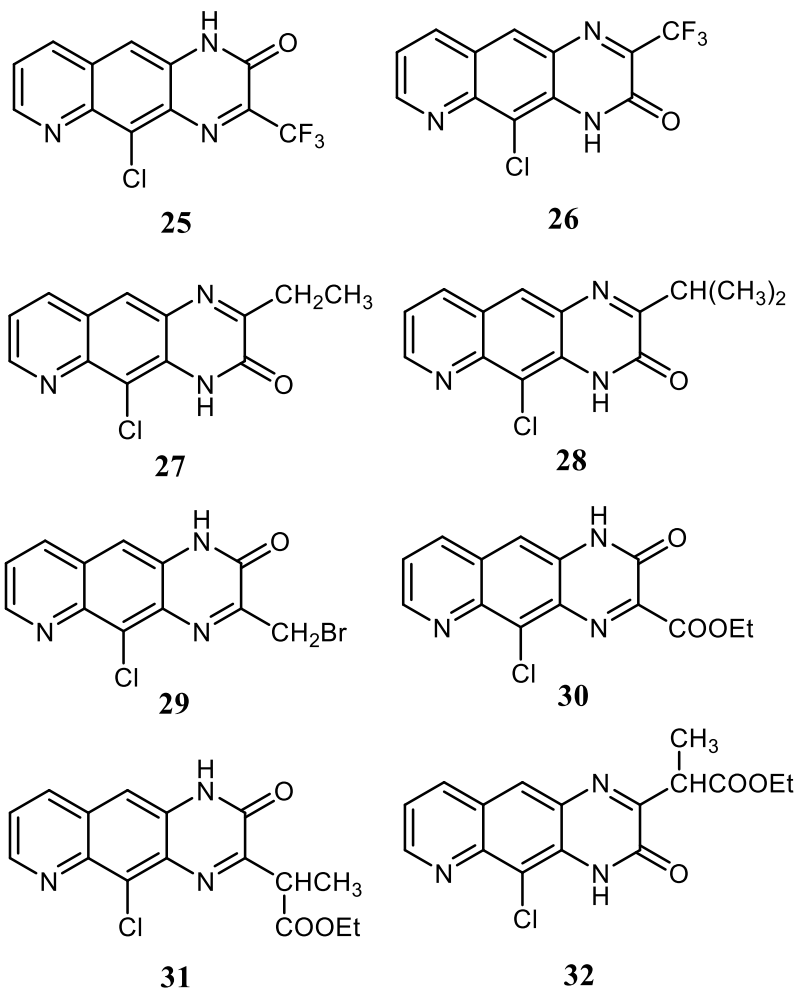
1.4.1 Антитуморска активност деривата хиноксалина

Канцер је један од најозбиљнијих клиничких проблема и сходно томе научници улажу велике напоре за развиће нових антитуморских агенаса са високим степеном селективности. Велики број деривата хиноксалина показао је антитуморску активност *in vitro* на неколико типова туморских ћелија.⁵⁴ Sanna и сарадници синтетисали су групу хиноксалинона и испитивали њихову антитуморску активност.⁵⁵ Већина испитиваних једињења није показала значајну антитуморску активност осим једињења **21** и **22** која су показала активност на различитим туморским ћелијама у концентрацији 10^{-4} М. Једињења **23** и **24** у истој концентрацији показала су активност против леукемије (Слика 7).



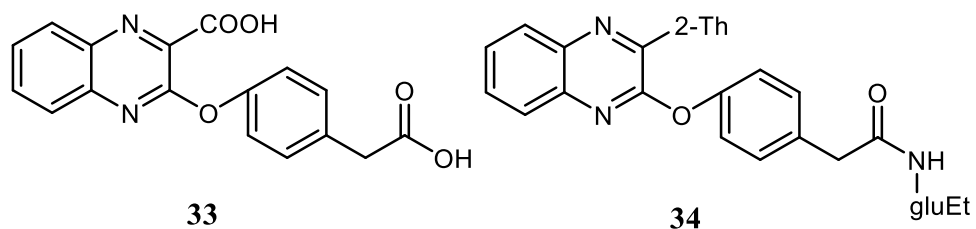
Слика 7. Структуре једињења 21-24

Убрзо после тога Carta и сарадници синтетисали су серију нових пиридо-[2,3]хиноксалинона са различитим супституентима у положају С-3.⁵⁶ За ова једињења испитиване су три врсте активности, антитуморска, антибактеријска и антифунгална активност. Резултати испитивања антитуморске активности *in vitro* показали су да пиридохиноксалинони **25-32** (Слика 8) показују просечну активност у концентрацији 10^{-4} М. Поред ове активности једињења **25** и **30** показала су селективну антипролиферативну активност према различитим ћелијским линијама леукемије, туморским ћелијама плућа, према канцеру дебелог црева, мозга и меланома.



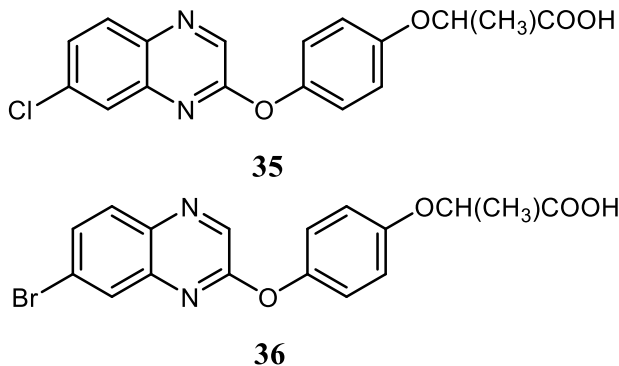
Слика 8. Структуре испитиваних пиридохиноксалинона 25-32

Такође, једињења **33** и **34** (Слика 9) показали су селективну активност према различитим ћелијским линијама леукемије (HL-60 (ТВ), К-562 и SR) у концентрацији од 10^{-8} до 10^{-4} М. Једињење **34** показало је и значајну инхибицију раста тумора при ниској концентрацији (10^{-8} - 10^{-5} М).⁵⁴



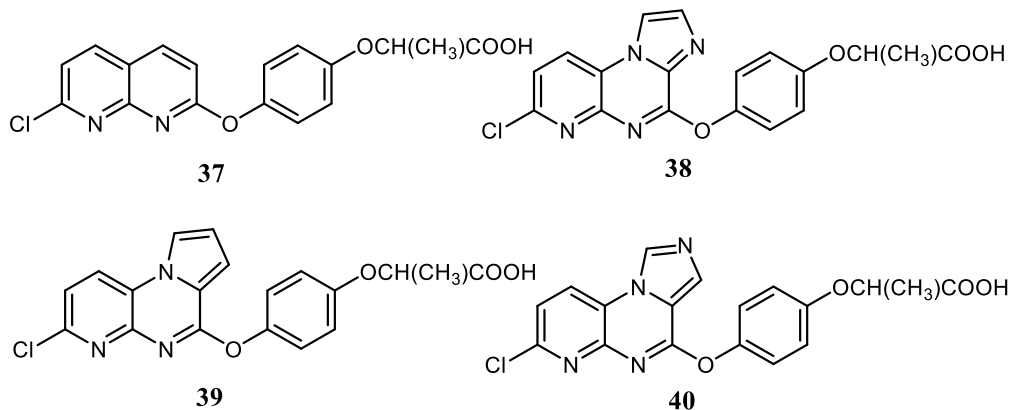
Слика 9. Структуре једињења 33 и 34

Hazeldine и сарадници синтетисали су антитуморске агенсе 2-{4-[(7-хлоро-2-хиноксалинил)-окси] фенокси} пропионску киселину (ХК469) **35** и 2-{4-[(7-бромо-2-хиноксалинил)-окси] фенокси} пропионску киселину (SH80) **36** (Слика 10).^{57,58} Испитивања су показала да једињења са структуром сличном једињењу **35**, које се иначе понаша као цитотоксични агенс, подједнако добро реагују *in vivo* и *in vitro* са тумором дебелог црева и панкреаса код мишева.⁵⁹



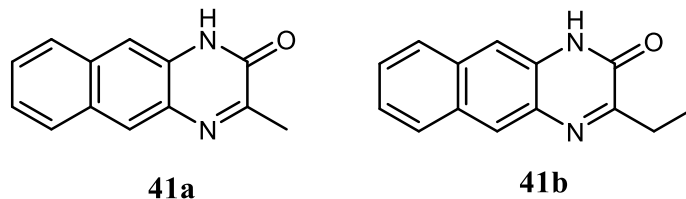
Слика 10. Структуре једињења **35** и **36**

Хиноксалински и хинолински прстен у ХК469 и SH80 одговоран је за активности које ова једињења показују. Неке модификације у овим структурама воде до [1,8] нафтилпиридинских **37**, имидазо [1,2-а] **38**, пирило [1,2-а] **39** и имидазо [1,5-а] **40** деривата (Слика 11), док увођењем различитих супституената у положај С-4 хинолинског прстена код једињења **36** води до групе једињења која имају слабу антитуморску активност.



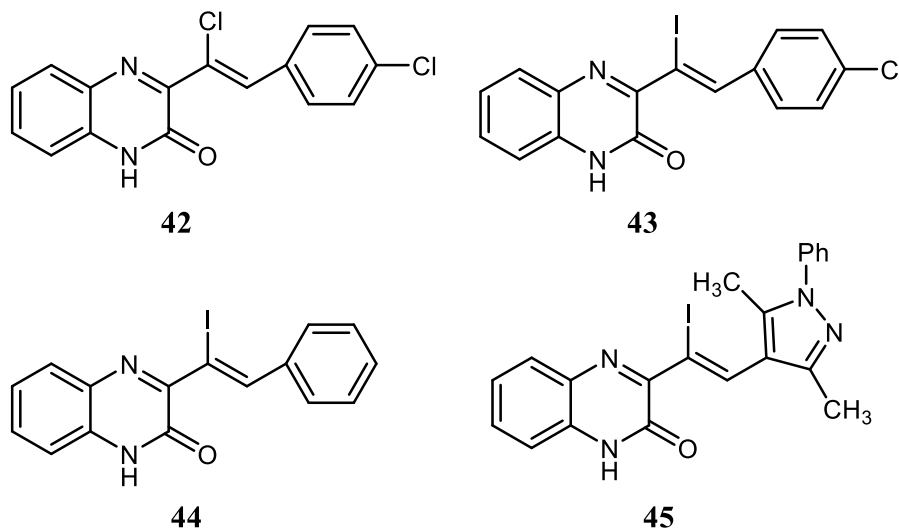
Слика 11. Структуре једињења **37-40**

Gris и сарадници⁶⁰ синтетисали су серију хиноксалинона помоћу Hinsberg-ове реакције⁶¹ која представља једну од најпознатијих метода за добијање ових једињења. Испитивана је потенцијална антитуморска активност једињења **41a** и **41b** (Слика 12) и показало се да једињење **41a** показује активност према ћелијским линијама тумора плућа и бубрега *in vitro* условима, док једињење **41b** показује активност према туморским ћелијама мозга.



Слика 12. Структуре једињења **41a** и **41b**

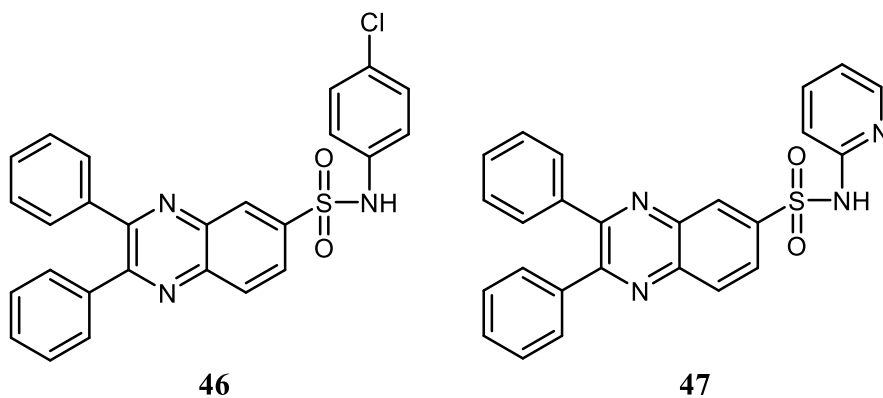
У циљу проналажења новог антитуморског агенса са обећавајућим фармаколошким профилем синтетисана је серија супституисаних 4-халофуран-2(5H)-она и халогенованих хиноксалин-2(1H)-она. Структуре неких од ових једињења налазе се на Слици 13 (**42-45**).⁶² Двадесет и два једињења тестирана су на три различите протеин киназе и показала су се активна за вредност IC₅₀ до 10 μM.



Слика 13. Структуре једињења **42-45**

Синтетисана је серија нових деривата сулфонамидо-хиноксалина и сва једињења су тестирана на хуманим туморским ћелијама.⁶³ Два једињења показала су веома добру

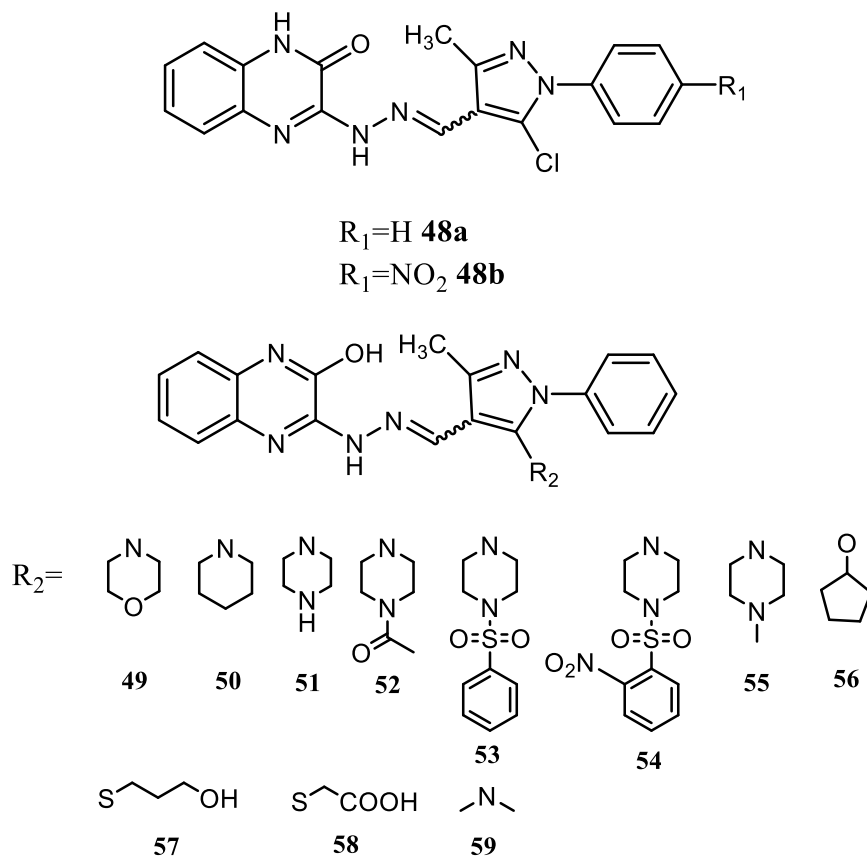
активност (Слика 14). Једињење **46** показало је активност против леукемије на ћелијама HL-60 и RPMI-8226, ћелијама тумора плућа HOP-62 и HOP-92, ћелијама тумора простате PC-3, ћелијама тумора дојке T-47D и ћелијама тумора мозга SNB-75. Једињење **47** показало је значајну антитуморску активност против већине тестираних ћелијских линија са вредностима IC₅₀ од 1,11 до 4,54 μM. Највећу активност показало је према ћелијама леукемије RPMI-8226, а најмању према ћелијама канцера плућа HOP-62. За оба једињења доказано је да нису летална.



Слика 14. Структуре једињења **46** и **47**

Протеин киназе су тип ензима који су неопходни за различите процесе у ћелији и катализатори су у процесу фосфорилације појединих ћелијских супстрата. У патолошким условима долази до поремећаја функције протеин киназа што узрокује промене у процесу фосфорилације и резултира неконтролисаном деобом ћелије и доводи до других поремећаја.⁶⁴ Познат је велики број инхибитора тирозин киназе.^{65,66} Молекули са обећавајућим инхибиторским способностима управо садрже хиноксалине. Galal и сарадници синтетисали су серију деривата хиноксалина и испитивали антитуморску активност на ћелијама канцера дојке MCF7 и канцера јетре HepG2.⁶⁷ Велики број једињења показао је добру активност, а за неке је пронађено да имају два пута већу активност од cisPt за ћелије HepG2. На Слици 15 представљена су синтетисана једињења. Антитуморска активност синтетисаних једињења за ћелије HepG2 у односу на cisPt дата је у следећем редоследу: **49** > **55** > **52** > **50** > **48a** > **57** > **53** > cisPt > **59** > **54** > **48b** > **56** > **51** > **58** где једињења **49**, **55**, **52**, **48a**, **57**, **50** и **59** имају сличну активност и селективност као cisPt. Антитуморска активност синтетисаних једињења за ћелије MCF-7 у односу на cisPt

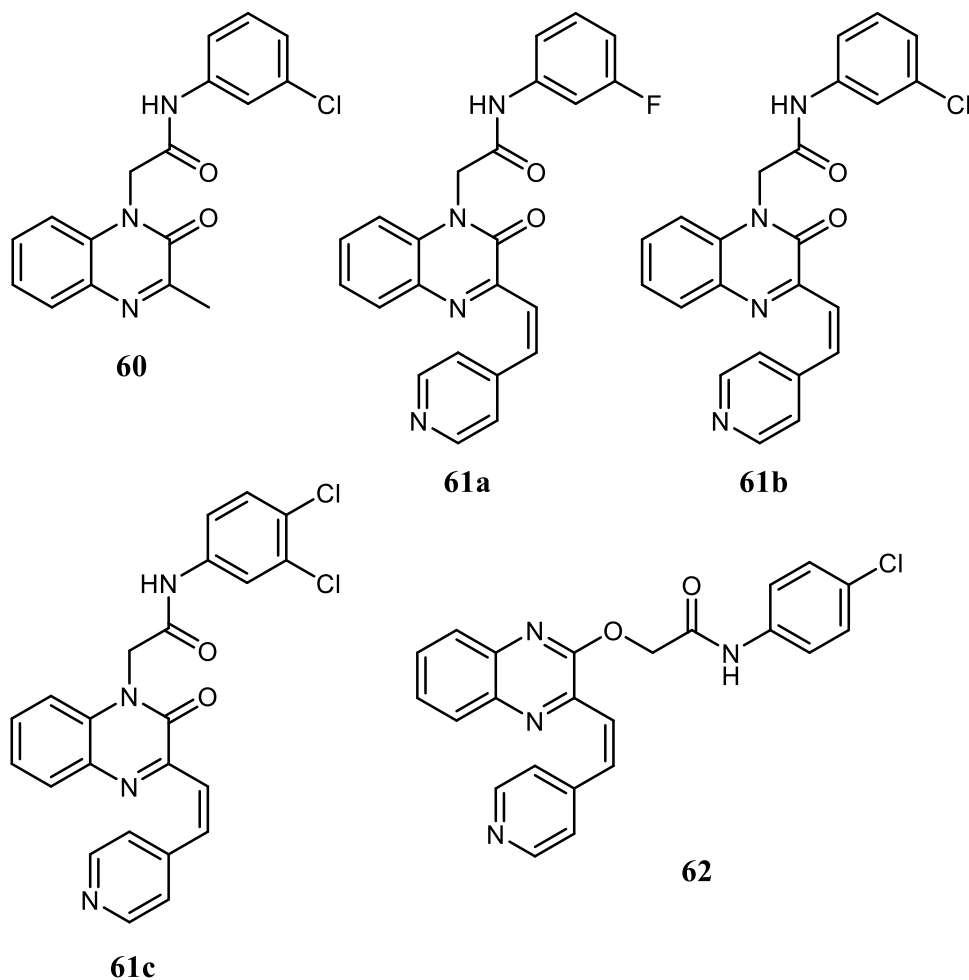
дата је у следећем редоследу: **49** > **55** > **57** > **50** > **54** > cisPt > **51** > **52** > **59** > **48b** > **48a** > **53** > **56** > **58** где једињења **49**, **55**, **57**, **50**, **51** и **59** имају сличну активност и селективност као cisPt. За једињења **49** и **55** пронађено је да инхибирају хумане рецепторе тирозин киназа исто као и cisPt за обе ћелијске линије. Резултати овог истраживања веома су добри, а једињења **49**, **52**, **55**, **48a** и **59** могла би бити употребљена за даља истраживања.



Слика 15. Структуре једињења **48-59**

Инхибиција VEGFR-2 киназе доводи до спречавања раста тумора тако што се блокира процес ангиогенезе. У циљу проналаска инхибитора Shi и сарадници синтетисали су серију (Z)-3-(2-(пиридин-4-ил)винил) хиноксалинона и испитивали *in vitro* и *ex vivo* условима анти-ангиогенетске способности ових једињења.⁶⁸ Једињења **60**, **61a-c** и **62** показала су веома добру инхибицију VEGFR-2 киназе *in vitro* условима (Слика 16). У *ex vivo* условима иста једињења **60**, **61a-c** и **62** са анти-ангиогенетском активношћу на ћелијском нивоу такође имају способност да инхибирају микроваскуларизацију на нивоу ткива. За већ поменута једињења испитиване су њихове инхибиторске активности на

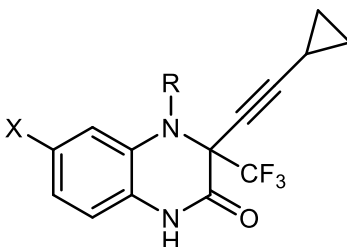
већем броју киназа које су укључене у процес ангиогенезе. Испитивања су вршена на хуманој кинази KDR/ VEGFR-2, серин/треонин протеин кинази B-RAF, тирозин киназама FGFR1 и EGFR.⁶⁹ Једињења **61c**, **61b** и **62** показала су највећи потенцијал за инхибицију VEGFR-2 у концентрацији 1 μ M док **60** и **61a** имају најмањи потенцијал што је у корелацији са њиховим *in vitro* и *in vivo* активностима. Сва тестирана једињења показала су слабију активност од референтних стандарда али су показали селективну инхибицију за VEGFR-2 када се упореди са осталим киназама укљученим у процес ангиогенезе.



Слика 16. Структуре једињења 60-62

1.4.2 Антивирусна активност деривата хиноксалина

Поред канцера још један од веома озбиљних проблема данашњице је HIV као и број људи заражених њим. Улажу се велики напори за проналазак анти-HIV агенаса и тиме смањи број инфицираних особа. Истраживања су показала да се годишње инфицира око 2.5 милиона људи и да тај број непрекидно расте, тако да је до сада забележено око 40 милиона заражених.⁷⁰ Овај поражавајући податак води до тога да се константно ради на проналажењу нових терапеутских агенаса. Приликом примене терапије за AIDS веома је битно користити инхибиторе који не садрже нуклеозиде. Patel и сарадници⁷¹ синтетисали су једињења која садрже структурне карактеристичне фрагменте једињења Efavirenz и Glaxo Wellcome GW420867X, кандидата за клиничка испитивања.⁷² Из ове серије карбамати су се показали као једињења са највише потенцијала (Слика 17). Једињење **63a** слабо се везује за протеине. Урађена је фармакокинетичка студија за активни енантиомер **63a** на мајмунима, али лоша биорасположивост узроковала је прекид даљег истраживања.



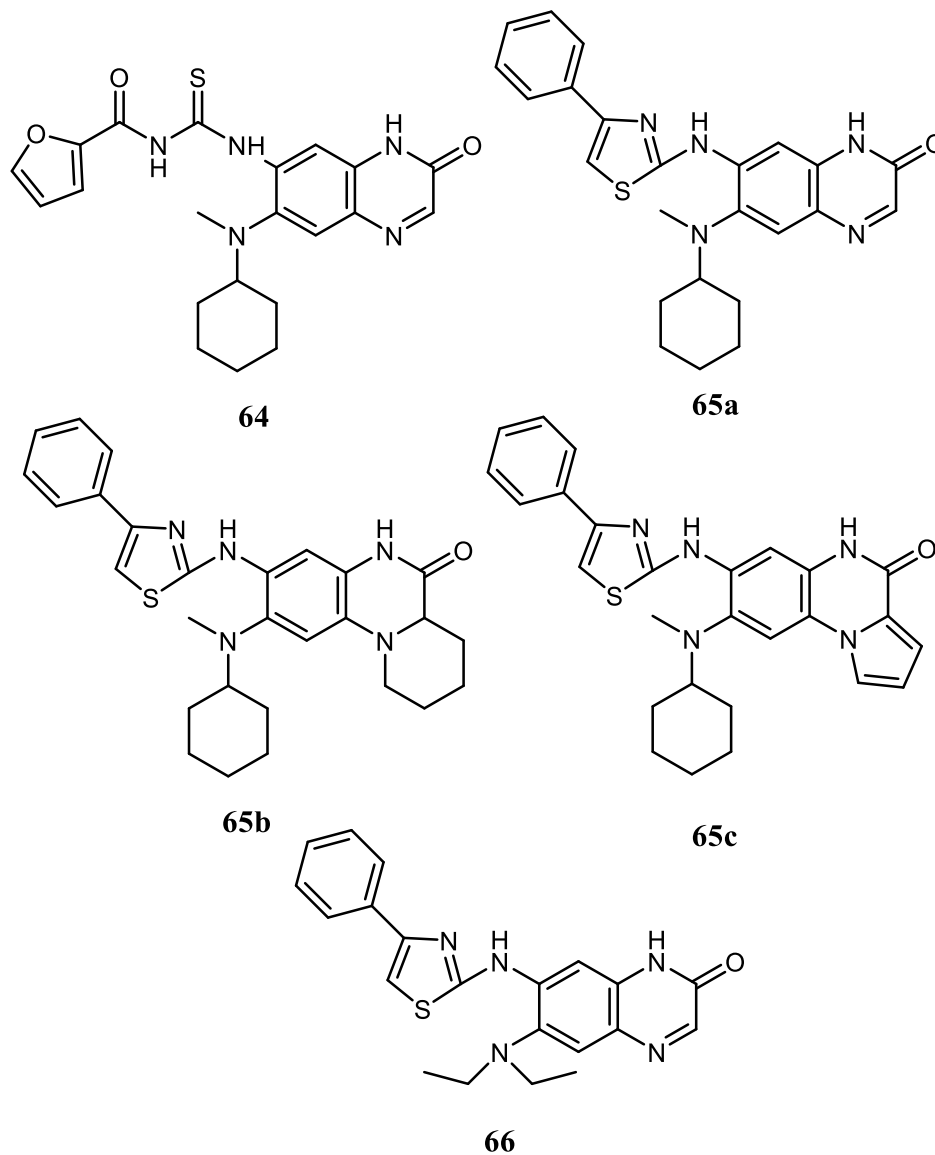
63a-j

X=H R=COOEt 63a	X=H R=COO <i>i</i> Pr 63b	X=H R=COOC(CH ₂)CH ₃ 63c	X=H R=COOCH ₂ (CH)CH ₂ 63d	X=H R=COOCH ₃ 63e
X=Cl R=COOEt 63f	X=Cl R=COO <i>i</i> Pr 63g	X=Cl R=COOC(CH ₂)CH ₃ 63h	X=F R=COOEt 63i	X=F R=COO <i>i</i> Pr 63j

Слика 17. Структуре једињења **63a-j**

Hepatitis C (HCV) је позитиван једноланчани РНК (рибонуклеинска киселина) вирус који је први пут откривен 1989. године као патоген одговоран за хепатитисе различите од типа А и Б.⁷³ Више од 170 милиона људи инфицирано је HCV-ом где је у 60-80% случајева долазило до преласка у хроничну форму. Liu и сарадници синтетисали су

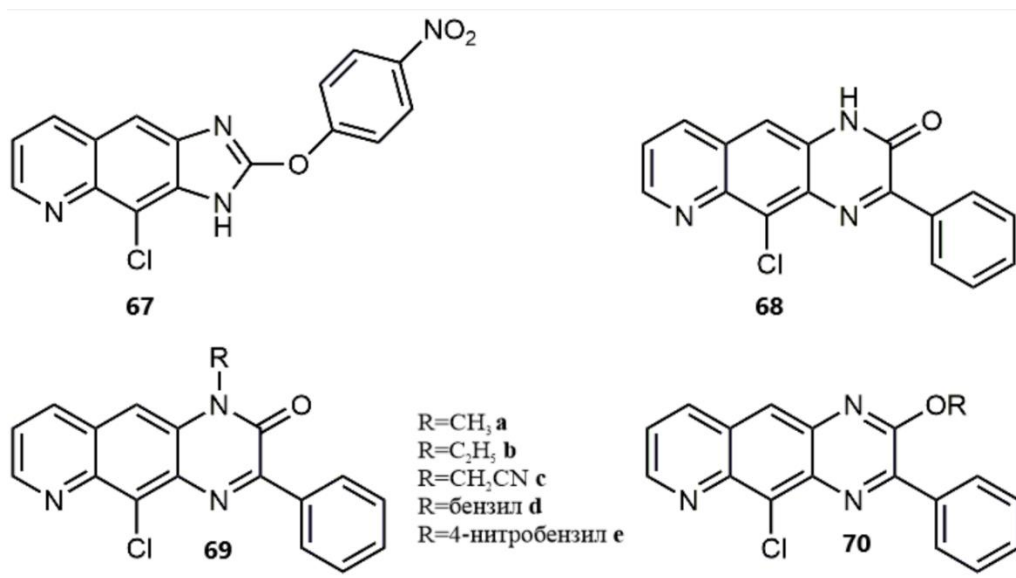
групу хиноксалинских деривата и испитивали анти-НСV активност.⁷⁴ Једињења **64**, **65a-c** и **66** (Слика 18) показала су јако добру антивирусну активност са прихватљивим индексом селективности. Даљим испитивањем показало се да хиноксалинони који садрже тиазол-фенил фрагмент у свом молекулу имају велики потенцијал за анти-НСV активност.



Слика 18. Структуре једињења **64-66**

Синтетисане су три групе линеарних ароматичних *N*-трицикличних једињења тиазоло[4,5-*g*]хинолини, имидазо[4,5-*g*]хинолини и пиридо[2,3-*g*]хинолини у циљу развијања новог антивирусног агенса.⁷⁵ Сва једињења су тестирана на РНК и ДНК вирусе и из сваке групе најмање по једно једињење показало је потенцијал и селективност (Слика

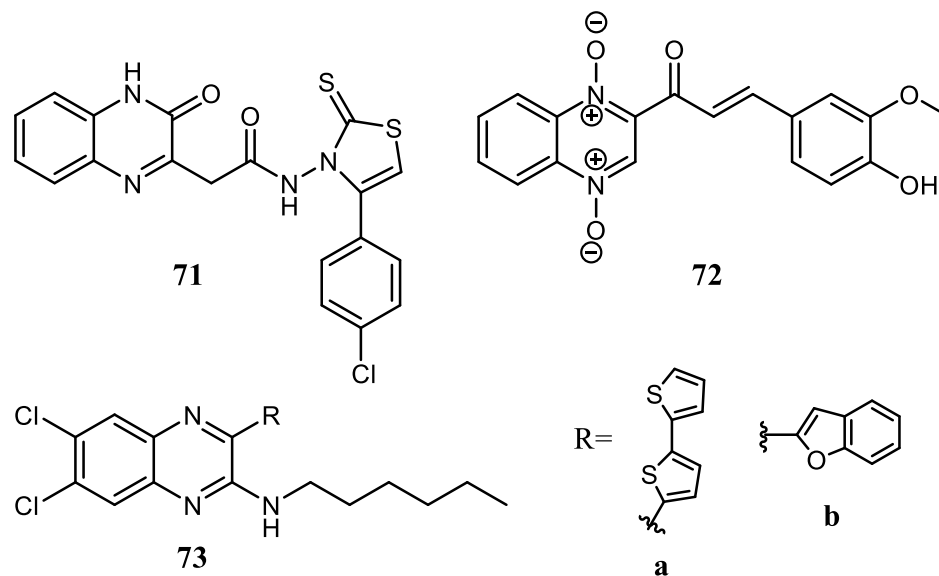
19). Од посебног значаја је једињење **67** које је показало већу активност и селективност према BVDV⁷⁶ него према HCV-у. За даља истраживања коришћено је једињење **68** са модификованом структуром. Након модификације добијени су *N*- и *O*-алкил деривати **69** и **70** који су показали антивирусну активност против BVDV, CVB-5, Sb-1, RSV и Reo-1 вируса.⁷⁷



Слика 19. Структуре једињења 67-70

1.4.3 Анти-инфламаторна активност деривата хиноксалина

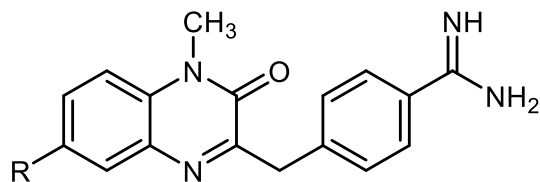
Познато је да деривати хиноксалина показују широк спектар активности, а међу њима и анти-инфламаторну активност. У складу са тим, синтетисани су 2(1*H*)-хиноксалинони и њихови хексахидро деривати.⁷⁸ Неки деривати 2(1*H*)-хиноксалинона садрже у молекулу 4-хлорофенил-2,3-дихидротиазол **71**, део молекула који показује највећу анти-инфламаторну активност и не проузрокује споредне ефекте. Burguete и сарадници су проучавали анти-инфламаторну и анти-оксидативну активност хиноксалина где се показало да једињење **72** показује анти-инфламаторну активност.⁷⁹ Li и сарадници су проучавајући анти-инфламаторну активност хиноксалина пронашли да једињење **73** са различитим R супституентима показује анти-инфламаторну активност (Слика 20).⁸⁰



Слика 20. Структуре једињења 71-73

1.4.4 Антикоагулантна активност

Неконтролисане активности хемостатичког система доводе до тромбоемболијских болести које представљају један од највећих узрока морталитета. Главну улогу у хемостази имају серинске протеазе Ха и тромбин што их чини јако важним за антикоагулантну терапију. Фактор Ха, фактор Va, калцијум и фосфолипиди чине комплекс који протромбин трансформише у тромбин. Тромбин веома ефикасно иницира формирање фибрина и агрегацију тромбоцита. За селективне инхибиторе тромбина очекује се да ће бити терапеутски корисни у лечењу или профилакси тромбоемболијских болести.⁸¹ У циљу развијања орално активних инхибитора коагулације, која у структури садрже хетероциклична језгра, Ries је синтетисао нека једињења као потенцијалне инхибиторе.⁸² Њихове структуре имају хиноксалинон **74** као централни структурни део (Слика 21).

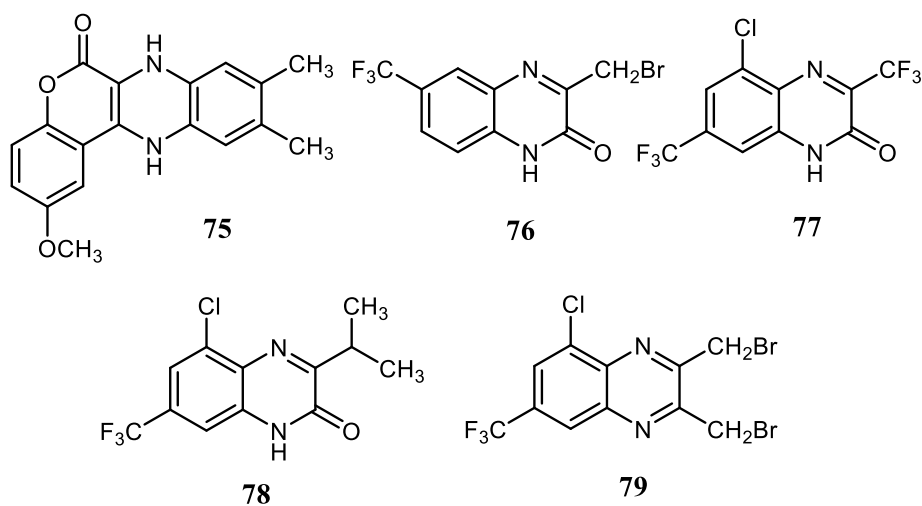


74

Слика 21. Структура једињења 74

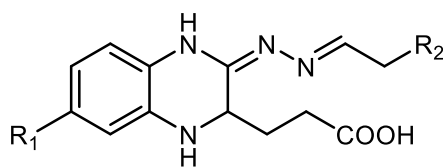
1.4.5 Антимикробна активност

Антимикробни агенси значајни су за лечење болести бактеријског и гљивичног порекла. Бактерије брзо стекну резистенцију на агенс па постоји непрекидна потреба за проналажењем нових антимикробних агенаса. Многа хетероциклична једињења која садрже азот показују антимикробну активност а нека од њих користе се у клиничке сврхе.⁸³ Хиноксалинов прстен, као једна од хетероцикличних јединица, често улази у састав различитих молекула антибиотика као што су хемомицин, левомоцин и актинодеутин који инхибирају раст грам-позитивних бактерија и користе се против галопирајућих тумора.⁸⁴ Испитивање 9,10-диметил-2-метокси-6-оксо-7,12-дихидро-хромохиноксалина **75** показало је да поседује и антибактеријску и антифунгалну активност. Хиноксалинони **76-79** показују исте активности (Слика 22).⁸⁵



Слика 22. Структуре једињења 75-79

У потрази за новим антимикуробним агенсом, 2(1*H*)-хиноксалинони и њихови хексахидро деривати су се показали као веома корисни.⁷⁸ Тиосемикарбазид добијен од хексахидро-2(1*H*)-хиноксалинона показао је у *in vitro* условима високу антибактеријску активност. Синтетисана је серија 3-(3-оксо-3,4-дихидрохиноксалин-2-ил) деривата пропионске киселине, а потом су деривати третирани хидразин-хидратом при чему настају хидразони. Хидразони даље реагују са супституисаним ароматичним алдехидима и добијају се хиноксалини представљени на Слици 23. Сва синтетисана једињења показала су антимикуробну и анти-инфламаторну активност.



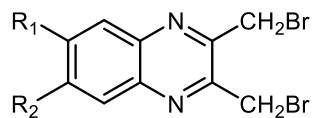
80a-r

R ₁ =H R ₂ =4-F-C ₆ H ₄ 80a	R ₁ =H R ₂ =2-Cl-C ₆ H ₄ 80b	R ₁ =H R ₂ =3-Cl-C ₆ H ₄ 80c	R ₁ =H R ₂ =4-Cl-C ₆ H ₄ 80d
R ₁ =H R ₂ =4-OH-C ₆ H ₄ 80e	R ₁ =H R ₂ =4-OCH ₃ -C ₆ H ₄ 80f	R ₁ =H R ₂ =3,4-OCH ₃ -C ₆ H ₃ 80g	
R ₁ =H R ₂ =3,4,5-OCH ₃ -C ₆ H ₂ 80h	R ₁ =H R ₂ =2-NO ₂ -C ₆ H ₄ 80i	R ₁ =H R ₂ =4-NO ₂ -C ₆ H ₄ 80j	
R ₁ =CH ₃ R ₂ =4-F-C ₆ H ₄ 80k	R ₁ =CH ₃ R ₂ =2-Cl-C ₆ H ₄ 80l	R ₁ =CH ₃ R ₂ =3-Cl-C ₆ H ₄ 80m	R ₁ =CH ₃ R ₂ =4-Cl-C ₆ H ₄ 80n
R ₁ =CH ₃ R ₂ =4-OH-C ₆ H ₄ 80o	R ₁ =CH ₃ R ₂ =4-OCH ₃ -C ₆ H ₄ 80p	R ₁ =CH ₃ R ₂ =2-NO ₂ -C ₆ H ₄ 80q	R ₁ =CH ₃ R ₂ =4-NO ₂ -C ₆ H ₄ 80r

Слика 23. Структуре једињења 80a-r

Ishikawa је синтетисао деривате 2,3-бис(бромометил)-хиноксалина са супституентима у положају 6 и/или 7 и пронашао да ова једињења показују активност против бактерија и гљива.⁸⁶ На Слици 24 приказане су структуре синтетисаних једињења.

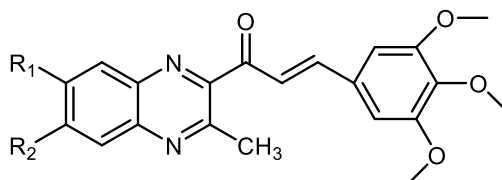
Од синтетисаних дванаест једињења, десет (**81a-h**, **81j** и **81k**) је показало антибактеријску активност. Једињење **81g**, које садржи трифлуорометил-групу у положају 6 показује инхибиторску активност на грам-позитивним бактеријама. Једино дериват **81k** са етил-естром као супституентом показује активност на грам-негативним бактеријама.

**81a-l**

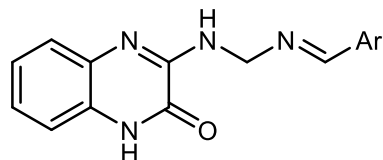
R ₁ =CH ₃	R ₁ =CN	R ₁ =F	R ₁ =Cl	R ₁ =Br	R ₁ =OCH ₃	R ₁ =CF ₃
R ₂ =CH ₃	R ₂ =H	R ₂ =H	R ₂ =H	R ₂ =H	R ₂ =H	R ₂ =H
81a	81b	81c	81d	81e	81f	81g
R ₁ =NO ₂	R ₁ =CO ₂	R ₁ =CO ₂ CH ₃	R ₁ =CO ₂ CH ₂ CH ₃	R ₁ =OH		
R ₂ =H	R ₂ =H	R ₂ =H	R ₂ =H	R ₂ =H		
81h	81i	81j	81k	81l		

Слика 24. Структуре једињења **81a-l**

Два посебно интересантна једињења (*2E*)-1-(7-флуоро-3-метил-4-хиноксалин-2-ил)-3-(3,4,5-триметокси-фенил)-пропенон **82a** и (*2E*)-3-(3,4,5-триметокси-фенил)-1-(3,6,7-триметил-хиноксалин-2-ил)-пропенон **82b** показала су селективну пролиферативну активност на туморским ћелијама и паразитима (Слика 25).

R₁/R₂=H/F (**a**); CH₃/CH₃ (**b**)**82**Слика 25. Структуре једињења **82a** и **82b**

У покушају да се развије моћан антимикуробни агенс, Ghadage и Shirote синтетисали су супституисане деривате хиноксалин-2(1*H*)-она.⁸⁷ Пронађено је да деривати **83a-e** (Слика 26) показују јако добру антимикуробну активност, а посебно дериват **83b** који показује јако добру активност против *E.coli*.



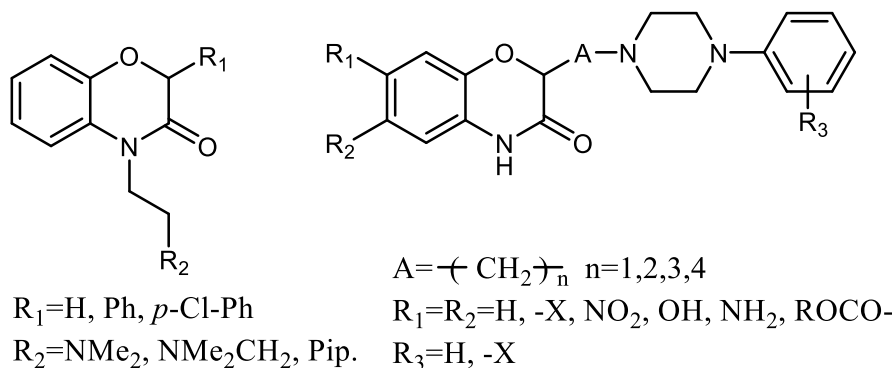
83a-e

- a**, Ar = C₆H₄CH₂CH=CHCHO **d**, Ar = 3,4-ClC₆H₃CHO
b, Ar = 3-Cl-C₆H₄CHO **e**, Ar = OHC₁₂H₈CHO
c, Ar = (CH₃)₂N-C₆H₄CHO

Слика 26. Структуре једињења 83a-e

1.5 Биолошка активност деривата оксазина

Због велике важности ових једињења уложен је велики труд да се развију фармацеутски производи на бази функционализованих 1,4-бензоксазинона. Због антифлогистичког, антипиретичког и аналгетског дејства која су показала једињења **84** дошло се до закључка да се нека од њих могу употребити као ефикасни фармацеутски производи.^{88,89} Након тога заиста се показало да су супституисани 1,4-бензоксазинони **85** одлични блокатори калцијумових канала (Слика 27).⁹⁰ Осим тога, неколико деривата бензоксазинона описани су као корисни антифунгални лекови и бронхолитици.^{91,92} Након патентирања синтезе ових једињења, настављено је са побољшавањем постојеће методе и развијањем нових метода синтезе 1,4-бензоксазинона као и испитивањем биолошке активности ове групе једињења.



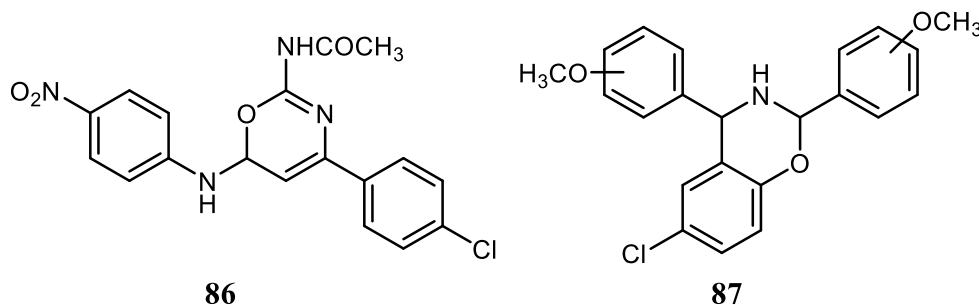
84

85

Слика 27. Структуре једињења 84 и 85

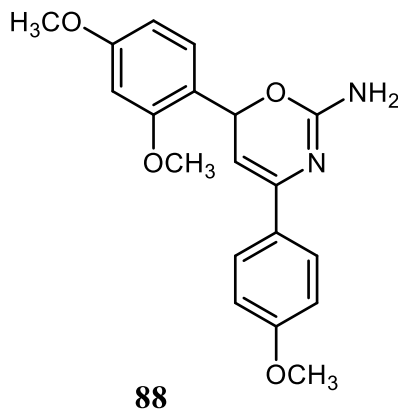
Bhat и сарадници су синтетисали деривате [1,4]-оксазин-2-она помоћу *o*-аминофенола и анхидрида малеинске киселине.⁹³ Даље су помоћу 3,3а-дихидро-бензо(б)фуоро(2,3-е) [1,4] оксазин-2-она и супституисаних ароматичних амина синтетисане Mannich-ове базе. За сва једињења испитиване су антитуберкулозна, антибактеријска и антифунгална активност. Резултати су показали да су 1,4-оксазинони обећавајућа једињења за даља истраживања.

Синтетисана је прва серија [6-(*p*-супституисани аминофенил)-4-(*p*-супституисани фенил)-6*H*-1,3-оксазин-ил]-ацетамида⁹⁴ и серија 6-хлоро-2,4-дифенил-3,4-дихидро-2*H*-1,3-бензоксазин деривата.⁹⁵ За обе серије испитивана је антимикуробна активност. Из прве серије, јаку антибактеријску и антифунгалну активност показао је хлоро супституисани 1,3-оксазинил ацетамидни дериват **86** (Слика 28). У другој серији метокси супституисани деривати **87** показали су већу антимикуробну активност од стандардних лекова.



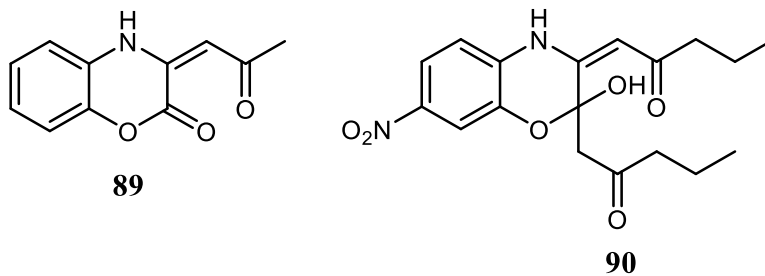
Слика 28. Структуре једињења **86** и **87**

Dhanuа и сарадници синтетисали су серију 4-(4-супституисани фенил)-6-супституисани-6*H*-1,3-оксазина полазећи од халкона и урее у етанолу и у присуству концентроване хлороводоничне киселине.⁹⁶ 6-[2,4-Диметоксифенил]-4-(4-метоксифенил)-6*H*-1,3-оксазин-2 амин **88** (Слика 29) показао је одличну активност против грам-позитивних бактерија.



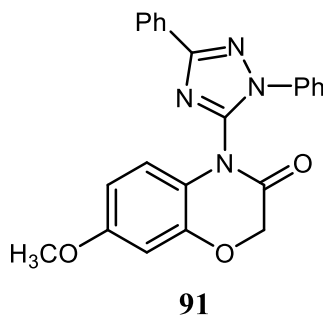
Слика 29. Структура једињења 88

Испитивана је акутна токсичност деривата [1,4]-бензоксазин-2-она **89** и **90** на мишевима при чему су оба једињења тестирана на шест јединки (Слика 30).⁹⁷ У току десет дана праћене су и бележене све промене које су се дешавале на животињама. Као параметар токсичности узета је доза која убија 50% животиња до краја експеримента (LD₅₀). Приликом овог експеримента нису уочене девијације код огледних животиња као ни други симптоми интоксикације. Леталне дозе (LD₅₀) тестираних једињења, после једне оралне примене, износиле су 1000 mg/kg и на основу ових резултата окарактерисани су као једињења са ниском токсичношћу. Поред акутне токсичности, испитиван је и утицај ових једињења на резистенцију бактерије *E. coli*, односно испитиван је утицај ових једињења на антиоксидативни систем бактерије. Као стандард за антиоксидативну активност употребљен је ресвератрол у истој концентрацији као и испитивана једињења (10⁻⁵ M). Једињење **89** показало је анти-оксидативну, а једињење **90** прооксидативну активност. Ова једињења су подвргнута и испитивању антирадикалске активности где се једињење **90** показало као ефикаснији „хватач” радикала од стандардног једињења тролокс.



Слика 30. Структуре једињења 89 и 90

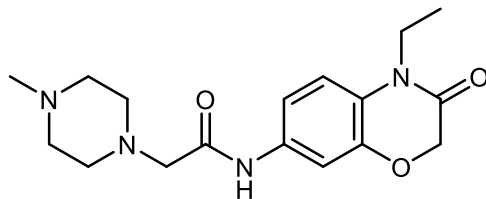
Синтетисана је серија бензо[1,4]-оксазин-3-он деривата и испитивана је њихова цитотоксична активност на ћелијској линији рака дојке и рака грлића материце (HeLa). Од свих испитиваних једињења, једино је једињење **91** (Слика 31) показало добру антитуморску активност на HeLa ћелијској линији. Међутим, иако ова серија бензоксазинона није показала добру антитуморску активност, ова једињења се могу користити као скелет за потенцијалне антитуморске агенсе.⁹⁸



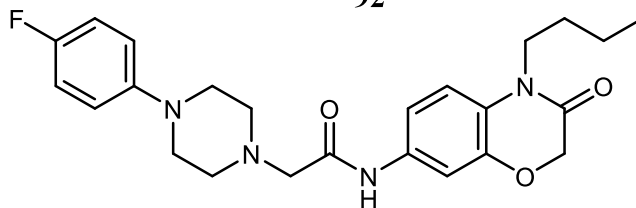
Слика 31. Структура једињења 91

Група научника инспирисана претходним истраживањима у којима је доказано да деривати бензоксазинона поседују идеалну антитромботску активност синтетисала је и испитивала серију 1,4-бензоксазинона који имају структурну предиспозицију да се понашају као инхибитори агрегације тромбоцита.⁹⁹ Како би побољшали инхибиторску активност, развили су нову групу *N*-(1,4-бензоксазинона) ацетамида (BOAP-AM). Биолошка испитивања су показала да сва једињења поседују добру антитромбоцитну активност при чему се IC₅₀ вредности крећу од 8,67-13,88 μM. Најбољу инхибиторску активност агрегације тромбоцита показала су једињења **92** и **93** (Слика 32) која имају IC₅₀

вредност готово исту као контролно једињење, аспирин. Ова једињења се могу даље модификовати, односно користити као структурни модели за неку следећу генерацију инхибитора тримбоцита.



92



93

Слика 32. Структуре једињења 92 и 93

2. НАШИ РАДОВИ

2.1 Увод

С обзиром на то да хиноксалинони и бензоксазинони поседују широк спектар биолошких активности или улазе у састав биолошки активних једињења постали су предмет истраживања великог броја научника. Улазе у састав многих антибиотика као што су ехиномицин, левомоцин и актиномицин а такође је добро познато да инхибирају раст грам-позитивних бактерија. Због биолошке важности постоји тенденција да се развију нове методе синтезе ових једињења. До сада публиковане методе подразумевају употребу катализатора који су штетни и скупи или употребу токсичних органских растварача. Употреба ових метода праћена је нежељеним ефектима као што су компликована синтеза катализатора, тешкоће у изоловању производа, употреба специјалних апаратура и др.

Ова једињења су важна и за индустрију због њихове способности инхибиције корозије метала. Ефикасност инхибиције корозије метала одређена је физичко-хемијским особинама самог метала (електронска густина, геометријски фактори, величина молекула и др.), док ефекат адсорпције зависи од типа метала, природе инхибитора и електрохемијског потенцијала система (метал и раствор). Поред тога што се способност инхибиције корозије метала неког једињења може испитати експериментално то се може урадити и помоћу DFT (density functional theory) студије. Израчунавањем квантно хемијских параметара можемо добити информацију о томе да ли испитивани молекул има способност инхибиције корозије или не. Поред квантно хемијских параметара помоћу DFT-а можемо израчунати равнотежну структуру, при чему добијамо информацију о геометријским параметрима, симулиране спектре једињења (UV-Vis, IR, Raman и NMR) као и информације о молекулским орбиталама. Добијени теоријски резултати могу се упоредити са експерименталним уколико постоје, али највећи значај ових прорачуна је то што се могу добити додатне информације о структури и особинама једињења, посебно о онима која су тешко растворна.

У оквиру ове тезе синтетисане су две групе једињења, 3,4-дихидро-2(1*H*)-хиноксалинони и 3,4-дихидро-1,4-бензоксазин-2-они и разрађена је нова еколошки одржива метода синтезе.¹⁰⁰ Полазни супстрати за ову реакцију били су различити етил 2-хидрокси-4-алкил(арил)-4-оксо-2-бутеноати или њихове одговарајуће соли. Реакција је рађена у лимуновом соку који се понаша као растварач и катализатор. Добијени приноси производа

су високи при чему на то не утичу различити супституенти на бензеновом прстену етил 2-хидрокси-4-арил-4-оксо-2-бутеноата.

Због широког спектра фармаколошких активности које показују поменута једињења¹⁰¹, урађена је евалуација биолошких активности. Том приликом испитана је цитотоксичност, антиангиогенеза и антидијабетска активност хиноксалинона и бензоксаинона. Као допуна овим испитивањима урађена је ДНК и БСА интеракција као и докинг студија.

Коришћењем DFT методе могу се добити информације о системима које је тешко или немогуће добити експерименталним методама. Ова метода је последњих година веома популарна јер је бржа од осталих метода сличне тачности. Она се не заснива на таласној функцији већ на функцији густине електрона. За сва израчунавања коришћен је B3LYP функционал са базисним скупом 6-311+G(d,p). Све истражене структуре су оптимизоване и за њих је урађена вибрациона анализа како би се утврдило равнотежно стање. За добијање UV-Vis спектра коришћен је 6-311+G(d,p) базисни скуп и TD-DFT ниво теорије при чему је за израчунавања као растварач подешен етанол. Као додатак овоме израчунате су и молекулске орбитале и одређени су доприноси електронских прелаза. Урађена су квантно хемијска израчунавања како би се теоријски испитале особине ових једињења и њихова могућност да инхибирају корозију неког метала. NMR спектроскопски подаци су добијени у оквиру GIAO методе. Приликом ових израчунавања добијена су јако добра слагања између израчунатих и експериментално добијених података.

2.2 Синтеза 3,4-дихидро-2(1*H*)-хиноксалинона и 3,4-дихидро-1,4-бензоксазин-2-она

Реакцијом хетероциклизације различитих етил 2-хидрокси-4-алкил(арил)-4-оксо-2-бутеноата или њихових одговарајућих соли са *o*-фенилендиамином (**3**) или *o*-аминофенолом (**4**) добијају се 3,4-дихидро-2(1*H*)-хиноксалинони односно 3,4-дихидро-1,4-бензоксазин-2-они. Различити етил 2-хидрокси-4-алкил(арил)-4-оксо-2-бутеноати синтетисани су по претходно публикованој процедури.^{102,103} Неки од коришћених су већ били познати а неки су новосинтетисани. Синтеза етил 2-хидрокси-4-алкил(арил)-4-оксо-2-бутеноата одвија се Claisen-овом кондензацијом између различитих алифатичних и ароматичних метил кетона и диетил-оксалата. На Схеми 22 приказана је синтеза 3,4-дихидро-2(1*H*)-хиноксалинона **5(a-m)** и 3,4-дихидро-1,4-бензоксазин-2-она (**6a, 6b, 6f, 6k-o**).

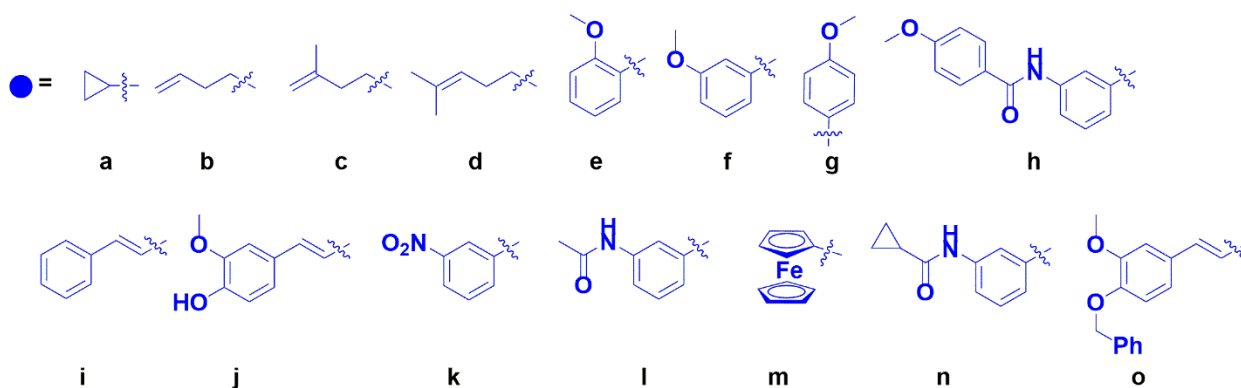
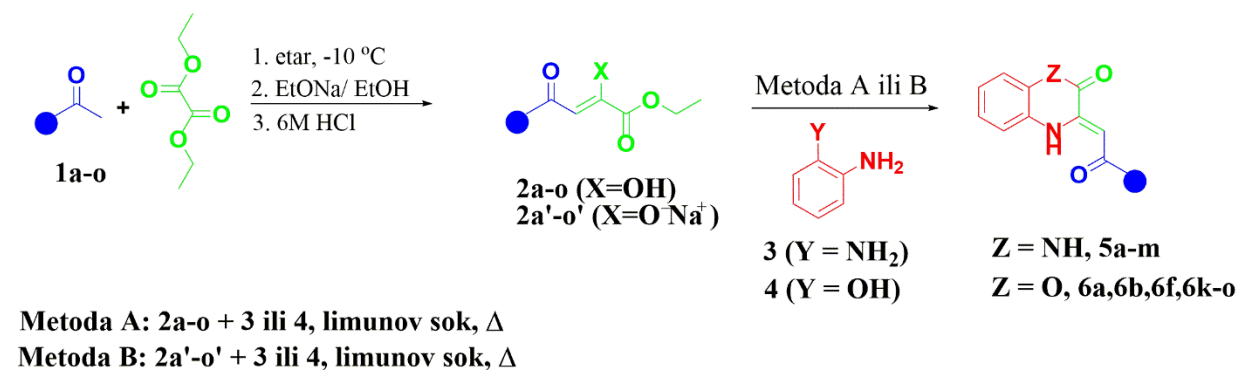
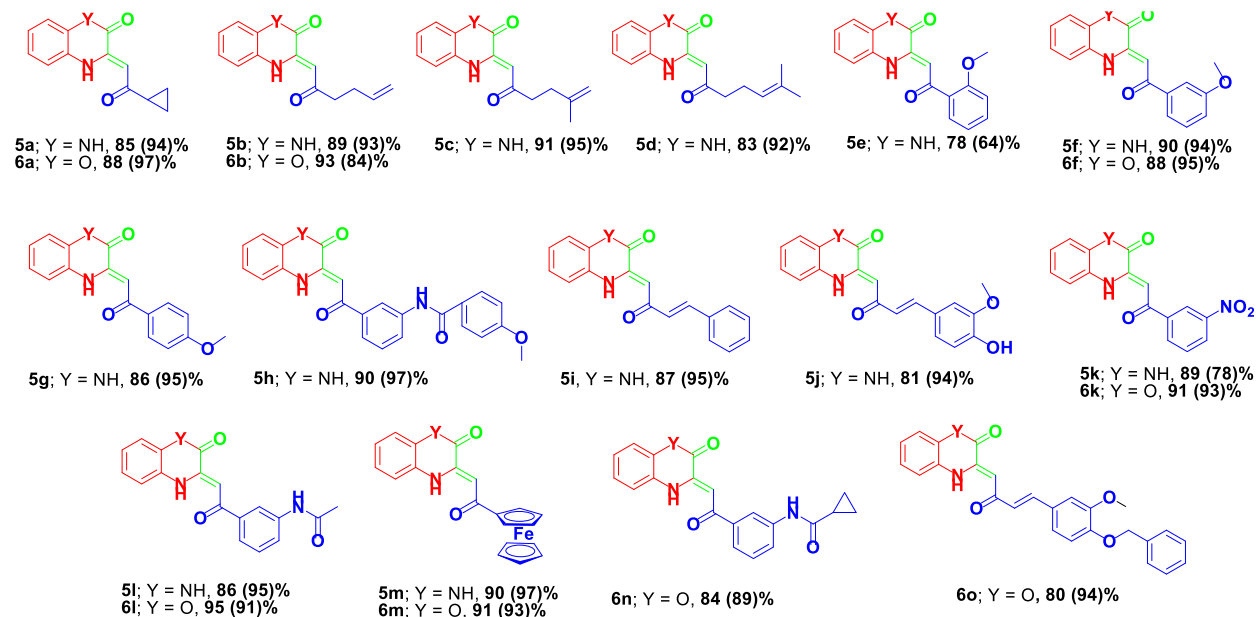


Схема 22. Синтеза 3,4-дихидро-2(1*H*)-хиноксалинона **5(a-m)** и 3,4-дихидро-1,4-бензоксазин-2-она (**6a, 6b, 6f, 6k-o**)

За оптимизацију реакционих услова одабрали смо реакцију између реактанта **3** или **4** са етил 2-хидрокси-4-(бут-2'-енил)-4-оксо-2-бутеноатом (**2b**) или етил 2-хидрокси-4-(3'-метоксифенил)-4-оксо-2-бутеноатом (**2f**) где се као производи добијају **5b**, **5f**, **6b** и **6f**. Ова реакција је изведена у води и у лимуновом соку (метода А) као растварачу у моларном односу 1:1 са променом температуре. Након изоловања производа најбољи резултати су постигнути помоћу методе А. У току 24 сата у лимуновом соку на тачки кључања добијени су следећи приноси за **5b**, **5f**, **6b** и **6f** : 89, 90, 93 и 88%. Ове реакције су изведене и у води у присуству каталитичких количина лимунске киселине (10 mol%) али су приноси производа **5b**, **5f**, **6b** и **6f** знатно нижи (25-54%) у поређењу са методом А где се користи лимунов сок (88-93%). Претпостављамо да разлог добијања виших приноса коришћењем лимуновог сока лежи у томе што лимунов сок представља смешу витамина, антиоксиданата и ензима, што није случај код воденог раствора лимунске киселине. Такође, приликом оптимизације услова мењан је молски однос између **3** или **4** и естара **2b** или **2f** (1,1:1, 1,5:1, 2:1) и уз продужено време реакције (24-48 сати) добијени су приноси производа (**5b**, **5f**, **6b** и **6f**) 70-92%. Резултати ових експеримената показали су да су оптимални услови за синтезу ових једињења рефлукс, 24 сата са молским односом реактаната 1:1.

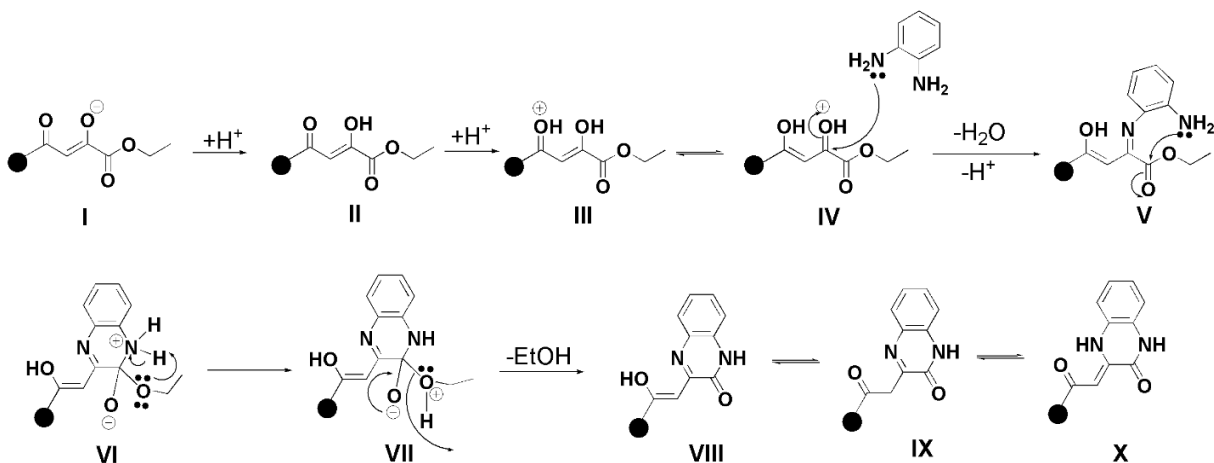
Након успешне оптимизације реакционих услова урађена је синтеза свих 3,4-дихидро-2(1*H*)-хиноксалинона и 3,4-дихидро-1,4-бензоксазин-2-она. Структуре синтетисаних једињења (**5a-m**, **6a**, **6b**, **6f**, **6k-o**) и приноси производа приказани су на Слици 33. У свим изведеним реакцијама постигнути су добри до одлични приноси, а најбољи принос од 95% постигнут је у синтези једињења **6l**. Што се тиче утицаја структуре једињења на принос, групе са електрон-донорским или електрон-акцепторским ефектом које се налазе на ароматичном прстену естара немају значајан утицај на принос производа. Примећено је да је принос у реакцијама естара (**2a-d**) који садрже алкил групу као супституент виши од приноса који су добијени употребом сличних супстрата.^{104,105} Једињење **5g** је синтетисано помоћу методе А у nižем приносу у односу на претходно коришћену процедуру.¹⁰⁶ Међутим, једињења **5f** и **5g** су добијена у вишем приносу него једињење **5e** вероватно због присуства стерних сметњи које потичу од метокси групе у орто положају.



Слика 33. Структуре и приноси (%) једињења 5(a-m) и 6a, 6b, 6f, 6k-o; у загради се налазе приноси остварени применом методе В

Један од најважнијих принципа зелене хемије је смањење утршка енергије у хемијским процесима. Сходно томе, применом методе В смањено је време реакције тако што су уместо естара, као полазних супстрата, коришћене одговарајуће енолне соли **2a'-o'**. Синтеза се изводи тако што се у кључали раствор лимуновог сока у коме се налази реактант **3** или **4** дода загрејани водени раствор енолне соли (**2a'-o'**). У свим случајевима, одмах по додатку енолне соли ствара се замућење и у периоду од 2-6 сати настаје производ у одличном приносу (Слика 33). Применом методе В, са краћим периодом трајања реакције у односу на методу А, добијају се слични или чак бољи приноси. Најбољи приноси добијени су у синтези **5h**, **5m** и **6a** (97%).

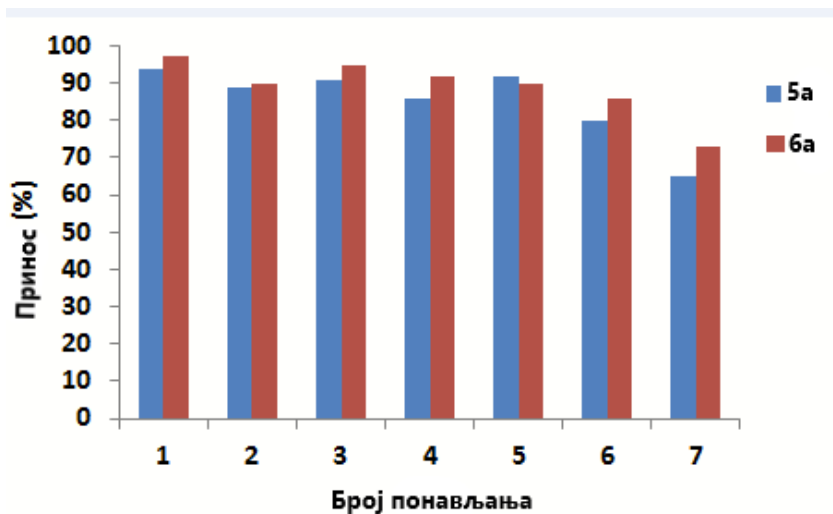
Претпостављени механизам реакције добијања 3,4-дихидро-2(1H)-хиноксалинона и 3,4-дихидро-1,4-бензоксазин-2-она приказан је на слици 34. У првој фази реакције долази до протоновања једињења **I** што доводи до формирања енолног облика **II**. У даљем ступњу реакције протонује се облик **II** и формира се интермедијер подложен таутомеризацији (**III** и **IV**). У реакцији реактанта **3** или **4** са интермедијером **IV** долази до формирања C-N везе и дехидратације након чега се формира интермедијер **V**. У последњем кораку реакције долази до интрамолекуларске циклизације интермедијера **V** и формирања енол-имина **VIII** који таутомеризује преко кето-имина **IX** у жељени производ **X**.



Слика 34. Предложени механизам реакције добијања 3,4-дихидро-2(1H)-хиноксалинона

2.2.1 Постсинтетичка анализа

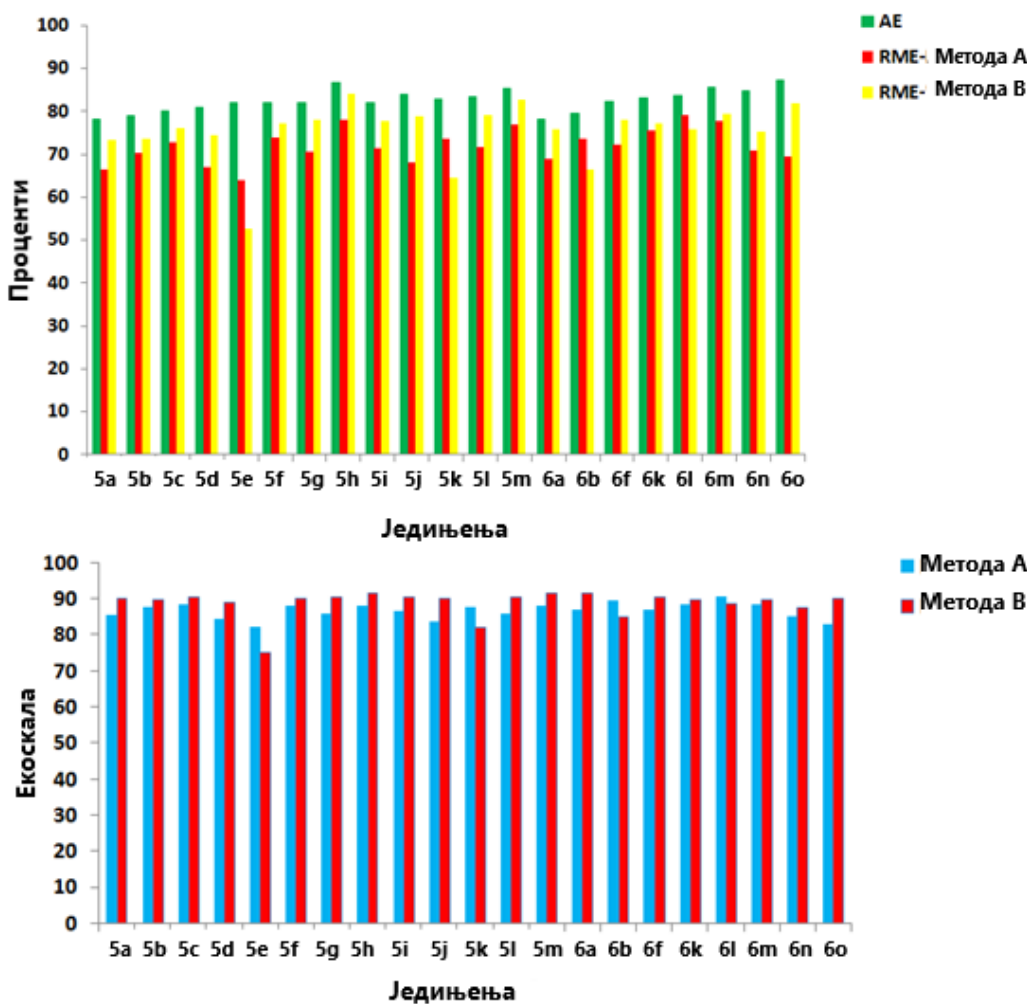
У циљу испитивања могућности рециклирања и поновне употребе лимуновог сока, синтетисана су једињења **5a** и **6a** помоћу методе В. Након одговарајућег изоловања производа, лимунов сок је третиран са 0,05 g активног угља и након филтрирања поново употребљен за синтезу **5a** и **6a**. Синтеза са рециклираним лимуновим соком је изведена седам пута и на Слици 35 је приказан утицај рециклираног медијума на приносе производа **5a** и **6a**.



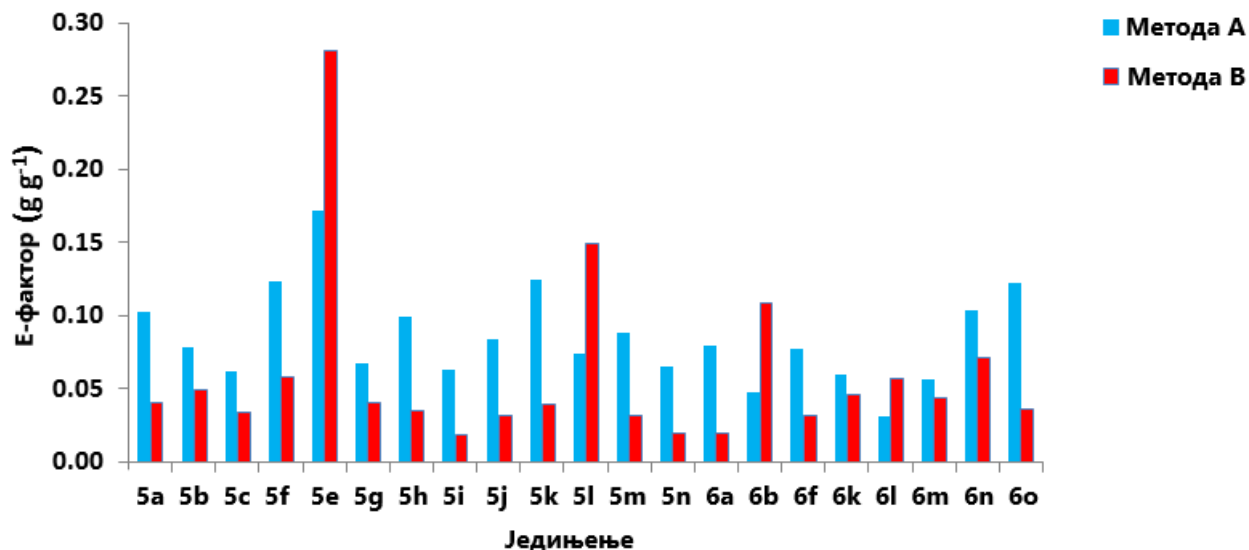
Слика 35. Утицај рециклираног лимуновог сока на приносе производа

Као што се може видети на графику, рециклирани лимунов сок се може пет пута употребити а да при томе не изгуби каталитичку активност, док шести и седми пут долази до значајног опадања приноса (65-80%).

Приликом развијања нових метода које подразумевају употребу нетоксичних растварача потребно је утврдити да ли су и колико те методе еколошки одрживе. То се одређује израчунавањем параметара зелене хемије. У циљу одређивања еколошке одрживости примењене методе, израчунати су еколошки фактори за методу А и В (Слика 36 и Слика 37). У параметре зелене хемије спадају ефективно искоришћење масе, Е-фактор, атомска ефикасност (АЕ) и ефикасност реакционе масе (RME) као једни од најбитнијих.



Слика 36. Графички приказ фактора АЕ и RME за методу А и В (горе) и Екоскала за обе методе (доле)



Слика 37. Графички приказ Е-фактора ($g\ g^{-1}$) за методу А и В

Атомска ефикасност (АЕ), као један од параметара зелене хемије, која показује колики проценат реактаната учествује у грађењу производа, има високе вредности (Слика 36, до 87%), док постоје значајне разлике у вредностима за RME израчунате за примењену методу.¹⁰⁷ Ефикасност реакционе масе (RME) представља количник масе производа (**5** или **6**) и збира масе реактаната (принос реакције) који је помножен са АЕ. Вредности за RME, за методу А и В, иду до 76,8 односно 84%. Остварене вредности Е-фактора (Слика 37) за методу А и В имају вредности 0,17 и 0,15. Такође, екоскала се налази у опсегу од 75-88,5 за методу А и од 82-91,5 за методу В. На основу добијених резултата метода В има боље вредности за АЕ, RME, Е-фактор и Екоскалу у односу на методу А, чиме је доказано да је ова метода чистија и еколошки одрживија.

Испитивана је скалабилност методе В, односно ефикасност методе на 40 mmol скали. У ту сврху синтетисано је неколико 3,4-дихидро-2(1*H*)-хиноксалинона (**5a**, **5k-5m**) и 3,4-дихидро-1,4-бензоксазин-2-она (**6a**, **6k-6m**). У свим реакцијама су коришћене еквимоларне количине енолних соли **2a'**, **2k'-2m'** и **3** или **4** и урађене су на 40 mmol скали. Одговарајући производи су добијени у приносу 74-95% (Табела 1.).

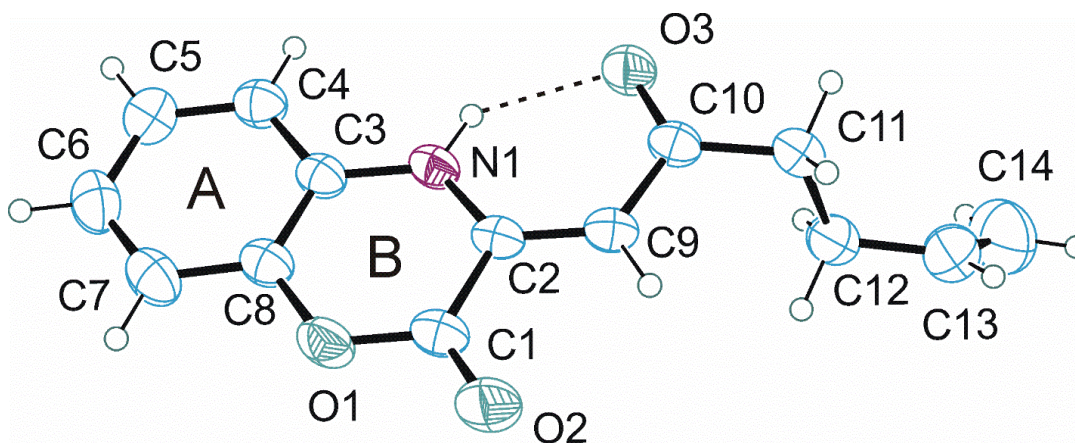
Табела 1. Синтеза одабраних једињење на грамској скали и зелени параметри (Е-фактор и Екоскала)

Супстрати	Реакциони услови	Производ	Е-фактор (g g ⁻¹)*	Екоскала*
2a' + 3	рефлукс, 2h	5a , 84%, 7,7 g	0,12	85
2k' + 3	рефлукс, 10h	5k , 74%, 9,1 g	0,21	80
2l' + 3	рефлукс, 7h	5l , 92%, 11,8 g	0,05	89
2m' + 3	120 °C, 15h	5m , 80%, 11,9 g	0,15	83
2a' + 4	рефлукс, 5h	6a , 95% , 8,7 g	0,03	90,5
2k' + 4	120 °C, 10h	6k , 87%, 10,8 g	0,09	86,5
2l' + 4	120 °C, 15h	6l , 90%, 11,6 g	0,07	88
2m' + 4	120 °C, 24h	6m , 89%, 13,3 g	0,07	87,5

*Еколошки фактор и Е-фактор израчунати су помоћу следећих једначина: Е-фактор (g g⁻¹) = маса отпада (g) / маса добијеног производа **5** или **6** (g)¹⁰⁷ и Екоскала = 100 – збир појединачних пенала¹⁰⁸.

2.2.2 Кристалографска анализа

Једињење **6b** је добијено у погодном кристалном облику тако да је за њега било могуће урадити рендгенску структурну анализу. На овај начин је потврђена структура овог једињења која је приказана на Слици 38. Пошто се ради о сличним једињењима, на овај начин је потврђена и структура свих осталих молекула.

Слика 38. Кристална структура и шема нумерисања атома једињења **6b**

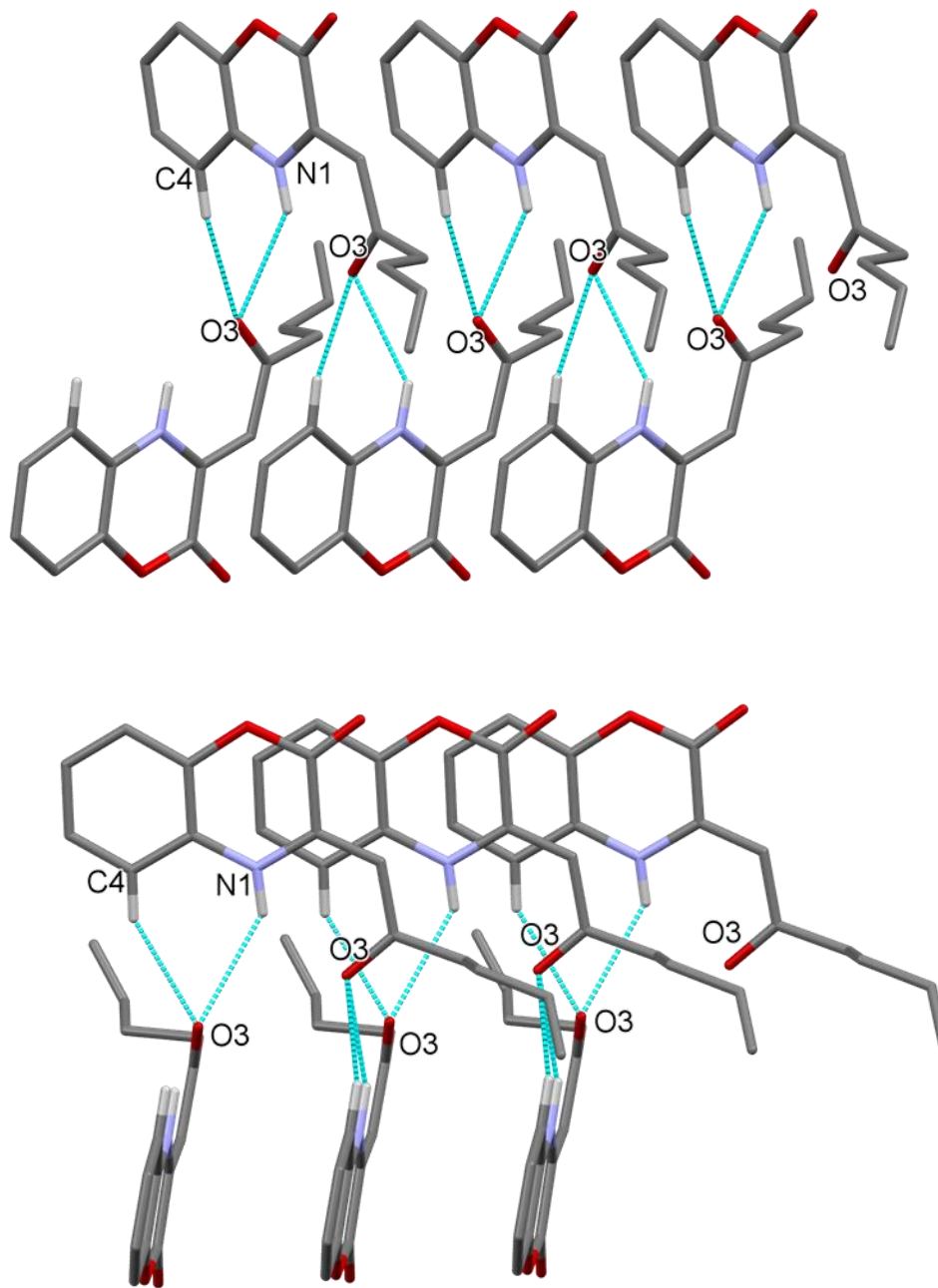
Са слике се види да овај молекул садржи два кондензована шесточлана прстена (на слици обележена као прстен А и В). Прстен В је скоро идеално планаран иако су неке везе унутар тог прстена једноструке (Табела 2). Ова планарна конформација прстена В вероватно је стабилизована јаком интрамолекулском водоничном везом N1–H···O3 [H···O3 = 2.01(2) Å, N1–H···O3 = 134(2)°]. Прстенови А и В су копланарни јер диедарски угао између два прстена износи 1.42(9)°, док померање O2, C9, C10, C11 и O3 атома из равни два прстена не прелази 0.09 Å. Дакле, сви атоми у молекулу формирају дугачак планарни систем осим крајњих (C12–C13–C14) атома.

Табела 2. Дужине веза (Å) у кристалној структури једињења **6b**

O1-C1	1,352(2)
O1-C8	1,385(2)
O2-C1	1,193(2)
O3-C10	1,238(2)
N1-C2	1,357(2)
N1-C3	1,382(2)
C1-C2	1,494(2)
C2-C9	1,351(2)
C3-C8	1,386(2)
C9-C10	1,444(2)
C10-C11	1,493(2)
C11-C12	1,526(2)
C12-C13	1,473(2)
C13-C14	1,287(3)

Поред поменуте интрамолекулске водоничне везе, кисеоников атом O3 у кристалној структури гради две јако битне интермолекулске водоничне везе N1–H···O3 [H···O3 = 2,52(2) Å, N1–H···O3 = 142(2)°] и C4–H···O3 [H···O3 = 2,47 Å, C4–H···O3 = 144°]. Помоћу ових водоничних веза молекули једињења **6b** формирају двоструки низ дуж кристалографске осе *b* у кристалном паковању (Слика 39). Занимљиво је поменути да су

прстенови А и В суседних молекула у двоструком низу постављени паралелно једни према другима.



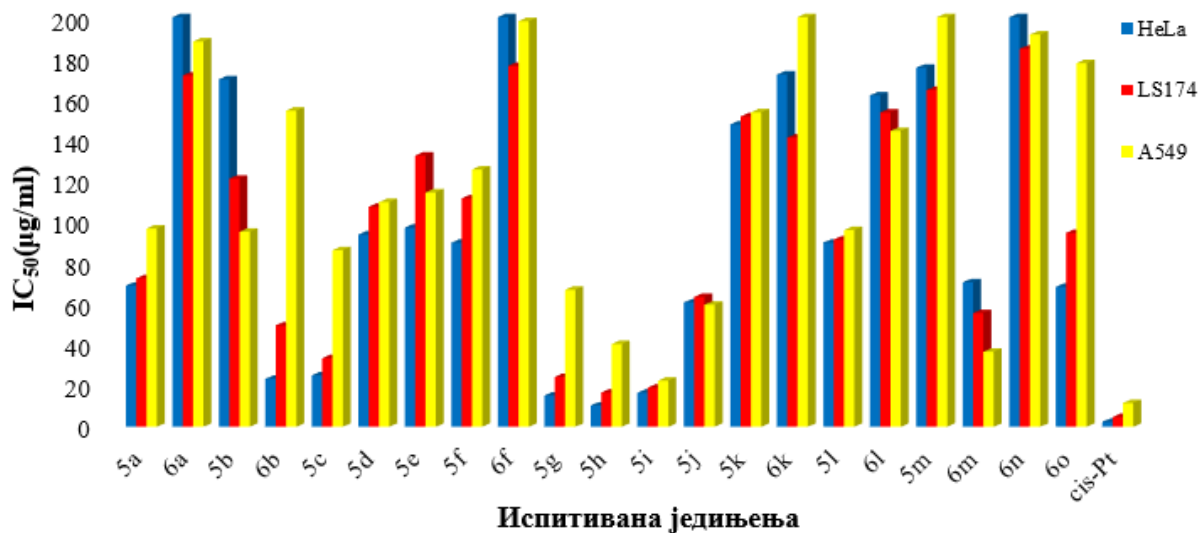
Слика 39. Формирање двоструког низа у кристалном паковању једињења **6b**. Интермолекулске водоничне везе су приказане испрекиданом плавим линијама.

Интерпланарна удаљеност између суседних А и В прстенова износи само 3,36 Å, а удаљеност између прстенова износи 3,50 Å. Овакво паковање прстенова може се сматрати изненађујућим и структурно јако занимљивим јер хетероциклични прстен В не испуњава све критеријуме ароматичности. Заправо, делокализација π електрона унутар целог прстена је један од основних услова ароматичности. Међутим, у случају прстена В, С1–С2 веза има дужину од 1,493(2) Å и може се посматрати једино као локализована С–С једнострука веза.

2.3 Биолошка активност 3,4-дихидро-2(1H)-хиноксалинона и 3,4-дихидро-1,4-бензоксазин-2-она

2.3.1 Антитуморска активност

Испитана је цитотоксична активност *in vitro* свих синтетисаних једињења **5(a-m)** и **6a, 6b, 6f, 6k-o** према ћелијским линијама хуманог карцинома грлића материце (HeLa), хуманог карцинома дебелог црева (LS174), хуманог карцинома плућа (A549) и нормалним хуманим ћелијама феталних фибробласта плућа (MRC-5) које су коришћене као контролне ћелије. Цисплатина је коришћена као референтно једињење. На Слици 40 су дате IC₅₀ вредности одређене током периода инкубације од 72h. До ових резултата се дошло коришћењем МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид) теста. Анализа резултата је показала да неколико једињења (**5c, 5g, 5h** и **5i**) показују добру цитотоксичну активност према свим ћелијским линијама док остала показују умерену до слабу активност.



Слика 40. Концентрације испитиваних једињења које доводе до 50% инхибиције преживљавања ћелије (IC₅₀) изражене у µg/ml

Једињења **5a, 6b, 5j** и **6m** према неким ћелијским линијама показују јаку цитотоксичну активност, а према неким слабију. На пример, једињење **6b** према HeLa ћелијској линији показује добру цитотоксичну активност, према LS174 показује умерену активност, док према A549 показује јако слабу цитотоксичну активност. Што се тиче

селективности, односно активности испитиваних једињења на здравим ћелијама, готова сва испитивана једињења показала су се као нетоксична према здравим ћелијама. Једињења **5c**, **5g**, **5h** и **5i** показала су бољу селективност од цисплатине, посебно једињење **5h** чији индекс селективности за HeLa ћелијску линију износи 17,44 (Табела 3).

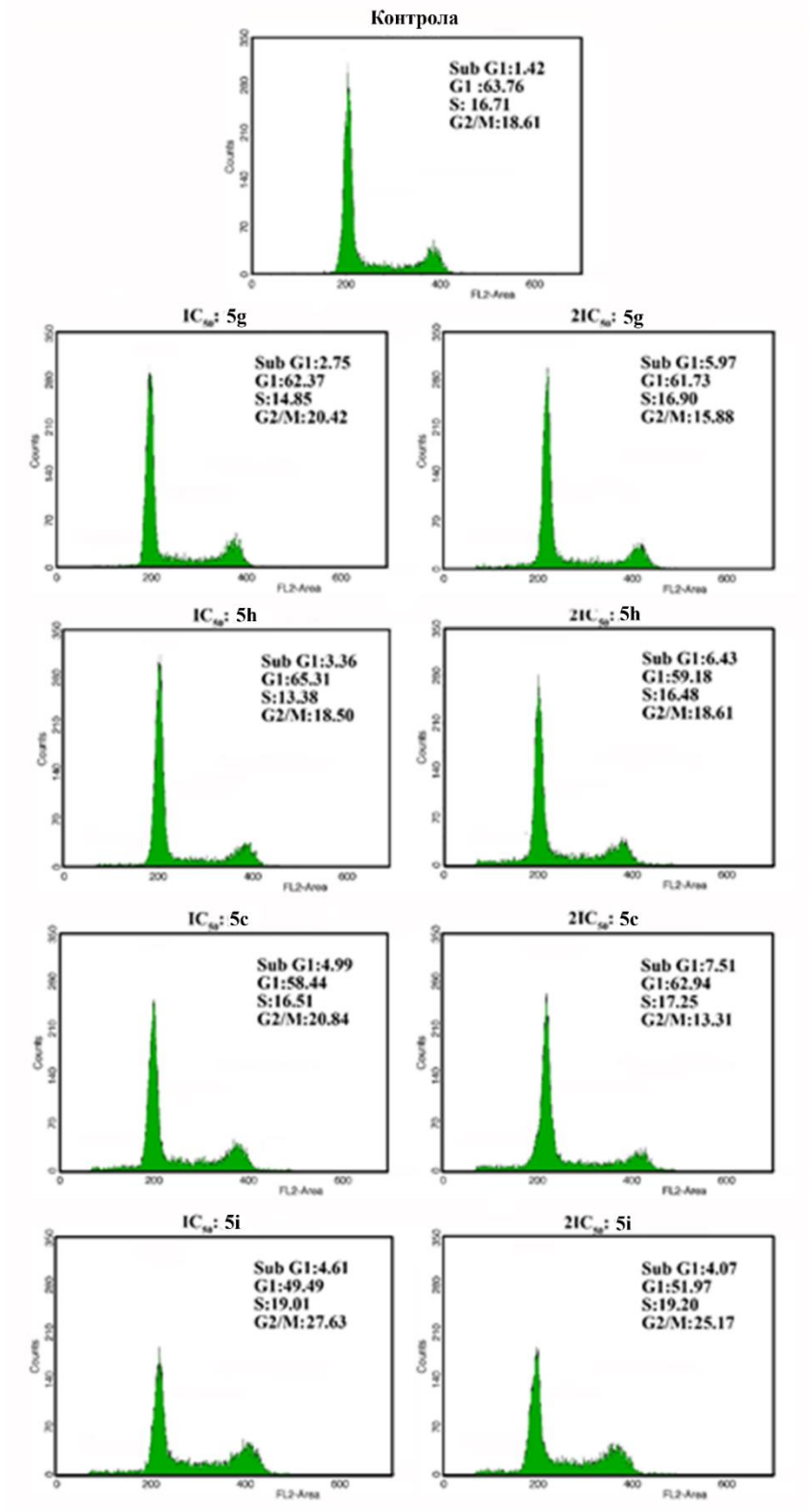
Табела 3. Индекс селективности

Једињења	HeLa LS174 A549		
	IC ₅₀ (MRC-5)/IC ₅₀ (ћелијске линије)		
5c	6,92	5,18	2,01
5g	12,53	7,83	2,84
5h	17,44	10,88	4,51
5i	10,51	9,12	7,72
Цисплатина	6,04	2,96	1,24

2.3.2 Механизам антитуморске активности

2.3.2.1 Анализа фаза ћелијског циклуса

Испитивано је дејство одабраних једињења (**5c**, **5g**, **5h** и **5i**) на промену у дистрибуцији HeLa ћелија у појединим фазама ћелијског циклуса током 24h и резултати су приказани на Слици 41.



Слика 41. Хистограми добијени анализом ћелијског циклуса на проточном цитометру

Ова једињења показују добру цитотоксичност и инхибицију на свим тестираним ћелијским линијама. Њихов механизам активности испитиван је помоћу проточне цитометрије. Након 24h инкубирања са испитиваним једињењима долази до благог повећања процента HeLa ћелија у sub-G1 фази ћелијског циклуса. Примећене су и одређене промене које зависе од дозе у sub-G1 фази ћелијског циклуса HeLa ћелија. HeLa ћелије третиране су са две различите концентрације једињења **5i** и примећено је повећање процента ћелија у G2/M фази које је повезано са опадањем процента ћелија у G1 фази. На основу добијених резултата дошло се до закључка да нема значајних промена на нивоу ћелијског циклуса и да ова једињења имају другачији механизам активности.

2.3.2.2 Интеракција са биомакромолекулама (ДНК и БСА)

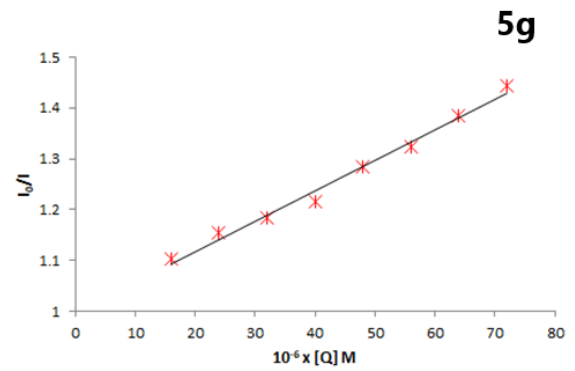
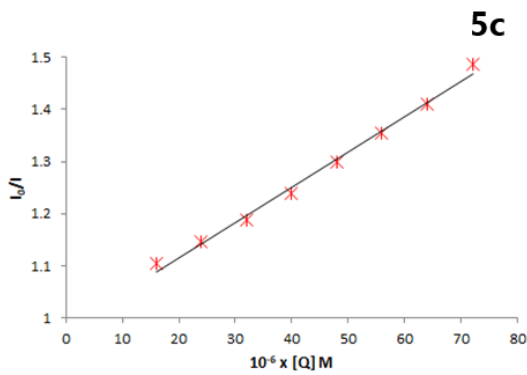
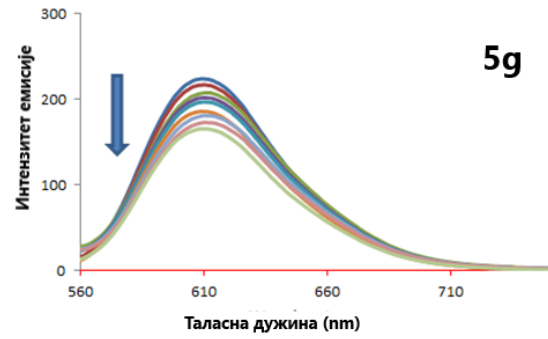
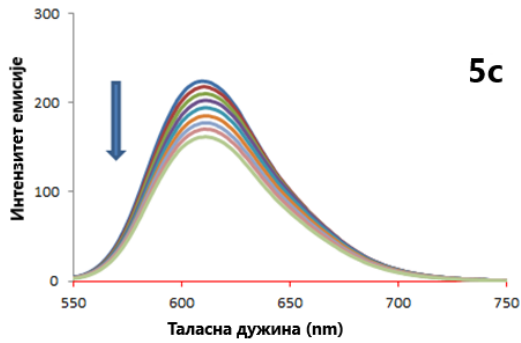
Испитивана је могућност везивања одабраних једињења за ДНК мерењем флуоресценције. Експеримент је изведен тако што се прво направи комплекс ЕБ-ДНК а онда се додаје испитивано једињење које у конкурентној реакцији са ЕБ замењује ЕБ који је везан за ДНК указујући на јаку конкуренцију са ЕБ. Спектри су снимљени у опсегу таласних дужина од 550-750 nm. Повећањем концентрације једињења **5c**, **5g**, **5h** и **5i** долази до смањења (хипохромизма) интезитета емисије раствора ЕБ-ДНК (Слика 42). Такође, поред хипохромизма, у већини случајева јавља се и батохромни ефекат.

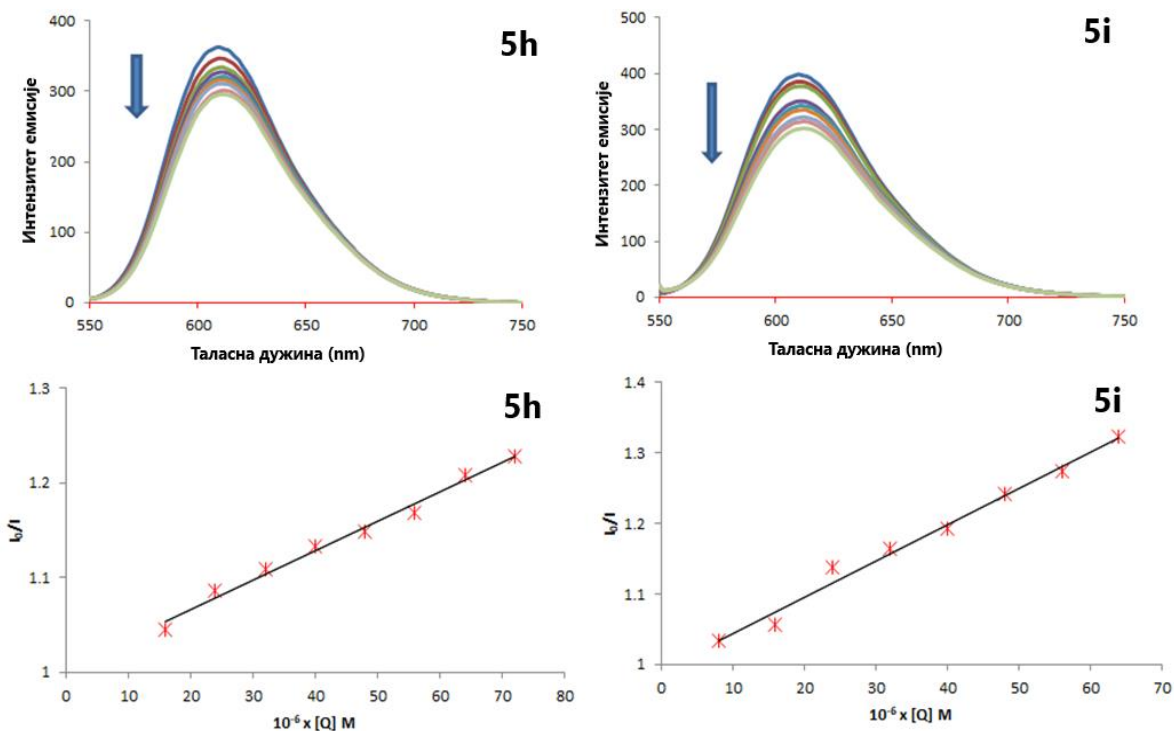
Везивање једињења **5c**, **5g**, **5h** и **5i** описано је помоћу *Stern-Volmer*-ове једначине (1)¹⁰⁹ где је испитивана зависност I_0/I од $[Q]$

$$I_0/I = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_{SV}[Q] \quad (1)$$

У једначини I_0 и I представљају интезитете емисије у одсуству и присуству испитиваних једињења, $[Q]$ је равнотежна концентрација испитиваног једињења, k_q је бимолекулска константа гашења и τ_0 је просечан животни век ДНК у одсуству испитиваног једињења (10^{-8} s). K_{SV} је *Stern-Volmer*-ова константа чија је вредност добијена испитивањем зависности I_0/I у функцији од $[Q]$. У Табели 4 налазе се вредности за k_q и K_{SV} за једињења **5c**, **5g**, **5h** и **5i**. На основу добијених вредности константи може се закључити да испитивана једињења имају афинитет да супституишу ЕБ из ЕБ-ДНК комплекса и везују се за ДНК преко

интеркалације. Такође, добијене вредности за K_{SV} су у рангу константи које су добијене за потенцијалне лекове који садрже метал.^{102,110}





Слика 42. На горњим сликама приказани су емисиони спектри ЕБ везаног за ДНК у одсуству (црвене линије) и присуству једињења **5c**, **5g**, **5h** и **5i**. Црвена линија одговара раствору пуфер + испитивано једињење. $[EB] = 100 \mu\text{M}$, $[ДНК] = 100 \mu\text{M}$; $[5c]$, $[5g]$, $[5h]$ and $[5i] = 0-100 \mu\text{M}$; $pH = 7,4$; $\lambda_{ex} = 520 \text{ nm}$. Стрелицама је приказана промена интензитета емисије са повећањем концентрације испитиваних једињења. Доле: графици зависности I_0/I у функцији од $[Q]$.

Табела 4. Бимолекулска константа гашења k_q , Stern-Volmer-ова константа K_{sv} и фактор корелације R за једињења **5c**, **5g**, **5h** и **5i**

Једињење	k_q [$M^{-1} s^{-1}$] $\times 10^{11}$	K_{sv} [M^{-1}] $\times 10^3$	R
5c	$6,3 \pm 0,2$	$6,3 \pm 0,2$	0,9964
5g	$5,6 \pm 0,2$	$5,6 \pm 0,2$	0,9944
5h	$3,1 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,2$	0,9940
5i	$5,1 \pm 0,1$	$5,1 \pm 0,1$	0,9935

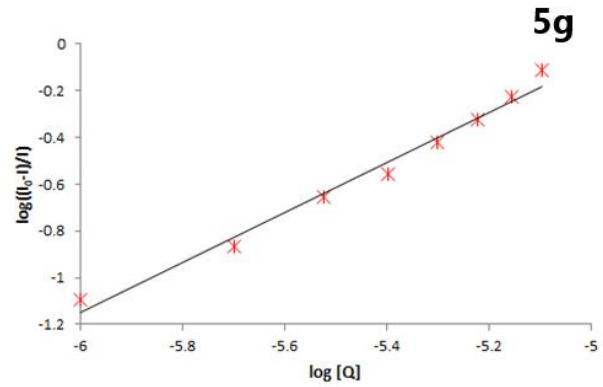
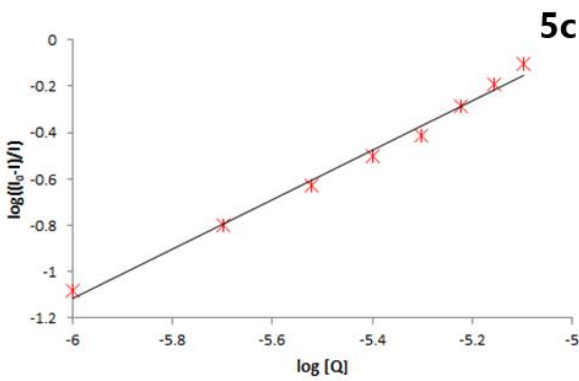
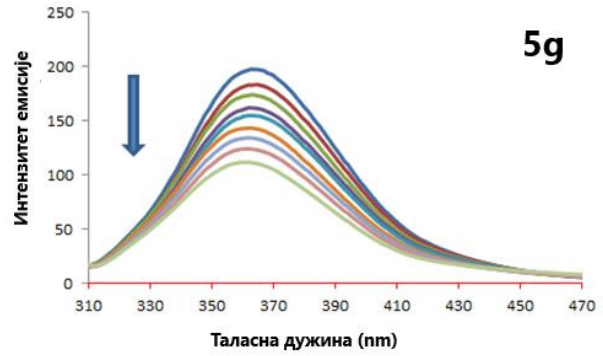
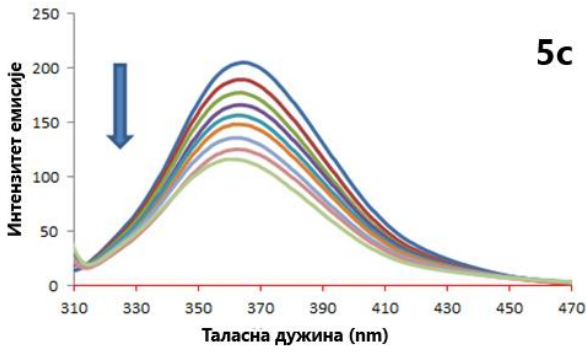
Познато је да ефикасност лекова зависи од њихове способности да се везују за протеин. Имајући ово на уму, поред интеракције са ДНК испитивана је и интеракција са говеђим серум албумином (БСА). Праћено је смањење интензитета флуоресценције БСА са испитиваним једињењима **5c**, **5g**, **5h** и **5i** у опсегу од 300-500 nm. Максимум интензитета флуоресценције за БСА постигнут је на 365 nm. Интензитет флуоресценције БСА се постепено смањује са повећањем концентрације испитиваних једињења. Померање максимума интензитета флуоресценције комплекса БСА-испитивано једињење ка нижим таласним дужинама (хипсохромно померање) узроковано је повећањем хидрофобности већ поменутог комплекса.¹¹¹

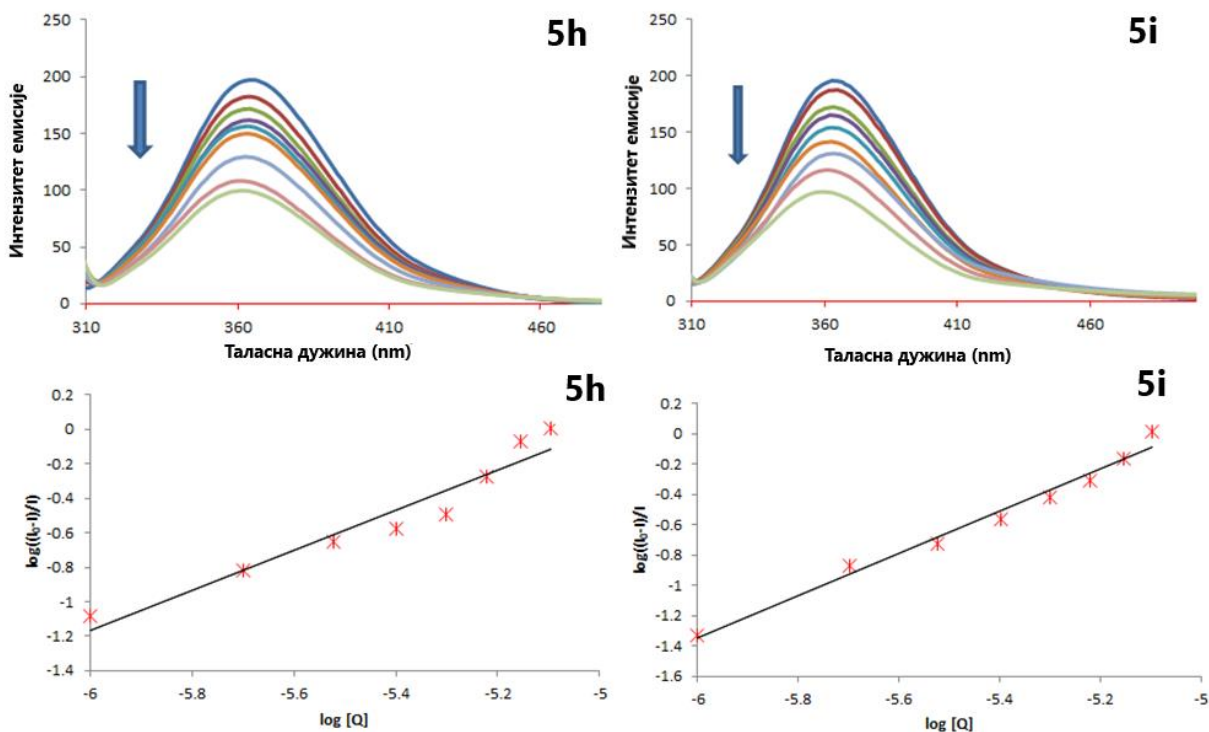
Везивање испитиваних једињења за БСА описано је помоћу једначине (2)¹¹²:

$$\log(I_0 - I/I) = \log K_a + n \log [Q] \quad (2)$$

У једначини I_0 и I представљају интензитета емисије у одсуству и присуству испитиваних једињења, K_a је константа везивања испитиваних једињења за БСА, n је број везивних места за молекула БСА и $[Q]$ је равнотежна концентрација испитиваног једињења. На Слици 43 приказани су графици зависности $\log(I_0 - I/I)$ у функцији од $\log [Q]$. Вредности K_a и n одређене су из одсечка и нагиба праве. Вредности константи и параметара за **5c**, **5g**, **5h** и **5i**-БСА комплекса дате су у Табели 5. На основу добијених вредности за n може се закључити да постоји једно место где се хиноксалинони везују за БСА током њихове интеракције. Треба поменути да је најбитнији фактор доступности лека управо јачина везивања лека за БСА.¹¹³ Уколико се вредности константе K_a налазе између 10^4 и 10^6 онда се лиганди реверзибилно

везују за протеин.¹¹⁴ Добијене вредности за K_a показују да је везивање између испитиваних једињења и БСА умерено, односно да се испитивана једињења реверзибилно везују за БСА и да се могу транспортовати помоћу БСА.





Слика 43. На горњим сликама приказани су емисиони спектри БСА у одсуству (црвене линије) и присуству једињења **5c**, **5g**, **5h** и **5i**. Црвена линија одговара раствору пуфер + испитивано једињење. $[BCA] = 10 \mu M$, $[5c]$, $[5g]$, $[5h]$ and $[5i] = 0,0, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0$ и $8,0; \mu M$; $pH = 7,4$; $\lambda_{ex} = 280 nm$. Доле: графици зависности I_0/I у функцији од $[Q]$.

Табела 5. Параметри K_a и n и коефицијент корелације R за једињења **5c**, **5g**, **5h** и **5i**

Једињења	K_a (M)	n	R
5c	$(1,9 \pm 0,1) \times 10^3$	1,06	0,9954
5g	$(2,0 \pm 0,1) \times 10^3$	1,08	0,9908
5h	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^4$	1,16	0,9505
5i	$(3,4 \pm 0,1) \times 10^4$	1,38	0,9906

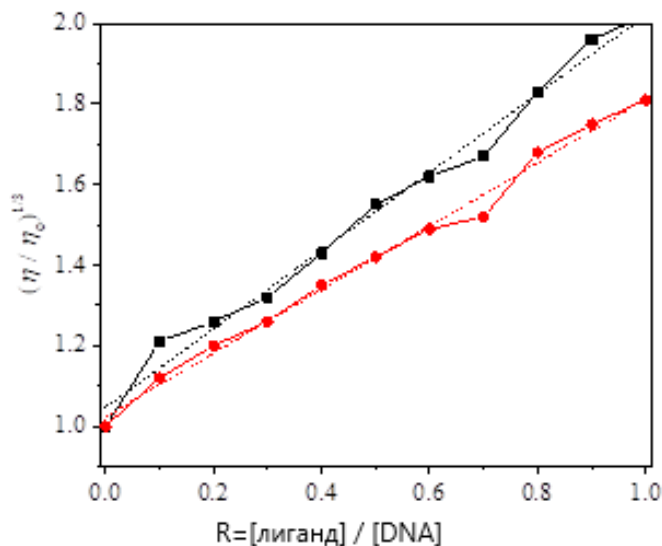
2.3.2.3 Мерење вискозности

Мерењем вискозности раствора ДНК може се уочити промена дужине ДНК ланца у присуству једињења које може да се веже за ДНК.¹¹⁵ Вредности релативне специфичне вискозности $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ зависе од релативне дужине ДНК (L/L_0) и повезане су једначином (3)^{116,117}:

$$(\eta/\eta_0)^{1/3} = (L/L_0), \quad (3)$$

У једначини η_0 и η представљају доприносе специфичној вискозности ДНК у одсуству и присуству лиганда. Уопштено, када се неко једињење угради између базних парова ДНК, долази до повећања растојања између база ДНК. Самим тим повећава се дужина ДНК и повећава се вискозност. Приликом интеркалације између суседних парова база уграђује се планарни део молекула који изазива продужавање хеликса.¹¹⁸⁻¹²⁰ Интеракције које доводе до повећања дужине ДНК доводе и до повећања вискозности. Међутим, екстерне интеракције као што је електростатичка интеракција не доводе до повећања вискозности ДНК раствора јер се не повећава растојање између базних парова. Приликом овог типа интеракција долази до савијања ДНК хеликса, при чему се мало смањује дужина ДНК а самим тим и вискозност.¹²¹⁻¹²³

На Слици 44 приказане су вредности релативне специфичне вискозности $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ у функцији од R ($R = [\text{лиганд}] / [\text{ДНК}]$) у одсуству и присуству комплекса у *tris* HCl пуферу. Резултати су показали да додатком лиганда у 0,01 mM раствор ДНК (до $R = 1,0$) долази до значајног повећања релативне вискозности ДНК узорка. Ово повећање је било најизраженије након додатка једињења **5i**. На основу добијених резултата може се закључити да испитивана једињења интеркалирају са ДНК.¹²⁴

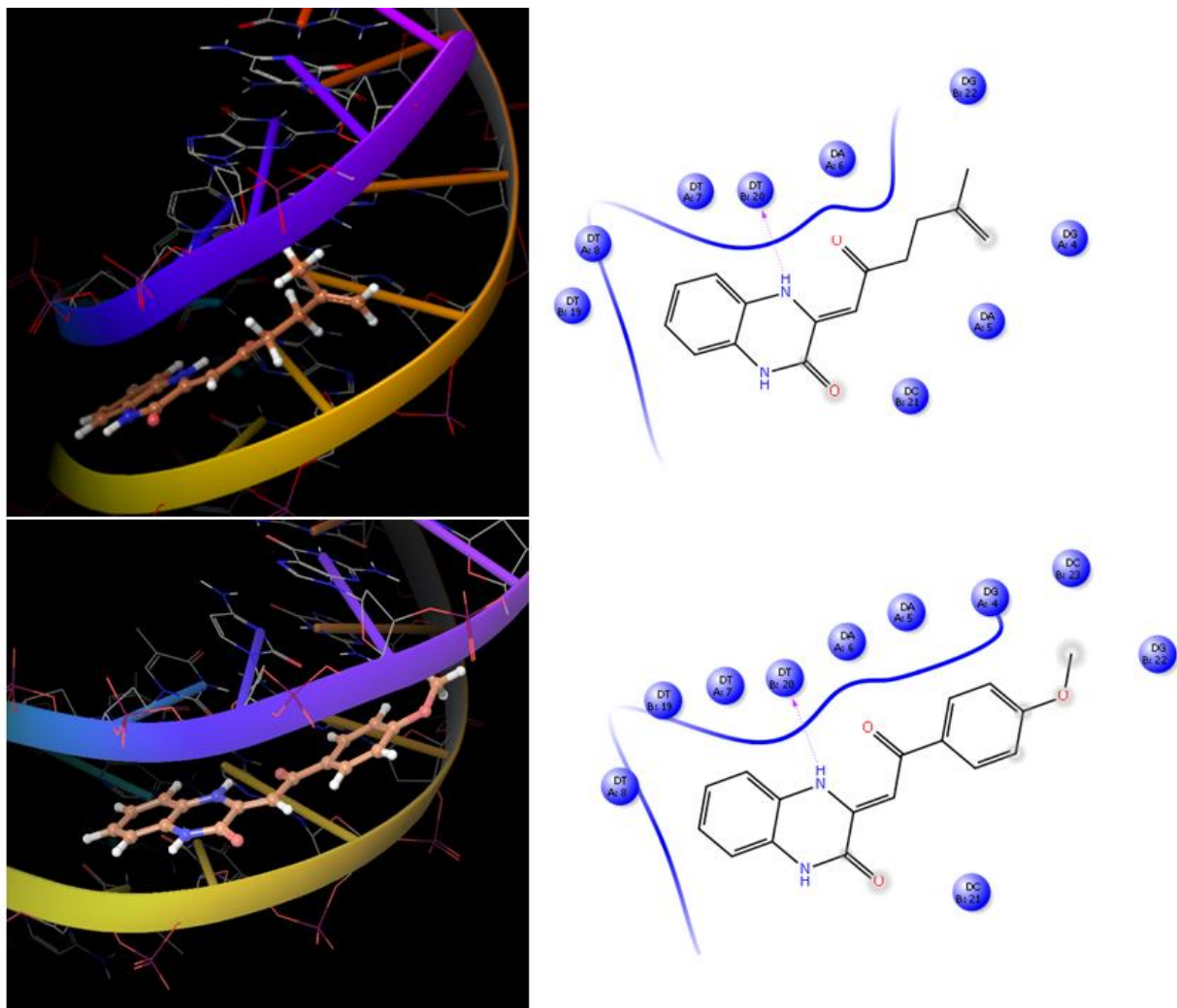


Слика 44. Релативна вискозност $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ ДНК (0,01 mM) у раствору пуфера (50 mM NaCl и 5 mM tris HCl на pH 7,4) по додатку лиганда **5h** (црвено) и лиганда **5i** (црно) са повећањем односа R

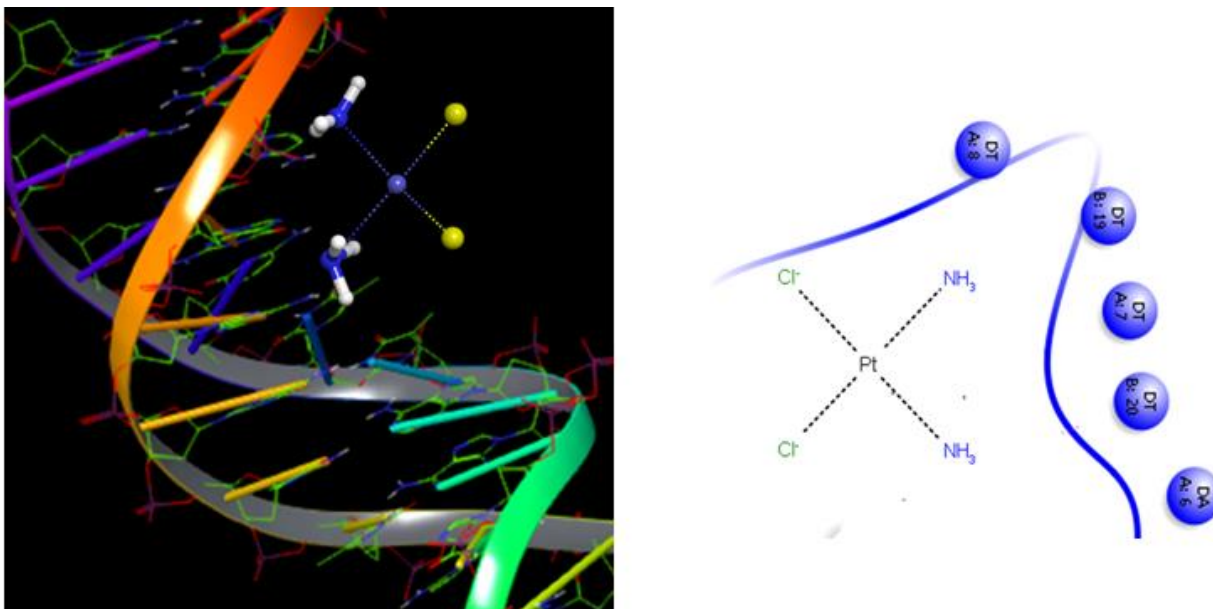
У ранијим испитивањима¹²⁵ показало се да присуство добро познатог органског интеркалатора, етидијум-бромида, доводи до повећања релативне вискозности ДНК где нагиб праве за $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ у функцији од R износи 0,96. Сходно томе, очекује се да долази до повећања релативне вискозности ДНК где је нагиб праве између 0 и 0,96 уколико је дошло до интеркалације лиганда или уколико је интеркалација јача од других интеракција које се дешавају између ДНК и лиганда. У нашем случају, релативна вискозност ДНК се повећава са нагибом праве од 0,97 за лиганд **5i** и 0,789 за лиганд **5h** услед продужења хеликса ДНК и удаљавања базних парова како би се хеликс прилагодио лиганду. Овако висока вредност нагиба за лиганд **5i** слична је вредностима које одговарају комплексима ДНК са класичним интеркалационим лигандима. У случају **5h** вредност нагиба је нешто нижа па се може претпоставити да постоје неке друге интеракције између ДНК и овог лиганда које доводе до савијања ДНК хеликса и смањују његову дужину.

2.3.2.4 Молекулски докинг

У наредном делу истраживања урађена је докинг студија са ДНК додекамером како би се потврдила интеракција лиганда **5c**, **5g**, **5h** и **5i** са ДНК и утврдио њихов начин везивања за ДНК. Као референтно једињење коришћена је цисплатина (Слика 46). На Сликама 45 и П1 приказани су најбољи начини везивања лиганда са ДНК, а у Табели 6 налазе се израчунате енергије везивања и константе инхибиције. Резултати докинг студије показали су да сва једињења интерагују са ДНК интеркалацијом чиме се потврђују експериментални резултати. Као што је приказано на Сликама 45 и П1 једињења се јако добро уклапају између ДНК нуклеотида без прекидања двоструког ДНК хеликса. Лиганди **5c** и **5g** интерагују са базним паровима ДНК преко van der Waals-ових сила, хидрофобних интеракција и водоничних веза са DT:B20. Лиганд **5c** се боље уклапа између ДНК ланаца због мање величине молекула. Лиганд **5i** интерагује са базним паровима ДНК преко van der Waals-ових и хидрофобних интеракција док лиганд **5h** поред ових интеракција формира и две водоничне везе са DT:B19 и DG:A4. Постојање јаким водоничних веза између атома кисеоника из метокси групе лиганда **5h** и гуанинске базе молекула ДНК и између -NH из пиазинског прстена лиганда **5h** и тимина у складу је са резултатима мерења вискозности и управо из ових разлога је нагиб праве за лиганд **5h** нижи од нагиба праве за **5i**. На основу добијених резултата, из Табеле 6 може се видети да лиганд **5i** има негативнију вредност енергије слободног везивања (ΔG) и већи афинитет везивања за ДНК од лиганда **5h**. Ови резултати показују да геометријско уклапање лиганда у хеликс ДНК има већи утицај на везивање лиганда за ДНК од формирања водоничних веза. Најнижу вредност енергије слободног везивања има лиганд **5c**, вероватно због мале величине молекула и бољег уклапања између хеликса ДНК. Када се добијени резултати упореде са цисплатином, уочава се да најсличнију вредност за ΔG са цисплатином има лиганд **5i**.

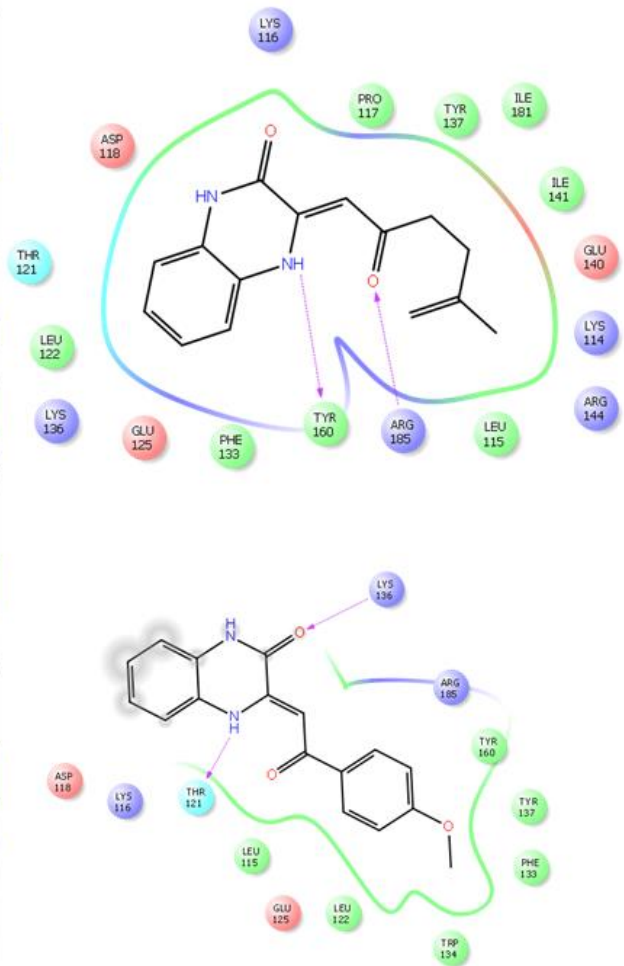
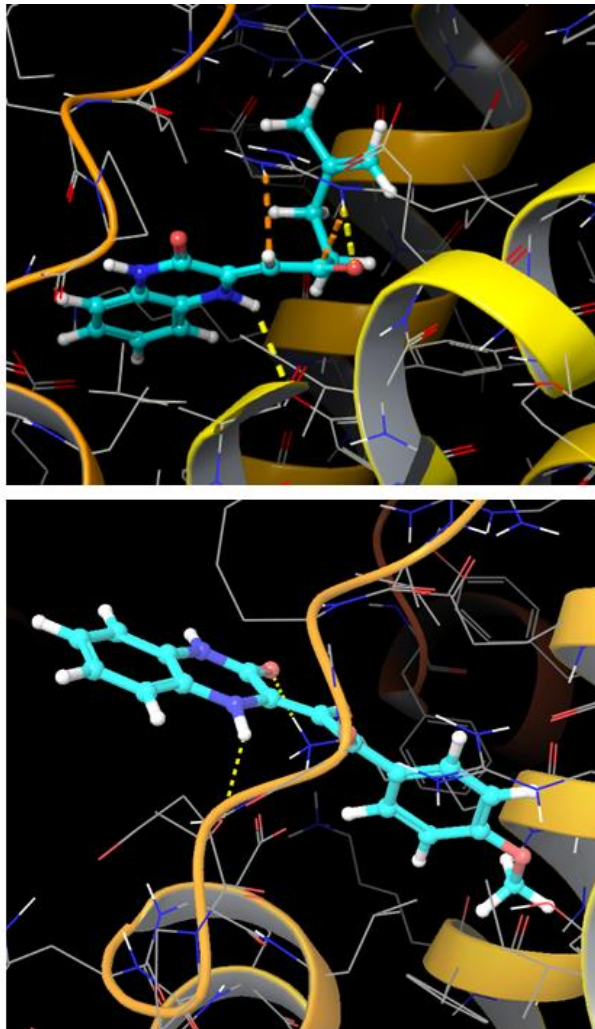


Слика 45. Резултати докинг студије лигананда 5c и 5g са ДНК

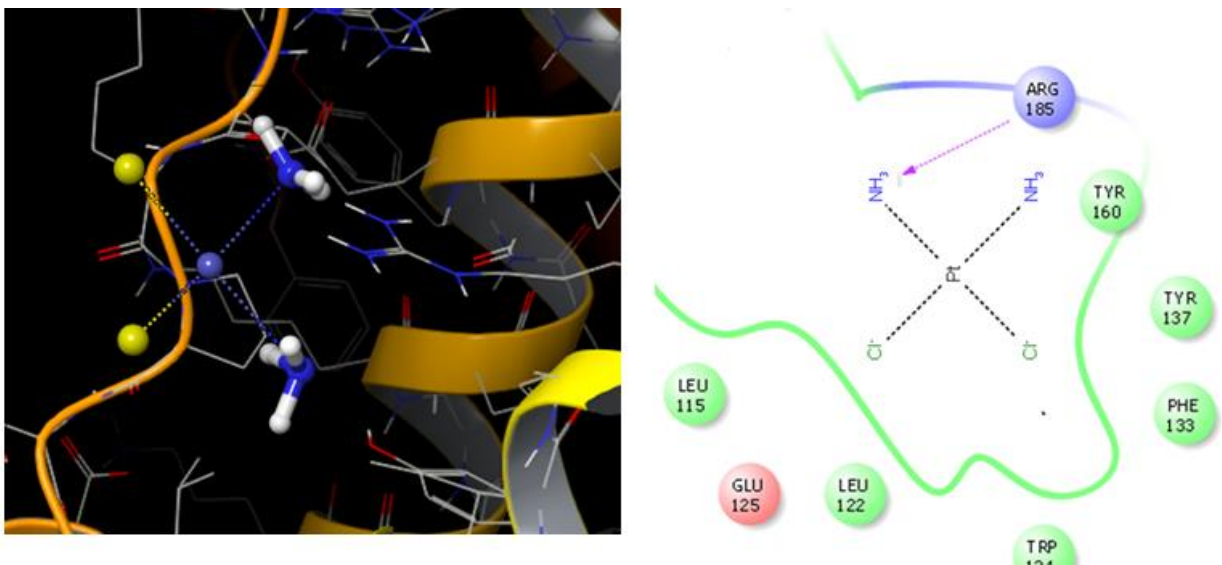


Слика 46. Резултати докинг студије цисплатине са ДНК

Поред докинг студије урађене за лиганде са ДНК урађена је и докинг студија са БСА. Као референтно једињење коришћена је цисплатина (Слика 48). На овај начин су потврђени експериментални резултати и приказана су могућа места везивања. Анализа резултата показала је да сви лиганди интерагују са БСА на истом везивном месту (Слика 47 и П2) које се налази између две субјединице Па и Ша и изложено је утицају растварачу.¹²⁶ Лиганд **5c** са БСА формира две водоничне везе, једну са Arg 185 и једну са Tyr 160. Лиганд **5g** формира водоничну везу са Lys 136 и Thr 121 молекула БСА. Интеракција између **5i** и БСА остварује се формирањем водоничне везе између карбонилне групе лиганда и гванидино групе из Arg 185 и -NH₂ групе Leu 115. Интеракција је додатно јача због постојања π-π интеракција између Lys 114 и ароматичног прстена лиганда. Лиганд **5h** формира две водоничне везе са Leu 115 и једну са Arg 185 и Lys 114. Поређењем добијених резултата очигледно је да за лиганде **5c**, **5g** и **5h** најважнију улогу у везивању за БСА има Arg 185. Што се тиче лиганда **5i** он има нижу вредност за ΔG у односу на **5h** што указује на већи афинитет везивања према БСА што је у сагласности са флуориметријским титрацијама (Табела 5).



Слика 47. Резултати докинџ студије лигананда 5c и 5g са БСА



Слика 48. Резултати докинг студије цисплатине са БСА

Табела 6. Параметри добијени анализом докинг студије за 5c, 5g, 5h и 5i

Једињење	Докинг учинак	Слободна енергија везивања (ΔG) / kJ mol^{-1}	Константа инхибиције (K_i) / μM
ДНК			
5c	-5,783	-39,17	0,137
5g	-6,664	-46,09	0,008
5h	-6,663	-33,16	1,553
5i	-7,018	-37,11	0,315
цисплатина	-6,345	-37,06	0,304
БСА			
5c	-5,879	-31,43	3,114
5g	-6,119	-33,63	1,282
5h	-6,794	-21,73	155,986
5i	-7,225	-28,11	11,894
цисплатина	-5,321	-20,18	291,35

2.3.3 Анти α -глукозидазна активност

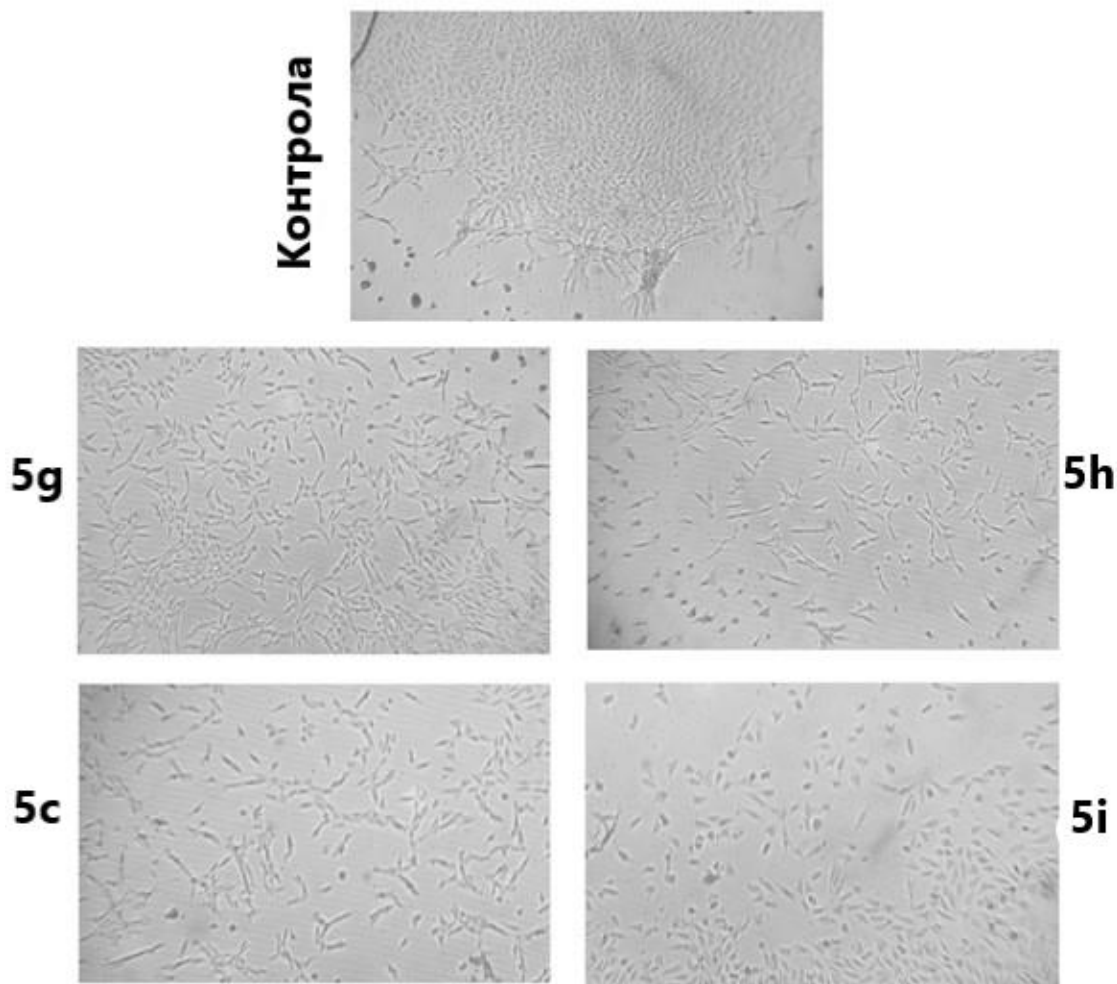
Приликом испитивања инхибиције ензима α -глукозидазе утврђено је да два од свих тестираних једињења показују значајну инхибицију *in vitro* (Табела 7). Након читавања апсорбанције и сређивања резултата израчунате су IC_{50} вредности. Једињење **5i** је показало најбољу инхибицију са IC_{50} вредношћу од $40,09 \pm 0,49$ μ M док је једињење **5c** показало најлошију инхибиторну активност са IC_{50} вредношћу од $166,09 \pm 9,80$ μ M. Генерално, IC_{50} вредност за сва испитивана једињења, осим за **5c**, нижа је од IC_{50} вредности стандардног антидијабетичког лека (акарбозе). Добијени резултати се поклапају са неким претходним истраживањима која су урађена на хиноксалинонима и указују на то да овакав тип једињења може да инхибира α -глукозидазу¹²⁷ и поседују антидијабетичка својства.¹²⁸ Сходно томе, једињења **5h** и **5i** се могу даље испитивати и користити као нова потенцијална контролна хипергликемијска једињења.

Табела 7. IC_{50} вредности испитиваних једињења **5c**, **5g**, **5h** и **5i** за анти α -глукозидазну активност

Једињење	$IC_{50}(\mu M)$
5c	$166,09 \pm 9,80$
5g	$133,85 \pm 8,05$
5h	$52,54 \pm 0,09$
5i	$40,09 \pm 0,49$
Акарбоза	$145,43 \pm 3,88$

2.3.4 Утицај на ангиогенезу

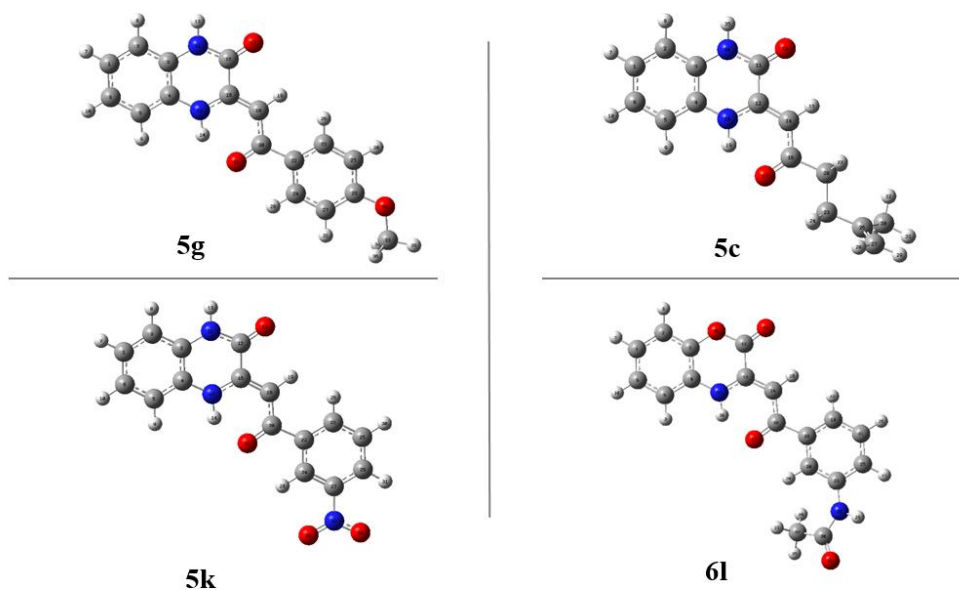
На основу претходних испитивања и резултата, као допуна урађена је процена утицаја испитиваних једињења на ангиогенезу *in vitro*. Као што се може видети на Слици 49, ћелије EA.hy926 у контролној серији су поређане тако да формирају цевасте структуре као и прелазне цеви са мултицентричним спојевима. Након тога урађен је третман суб-токсичном дозом IC₂₀ испитиваних једињења **5c** (45 μM), **5g** (8 μM), **5h** (5 μM) and **5i** (9,5 μM) који је резултирао значајним инхибиторским ефектом на ангиогенезу. Овај утицај се огледа у томе што долази до смањења формирања капиларних цеви као и инхибиције спајања ћелија и формирања полигонских структура. Постоје подаци у литератури који указују на то да су бензоксазини и хиноксалинони инхибитори ангиогенезе.^{129,130}



Слика 49. Утицај испитиваних једињења **5c**, **5g**, **5h** и **5i** на ангиогенезу ендотелних ћелија

2.4 Теоријско испитивање одабраних 3,4-дихидро-2(1H)-хиноксалинона и 3,4-дихидро-1,4-бензоксазин-2-она

За теоријско испитивање (DFT израчунавање) одабрана су три деривата хиноксалинона и један дериват бензоксазинона (Слика 50). За сва израчунавања коришћен је B3LYP^{131,132} функционал са базисним скупом 6-311+G(d,p)¹³³ и сва израчунавања су урађена у програму Gaussian 09.¹³⁴ У првом кораку урађена је оптимизација одабраних молекула у вакууму и израчунате су вибрационе фреквенције. На основу добијених фреквенција и енергија одређене су равнотежне геометрије. Овако добијене равнотежне геометрије коришћене су за UV-Vis, IR, Raman, ¹H и ¹³C NMR и квантно хемијска израчунавања. Добијене вибрационе фреквенције скалиране су фактором скалирања који износи 0,9679.¹³⁵ ¹H и ¹³C хемијска померања израчуната су помоћу GIAO методе у DMSO-у као растварачу.¹³⁶ Такође су израчуната и хемијска померања за стандард TMS у DMSO-у и та вредност за ¹H износи 32,0121, а за ¹³C 184,5363 ppm. Добијене вредности померања ¹H и ¹³C за испитивана једињења било је потребно скалирати одређеним факторима који су израчунати помоћу методе најмањег квадрата и износе 0,9409 за ¹³C и 1,1119 за ¹H.

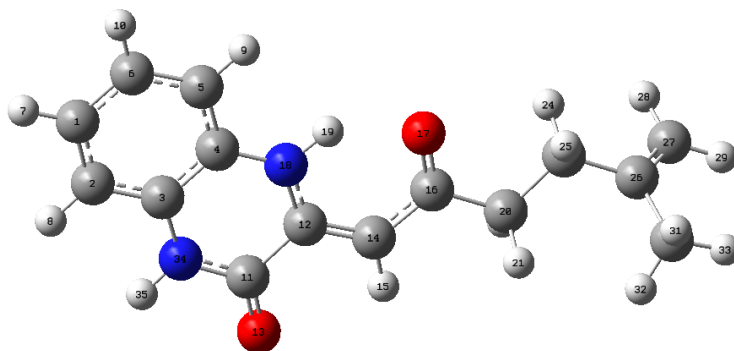


Слика 50. Структуре одабраних деривата хиноксалинона и бензоксазинона

2.4.1 Молекулска геометрија

Помоћу DFT студије добијени су подаци о молекулској геометрији једињења за које није било могуће добити кристалну структуру. У Табели 8 приказани су структурни параметри који се односе на оптимизоване геометрије (дужине веза и углови). Подаци о кристалној структури једињења **5c** нису познати али су познати за једињење сличне структуре¹⁰⁰ тако да су израчунати структурни параметри упоређени са постојећим подацима. Хетероциклични прстен који је део два кондензована шесточлана прстена скоро је идеално планаран што је потврђено у кристалној структури сличног једињења (3,4-дихидро-3-(2-оксо-хекс-5-енилиден)-1,4-бензоксазин-2-она).¹⁰⁰ Израчунати диедарски угао између N(18)-C(12)-C(14)-C(16) износи $0,12^\circ$, а између C(14)-C(16)-C(20)-C(23) износи $176,71^\circ$ што указује на то да сви атоми у молекулу (осим крајњег фрагмента C26–C27–C30) чине један дуг планарни систем. Претпоставља се да је планарна конформација готово читавог система стабилизована јаком интрамолекулском водоничном везом. Као што се може видети у табели, израчунати параметри се не поклапају потпуно са XRD вредностима. Разлог ових одступања је то што се израчунавања односе на равнотежну структуру изолованог молекула у гасној фази док се експериментални резултати односе на молекул који има сличну структуру и при томе се налази у кондензованој фази.

Табела 8. Израчунати геометријски параметри за једињење **5c** у поређењу са експериментално доступним подацима структурно сличног једињења



Дужина веза	V3LYP/6- 311+G(d,p)	Експер. ^[13]	Углови	V3LYP/6- 311+G(d,p)
C(1)-C(2)	1,391		C(2)-C(1)-C(6)	120,1

C(1)-C(6)	1,397		C(1)-C(2)-C(3)	119,9
C(2)-C(3)	1,395		C(2)-C(3)-C(4)	120,1
C(3)-C(4)	1,404	1,386	C(2)-C(3)-N(34)	122,2
C(3)-N(34)	1,397	1,384	C(4)-C(3)-N(34)	117,7
C(4)-C(5)	1,398		C(3)-C(4)-C(5)	119,6
C(4)-N(18)	1,385	1,382	C(3)-C(4)-N(18)	118,5
C(5)-C(6)	1,389		C(5)-C(4)-N(18)	121,9
C(11)-C(12)	1,502	1,494	C(4)-C(5)-C(6)	120,0
C(11)-O(13)	1,217	1,193	C(1)-C(6)-C(5)	120,2
C(11)-N(34)	1,376		C(12)-C(11)-O(13)	123,1
C(12)-C(14)	1,370	1,351	C(12)-C(11)-N(34)	114,9
C(12)-N(18)	1,364	1,357	O(13)-C(11)-N(34)	122,0
C(14)-C(16)	1,447	1,444	C(11)-C(12)-C(14)	119,2
C(16)-O(17)	1,242	1,238	C(11)-C(12)-N(18)	117,7
C(16)-C(20)	1,521	1,493	C(14)-C(12)-N(18)	123,1
C(20)-C(23)	1,534	1,526	C(12)-C(14)-C(16)	122,6
C(23)-C(26)	1,512	1,473	C(14)-C(16)-O(17)	122,5
C(26)-C(27)	1,335	1,351	C(14)-C(16)-C(20)	116,9
C(26)-C(30)	1,509		O(17)-C(16)-C(20)	120,6
			C(4)-N(18)-C(12)	125,1
			C(16)-C(20)-C(23)	113,5
			C(20)-C(23)-C(26)	113,1

			C(23)-C(26)-C(27)	121,6
			C(23)-C(26)-C(30)	116,5
			C(27)-C(26)-C(30)	121,9
			C(3)-N(34)-C(11)	126,1

2.4.2 Вибрациона анализа

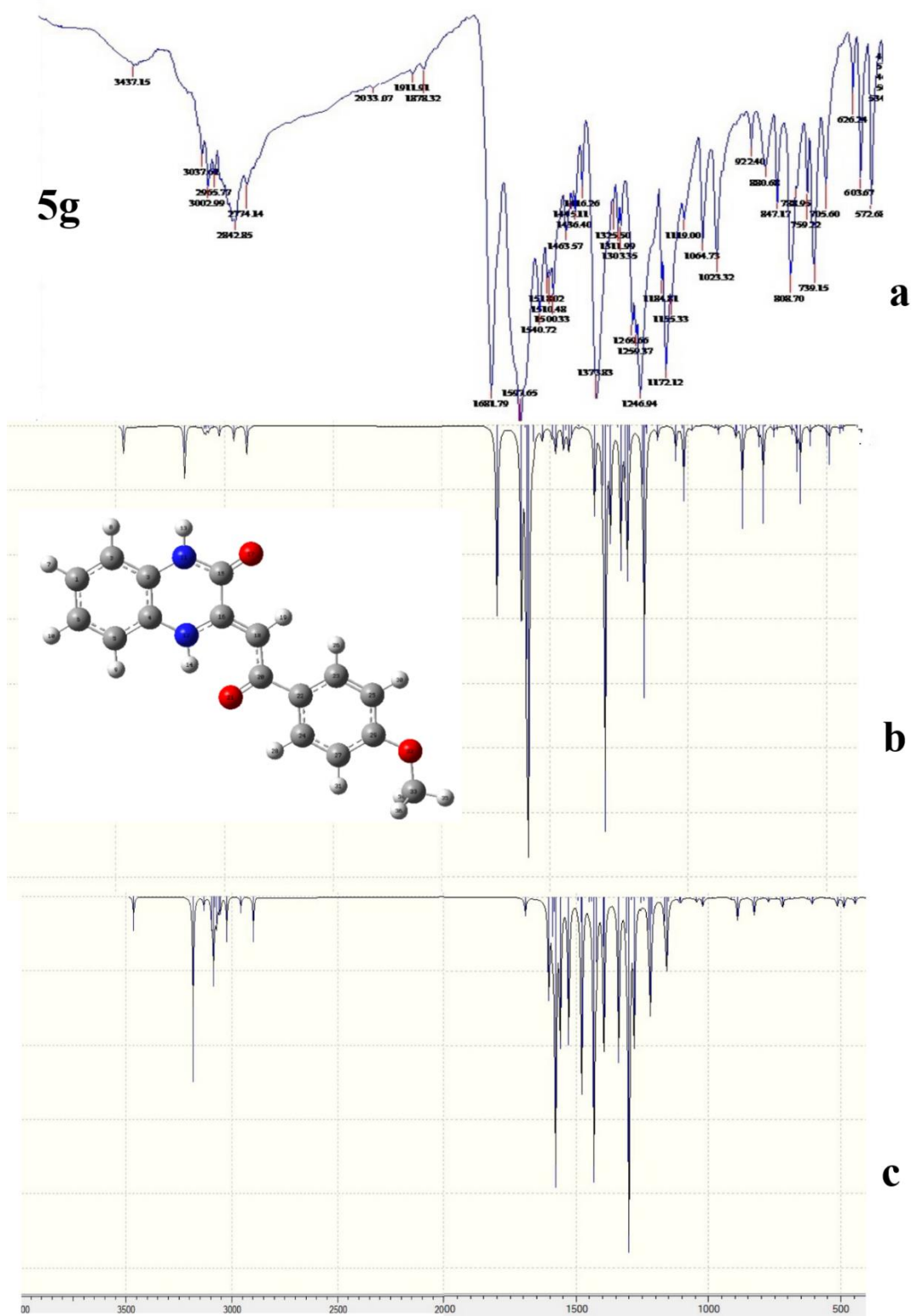
Употребом B3LYP/6-311+G(d,p) нивоа теорије у вакууму израчунате су вибрационе фреквенције и додељена вибрациона померања добијена помоћу TED-а (total energy distribution) (Табела 9). Јавља се одређено одступање израчунатих од експерименталних резултата које је последица тога што се израчунавања односе на молекул у вакууму, а експериментални подаци на молекул у чврстом стању. Због овог одступања било је потребно скалирати израчунате фреквенције фактором скалирања који износи 0,9679. На следећим сликама налазе се упоређени експериментални и теоријски IR и Рамански спектри једињења **5g**, **5c**, **5k** и **6l** (Слика 51, Слика 52, Сликe П3 и П4). Постоји веома добро слагање између скалираних израчунатих и експерименталних вредности фреквенција.

Табела 9. Експерименталне и израчунате вредности вибрационих модова као и додељена вибрациона померања добијена помоћу TED-а

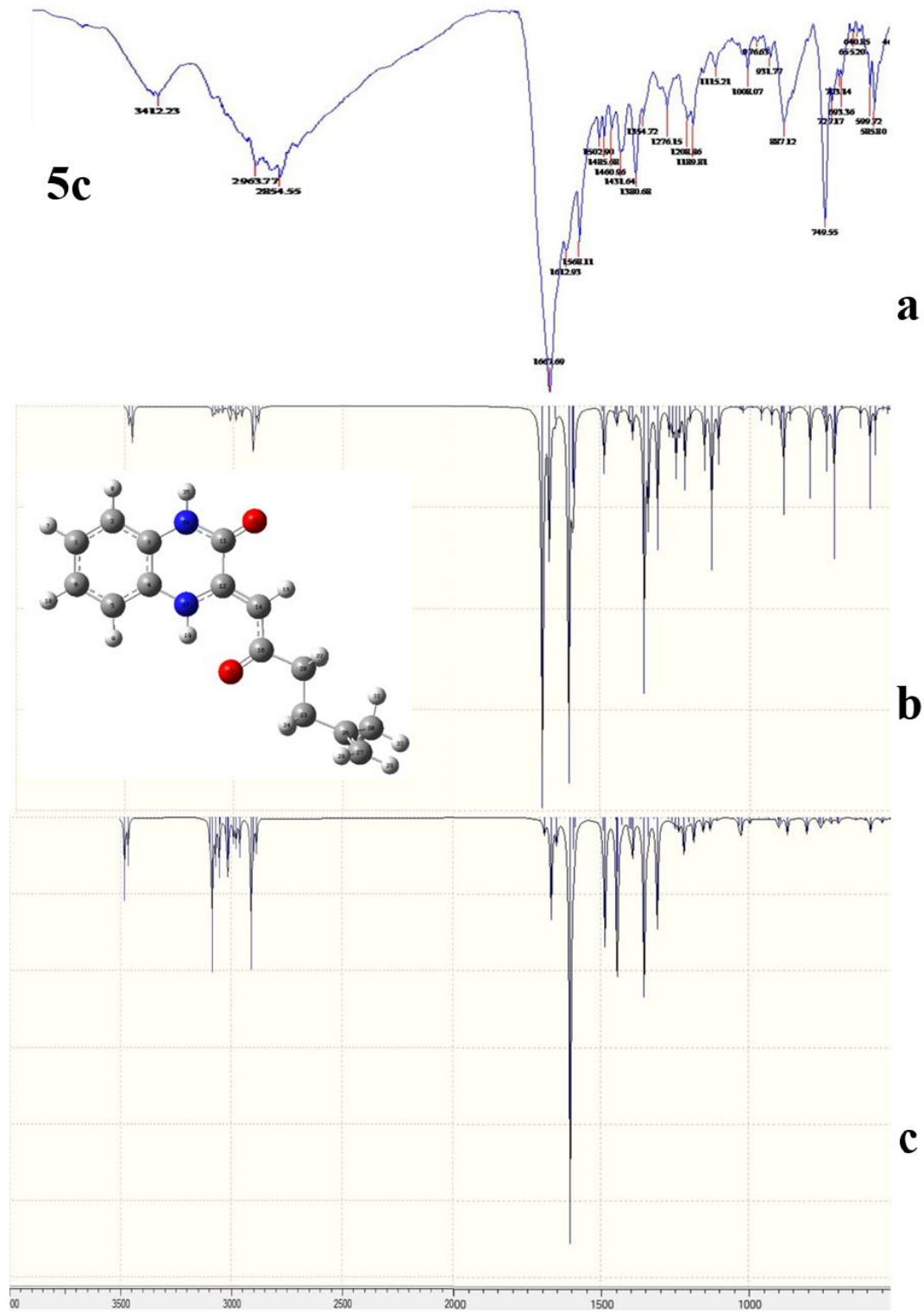
Нескалирано (cm ⁻¹)	Скалирано (cm ⁻¹)	Посматране фреквенције		Додељене вибрације (TED %)
		FT-IR	FT-Raman	
3572	3457	3437		$\nu_{N_{11}H_{13}}(79)$
3327	3220			$\nu_{N_{12}H_{14}}(70)$
3252	3147			$\nu_{C_{18}H_{19}}(64)$
3210	3107			$\nu_{C_{24}H_{28}}(30) + \nu_{C_{27}H_{31}}(45)$
3200	3097			$\nu_{C_1H_7}(28) + \nu_{C_6H_{10}}(28) +$ $\nu_{C_5H_9}(13) + \nu_{C_2H_8}(10)$
3199	3096		3079	$\nu_{C_{23}H_{26}}(38)$

3195	3092			$\nu\text{C}_{24}\text{H}_{28}(43) + \nu\text{C}_{27}\text{H}_{31}(28)$
3189	3086			$\nu\text{C}_1\text{H}_7(25) + \nu\text{C}_6\text{H}_{10}(19) +$ $\nu\text{C}_5\text{H}_9(25) + \nu\text{C}_2\text{H}_8(15)$
3184	3081			$\nu\text{C}_{23}\text{H}_{26}(28) + \nu\text{C}_{25}\text{H}_{30}(42)$
3178	3076			$\nu\text{C}_5\text{H}_9(33) + \nu\text{C}_6\text{H}_{10}(24) +$ $\nu\text{C}_2\text{H}_8(21)$
3172	3070	3037		$\nu\text{C}_1\text{H}_7(21) + \nu\text{C}_6\text{H}_{10}(14) +$ $\nu\text{C}_5\text{H}_9(11) + \nu\text{C}_2\text{H}_8(34)$
3147	3046	3002		$\nu\text{C}_{33}\text{H}_{35}(53) + \gamma\text{C}_{33}\text{H}_{36}(13) +$ $\gamma\text{C}_{33}\text{H}_{34}(13)$
3089	2989	2965		$\nu_{\text{asym}}\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{H}_{36}(40)$
3023	2926			$\nu_{\text{sym}}\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{H}_{36}(36)$
1720	1664	1681	1628	$\nu\text{C}_{15}\text{O}_{17}(15)$
1610	1558	1597	1580	$\nu(\text{C-C})_{\text{aromatic}}$
1529	1479	1518	1553	$\beta\text{C}_4\text{N}_{12}\text{C}_{16}(6) + \beta\text{C}_3\text{N}_{11}\text{C}_{15}(6)$
1500	1451	1510		$\beta\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{H}_{36}(23) +$ $\beta\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{H}_{36}(12)$
1498	1449	1500		$\nu\text{C}_1\text{C}_2 + \nu\text{C}_1\text{C}_6 + \nu\text{C}_5\text{C}_6 +$ $\nu\text{C}_5\text{C}_4(6) + \beta\text{C}_{29}\text{O}_{32}\text{C}_{33}(10)$
1493	1445	1445	1445	$\nu\text{C}_{33}\text{H}_{35}(24) + \gamma\text{C}_{33}\text{H}_{36}(21)$
1488	1440	1436	1424	$\beta\text{C}_{16}\text{C}_{18}\text{H}_{19}(6) +$ $\beta\text{C}_{16}\text{C}_{18}\text{C}_{20}(6)$
1468	1420	1416	1410	$\beta\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{H}_{36}(9)$
1442	1395		1392	$\beta\text{H}_{13}\text{N}_{11}\text{C}_{15}$
1385	1340	1373	1320	$\beta\text{C}_{15}\text{C}_{16}\text{N}_{12}(6) +$ $\beta\text{C}_{18}\text{C}_{16}\text{N}_{12}(6)$
1181	1143			$\beta\text{C}_1\text{C}_6\text{H}_{10}(11) + \beta\text{C}_6\text{C}_1\text{H}_7(11)$ $+ \beta\text{C}_5\text{C}_6\text{H}_{10}(11) +$ $\beta\text{C}_2\text{C}_1\text{H}_7(11)$
1161	1123	1155		$\gamma\text{C}_{33}\text{H}_{34}(20) + \gamma\text{C}_{33}\text{H}_{36}(21)$

1052	1018			$vC_1C_6(11)$
1034	1000			$vC_{32}C_{33}(21)$



Слика 51. Експериментални (а), израчунати IR (b) и израчунати Raman-ски (c) спектри за једињење 5g



Слика 52. Експериментални (a), израчунати IR (b) и израчунати Raman-ски (c) спектри за једињења 5c

2.4.2.1 C-H вибрације

Вибрације C-H истезања ароматичних и алифатичних једињења јављају се у опсегу од 3100-3000 cm^{-1} и 3000-2840 cm^{-1} .¹³⁶ Израчунате вибрације C-H истезања ароматичног прстена јављају се у области од 3100-3000 cm^{-1} док се експерименталне вредности јављају у опсегу од 3140-2963 cm^{-1} . Израчунате вибрације C-H истезања код алифатичних фрагмената као што су метокси или метил групе износе између 3050-2900 cm^{-1} док су експерименталне вредности пронађене у области од 2965-2811 cm^{-1} . На основу добијених резултата може се закључити да су израчунате вредности више у односу на експерименталне.

2.4.2.2 C-C вибрације

Код хетероцикличних ароматичних једињења вибрације истезања C-C веза налазе се у области од 1600-1585 и 1500-1400 cm^{-1} .¹³⁷ За вибрације које потичу од ароматичних C-C веза израчунате вредности износе 1558 и 1340 cm^{-1} док експерименталне вредности износе 1553 и 1351 cm^{-1} . За вибрације које потичу од алифатичних C-C веза (једињење **5c**) израчуната вредност износи 1412 cm^{-1} док та вредност у експерименталном IR спектру износи 1380 cm^{-1} . Као што се може видети из добијених резултата, у случају ароматичних C-C истезања имамо одлично поклапање између експерименталних и израчунатих вредности док код алифатичних постоји мало одступање.

2.4.2.3 N-H вибрације

Вибрације N-H истезања јављају се у области од 3500-3300 cm^{-1} .¹³⁸ Као што се може видети из структуре испитиваних једињења у прстену хиноксалинона налазе се две -NH групе. Постојање ових група потврђено је израчунатим вибрацијама где се налазе две траке на 3457 и 3220 cm^{-1} за једињење **5g**, 3472 и 3070 cm^{-1} за једињење **5c**, 3460 и 3191 cm^{-1} за једињење **5k** и 3480 и 3455 cm^{-1} за једињење **6l**. У експерименталним спектрима за -NH групе не јављају се две траке већ једна широка трака (изузетак једињење **5k**) и то на 3473 (**5g**), 3412 (**5c**), 3438 и 3411 (**5k**) и 3484 cm^{-1} (**6l**).

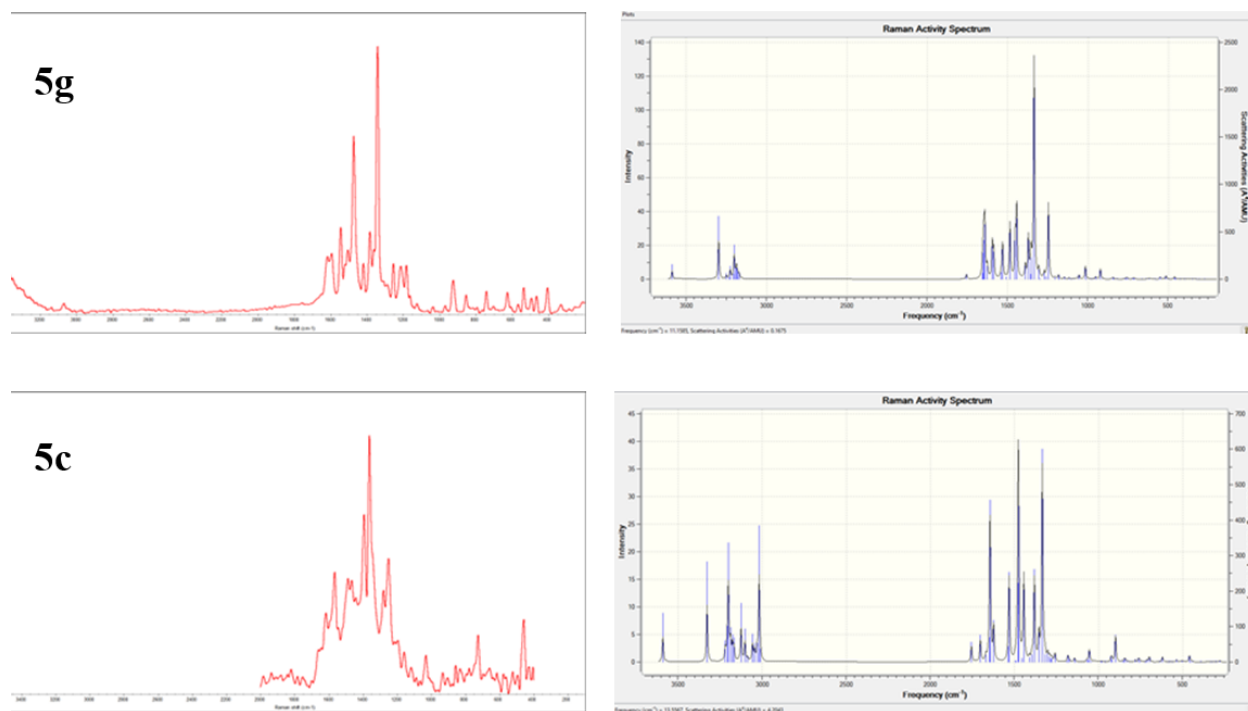
2.4.2.4 C=O вибрације

За валенционе вибрације карбонилне групе очекивано је да се нађу у области од 1680-1715 cm^{-1} .¹³⁹ У случају испитиваних хиноксалинона вибрација истезања карбонилне групе која је део амидне групе у експерименталном спектру појављује се као интензивна трака на 1700 cm^{-1} док се израчуната вредност налази на 1690 cm^{-1} . У случају бензоксазинона експериментална вредност вибрације естарске карбонилне групе јавља се на 1754 cm^{-1} , а израчуната вредност износи 1756 cm^{-1} . Експериментална вредност вибрација карбонилне групе која припада бензоил фрагменту за сва испитивана једињења налази се у опсегу од 1650-1605 cm^{-1} , а израчунате вредности се налазе између 1680-1600 cm^{-1} . Код бензоксазинона **6l** се поред две карбонилне групе које се налазе као саставни део свих испитиваних једињења налази још једна која припада NHCOCH_3 фрагменту. Експериментална вредност вибрације карбонилне групе која припада N-ацетил фрагменту износи 1599 cm^{-1} док израчуната вредност износи 1645 cm^{-1} . Упоредивањем експерименталних и израчунатих резултата може се закључити да у случају C=O вибрација постоји одлично поклапање скоро у свим случајевима.

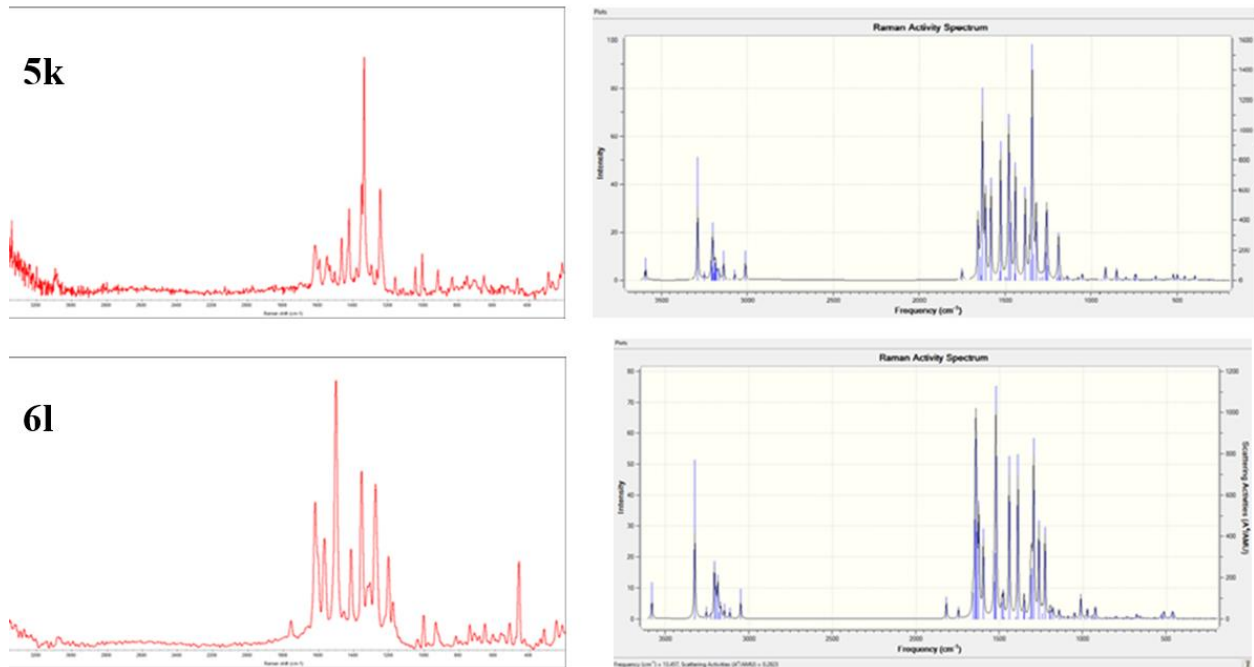
2.4.3 Рамански спектри

Рамански спектри добијени су коришћењем ласера таласне дужине 780 nm и снаге 10 mW. Овако добијени експериментални спектри упоређени су са теоријски добијеним резултатима. Вибрације C-N истезања на око 3000 cm^{-1} одсуствују само из спектра једињења **5c** због шума који се јавља у том опсегу.¹⁴⁰ Траке које одговарају C-N-H вибрацијама за једињења **5g** и **5c** јављају се на 1540 cm^{-1} , а за једињења **5k** и **6l** на 1560 cm^{-1} . Један од најинтензивнијих пикова у спектрима једињења **5g**, **5c** и **5k** јавља се на 1380-1330 cm^{-1} и одговара C-O истезању.¹⁴¹ Најинтензивнији пик у спектру једињења **6l** одговара осцилацијама бензеновог прстена и јавља се на 1498 cm^{-1} што је потврђено и теоријским испитивањима (трака се јавља на око 1500 cm^{-1}). Траке у области од 1275-1235 cm^{-1} одговарају асиметричном савијању N-O веза. Вибрације које одговарају C-O-C симетричном истезању налазе се у области од 1050-1000 cm^{-1} .¹⁴² На Сликама 53 и 54 приказани су експериментални и израчунати Рамански спектри испитиваних једињења. У експерименталном раманском спектру једињења **5k** пикови су ниског интензитета и јавља се велики шум у спектру. Добијени резултат може се приписати самој морфологији узорка,

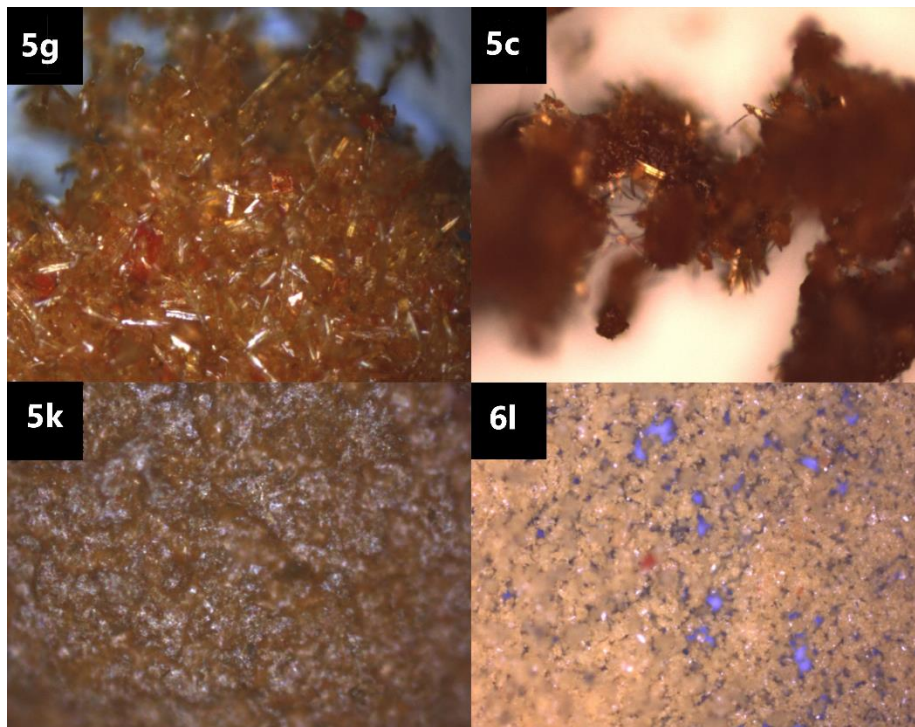
то јест односу кристалне и аморфне фазе у узорку. Узорци који имају структуру кристала поседују пикове већег интензитета. Ово се може потврдити и микроскопским снимцима добијеним током Раманске спектроскопске анализе (Слика 55). Вибрације анализираних узорака налазе се у оквиру њихових карактеристичних области при чему се експерименталне и теоријске вредности веома добро поклапају. Наравно, могуће је уочити и одређена одступања између експерименталних и израчунатих спектра која су последица природе квантно-механичког модела коришћеног за израчунавање вибрација. Такође, ова одступања се могу приписати и потцењивању делокализације π -електрона због коњугације молекула приликом израчунавања.



Слика 53. Експериментални (лево) и израчунати (десно) Рамански спектри једињења 5g и 5c



Слика 54. Експериментални (лево) и израчунати (десно) Рамански спектри једињења **5k** и **6l**



Слика 55. Микроскопски снимци добијени приликом снимања Раманских спектра

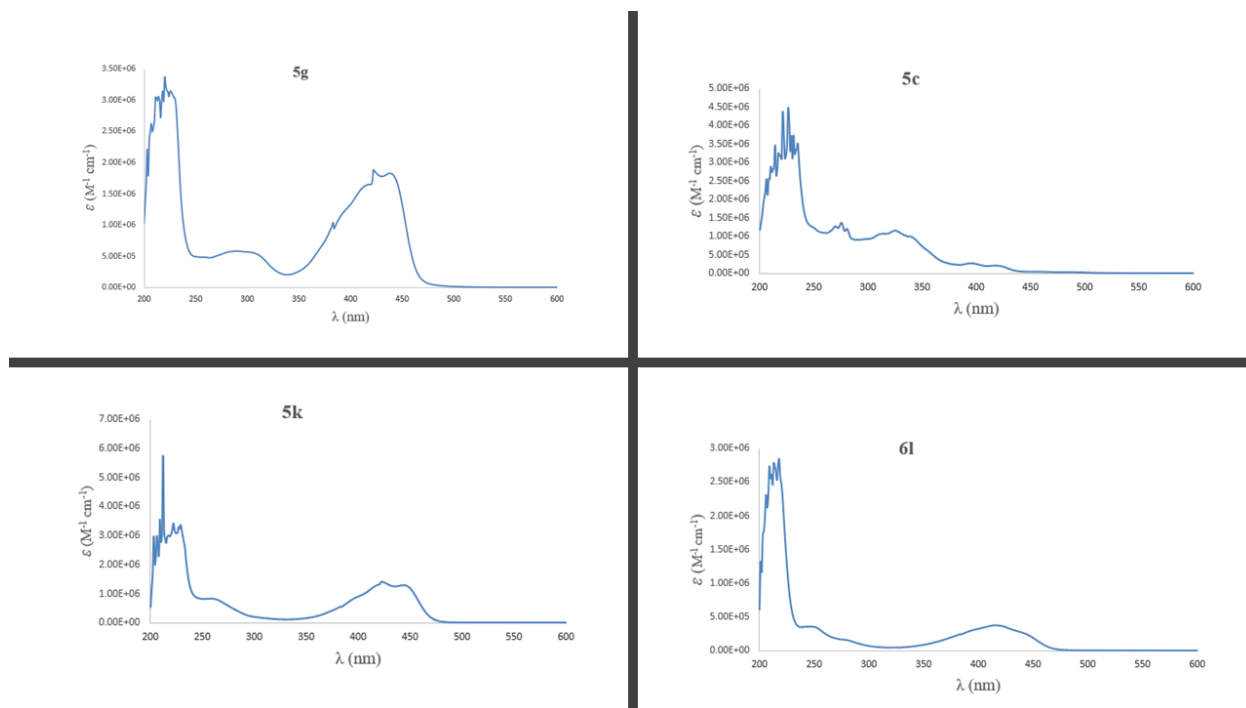
2.4.4 UV-Vis спектри и израчунавање електронских параметара

Апсорпциона таласна дужина одговара електронском прелазу из основног у прво ексцитовано стање. Електронска апсорпција описује се као прелазак електрона из највише попуњене молекулске орбитале (НОМО) у најниже непопуњену молекулску орбиталу (LUMO). Граничне орбитале као и енергетска разлика између НОМО и LUMO у великој мери одређују електронске и оптичке особине молекула. Најчешћи електронски прелази у органским молекулима су π - π^* , n - π^* и π^* (акцептор)- π (донор). На Слици 56 приказани су експериментални UV-Vis спектри једињења **5g**, **5c**, **5k** и **6l**. У Табели 10 приказане су експерименталне и теоријске апсорпционе таласне дужине, енергије, осцилаторна јачина (f) и прелази који одговарају таласним дужинама. За хемијску реакцију од велике је важности изглед (познавање, израчунавање) НОМО и LUMO орбитала. Енергија НОМО орбитале представља способност давања електрона док енергија LUMO орбитале представља способност прихватања електрона. Разлика између НОМО и LUMO енергије одређује хемијску стабилност молекула. Израчунавања су урађена помоћу TD-DFT нивоа теорије са B3LYP/6-311+G(d,p) базисним скупом и CPCM¹⁴³ солватационим моделом у етанолу као растварачу. Помоћу ових прорачуна добија се јаснија слика о електронским прелазима, а самим тим и о особинама испитиваног једињења.

Табела 10. Експерименталне и израчунате вредности електронских параметара (λ , E и f) добијене помоћу TD-DFT/B3LYP/6-311+G(d,p) методе

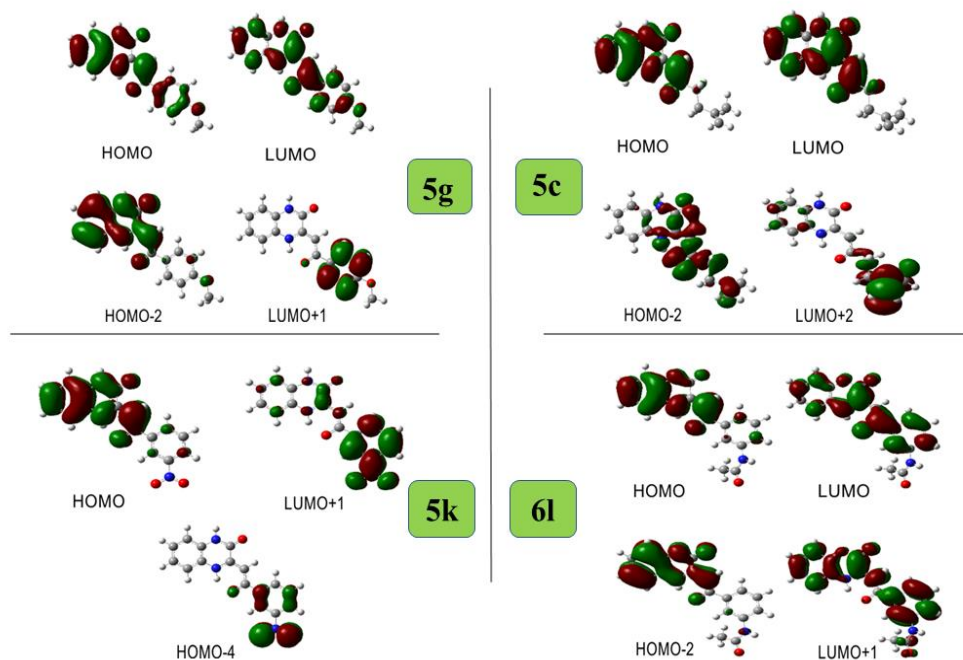
Једињење	Експериментално		TD-DFT (B3LYP/6-311+G(d,p))			
	λ (nm)	E (eV)	λ (nm)	E (eV)	f	Електронски прелази
5g	422	2.93	412	3.00	0.95	H→L (70%)
	270	4.37	228	5.43	0.33	H-2→L+1 (61%)
5c	400	3.09	377	3.28	0.59	H→L (70%)
	275	4.49	219	5.66	0.14	H-2→L+2 (58%)
5k	425	2.87	417	2.97	0.78	H→L+1 (70%)
	260	4.74	270	4.58	0.06	H-4→L+1 (60%)

6l	420	2.93	421	2.94	0.73	H→L (70%)
	255	4.81	228	5.42	0.11	H-2→L+1 (64%)



Слика 56. Експериментални UV-Vis спектри једињења **5g**, **5c**, **5k** и **6l**

За једињење **5g** апсорпција UV зрачења на таласној дужини од 412 nm са осцилаторном јачином од $f = 0,95$ указује на то да постоји $n \rightarrow \pi^*$ електронски прелаз. Апсорпциона трака која се јавља на 228 nm са осцилаторном јачином $f = 0,33$ потиче од $n \rightarrow \pi^*$ и $\pi \rightarrow \pi^*$ електронског прелaza. На основу резултата који су добијени израчунавањем примећује се да апсорпционе траке са највишим таласним дужинама потичу од прелaza електрона из НОМО у LUMO и из НОМО у LUMO+1 са 70% доприноса. На Слици 57 приказане су НОМО и LUMO орбитале одабраних једињења.



Слика 57. Граничне молекулске орбитале (НОМО и LUMO) једињења 5g, 5c, 5k и 6l

На основу изгледа симулираних LUMO орбитала закључује се да постоји интрамолекулски пренос наелектрисања унутар целог система. Изузетак се јавља у случају једињења 5c где се пренос наелектрисања дешава само у хиноксалинском фрагменту као последица одсуства бензоил фрагмента. Код НОМО орбитала може се видети да се дистрибуција наелектрисања дешава само унутар хетероцикличних прстенова.

Уколико се осврнемо на литературне податке, односно претходно публиковане радове, може се пронаћи да се као инхибитори корозије најчешће користе хетероциклична једињења која садрже поларне функционалне групе као што су -ОН, -ОСН₃, -Сл, -НО₂, -СН, -С=Н-, -СН₃, -NH₂ или незасићена једињења са двоструком или троструком везом где незасићене везе служе као адсорпциони центри због присуства π електрона или слободног електронског пара.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ Електрон донорске групе као што су -ОН, -NH₂, -СН₃, -ОСН₃ повећавају инхибиторске способности молекула због повећања густине електрона на самом адсорпционом центру чиме се повећава интеракција између инхибитора и површине метала. Супротно томе, присуство електрон привлачних група као што су -НО₂, -СН, -СООН, -

COOC₂H₅ смањује електронску густину на адсорпционом центру инхибитора, а самим тим смањује и ефикасност инхибиције.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹

Поред таласне дужине, ексцитационе енергије и осцилаторне дужине израчунати су и други електронски параметри као што су енергије HOMO и LUMO орбитале (E_{HOMO} , E_{LUMO}), енергетска разлика између HOMO и LUMO (ΔE), електронегативност (χ), диполни момент (μ), електронски афинитет (A), јонизациони потенцијал (I), тврдоћа (η), мекоћа (σ) и трансфер наелектрисања електрона (ΔN) (Табела 11). Ови параметри су израчунати помоћу података добијених из оптимизоване структуре који су употребљени у једначинама које се налазе испод:¹⁵⁰

$$\Delta E_{gap} = E_{LUMO} - E_{HOMO} \quad (4)$$

$$I = -E_{HOMO} \quad (5)$$

$$A = -E_{LUMO} \quad (6)$$

$$\chi = \frac{I+A}{2} \quad (7)$$

$$\eta = \frac{I-A}{2} \quad (8)$$

$$\sigma = \frac{1}{\eta} \quad (9)$$

$$\Delta N = \frac{\chi(Fe) - \chi(inh)}{2(\eta(Fe) + \eta(inh))} \quad (10)$$

Табела 11. Вредности електронских параметара једињења **5g**, **5c**, **5k** и **6l** (ΔE , A , I , χ , η , σ и ΔN)

parameter	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV)	A (eV)	I (eV)	χ (eV)	η (eV)	σ (eV ⁻¹)	ΔN
5g	-5,900	-2,514	3,386	2,514	5,900	4,207	1,693	0,591	0,825
5c	-5,961	-2,332	3,629	2,332	5,961	4,146	1,814	0,551	0,786
5k	-6,096	-0,657	5,439	0,657	6,096	3,376	2,720	0,368	0,666
6l	-6,237	-2,928	3,309	2,928	6,237	4,582	1,654	0,604	0,731

Вредности χ и η за гвожђе износе 7 eV/mol и 0 eV/mol. Када се упореде резултати ова четири испитивана једињења може се видети да једињење **5g** има највишу енергију НОМО орбитале, а једињење **6l** најнижу енергију LUMO орбитале. Добијени резултати указују на то да једињење **5g** показује највећу способност инхибиције корозије зато што висока вредност НОМО енергије значи нижи јонизациони потенцијал и лакше се отпуштају електрони.¹⁵¹ Разлика између НОМО и LUMO (ΔE) одређује реактивност органских молекула према површини метала као и могућност преласка електрона. Уколико је вредност ΔE_{gap} ниска то значи да је потребна мала енергија за уклањање електрона из последње окупираних орбитале чиме се обезбеђује добра ефикасност инхибиције. Осим тога, ниска вредност ΔE_{gap} значи и већу стабилност формираног комплекса на површини метала. Вредности ΔE за једињења **5g**, **5c**, **5k** и **6l** износе 3,386, 3,629, 5,439 и 3,309 eV. На основу резултата може се закључити да једињење **6l** има нижу вредност ΔE од осталих испитиваних једињења и самим тим поседује боље инхибиторске способности од осталих молекула. Вредност ΔE за једињење **5k** износи 5,439 eV што потврђује да овај молекул има најстабилнију структуру у односу на **5g**, **5c** и **6l** при чему се вредност ΔE_{gap} може упоредити са ΔE_{gap} неких биолошки активних молекула.¹⁵² Ниска вредност електронског афинитета молекула **5k** (0,657 eV) указује на то да поменути молекул лако прихвата електроне за формирање везе што значи да је молекул јако реактиван и лако ступа у реакцију са нуклеофилима.

Апсолутна тврдоћа (η) и мекоћа (σ) су електронске особине које су уско повезане са стабилношћу и реактивношћу молекула. Ефикасност инхибиције корозије повећава се повећањем мекоће, а смањује се повећањем тврдоће молекула.¹⁵³ Када се упореде резултати

добијени за испитивана једињења може се закључити да једињење **6l** има најнижу вредност тврдоће (1,654 eV) и највишу вредност мекоће (0,604 eV⁻¹).

ΔN се дефинише као количина преноса наелектрисања између молекула и површине челика. Уколико ΔN има позитивну вредност онда молекул има способност да прими електроне а уколико је та вредност негативна онда молекул има способност да донира електрон.¹⁵⁴ У нашем случају, сва испитивана једињења имају позитивну вредност за ΔN што указује на то да сви испитивани молекули поседују способност преноса наелектрисања на површину челика.

Једињења **5g** и **6l** поседују боље инхибиторске способности јер садрже електрон донорске групе (-OCH₃ и -NHCOCH₃) у односу на једињења **5c** и **5k** која садрже електрон привлачне групе (-NO₂ и алкенил низ) што је у корелацији са претходно публикованим резултатима.

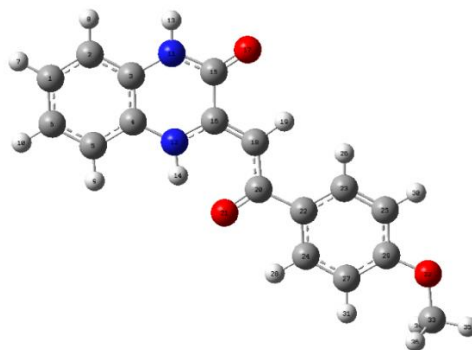
2.4.5 ¹H и ¹³C NMR спектри

Комбинација експерименталних и теоријских испитивања може бити јако моћна и корисна за тумачење и предвиђање структура молекула. NMR спектри испитиваних једињења снимљени су у DMSO-у и урађена је асигнација. У циљу упоређивања експерименталних и израчунатих резултата урађена је симулација ¹H и ¹³C NMR спектра поменутих једињења помоћу GIAO методе у DMSO-у применом IEF-PCM солватационог модела и помоћу B3LYP/6-311+ G(d,p) базисног скупа. У Табели 12 приказане су теоријске и експерименталне вредности ¹H и ¹³C хемијских померања једињења **5g**. На слици која се налази у оквиру табеле налази се структура са нумерацијом атома. За теоријска испитивања било је потребно израчунати хемијска померања за TMS као стандард. Добијене вредности за ¹H и ¹³C било је потребно скалирати па су у том циљу, помоћу методе најмањих квадрата израчунати фактори скалирања. Они износе 1,1119 за ¹H и 0,9409 за ¹³C померања.

За органска једињења карактеристично је да се хемијска померања у ¹³C NMR спектру јављају изнад 100 ppm¹⁵⁵ што је потврђено и у нашем случају. Хемијска померања угљеникових атома који су конституенти прстенова већа су од 100 ppm као што је и очекивано. У експерименталном спектру померања се јављају на 115,6; 114,2; 129,4; 116,4; 131,6; 124,5 и 126,7 ppm, а у израчунатом на 123,8; 114,9; 125,0; 126,1; 130,5; 128,6 и 129,4

ppm. Израчунате вредности ^{13}C померања се веома добро поклапају са експерименталним што потврђују и квадрат коефицијента корелације (R^2) 0,9696 (**5g**), 0,9910 (**5c**), 0,9933 (**5k**) и 0,9528 (**6l**). Приликом симулирања ^1H NMR спектра наишли смо на одступања од експерименталних вредности што наравно није неубичајено. У нашем случају највеће одступање се јавља код N-H померања при чему се претпоставља да је узрок постојање интра- и интермолекулских интеракција којих нема приликом израчунавања.

Табела 12. Експерименталне и израчунате вредности ^1H и ^{13}C померања једињења **5g**



Атом	Експериментални ^{13}C NMR	Скалиране теоријске вредности ^{13}C NMR (ppm)	Атом	Експериментални ^1H NMR	Скалиране теоријске вредности ^1H NMR (ppm)
C1	115.6	123.8	H7	7.05	8.4
C2	114.2	114.9	H8	7.05	8.4
C3	129.4	125.0	H9	7.05	8.1
C4	116.4	126.1	H10	7.05	8.4
C5	114.2	114.4	H12	13.57	15.2
C6	115.6	123.2	H14	11.96	8.9
C15	145.2	142.9	H20	6.76	7.9
C16	156.1	154.0	H26	7.94	9.1
C18	89.2	89.3	H28	7.94	9.7
C19	188	184.6	H30	7.05	8.1
C22	131.6	130.5	H31	7.42	8.1

C23	124.5	128.6	H34	3.82	4.8
C24	126.7	129.4	H35	3.82	4.5
C25	123.9	115.7	H36	3.82	4.5
C27	116.4	108.9			
C29	162.6	162.3			
C33	55.6	55.3			

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1 Опште напомене

За синтезу, карактеризацију и биолошка испитивања 3,4-дихидро-2(1*H*)-хиноксалинона и 3,4-дихидро-1,4-бензоксазин-2-она коришћене су следеће комерцијално доступне супстанце и растварачи: *o*-фенилендиамин (99,5%), *o*-аминофенол (99%), лимунска киселина (99,5%), алуминијум-оксид (Al_2O_3), силикагел (SiO_2), диметилсулфоксид (DMSO), потпуно деутерисани диметилсулфоксид ($\text{DMSO-}d_6$), CDCl_3 , етанол, пропиридијум-бромид (PB), етидијум-бромид (EB), фосфатни пуфер (PBS), дезоксирибонуклеинска киселина (ДНК), бовин серум албумин (БСА), α -глукозидаза, акарбоза, *p*-нитрофенил- α -D-глукопиранозид (PNP-G) и 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум-бромид (МТТ). Произвођач свих поменутих једињења је Sigma Aldrich.

Реакције су праћене коришћењем танкослојне хроматографије (TLC) на алуминијумским плочама, које су превучене слојем силика-гела дебљине 0,2 mm (Silica gel on TLC Al foils, Fluka Analytical).

Употребом *Mel-Temp* апарата одређене су тачке тољења синтетисаних производа. UV-Vis спектри су снимљени у етанолском раствору на таласној дужини од 200-600 nm, у кварцној кивети дужине оптичког пута 1,0 cm, на Perkin Elmer Lambda 35 double-beam спектрофотометру на собној температури.

Инфрацрвени спектри су снимљени на Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR спектрофотометру (KBr пилула). Рамански спектри снимљени су на Thermo Fisher Scientific DXR Raman микроскопу на 25°C. Овај уређај користи DPSS (Diode Pumped Solid State) ласер са таласном дужином од 780nm. Ласер који се користи за побуђивање повезан је са оптичким Olympus микроскопом и објективом са увећањем 10 пута, који усмерава сноп ласерских зрака на узорак. Помоћу истог објектива са отвором размере 50 μm прикупљени су повратни подаци помоћу CCD камере као детектора. OMNIC софтвер је коришћен за прикупљање и анализу добијених Раманских спектра узорака. NMR спектри (^1H и ^{13}C) снимљени су на Varian Gemini 200 MHz NMR спектрометру (^1H на 200 и ^{13}C на 50 MHz) у CDCl_3 или $\text{DMSO-}d_6$ (при чему је као стандард коришћен тетраметилсилан). Скраћенице коришћене за ^1H сигнале су: s (синглет), d (дублет), t (триплет), q (квартет), m (мултиплет) и br. s. (широки синглет). Хемијска померања (δ) су дата у ppm (parts per million).

Масена спектрометрија рађена је на Waters Micromass Quattro II triple quadrupole масеном спектрометру при чему је коришћен MassLynx софтвер за обраду резултата. Коришћена је електроспреј јонизација у позитивном моду (капилара је била подешена на 3,0 kV, а конус на 20 V). Температура потребна за јонизацију је била подешена на 120°C, а проток азота износио је 500 l h⁻¹ и 50 l h⁻¹. Енергија колизије износила је 20 eV. Елементална анализа (C, H и N) урађена је на Carlo Erba EA1108.

Подаци о дифракцији X-зрака монокристала одговарајућег једињења добијени су на собној температури, на Agilent Gemini S дифрактометру са извором зрачења MoK α ($\lambda = 71\ 073\ \text{\AA}$). За обраду података коришћен је софтвер CrysAlisPro.¹⁵⁶ Кристална структура одређена је директним методом коришћењем SIR2002¹⁵⁷ и SHELXL¹⁵⁸ (методом најмањег квадрата).

Програми PARST¹⁵⁹, PLATON¹⁶⁰ и WinGX¹⁶¹ су коришћени за геометријске прорачуне. Сlike су урађене коришћењем програма ORTEP-3¹⁶² и MERCURY (Version 2.4)¹⁶³.

Телијске линије HeLa, LS174, A549 и MRC-5 одржаване су и гајене на температури 37°C у виду моносоља у хранљивом медијуму RPMI-1640 (Sigma Aldrich). Овим хранљивим подлогама пре употребе је додат 10% говеђи серум, L-глутамин и смеша пеницилин-стрептомицин (Sigma Aldrich).

Раствор БСА концентрације 200 μM припремљен је у 10 mM PBS пуферу (pH= 7.4), заштићен је од светлости и остављен на температури 4°C три дана. Комплекси БСА са испитиваним једињењима направљени су тако што је коришћена иста количина БСА а различите количине испитиваног једињења. Моларни однос БСА:испитивано једињење је: 1:0 (контрола), 1:0,1, 1:0,2, 1:0,3, 1:0,4, 1:0,5, 1:0,6, 1:0,7, 1:0,8, у укупној запремини од 5 ml, pH = 7.4 на 25°C. Раствор комплекса БСА-испитивано једињење инкубиран је 3h пре него што је снимљен емисиони спектар, у опсегу од 300-500 nm, при чему су максимални интензитети искоришћени за даље прорачуне.

Испитивање интеракција са ДНК рађена су у 10 mM PBS пуферу (pH = 7.4). Као интеркалирајући агенс коришћен је етидијум-бромид у концентрацији од 100 μM при чему је и концентрација ДНК износила 100 μM . Комплекси ДНК са испитиваним једињењима

направљени су тако што је коришћена иста концентрација ДНК, а различите концентрације испитиваног једињења. Раствор комплекса ДНК-испитивано једињење инкубиран је 24h пре снимања спектра. Узорци су ексцитовани на 527 nm, а емисија је праћена на 610 nm.

3.2 Компјутерске методе за докинг и симулирање

Из PDB базе узета је структура В-ДНК додекамера за испитивање интеракције одабраних једињења са поменутиим фрагментом ДНК док је за испитивање интеракције са БСА из исте базе узета структура 3V03. Структуре су обрађене у Protein Preparation Wizard програму који је део Schrödinger 2015-02 пакета.¹⁶⁴ Подешен је интегритет структура, а петља је додата помоћу програма Prime.^{165,166} Водоникови атоми додати су након брисања оригиналних, а затим је уследило подешавање веза за остатке и лиганде. Протоновање и таутомерна стања остатака подешена су на рН 7. Након завршеног докинга, молекули воде који су се налазили на удаљености већој од 5,0 Å од лиганда су обрисани у циљу лакше презентације података. Током симулација, наелектрисања аминокиселина, оријентација молекула воде у околини активних центара на рецептору и формирање водоничних веза између лиганда и рецептора били су третираны методом PROPKA при рН вредности 7.¹⁶⁷ Затим је ензим подвргнут геометријској оптимизацији коришћењем поља сила OPLS-2005¹⁶⁸, уз процес енергетске минимизације. Статичка валидност модела проверавана је анализом варијансе, тачније коришћењем квадратног корена средње вредности девијације (RMSD) позиције атома од 0,3 Å. Прво је урађена оптимизација геометрије свих лиганда употребом V3LYP-D3 методе са базисним скупом 6-31+G(d,p) помоћу Macro Model/Conformational Search програма. Овако оптимизоване структуре су даље припремљене за испитивање помоћу LigPrep-а са пољем силе OPLS-2005.¹⁶⁹ Мрежа рецептора припремљена је коришћењем OPLS-2005 поља силе, а докинг студија је урађена помоћу Glide-а са стандардном прецизношћу.¹⁷⁰ Одређене су најпогодније структуре лиганда на основу енергије која је сума енергије мреже, афинитета везивања, енергије унутрашњег напрезања и van der Waals-ових интеракција.

За потребе симулирања спектра све геометрије су оптимизоване употребом DFT-а са V3LYP функционалом.^{131,132} Израчунавања су урађена помоћу 6-311+G(d,p)¹³³ базисног скупа у софтверу GAUSSIAN 09.¹³⁴ V3LYP/6-311+G(d,p) теоријски модел употребљен је за добијање геометрије основног стања одабраних хиноксалинона и бензоксаинона у

вакууму. Израчунавањем фреквенција показало се да не постоје имагинарне фреквенције што указује на то да стационарне тачке одговарају равнотежним геометријама. Добијене равнотежне геометрије коришћене су као улазни подаци (input-и) за даља израчунавања (UV-Vis, IR, Raman, ^1H и ^{13}C NMR спектра). За боље разумевање електронских особина, симулирани су UV-Vis спектри помоћу TDDFT/B3LYP методе са 6-311+G(d,p) базисним скупом при чему је подешен етанол као растварач. Структуре које су оптимизоване у вакууму коришћене су за симулирање Раманских и IR спектра. Израчунате вибрационе фреквенције скалиране су фактором скалирања који износи 0,9679.¹³⁵ Израчуната су хемијска померања у ^1H и ^{13}C NMR спектрима помоћу GIAO методе у DMSO као растварачу.¹³⁶ Израчуната су и ^1H и ^{13}C NMR хемијска померања за TMS као стандард у DMSO. Израчуната хемијска померања скалирана су факторима скалирања 0,9409 за ^{13}C и 1,1119 за ^1H , који су добијени методом најмањих квадрата.

3.3 Припремање лимуновог сока

50 ml свежег лимуновог сока процеђено је кроз активни угаљ. Добијени филтрат је пропуштен кроз колону која је претходно напуњена слојем Al_2O_3 , силика гелом и на врху колоне још једним слојем Al_2O_3 . На овај начин је добијен филтрат пречишћен од пектина и уљастих примеса са рН вредношћу око 3,5. Овако добијен лимунов сок коришћен је као растварач и катализатор за синтезу 3,4-дихидро-2(1*H*)-хиноксалинона и 3,4-дихидро-1,4-бензоксазин-2-она.

3.4 Генерална процедура за добијање 3,4-дихидро-2(1H)-хиноксалинона (5a-m) и 3,4-дихидро-1,4-бензоксазин-2-она (6a, 6b, 6f, 6k-o)

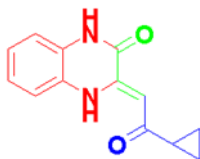
Метода А. У балон од 100 ml у коме се налази 50 ml кључалог лимуновог сока додаје се одговарајући естар **1a-o** (1 mmol) и *o*-фенилендиамин (1 mmol, 0.108 g) или *o*-аминофенол (1 mmol, 0.109 g). Остави се да се загрева на пешчаном купатилу уз рефлуктовање 24h. Након хлађења, производи се процеде, исперу врућом водом и суше помоћу вакуума.

Метода В. У балон од 100 ml у коме се налази 50 ml кључалог лимуновог сока додаје се *o*-фенилендиамин (1 mmol, 0.108 g) или *o*-аминофенол (1 mmol, 0.109 g) а затим се дода 5 ml воденог раствора одговарајуће енолне соли **1a'-o'** (1 mmol). Таложeње производа је опажа након 10 минута. Реакција се прекида након 2-6 часова. Обрада производа је иста као и код методе А.

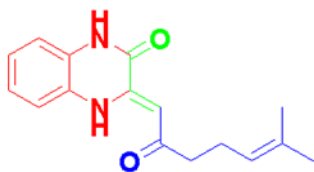
3.5 Спектроскопски подаци хиноксалинона и бензоксазинона

У тексту који се налази испод описане су физичке особине синтетисаних једињења (боја и тачка топљења), принос по методи А, а у загради принос по методи В, IR и NMR карактеризација као и масена и елементална анализа.

3,4-дихидро-3-(2-оксо-2-циклопропилиден)-2(1H)-хиноксалинон (5a). Наранџаста прашкаста супстанца; Принос: 85 (94)%; Tt 257°C; IR (KBr): ν 3438, 3413, 2964, 1681, 1613, 1574, 1390 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ = 0,83-1,08 (m, 4H, 2 \times CH $_2$), 1,99-2,11 (m, 1H, CH), 6,22 (s, 1H, CH), 7,03-7,09 (t, 3H, CH $_{Ar}$), 7,31-7,42 (m, 1H, CH $_{Ar}$), 11,86 (br. s, 1H, NH), 12,99 (br. s, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ = 10,1, 20,9, 93,0, 115,4, 115,9, 123,4, 123,7, 124,4, 126,3, 142,7, 155,9, 199,4 ppm; ESI-MS (m/z): 228 [M] $^+$. Израчунато за C $_{13}$ H $_{12}$ N $_2$ O $_2$ (%): C 68,41, H 5,30, N 12,27; нађено: C 68,30, H 5,38, N 12,20.



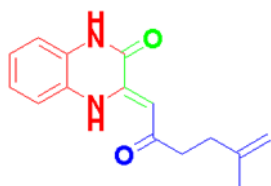
3,4-дихидро-3-(2-оксо-хекс-5-етилиден)-2(1H)-хиноксалинон (5b). Браон кристали;



Принос: 89 (93)%; Tt 212°C; IR (KBr): ν 3438, 2961, 1673, 1614, 1577, 1380 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ = 2,32-2,49 (m, 2H, CH₂), 2,50-2,55 (m, 2H, CH₂), 4,91-5,00 (m, 2H, CH₂), 5,76-5,90 (m, 1H, CH), 6,05 (s, 1H, CH), 6,93-7,07 (m, 3H, CH_{Ar}), 7,09-7,40

(m, 1H, CH_{Ar}), 11,87 (br. s, 1H, NH), 12,95 (br. s, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ = 29,0, 41,2, 92,9, 115,3, 115,5, 116,2, 123,6, 123,8, 124,4, 126,4, 138,0, 143,6, 155,9, 199,3 ppm; ESI-MS (m/z): 265 [M + Na]⁺; Израчунато за C₁₄H₁₄N₂O₂ (%): C 69,41, H 5,82, N 11,56; нађено: C 69,28, H 5,87, N 11,51.

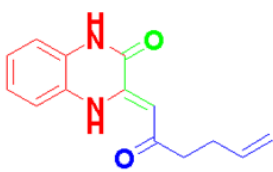
3,4-дихидро-3-(5-метил-2-оксо-хекс-5-етилиден)-2(1H)-хиноксалинон (5c). Наранџаста



прашката супстанца; Принос: 91 (95)%; Tt > 300°C; IR (KBr): ν 3412, 2963, 2854, 1667, 1612, 1568, 1460, 1380 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ = 1,71 (s, 3H, CH₃), 2,24-2,31 (m, 2H, CH₂), 2,57-2,64 (m, 2H, CH₂), 4,69 (s, 2H, CH₂), 6,08 (s, 1H, CH), 7,04-7,10 (m, 3H, CH_{Ar}),

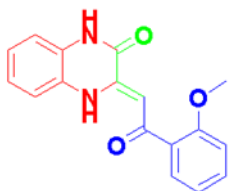
7,37-7,42 (m, 1H, CH_{Ar}), 11,88 (br. s, 1H, NH), 12,96 (br. s, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ = 22,6, 32,7, 40,3, 92,8, 110,4, 115,4, 116,1, 123,6, 123,7, 124,4, 126,4, 143,5, 144,7, 155,9, 199,5 ppm; ESI-MS (m/z): 256 [M]⁺; Израчунато за C₁₅H₁₆N₂O₂ (%): C 70,29, H 6,29, N 10,93; нађено: C 70,41, H 6,39, N 10,97.

3,4-дихидро-3-(6-метил-2-оксо-хепт-5-етилиден)-2(1H)-хиноксалинон (5d). Браон

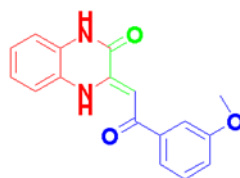


кристали; Принос: 83 (92)%; Tt 215°C; IR (KBr): ν 3438, 2966, 1681, 1627, 1614, 1580, 1387 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ = 1,58-1,63 (d, 6H, 2×CH₃), 2,22-2,30 (t, 2H, CH₂), 2,40-2,44 (d, 2H, CH₂), 5,07-5,14 (t, 1H, CH), 6,05 (s, 1H, CH), 7,07-7,10 (d, 3H, CH_{Ar}), 7,37-7,42 (m, 1H, CH_{Ar}), 11,87 (br. s, 1H, NH), 12,98 (br. s, 1H, NH) ppm;

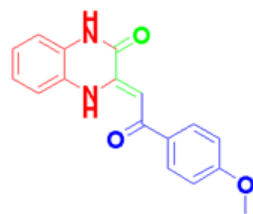
^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ = 17,7, 23,7, 25,6, 42,3, 92,9, 115,4, 116,1, 123,5, 123,7, 124,5, 126,4, 131,5, 143,4, 155,9, 199,7 ppm; ESI-MS (m/z): 271 [M + H]⁺; Израчунато за C₁₆H₁₈N₂O₂ (%): C 71,09, H 6,71, N 10,36; нађено: C 71,20, H 6,64, N 10,41.

3,4-дихидро-3-[2-оксо-2-(2-метоксифенил)етилиден]-2(1H)-хиноксалинон (5e).

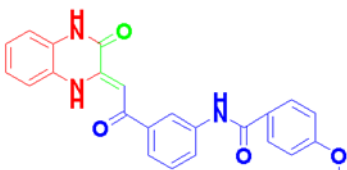
Наранџаста прашкаста супстанца; Принос: 78 (64)%; Tt 278-279°C; IR ((KBr): ν 3436, 2984, 2840, 1683, 1592, 1371, 1241, 1169 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ = 3,87 (s, 3H, OCH₃), 6,82 (s, 1H, CH), 7,10-7,17 (q, 4H, CH_{Ar}), 7,44-7,49 (m, 3H, CH_{Ar}), 7,52-7,68 (m, 1H, CH_{Ar}), 11,96 (br. s, 1H, NH), 13,53 (br. s, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ = 56,0, 95,2, 112,6, 115,5, 116,6, 120,7, 123,9, 124,0, 124,5, 126,9, 129,3, 129,8, 132,8, 144,7, 156,1, 157,6, 189,3 ppm; ESI-MS (m/z): 294 [M]⁺; Израчунато за C₁₇H₁₄N₂O₃ (%): C 69,38, H 4,79, N 9,52; нађено: C 69,45, H 4,81, N 9,47.

3,4-дихидро-3-[2-оксо-2-(3-метоксифенил)етилиден]-2(1H)-хиноксалинон (5f). Жута

прашкаста супстанца; Принос: 90 (94)%; Tt 263°C; IR (KBr): ν 3435, 3052, 2924, 1686, 1604, 1587, 1379 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ = 3,82 (s, 3H, OCH₃), 6,77 (s, 1H, CH), 7,12-7,14 (d, 4H, CH_{Ar}), 7,38-7,57 (m, 4H, CH_{Ar}), 12,04 (br. s, 1H, NH), 13,67 (br. s, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ = 55,4, 89,4, 111,8, 115,5, 116,7, 118,0, 119,6, 123,8, 124,2, 124,2, 126,9, 130,0, 140,3, 145,8, 155,8, 159,7, 188,2 ppm; ESI-MS (m/z): 317 [M + Na]⁺; Израчунато за C₁₇H₁₄N₂O₃ (%): C 69,38, H 4,79, N 9,52; нађено: C 69,27, H 4,85, N 9,50.

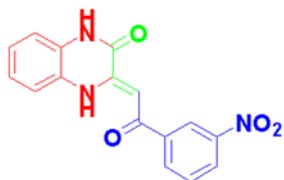
3,4-дихидро-3-[2-оксо-2-(4-метоксифенил)етилиден]-2(1H)-хиноксалинон (5g).

Наранџаста прашкаста супстанца; Принос: 86 (95)%; Tt 241°C; IR (KBr): ν 3437, 2965, 2842, 1681, 1597, 1373, 1246, 1172 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ = 3,82 (s, 3H, OCH₃), 6,76 (s, 1H, CH), 6,99-7,13 (m, 5H, CH_{Ar}), 7,38-7,46 (m, 1H, CH_{Ar}), 7,90-7,98 (m, 2H, CH_{Ar}), 11,96 (br. s, 1H, NH), 13,57 (br. s, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ = 55,6, 89,2, 114,2, 115,6, 116,4, 123,9, 124,5, 126,7, 129,4, 131,6, 145,2, 156,1, 162,6, 188,0 ppm; ESI-MS (m/z): 294 [M]⁺; Израчунато за C₁₇H₁₄N₂O₃ (%): C 69,38, H 4,79, N 9,52; нађено: C 69,49, H 4,75, N 9,47.

3,4-дихидро-3-[2-(3-(*N*-4-метоксибензоил)фенил)-2-оксо-етилиден]-2(1*H*)-

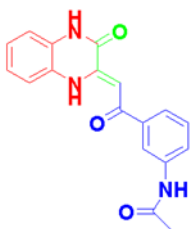
хиноксалинон (5h). Жута прашкаста супстанца; Принос: 90 (97)%; Tt 297°C; IR (KBr): ν 3412, 3359, 3285, 2964, 1683, 1650, 1607, 1594, 1378, 1255, 1214 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ = 3,85 (s, 3H, OCH₃), 6,85 (s, 1H, CH), 7,46-7,54 (t, 5H,

CH_{Ar}), 7,68-7,72 (m, 3H, CH_{Ar}), 7,99-8,08 (m, 3H, CH_{Ar}), 8,46 (s, 1H, CH_{Ar}), 10,32 (br. s, 1H, NH), 12,10 (br. s, 1H, NH), 13,67 (br. s, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ = 55,6, 89,3, 113,8, 115,6, 116,7, 119,0, 122,1, 123,6, 123,8, 124,2, 124,3, 126,9, 129,2, 129,8, 139,2, 140,0, 145,8, 155,9, 162,2, 165,2, 188,4 ppm; ESI-MS (m/z): 414 [M + H]⁺; Израчунато за C₂₄H₁₉N₃O₄ (%): C 69,72, H 4,63, N 10,16; нађено: C 69,64, H 4,74, N 10,15.

3,4-дихидро-3-[2-оксо-2-(3-нитрофенил)етилиден]-2(1*H*)-хиноксалинон (5k).

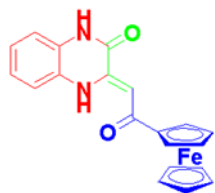
Наранџаста прашкаста супстанца; Принос: 89 (78)%; Tt > 300°C; IR (KBr): ν 3438, 3170, 2928, 1701, 1689, 1605, 1531, 1347 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ = 6,83 (s, 1H, CH), 7,16 (s, 3H, CH_{Ar}), 7,55 (s, 1H, CH_{Ar}), 7,76-7,84 (t, 1H, CH_{Ar}), 8,37-8,63 (d + s, 3H, CH_{Ar}), 12,16

(br. s, 1H, NH), 13,68 (br. s, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ = 89,0, 115,6, 117,1, 121,5, 124,0, 124,8, 126,3, 127,2, 130,8, 133,3, 140,1, 146,7, 148,4, 155,6, 185,6 ppm; ESI-MS (m/z): 308 [M + H]⁺; Израчунато за C₁₆H₁₁N₃O₄ (%): C 62,14, H 3,58, N 13,59; нађено: C 62,21, H 3,64, N 13,60.

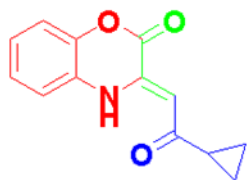
3,4-дихидро-3-[2-оксо-2-(3-*N*-ацетилфенил)етилиден]-2(1*H*)-хиноксалинон (5l).

Жута прашкаста супстанца; Принос: 86 (95)%; Tt > 300°C; IR (KBr): ν 3438, 3253, 3191, 2925, 1676, 1663, 1607, 1554, 1378 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ = 2,08 (s, 3H, CH₃), 6,79 (s, 1H, CH), 7,14-7,83 (m, 7H, CH_{Ar}), 8,25 (s, 1H, CH_{Ar}), 10,16 (br. s, 1H, NH), 12,06 (br. s, 1H, NH), 13,62 (br. s, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ = 24,2, 89,3, 115,5, 116,7, 117,7, 121,7,

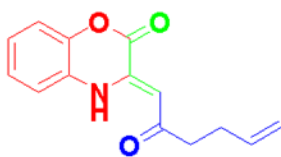
122,3, 123,8, 124,3, 126,9, 128,3, 129,3, 139,3, 139,9, 145,7, 155,9, 168,7, 188,4 ppm; ESI-MS (m/z): 322 [M + H]⁺; Израчунато за C₁₈H₁₅N₃O₃ (%): C 67,28, H 4,70, N 13,08; нађено: C 67,45, H 4,78, N 13,05.

3,4-дихидро-3-(2-оксо-2-фероценилетилиден)-2(1H)-хиноксалинон (5m). Црвени

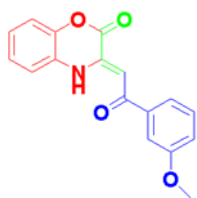
кристали; Принос: 90 (97)%; Tt > 300°C; IR (KBr): ν 3437, 3413, 2855, 1681, 1611, 1561, 1378 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ = 4,17 (s, 5H, CHFc), 4,54 (s, 2H, CHFc), 4,83 (s, 2H, CHFc), 6,35 (s, 1H, CH), 7,08-7,35 (d, 4H, CH_{Ar}), 11,89 (br. s, 1H, NH), 13,26 (br. s, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ = 68,6, 69,7, 71,7, 81,7, 91,2, 115,3, 115,8, 123,1, 123,6, 124,6, 126,2, 142,9, 156,1, 193,6 ppm; ESI-MS (m/z): 372 [M]⁺; Израчунато за C₂₀H₁₆N₂O₂Fe (%): C 64,54, H 4,33, N 7,53; нађено: C 64,60, H 4,41, N 7,47.

3,4-дихидро-3-(2-оксо-2-циклопропилетилиден)-1,4-бензоксазин-2-он (6a). Жута

прашката супстанца; Принос: 88 (97)%; Tt 189°C; IR (KBr): ν 3483, 3060, 1756, 1627, 1597, 1570, 1388 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 0,97-1,14 (m, 4H, 2×CH₂), 1,94-2,06 (m, 1H, CH), 6,44 (s, 1H, CH), 6,95-7,27 (m, 4H, CH_{Ar}), 12,45 (br. s, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = 11,3, 21,9, 97,9, 115,4, 117,0, 123,3, 123,9, 125,7, 136,4, 140,8, 156,2, 202,0 ppm; ESI-MS (m/z): 252 [M + Na]⁺; Израчунато за C₁₃H₁₁NO₃ (%): C 68,11, H 4,84, N 6,11; нађено: C 68,24, H 4,91, N 6,15.

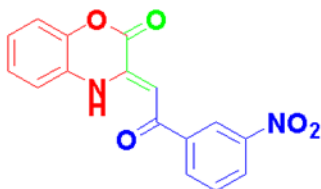
3,4-дихидро-3-(2-оксо-хекс-5-етилиден)-1,4-бензоксазин-2-он (6b). Жути кристали;

Принос: 93 (84)%; Tt 100°C; IR (KBr): ν 3491, 3061, 2854, 1758, 1638, 1583, 1571, 1499, 1361 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 2,37-2,47 (q, 2H, CH₂), 2,63-2,70 (t, 2H, CH₂), 4,99-5,12 (m, 2H, CH₂), 5,79-5,93 (m, 1H, CH), 6,32 (s, 1H, CH), 7,00-7,27 (m, 4H, CH_{Ar}), 12,46 (br. s, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = 28,8, 42,2, 97,6, 115,4, 115,6, 117,0, 126,6, 123,8, 125,7, 136,9, 137,4, 141,0, 156,1, 201,9 ppm; ESI-MS (m/z): 243 [M]⁺; Израчунато за C₁₄H₁₃NO₃ (%): C 69,12, H 5,39, N 5,76; нађено: C 69,26, H 5,41, N 5,69.

3,4-дихидро-3-[2-оксо-2-(3-метоксифенил)етилиден]-1,4-бензоксазин-2-он (6f). Жута

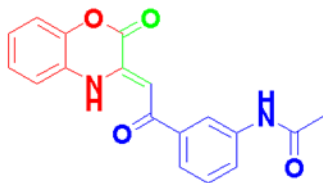
прашката супстанца; Принос: 88 (95)%; Tt 151°C; IR (KBr): ν 3852, 3491, 3060, 2918, 1758, 1621, 1601, 1585, 1348 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ = 3,87 (s, 3H, OCH_3), 7,01-7,56 (m, 9H, CH + CH_{Ar}), 13,04 (br. s, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ = 55,4, 94,7, 111,9, 115,9, 117,1, 119,1,

120,2, 123,7, 123,9, 125,8, 129,6, 139,0, 139,6, 141,2, 156,1, 160,0, 191,1 ppm; ESI-MS (m/z): 296 $[\text{M} + \text{H}]^+$; Израчунато за $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ (%): C 69,15, H 4,44, N 4,74; нађено: C 69,20, H 4,59, N 4,68.

3,4-дихидро-3-[2-оксо-2-(3-нитофенил)етилиден]-1,4-бензоксазин-2-он (6k). Наранџасти

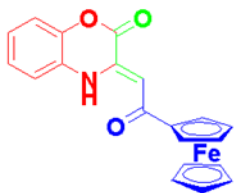
кристали; Принос: 91 (93)%; Tt 228°C; IR (KBr): ν 3490, 3101, 2918, 1751, 1625, 1615, 1587, 1348 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ = 7,07 (s, 1H, CH), 7,21-7,24 (m, 3H, CH_{Ar}), 7,71-7,75 (m, 1H, CH_{Ar}), 8,31-8,44 (m, 3H, CH_{Ar}), 8,84-8,86 (m, 1H, CH_{Ar}), 13,17 (br. s, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ = 29,7, 93,7,

116,4, 117,3, 122,6, 123,4, 124,8, 126,0, 126,7, 129,8, 133,0, 139,7, 140,3, 141,6, 188,4 ppm; ESI-MS (m/z): 310 $[\text{M}]^+$; Израчунато за $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_5$ (%): C 61,94, H 3,25, N 9,03; нађено: C 62,11, H 3,31, N 8,97.

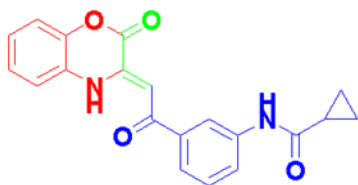
3,4-дихидро-3-[2-оксо-2-(3-N-ацетилфенил)етилиден]-1,4-бензоксазин-2-он (6l). Жута

прашката супстанца; Принос: 95 (91)%; Tt 235°C; IR (KBr): ν 3484, 3288, 3091, 2853, 1754, 1672, 1630, 1599, 1553, 1351 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 2,07 (s, 3H, CH_3), 6,81 (s, 1H, CH), 7,11-7,84 (m, 7H, CH_{Ar}), 8,24 (s, 1H, CH_{Ar}), 10,16 (br. s, 1H, NH), 12,76 (br. s, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 24,2,

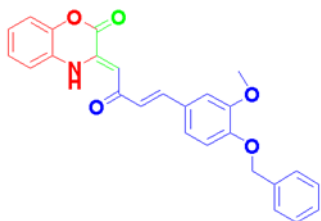
92,7, 116,6, 117,0, 117,7, 121,9, 122,8, 123,8, 124,1, 125,5, 129,4, 138,8, 140,0, 140,1, 141,3, 156,2, 168,8, 189,4 ppm; ESI-MS (m/z): 322 $[\text{M}]^+$; Израчунато за $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$ (%): C 67,08, H 4,38, N 8,69; нађено: C 67,15, H 4,31, 8,70.

3,4-дихидро-3-(2-оксо-2-фероценилетилиден)-1,4-бензоксазин-2-он (6т). Црвени

кристали; Принос: 91 (93)%; Tt 223°C; IR (KBr): ν 3853, 3750, 3491, 3081, 2918, 1760, 1629, 1596, 1375 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ = 4,21 (s, 5H, CHFc), 4,57-4,59 (d, 2H, CHFc), 4,87-4,89 (t, 2H, CHFc), 6,55 (s, 1H, CH), 6,99-7,26 (m, 4H, CH_{Ar}), 12,68 (br. s, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ = 69,1, 70,2, 72,7, 80,9, 96,6, 115,4, 117,0, 123,1, 124,2, 125,7, 136,5, 140,8, 156,7, 196,2 ppm; ESI-MS (m/z): 374 $[\text{M} + \text{H}]^+$; Израчунато за $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{Fe}$ (%): C 64,37, H 4,05, N 3,75; нађено: C 64,30, H 3,92, N 3,78.

3,4-дихидро-3-[2-оксо-2-(3-N-циклопропаноилфенил)етилиден]-1,4-бензоксазин-2-он

(6н). Жута прашкаста супстанца; Принос: 84 (89)%; Tt 264°C; IR (KBr): ν 3486, 3259, 3061, 2921, 1760, 1651, 1618, 1599, 1560, 1348 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 0,84 (s, 4H, CH_2), 1,78 (m, 1H, CH), 6,81 (s, 1H, CH), 7,16-7,81 (m, 7H, CH_{Ar}), 8,27 (s, 1H, CH_{Ar}), 10,42 (br. s, 1H, NH), 12,76 (br. s, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 7,5, 14,8, 92,7, 116,6, 117,0, 117,7, 121,8, 122,8, 123,9, 124,1, 125,5, 129,5, 138,8, 140,0, 140,1, 156,2, 172,1, 189,4 ppm; ESI-MS (m/z): 348 $[\text{M}]^+$; Израчунато за $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$ (%): C 68,96, H 4,63, N 8,04; нађено: C 68,90, H 4,75, N 8,01.

3,4-дихидро-3-[2-оксо-4-(4-бензилокси-3-метоксифенил)бут-3-етилиден]-1,4-

бензоксазин-2-оне (6о). Наранџаста прашкаста супстанца; Принос: 80 (94)%; Tt 188°C; IR (KBr): ν 3750, 3061, 2955, 1751, 1613, 1595, 1341 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ = 3,94 (s, 3H, OCH_3), 5,19 (s, 2H, OCH_2), 6,53-7,60 (m, 15H, CH_{Ar}), 12,99 (br. s, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ = 56,0, 70,8, 98,4, 113,5, 116,1, 117,0, 122,9, 123,8, 125,3, 125,7, 127,2, 128,0, 128,6, 136,5, 138,6, 141,3, 141,6, 149,8, 150,5, 156,1, 189,3 ppm; ESI-MS (m/z): 450 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; Израчунато за $\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{NO}_5$ (%): C 73,06, H 4,95, N 3,28; нађено: C 73,19, H 4,91, N 3,32.

4. ЗАКЉУЧАК

На основу приказаних и описаних резултата у овој докторској дисертацији, могу се извести следећи закључци:

- Развијена је еколошки одржива метода која подразумева употребу “зеленог растварача” као што је лимунов сок за синтезу нових 3,4-дихидро-2(1*H*)-хиноксалинона **5(a-m)** и 3,4-дихидро-1,4-бензоксазин-2-она (**6a, 6b, 6f, 6k-o**).
- Употребом ове методе врло лако се изолују производи у високом приносу (до 97%) и високе чистоће при чему се употребљени растварач може рециклирати и употребити поново, а да при томе не губи својства.
- Испитиван је утицај синтетисане серије једињења на три ћелијске линије тумора (карцинома грлића материце, карцинома дебелог црева, карцинома плућа) и нормалним ћелијама фибробласта плућа. Резултати су показали да четири једињења (**5c, 5g, 5h** и **5i**) показују добру цитотоксичну активност према свим ћелијским линијама. Испитивана једињења су показала висок индекс селективности, што значи да су нетоксична према здравим ћелијама.
- Урађена је и анализа ћелијског циклуса при чему добијени резултати за једињење **5i** показују да долази до повећања процента HeLa ћелија у G2/M фази које је повезано са опадањем ћелија у G1 фази.
- Поред цитотоксичне активности испитивана је и анти α -глукозидазна активност чији резултати указују на то да два једињења (**5h** и **5i**) показују значајну инхибицију α -глукозидазе *in vitro* и могу се даље испитивати у ове сврхе.
- Резултати добијени испитивањем интеракције DNA са једињењима **5c, 5g, 5h** и **5i** указују на то да се испитивана једињења везују за DNA преко интеркалације и да су добијене константе K_{sv} у рангу константи које одговарају потенцијалним лековима који садрже метал.
- Испитивањем интеракције BSA са једињењима **5c, 5g, 5h** и **5i** утврђено је да постоји једно место где се хиноксалинони везују за BSA. Добијене вредности за K_a показују да се испитивана једињења реверзибилно везују за BSA што им омогућава транспорт помоћу BSA.

- Захваљујући прорачунима који су урађени помоћу DFT студије добијене су додатне информације о структури и особинама хиноксалинона и бензоксазинона. Добијене вредности за квантно хемијске параметре указују на то да једињења **5g** и **6l** поседују добру инхибиторску активност корозије метала јер садрже електрон донорске групе.
- Такође, урађена је и симулација UV-Vis, IR, Raman, ¹H и ¹³C NMR спектра и израчунати спектри су упоређени са експерименталним при чему је добијено одлично поклапање резултата што коришћену методу B3LYP/6-311+G(d,p) чини врло погодном за примену код овог типа једињења.

5. ЛИТЕРАТУРА

1. B. Jiang, W. Zhao, S. Li, H. Liu, L. Yu, W. Niu, H. He and L. Wu, *J. Antibiot.*, **2018**, 71, 965.
2. P. Sanna, A. Carta, M. Loriga, S. Zanetti and L. Sechi, *II Farmaco*, **1999**, 54, 161.
3. A. Carta, M. Loriga, S. Prisas, G. Paglietti, P. La Colla, B. Busonera, G. Collu and R. Loddo, *Med. Chem.*, **2006**, 2, 113.
4. J. Balzarini, E. De Clercq, A. Carbonez, V. Burt and J.-P. Kleim, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **2000**, 16, 517.
5. S. Noorulla and N. Sreenivasulu, *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **2011**, 2, 2337.
6. G. Naga Raju, Y. Sravani, K. Naga Swathi Sri, B. Revathi and N. Ramarao, *World J. Pharm. Pharm. Sci.*, **2015**, 4, 2019.
7. B. Zarranz, A. Jaso, I. Aldana and A. Monge, *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, 11, 2149.
8. R. H. Bahekar, M. R. Jain, A. A. Gupta, A. Goel, P. A. Jadav, D. N. Patel, V. M. Prajapati and P. R. Patel, *Arch. Pharm.*, **2007**, 340, 359.
9. M. Zhang, Z. C. Dai, S. S. Qian, J. Y. Liu, Y. Xiao, A. M. Lu, H. L. Zhu, J. X. Wang and Y. H. Ye, *J. Agric. Food Chem.*, **2014**, 62, 9637.
10. I. B. Obot and N. O. Obi-Egbedi, *Corros. Sci.*, **2010**, 52, 198.
11. Z. El Adnani, M. Mcharfi, M. Sfaira, M. Benzakour, A. T. Benjelloun, M. Ebn Touhami, B. Hammouti and M. Taleb, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **2012**, 7, 6738.
12. M. J. Crossley, P. J. Sintic, J. A. Hutchinson and K. P. Ghiggino, *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, 3, 852.
13. M. Xia, Q. Yao, R. Ma and B. Zhou, *Faming Zhuanli Shenqing*, CN102993223A20130327, **2013**.
14. H. Veisi and R. Ghorbani-Vaghei, *Tetrahedron*, 2010, 66, 7445.
15. K. S. Rao and T.-S. Wu, *Tetrahedron*, 2012, 68, 7735.
16. M. Staderini, N. Cabezas, M. L. Bolognesi and J. C. M. Fendez, *Tetrahedron*, 2013, 69, 1024.
17. A. R. Katritzky, *The Principles of Heterocyclic Chemistry*, Pharma Med Press Publishers, 80.
18. R. M. Acheson, *An Introduction to the Chemistry of Heterocyclic Compounds*, Third edition, Wiley -Inter Science Publication, 410.

19. T. Zuhail, P. Emel and K. Adem, *Molecules*, 2007, 12, 345.
20. G. W. H. Chesseman and R. F. Cookson, *The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Condensed Pyrazines*, vol. 35, John Wiley & Sons, Inc., 1979.
21. D. J. Brown, E. C. Taylor and J. A. Ellman, *The Chemistry of Heterocyclic Compounds*, Hoboken, NJ:Wiley, 2004.
22. V. Kunkuma, L.A.P.D. Bethala, Y. Bhongiri, B.N.P. Rachapudi, S.S.P. Potharaju, *Eur. J. Chem.*, 2011, 2, 495.
23. S. Antoniotti and E. Dunach, *Tetrahedron Lett.*, 2002, 43, 3971.
24. O. Hinsberg, *Liebigs Ann. Chem.*, **1887**, 237, 327.
25. M. I. Abasolo, C. H. Gaozza, B. M. Fernández, *J. Heterocyclic Chem.*, **1987**, 24, 1771.
26. J. Gris, *Tetrahedron Lett.*, **2008**, 49, 1053.
27. F. E. King, J. W. Clark-Lewis, *J. Chem. Soc.*, **1951**, 3379.
28. Y. Tamura, M. W. Chun, H. Nishida, S. Kwon, M. Ikeda, *Chem. Pharm. Bull.*, **1978**, 26, 2866.
29. M. Jellal, Y. Ramli, A. Moussaif, Y. Kandri Rodi, J. Fifani, E. M. Essassi, M. Pierrot, *J. Soc. Chim. Tun.*, **2005**, 7, 19.
30. I. A. Tolmacheva, I. V. Mashevskaya, A. N. Maslivets, *Rus. J. Org. Chem.*, **2002**, 38, 281.
31. K. S. Bozdyreva, I. V. Smirnova, A. N. Maslivets, *Rus. J. Org. Chem.*, **2005**, 41, 1081.
32. I. V. Mashevskaya, I. G. Mokrushin, K. S. Bozdyreva, A. N. Maslivets, *Rus. J. Org. Chem.*, **2011**, 47, 253.
33. E. Korin, B. Cohen, Y. X. Bai, C. C. Zeng, J. Y. Becker, *Tetrahedron*. **2012**, 36, 7450.
34. D. Li, H. Ma and W. Yu, *Adv. Synth. Catal.*, **2015**, 357, 3696.
35. S. Tanimori, U. Inaba, Y. Kato, H. Ura, H. Kashiwagi, T. Nishimura and M. Kirihata, *Res. Chem. Intermed.*, **2014**, 40, 2157.
36. S. Balalaie, M. Bararjanian, S. Hosseinzadeh, F. Rominger, H. R. Bijanzadeh and E. Wolf, *Tetrahedron*, **2011**, 67, 7294.
37. X. Luo, E. Chenard, P. Martens, Y.-X. Cheng and M. J. Tomaszewski, *Org. Lett.*, **2010**, 12, 3574.
38. Y. Zhou, X. Ji, G. Liu, D. Zhang, L. Zhao, H. Jiang and H. Liu, *Adv. Synth. Catal.*, **2010**, 352, 1711.

39. J. D. Venable, D. E. Kindrachuk, M. L. Peterson and J. P. Edwards, *Tetrahedron Lett.*, **2010**, 51, 337.
40. J. Jesús Morales-Castellanos, K. Ramírez-Hernández, N. S. Gómez-Flores, O. R. Rodas-Suárez and J. Peralta-Cruz, *Molecules*, **2012**, 17, 5164.
41. B. Krishnakumar and M. Swaminathan, *J. Mol. Catal. A: Chem.*, **2011**, 350, 16.
42. Ö. Wahlroos and A. I. Virtanen, *Acta Chem. Scand.*, **1959**, 13, 1906.
43. E. Honkanen and A. I. Virtanen, *Acta Chem. Scand.*, **1960**, 14, 504.
44. C. L. Tipton, J. A. Klun, R. D. Husted and M. D. Pierson, *Biochemistry*, **1967**, 6, 2866.
45. J. A. Klun, C. L. Tipton and T. A. Brindley, *J. Econ. Entomol.*, **1967**, 60, 1529.
46. R. H. Hamilton, *Weeds*, **1964**, 12, 27.
47. J. N. BeMiller and J. A. Pappelis, *Phytopathology*, **1965**, 55, 1237.
48. G. Feng, J. Wu and W.-M. Dai, *Tetrahedron*, **2006**, 62, 4635.
49. J. Wolfer, T. Bekele, C. J. Abraham, C. Dogo-Isonagie and T. Lectka, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 7398.
50. J. Kang, K.-H. Kam, M. Ghate, Z. Hua, T.-H. Kim, C. R Reddy, S. Chandrasekhar and D.-S. Shina, *Arkivoc*, **2008**, 14, 67.
51. B. Parrino, C. Ciancimino, A. Carbone, V. Spanò, A. Montalbano, P. Barraja, G. Cirrincione and P. Diana, *Tetrahedron*, **2015**, 71, 7332.
52. K. Hachama, M. Khodja, S. Moulay, H. Boutoumi, L. Hennig and D. Sicker, *J. Heterocyclic Chem.*, **2013**, 50, 413.
53. M. Śmist, H. Kwiecien and M. Krawczyk, *J. Environ. Sci. Heal. B*, **2016**, 51, 393.
54. S. Piras, M. Loriga, and G. Paglietti, *Farmaco*, **2004**, 59, 185.
55. P. Sanna, A. Carta, M. Loriga, S. Zanetti and L. Sechi, *Farmaco*, **1999**, 54, 161.
56. A. Carta, P. Sanna, L. Gherardini, D. Usai and S. Zanetti, *Farmaco*, **2001**, 56, 933.
57. S. Hazeldine, L. Polin, J. Kushner, K. White, T. Corbett, J. Biehl and J. P. Horwitz, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 1069.
58. S. Hazeldine, L. Polin, J. Kushner, K. White, N. M. Bougeois, B. Crantz, E. Palomino, T. H. Corbett and J. P. Horwitz, *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 3130.
59. S. Hazeldine, L. Polin, J. Kushner, J. Paluch, K. White, M. Edelstein, E. Palomino, T. H. Corbett and J. P. Horwitz, *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 1758.

60. J. Gris, R. Glisoni, L. Fabian, B. Fernandez and A. G. Moglioni, *Tetrahedron Lett.*, **2008**, 49, 1053.
61. O. Hinsberg, *Liebigs Ann. Chem.*, **1887**, 237, 1228.
62. A. El-Tombary, Y. Abdel-Ghany, A. Belal, S. Shams El-Dine and F. Soliman, *Med. Chem. Res.*, **2011**, 20, 865.
63. R. Ingle, R. Marathe, D. Magar, H. M. Patel and S. J. Surana, *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, 65, 168.
64. I. Shchemelinin, L. Šefc and E. Nečas, *Folia Biol. (Praha)*, **2006**, 52, 81.
65. J. A. Adams, *Chem. Rev.*, **2001**, 101, 2271.
66. J. Dumas, *Drug Discov. Dev.*, **2001**, 4, 378.
67. A. S. Galal, H. M. S. Khairat, A. F. F. Ragab, S. A. Abdelsamie, M. M. Ali, M. S. Soliman, J. Mortier, G. Wolber and I. H. El Diwani, *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, 86, 122.
68. L. Shi, J. Zhou, J. Wuc, J. Cao, Y. Shen, H. Zhou and X. Li, *Bioorg. Med. Chem.*, **2016**, 24, 1840.
69. S. M. Wilhelm, C. Carter, L. Tang, D. Wilkie, A. McNabola, H. Rong, C. Chen, X. Zhang, P. Vincent, M. McHugh, Y. Cao, J. Shujath, S. Gawlak, D. Eveleigh, B. Rowley, L. Liu, L. Adnane, M. Lynch, D. Auclair, I. Taylor, R. Gedrich, A. Voznesensky, B. Riedl, L. E. Post, G. Bollag and P. A. Trail, *Cancer Res.*, **2004**, 64, 7099.
70. H. Wang et al. *Lancet HIV*, **2016**, 3, 361.
71. M. Patel, J. R. McHugh, B. C. Cordova, R. M. Klabe, S. Erickson-Viitanen, G. L. Trainor and J. D. Rodgers, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, 10, 1729.
72. J. P. Kleim, R. Bender, U. M. Billhardt, C. Meischner, G. Reiss, M. Rosner, I. Winkler and A. Paessens, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1993**, 37, 1659.
73. Q. L. Choo, G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley and M. Houghton, *Science*, **1989**, 244, 359.
74. R. Liu, Z. Huang, M. G. Murray, X. Guo and G. Liu, *J. Med. Chem.*, **2011**, 54, 5747.
75. A. Carta, I. Briguglio, S. Piras, P. Corona, G. Boatto, M. Nieddu, P. Giunchedi, M. E. Marongiu, G. Giliberti, F. Iuliano, S. Blois, C. Ibba, B. Busonera and P. La Colla, *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, 19, 7070.
76. L. N. Potgieter, *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, **1995**, 11, 501.

77. I. Briguglio, R. Loddo, E. Laurini, M. Fermeglia, S. Piras, P. Corona, P. Giunchedi, E. Gavini, G. Sanna, G. Giliberti, C. Ibba, P. Farci, P. La Colla, S. Pricl and A. Carta, *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, 105, 63.
78. O. I. El-Sabbagh, M. E. El-Sadek, S. M. Lashine, S. H. Yassin, and S. M. El-Nabtity, *Med. Chem. Res.*, **2009**, 18, 782.
79. A. Burguete, E. Pontiki, D. Hadjipavlou-Litina, R. Villar, E. Vicente, B. Solano, S. Ancizu, S. Pérez-Silanes, I. Aldana and A. Monge, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 6439.
80. J. J. Li, *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 8425.
81. J. Hauptmann and J. Stürzebecher, *Thrombosis Research*, **1999**, 93, 203.
82. U. J. Ries, H. W. M. Priepke, N. H. Huel, S. Handschuh, G. Mihm, J. M. Stassen, W. Wienen and H. Nar, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 2297.
83. J. Ohkanda and A. Katoh, *Rev. Heteroatom Chem.*, **1998**, 18, 87.
84. A. Dell, D. H. Williams and H. R. Morris, *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, 2497.
85. A. Carta, M. Loriga, S. Zanetti, and L. A. Sechi, *Farmaco*, **2003**, 58, 1251.
86. H. Ishikawa, T. Sugiyama, K. Kurita and A. Yokoyama, *Bioorg. Chem.*, **2012**, 41, 1.
87. R. V. Ghadage and P. J. Shirote, *J. Chem. Pharm. Res.*, **2011**, 3, 260.
88. A. Friebe, I. Wieland and M. Schulz, *Angew. Bot.*, **1996**, 70, 150.
89. A. Friebe, V. Vilich, L. Hennig, M. Kluge and D. Sicker, *Appl. Environ. Microb.*, **1998**, 64, 2386.
90. J. Zschiedrich and T. Eckhard, German Patent DE2044530 19710819, **1971**.
91. K. Meguro and K. Nishikawa, European Patent EP1987300974, **1987**.
92. K. Tanimura, K. Kosegi, H. Shimazu and H. Yaginuma, Japanese Patent JP1987-14379, **1988**.
93. A. R. Bhat and P. D. Pawar, *Indian drugs*, **2008**, 45, 962.
94. K. P. Beena and T. Akelesh, *Scholars Research Library*, **2013**, 5, 257.
95. S. D. Sayaji and B. P. Piste, *Int. J. Chemtech. Res.*, **2013**, 5, 2199.
96. S. Dhanya, U. H. Sadhana and S. M. Rama, *Res. J. Pharm. Sci.*, **2013**, 2, 15.
97. S. S. Zykova and O. G. Karmanova, *Pharm. Chem. J.*, **2015**, 49, 20.
98. P. Wang, F. Liu, Q. Zhong, S.-L. Zheng, Y. Chen, G.-D. Wang and L. He, *Chinese Chem. Lett.*, **2017**, 28, 1243.

99. Y. Xiang, X.-H. Wang, Q. Yang, J.-L. Tan, H.-J. Jang, H. Zuo, and D.-S. Shin, *Bulletin Korean Chem. Soc.*, **2018**, 39, 146.
100. J. Petronijević, Z. Bugarčić, G. A. Bogdanović, S. Stefanović and N. Janković, *Green Chem.*, **2017**, 19, 707.
101. J. Petronijević, N. Janković, T. P. Stanojković, N. Joksimović, N. Đ. Grozdanić, M. Vraneš, A. Tot and Z. Bugarčić, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, **2018**, 351, 1.
102. N. Joksimović, D. Baskić, S. Popović, M. Zarić, M. Kosanić, B. Ranković, T. Stanojković, S. B. Novaković, G. Davidović, Z. Bugarčić and N. Janković, *Dalton Trans.*, **2016**, 45, 15067.
103. M. M. Masood, V. K. Pillalamarri, M. Irfan, B. Aneja, M. A. Jairajpuri, Md. Zafaryab, M. M. A. Rizvi, U. Yadava, A. Addlagatta and M. Abid, *RSC Adv.*, **2015**, 5, 34173.
104. O. Koz'minykh, V. I. Goncharov and E. N. Koz'minykh, *Russ. J. Org. Chem.*, **2006**, 42, 1715.
105. S. S. Zykova and O. G. Karmanova, *Pharm. Chem. J.*, **2015**, 49, 362.
106. Yu. S. Andreichikov, S. G. Pitirimova, R. F. Saraeva, V. L. Gein, G. D. Plakhina and L. A. Voronova, *Khim. Geterotsikl. Soedin.*, **1978**, 3, 407.
107. D. J. C. Constable, A. D. Curzons and V. L. Cunningham, *Green Chem.*, **2002**, 4, 521.
108. K. V. Aken, L. Strekowski and L. Patiny, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2006**, 2, 3.
109. R. Lakowicz and G. Weber, *Biochem.*, **1973**, 12, 4161.
110. E. Sundaravadivel, S. Vedavalli, M. Kandaswamy, B. Vargheseb and P. Madankumar, *RSC Adv.*, **2014**, 4, 40763.
111. V. D. Suryawanshi, L. S. Walekar, A. H. Gore, P. V. Anbhule and G. B. Kolekar, *J. Pharm. Anal.*, **2016**, 6, 56.
112. W. L. Gabler, *Ress. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **1991**, 72, 39.
113. G. Colmenajero, A. Alvarez-Pedraglio and J. L. Lavandera, *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 4370.
114. T. Topala, A. Bodoki, L. Oprean and R. Oprean, *Clujul Med.*, **2014**, 87, 215.
115. D. S. Sigma, A. Mazuder and D. M. Pemn, *Chem. Rev.*, **1993**, 93, 2295.
116. D. Li, J. Tian, W. Gu, X. Liu and S. Yan, *J. Inorg. Biochem.*, **2010**, 104, 171.
117. J. L. Garcia-Gimenez, M. Gonzalez-Alvarez, M. Liu-Gonzalez, B. Macias, J. Borrás and G. Alzuet, *J. Inorg. Biochem.*, **2009**, 105, 923.

118. A. Tarushi, E. Polatoglou, J. Kljun, I. Turel, G. Psomas and D. P. Kessissoglou, *Dalton Trans.*, **2011**, 40, 9461.
119. K. C. Skyrianou, C. P. Raptopoulou, V. Psycharis, D. P. Kessissoglou and G. Psomas, *Polyhedron*, **2009**, 28, 3265.
120. K. C. Skyrianou, E. K. Efthimiadou, V. Psycharis, A. Terzis, D. P. Kessissoglou and G. Psomas, *J. Inorg. Biochem.*, **2009**, 103, 1617.
121. C. Tolia, A. N. Papadopoulos, C. P. Raptopoulou, V. Psycharis, C. Garino, L. Salassa and G. Psomas, *Inorg. Biochem.*, **2013**, 123, 53.
122. A. Tarushi, C. P. Raptopoulou, V. Psycharis, D. P. Kessissoglou, A. N. Papadopoulos and G. Psomas, *Inorg. Biochem.*, **2014**, 140, 185.
123. A. Tarushi, S. Perontsis, A. G. Hatzidimitriou, A. N. Papadopoulos, D. P. Kessissoglou and G. Psomas, *J. Inorg. Biochem.*, **2015**, 149, 68.
124. G. Cohen and H. Eisenberg, *Biopolymers.*, **1969**, 8, 45.
125. F. H. Li, G. H. Zhao, H. X. Wu, H. Lin, X. X. Wu, S. R. Zhu and H. K. Lin, *J. Inorg. Biochem.*, **2006**, 100, 36.
126. B. Bhattacharya, S. Nakka, L. Guruprasad and A. Samanta, *J. Phys. Chem. B.*, **2009**, 113, 2143.
127. F. A. S. Alasmay, F. S. Alnahdi, A. Ben Bacha, A. M. El-Araby, N. Moubayed, A. M. Alafeefy and A. M. El-Araby, *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.*, **2017**, 32, 1143.
128. N. V. Kulkarni, V. K. Revankar, B. N. Kirasur and M. H. Hugar, *Med. Chem. Res.*, **2012**, 21, 663.
129. S. Al-Rawi, T. Meehan-Andrews, C. Bradley and J. Al-Rawi, *Invest. New. Drugs.*, **2015**, 33, 45.
130. L. Shi, J. Zhou, J. Wu, J. Cao, Y. Shen, H. Zhou and X. Li, *Bioorg. Med. Chem.*, **2016**, 24, 1840.
131. A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1992**, 97, 9173 and *J. Chem. Phys.*, **1993**, 98, 5648
132. C. Lee, W. Yang and R. G. Parr, *Phys. Rev. B*, **1988**, 37, 785
133. R. Krishnan, J. S. Binkley, R. Seeger and J. A. Pople, *J. Chem. Phys.*, **1980**, 72, 650
134. Gaussian 09, Revision C.01, 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, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, 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, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2010**
135. M. P. Andersson and P. Uvdal, *J. Phys. Chem. A*, **2005**, 109, 2937
136. K. Wolinski, J. F. Hilton and P. Pulay, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 8251
137. R. M. Silverstein, F. X. Webster and D. J. Kiemle, John Wiley & Sons Inc., London, **2005**, p.72
138. N. R. Babu, S. Subashchandrabose, M. S. A. Padusha, H. Saleem, V. Manivannan and Y. Erdogdu, *J. Mol. Struct.*, **2014**, 1072, 84
139. F. Weinhold, Ed. Cambridge University Press, **2005**, p.367
140. V. Krishnakumar and S. Muthunatesan, *Spectrochim. Acta Part A*, **2007**, 66, 1082
141. V. Krishnakumar, R. Mathammal and S. Muthunatesan, *Spectrochim. Acta Part A*, **2008**, 70, 201
142. B. Schrader, Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany, **1995**, p.191
143. J. Tomasi, B. Mennucci and R. Cammi, *Chem. Rev.*, **2005**, 105, 2999
144. S. A. Umoren, O. Ogbobe, I. O. Igwe and E. E. Ebenso, *Corros. Sci.*, **2008**, 50, 1998
145. R. K. Gupta, M. Malviya, C. Verma and M. A. Quraishi, *Mater. Chem. Phys.*, **2017**, 198, 360
146. C. Verma, E. E. Ebenso and M. A. Quraishi, *J. Mol. Liq.*, **2017**, 233, 403
147. M. Yadav, R. R. Sinha, S. Kumar and T. K. Sarkar, *RSC Adv.*, **2015**, 5, 70832
148. T. G. Harvey, S. G. Hardin, A. E. Hughes, T. H. Muster, P. A. White, T. A. Markley, P. A. Corrigan, J. Mardel, S. J. Garcia, J. M. C. Mol and A. M. Glenn, *Corros. Sci.*, **2011**, 53, 2184
149. S. G. Sagdinc and Y. S. Kara, *Prot. Metal. Phys. Chem. Surf.*, **2014**, 50, 111

150. A. Bouoidina, E. F. Hajjaji, A. Abdellaoui, Z. Rais, M. Filali Baba, M. Chaouch, O. Karzazi, A. Lahkimi and M. Taleb, *J. Mater. Environ. Sci.*, **2017**, 8, 1328
151. M. K. Awad, *Can. J. Chem.*, **2013**, 91, 283
152. R. A. Costa, K. M. T. Oliveira, E. V. Costa and M. L. B. Pinheiro, *J. Mol. Struct.*, **2017**, 1145, 254
153. I. B. Obot and Z. M. Gasem, *Corros. Sci.*, **2014**, 83, 359
154. N. Kovacevic and A. Kokalj, *J. Phys. Chem. C*, **2011**, 115, 24189
155. H. O. Kalinowski, S. Berger and S. Braun, John Wiley & Sons, Chichester, **1988**, p. 512
156. Agilent, CrysAlis PRO, Agilent Technologies, Yarnton, Oxfordshire, England, **2013**
157. M. C. Burla, M. Camalli, B. Carrozzini, G. L. Cascarano, C. Giacovazzo, G. Polidori and R. Spagna, *J. Appl. Crystallogr.*, **2003**, 36, 1103
158. G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. A*, **2008**, 64, 112
159. M. Nardelli, *J. Appl. Crystallogr.*, **1995**, 28, 659
160. A. L. Spek, *J. Appl. Crystallogr.*, **2003**, 36, 7
161. L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.*, **1999**, 32, 837
162. L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.*, **2012**, 45, 849
163. C. F. Macrae, P. R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, G. P. Shields, R. Taylor, M. Towler and J. van de Streek, *J. Appl. Crystallogr.*, **2006**, 39, 453
164. Schrödinger Suite Prote in Preparation Wizard. Schrödinger, LLC; New York, NY, **2015**
165. M. P. Jacobson, R. A. Friesner, Z. Xiang and B. Honig, *J. Mol. Biol.*, **2002**, 320, 597
166. Schrödinger Suite, Prime, Schrödinger, LLC; New York, NY, **2015**
167. M. Rostkowski, M. Olsson, C. Sondergaard and J. Jensen, *BMC Struct. Bio.*, **2011**, 11, 1
168. W. L. Jorgensen and J. Tirado-Rives, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, 102, 6665
169. Schrödinger Suite, LigPrep, Schrödinger, LLC; New York, NY, **2015**
170. Schrödinger Suite, Glide, Schrödinger, LLC; New York, NY, **2012**

6. БИОГРАФИЈА



Јелена М. Петронијевић, је рођена 22.03.1991. године у Крагујевцу. Основну школу „Карађорђе“ и гимназију „Ђура Јакшић“ завршила је у Рачи са просечном оценом 5,00. Природно математички факултет у Крагујевцу, одсек хемија, смер заштита животне средине уписала 2010. године, а дипломирала септембра 2014. године са просечном оценом 8,78. Након тога 2014. године уписала мастер академске студије на Природно математичком факултету у Крагујевцу, а дипломирала у октобру 2015. године са просечном оценом 9,67, одбранивши мастер рад на тему „Синтеза и карактеризација нових 2(1*H*)-хиноксалинонских деривата“. Школовање је наставила уписавши докторске академске студије 2015. године на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, модул органска хемија.

Од 04.11.2016. године укључена је на изради пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије - „Испитивање механизма реакција комплекса јона прелазних метала са биолошки значајним молекулима“, бр. 172011, руководилац проф. др Зорица Бугарчић.

Као студент докторских студија, од октобра 2017. године ангажована је и у извођењу практичне наставе из предмета Одабрана поглавља органске хемије и Органски индустријски загађивачи.

Јелена Петронијевић се бави истраживачким радом из области органске хемије. Предмет истраживања на којима је ангажована су синтеза и функционализација нових хиноксалинонских и бензоксаинонских деривата коришћењем *one-pot* протокола и испитивање биолошке активности новосинтетисаних једињења. До сада има једанаест објављених научних радова у часописима од међународног значаја, пет саопштења на интернационалним конференцијама и једанаест саопштења на националним конференцијама.

1. Списак научних радова из докторске дисертације објављених у часописима са SCI-листе:

1.1 Jelena Petronijević, Zorica Bugarčić, Goran A. Bogdanović, Srđan Stefanović and Nenad Janković, „An enolate ion as a synthon in biocatalytic synthesis of 3,4-dihydro-2(1H)-quinoxalinones and 3,4-dihydro-1,4-benzoxazin-2-ones: lemon juice as an alternative to hazardous solvents and catalysts”, *Green Chem.*, 19 (2017) 707-715.

DOI: 10.1039/C6GC02893D

ISSN: 1463-9262

(IF = 9.125 за 2016. годину; 15/166; **M21a**; област: Chemistry, Multidisciplinary).

1.2 Jelena Petronijević, Nenad Janković, Tatjana P. Stanojković, Nenad Joksimović, Nađa Đ. Grozdanić, Milan Vraneš, Aleksandar Tot and Zorica Bugarčić, „Biological evaluation of selected 3,4-dihydro-2(1H)-quinoxalinones and 3,4-dihydro-1,4-benzoxazin-2-ones: Molecular docking study”, *Arch Pharm Chem Life Sci.*, **351 (2018) 1-13.**

DOI: 10.1002/ardp.201700308

ISSN: 0365-6233

(IF = 2.288 за 2017. годину; 81/166; **M22**; област: Chemistry, Multidisciplinary).

1.3 Jelena Petronijević, Nenad Joksimović, Zorica Bugarčić, Elvira Đurđić and Nenad Janković, „Experimental and computational analysis (DFT method) of some quinoxalinones and benzoxazinones: spectroscopic investigation (FT-IR, FT-Raman, UV-Vis, NMR)”, *J. Chem. Sci.*, **131 (2019) 106**

DOI: 10.1007/s12039-019-1681-y

ISSN: 0974-3626

(IF = 1.496 за 2018. годину; 113/172; **M23**; област: Chemistry, Multidisciplinary).

2. Списак осталих радова објављених у међународним часописима са SCI-листе:

2.1. Slavko Radenkovic, Jelena Kojic, Jelena Petronijevic, Marija Antic, Effect of Benzo-Annulation on Local Aromaticity in Heterocyclic Conjugated Compounds, *J. Phys. Chem. A*, **49 (2014) 11591**

DOI: 10.1021/jp507309m

ISSN: 1089-5639

(IF = 2.693 за 2014. годину; 10/34; **M21**; област: Physics, Atomic, Molecular & Chemical).

2.2. Nenad Jankovic, Srdjan Stefanovic, Jelena Petronijevic, Nenad Joksimovic, Sladjana B. Novakovic, Goran A. Bogdanovic, Jovana Muskinja, Milan Vranes, Zoran Ratkovic, and Zorica M Bugarcic „Water-tuned tautomer-selective tandem synthesis of the 5,6-dihydropyrimidin-4(3H)-ones driven under the umbrella of the sustainable chemistry”, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **6 (2018) 13358**

DOI: 10.1021/acssuschemeng.8b03127

ISSN: 2168-0485

(IF = 6.140 за 2017. годину; 10/137; **M21a**; област: Engineering, Chemical).

- 2.3. Jelena M. Petronijević, Nenad Janković and Zorica Bugarčić** „Synthesis of Quinoxaline-Based Compounds and Their Antitumor and Antiviral Potential”, *Mini Rev.Org. Chem.*, **15** (2018) 220
DOI: 10.2174/1570193X14666171201143357
ISSN: 1570-193X
(IF = 1.120 за 2018. годину; 43/57; **M23**; област: Chemistry, Organic).
- 2.4. Marijana Gavrilović, Nenad Janković, Ljubinka Joksović, Jelena Petronijević, Nenad Joksimović, Zorica Bugarčić** „Water ultrasound-assisted oxidation of 2-охо-1,2,3,4-tetrahydropyrimidines and benzylic acid salts”, *Environ. Chem. Lett.*, **16** (2018) 1501
DOI: 10.1007/s10311-018-0766-z
ISSN: 1610-3653
(IF = 4.617 за 2018. годину; 42/251; **M21**; област: Environmental Sciences)
- 2.5. Nenad Janković, Jovana Trifunović Ristovski, Milan Vraneš, Aleksandar Tot, Jelena Petronijević, Nenad Joksimović, Tatjana Stanojković, Marija Đorđić Crnogorac, Nina Petrović, Ivana Boljević, Ivana Z. Matic, Goran A. Bogdanović, Momir Mikov, Zorica Bugarčić** „Discovery of the Biginelli hybrids as novel caspase-9 activators in apoptotic machines: Lipophilicity, molecular docking study, influence on angiogenesis gene and miR-21 expression levels”, *Bioorg. Chem.*, **86** (2019) 569
DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.02.026
ISSN: 0045-2068
(IF = 3.926 за 2018. годину; 13/57; **M21**; област: Chemistry, Organic)
- 2.6. Nenad Joksimović, Jelena Petronijević, Nenad Janković, Dejan Baskić, Suzana Popović, Danijela Todorović, Sanja Matic, Goran A. Bogdanović, Milan Vraneš, Aleksandar Tot, Zorica Bugarčić** „Synthesis, characterization, anticancer evaluation and mechanisms of cytotoxic activity of novel 3-hydroxy-3-pyrrolin-2-ones bearing thenoyl fragment: DNA, BSA interactions and molecular docking study”, *Bioorg. Chem.*, **88** (2019) 102954
DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.102954
ISSN: 0045-2068
(IF = 3.926 за 2018. годину; 13/57; **M21**; област: Chemistry, Organic)
- 2.7. Nenad Joksimović, Nenad Janković, Jelena Petronijević, Dejan Baskić, Suzana Popovic, Danijela Todorović, Milan Zarić, Olivera Klisurić, Milan Vraneš, Aleksandar Tot and Zorica Bugarčić** „Synthesis, anticancer evaluation and synergistic effects with cisplatin of novel palladium complexes: DNA, BSA interactions and molecular docking study”, *Med. Chem.*, (2019)

DOI: 10.2174/1573406415666190128095732

ISSN: 1573-4064

(IF = 2.530 за 2018. годину; 31/61; **M22**; област: Chemistry, Medicinal)

- 2.8.** Nenad Joksimović, **Jelena Petronijević**, Nenad Janković, Marijana Kosanić, Dušan Milivojević, Milan Vraneš, Aleksandar Tot, Zorica Bugarčić, „Synthesis, characterization, antioxidant activity of β -diketonates, and effects of coordination to copper(II) ion on their activity: DNA, BSA interactions and molecular docking study”, *Med. Chem.*, (2019)

DOI: 10.2174/1573406415666191024102520

ISSN: 1573-4064

(IF = 2.530 за 2018. годину; 31/61; **M22**; област: Chemistry, Medicinal)

3. Списак саопштења на међународним (M34) конференцијама штампаним у изводу:

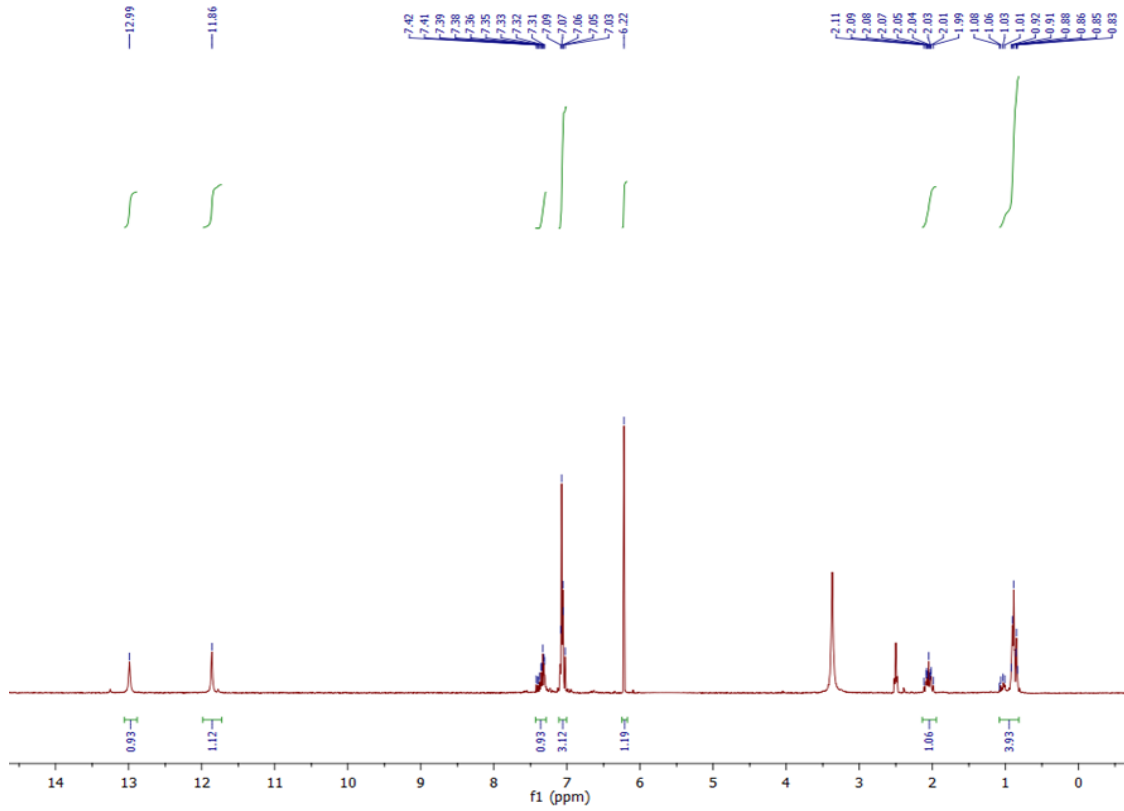
- 3.1.** Nenad Janković, Vesna Stanojlović, **Jelena Petronijević**, Ninko Radenković, „The synthesis and characterization of novel 3,4-dihydroquinoxalin-2(1H)-ones”, 22nd Young Research Fellows Meeting, 2015, Paris, France, February, 4-6, PO-033.
- 3.2.** **Jelena Petronijević**, Nenad Joksimović, Nenad Janković, Vera Divac, „Synthesis of 3,4-dihydro-2(1H)-quinoxalinones-based potential pharmacophores in lemon juice“, 24th Young Research Fellows Meeting, 2017, Paris, France, February, 8-10, PO-083.
- 3.3.** Nenad Joksimović, **Jelena Petronijević**, Nenad Janković, Vesna Stanojlović, „BSA binding study of copper(II) complexes with 2-hydroxy-4-aryl-4-oxo-2-butenolate and their effects on apoptosis and cell cycle in A549 cell line“, 24th Young Research Fellows Meeting, 2017, Paris, France, February, 8-10, PC-069.
- 3.4.** **Jelena Petronijević**, Nenad Joksimović, Emilija Milović and Nenad Janković, „Biginelli hybrids as antitumor agents: mechanism of action“, 6th EFMC Young Medicinal Chemist Symposium, 2019, Athens, Greece, September, 5-6, P-074.
- 3.5.** Nenad Joksimović, **Jelena Petronijević**, Emilija Milović and Nenad Janković, „Synthesis, anticancer evaluation and mechanism of cytotoxic activity of 3-hydroxy-3-pyrrolin-2-ones bearing thenoyl fragment“, 6th EFMC Young Medicinal Chemist Symposium, 2019, Athens, Greece, September, 5-6, P-042.

4. Списак саопштења на националним (М64) конференцијама штампаним у изводу:
- 4.1. Nenad Janković, Vesna Stanojlović, **Jelena Petronijević**, Nenad Joksimović, Zorica Bugarčić, Functionalization of 2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine and synthesis of novel chalcones under solvent-free conditions, *52nd Meeting of the Serbian Chemical Society, Novi Sad, Republic of Serbia, May 29-30, 2015, Book of Abstracts, OH P07, p. 121.*
- 4.2. Nenad Joksimović, Nenad Janković, Vesna Stanojlović, **Jelena Petronijević**, Synthesis and characterization of novel pyrimidine tricyclic derivatives, *Treća konferencija mladih hemičara Srbije, 2015, Beograd, 24. oktobar, Srpsko hemijsko drustvo, Book of Abstracts, HS P08, p. 35.*
- 4.3. **Jelena Petronijević**, Nenad Joksimović, Vesna Stanojlović, Nenad Janković, Meldrum's acid as a C2-sinton, *Treća konferencija mladih hemičara Srbije, 2015, Beograd, 24. oktobar, Srpsko hemijsko drustvo, Book of Abstracts, HS P11, p. 38.*
- 4.4. Nenad Janković, Vesna Stanojlović, **Jelena Petronijević**, Nenad Joksimović, Synthesis of novel Biginelli analogs with 1,3-thiazine ring, *Treća konferencija mladih hemičara Srbije, 2015, Beograd, 24. oktobar, Srpsko hemijsko drustvo, Book of Abstracts, HS P13, p. 40.*
- 4.5. Nenad Janković, Vesna Stanojlović, **Jelena Petronijević**, Nenad Joksimović, Snežana Đorđević, Vera Divac, Marina Rvović, Zorica Bugarčić, Application of acyl pyruvates in synthetic chemistry, *53rd Meeting of the Serbian Chemical Society, Kragujevac, Republic of Serbia, Jun 10-11, 2016, Book of Abstracts, OH P16, p. 114.*
- 4.6. Marina D. Kostić, Vera M. Divac, Nenad Ž. Janković, **Jelena M. Petronijević**, Kinetic and mechanistic studies of triethylamine-catalyzed phenylselenolactonization of 4-pentenoic acid, *53rd Meeting of the Serbian Chemical Society, Kragujevac, Republic of Serbia, Jun 10-11, 2016, Book of Abstracts, OH P08, p. 106.*
- 4.7. **Jelena M. Petronijević**, Nenad Janković, Zorica Bugarčić, Biocatalytic synthesis of novel 2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalines and benzo[b][1,4]oxazin-2-ones: lemon juice as an alternative to hazardous solvents and catalysts, *Četvrta konferencija mladih hemičara Srbije, 2016, Beograd, 5. novembar, Srpsko hemijsko drustvo, Book of Abstracts, HS P23, p. 59.*
- 4.8. **Jelena M. Petronijević**, Nenad Joksimović, Marina Kostić, Vera Divac and Nenad Janković, Biološka aktivnost 3,4-dihidro-2(1H)-hinoksalinona i 3,4-dihidro-1,4-

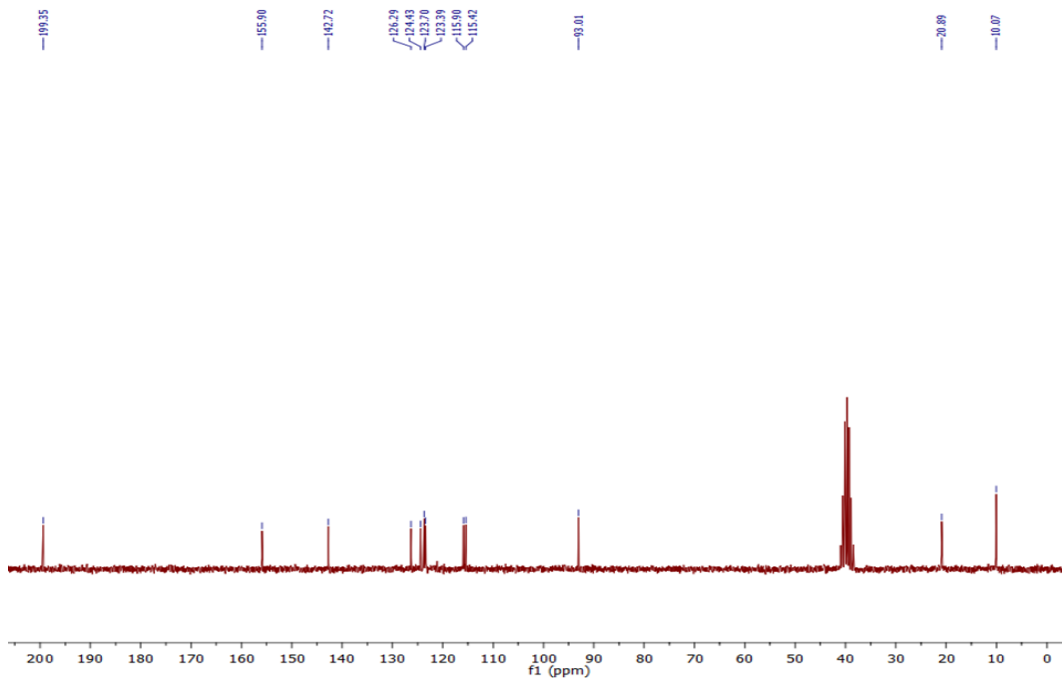
benzoksazin-2-ona, 55th Meeting of the Serbian Chemical Society, Novi Sad, Republic of Serbia Jun 8-9, 2018, Book of Abstracts, OH P11, p. 99.

- 4.9. Emilija Milović, Nenad Joksimović, **Jelena Petronijević**, Nenad Janković, Green synthesis of bicyclic thiazolo-pyrimidines, *Sedma konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 2. november 2019, Book of Abstracts, CS PP 06.*
- 4.10. Nenad Joksimović, **Jelena Petronijević**, Emilija Milović, Nenad Janković, Antioxidant activity of β -diketonates and effects of coordination to copper(II) ion on their activity, *Sedma konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 2. november 2019, Book of Abstracts, MC PP 01.*
- 4.11. **Jelena Petronijević**, Nenad Joksimović, Emilija Milović, Nenad Janković, Experimental and computational analysis (DFT method) of some quinoxalinones and benzoxazinones, *Sedma konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 2. november 2019, Book of Abstracts, TC PP 01.*

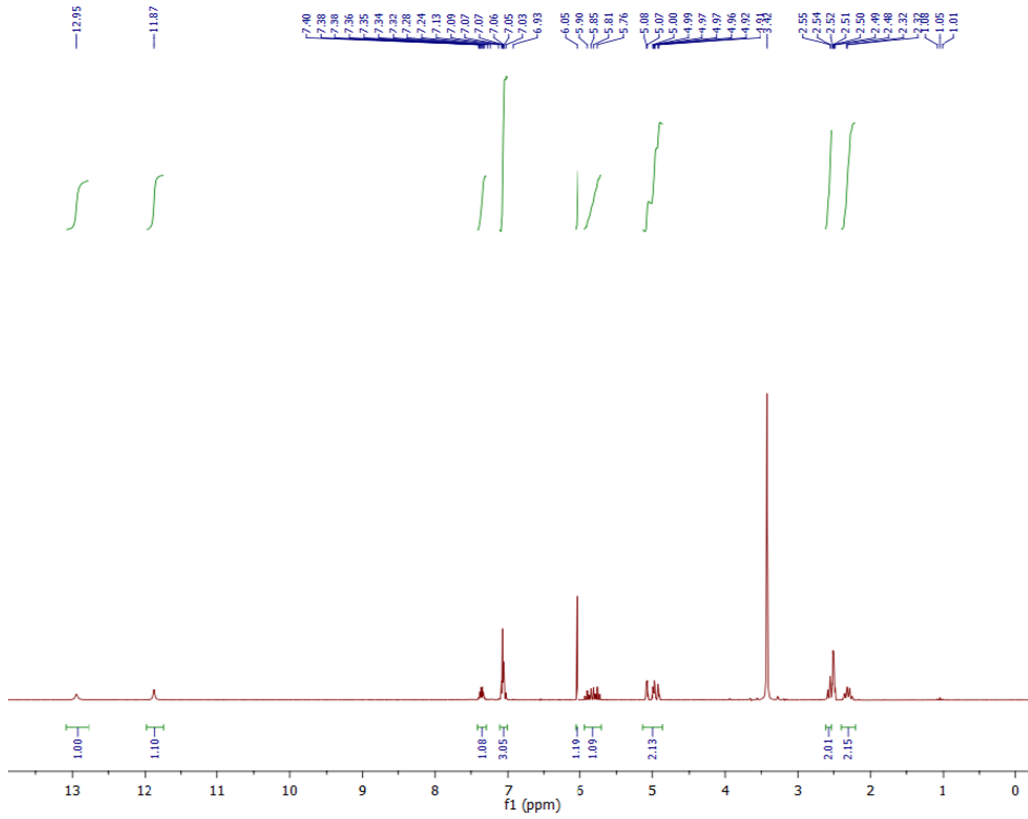
7. ПРИЛОГ



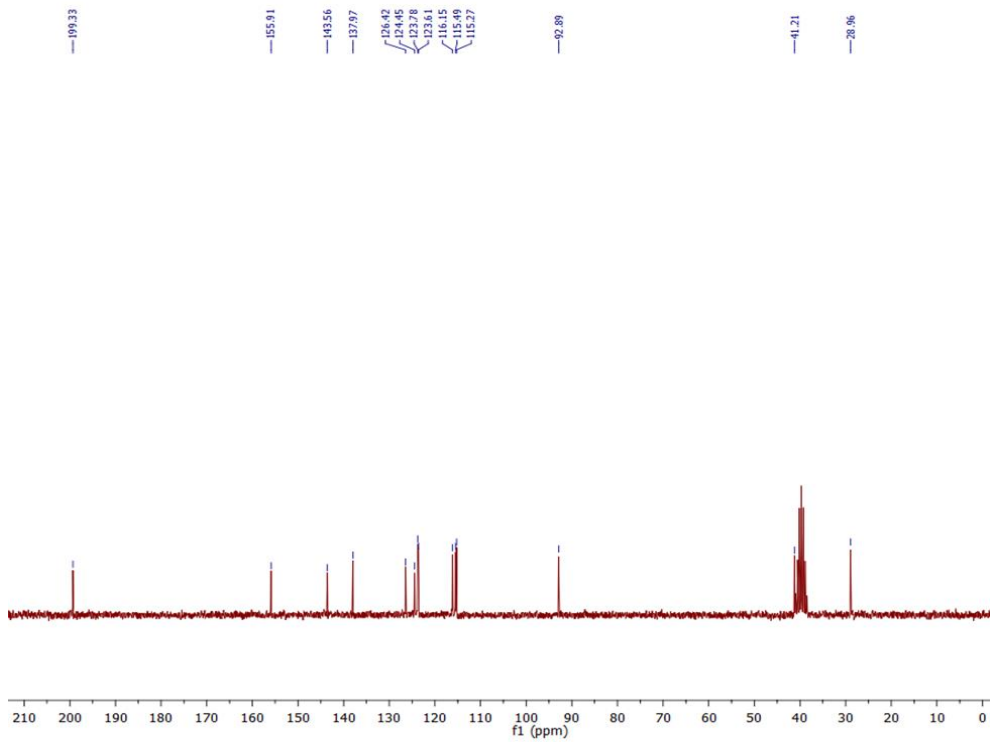
^1H NMR спектар једињења **5a**



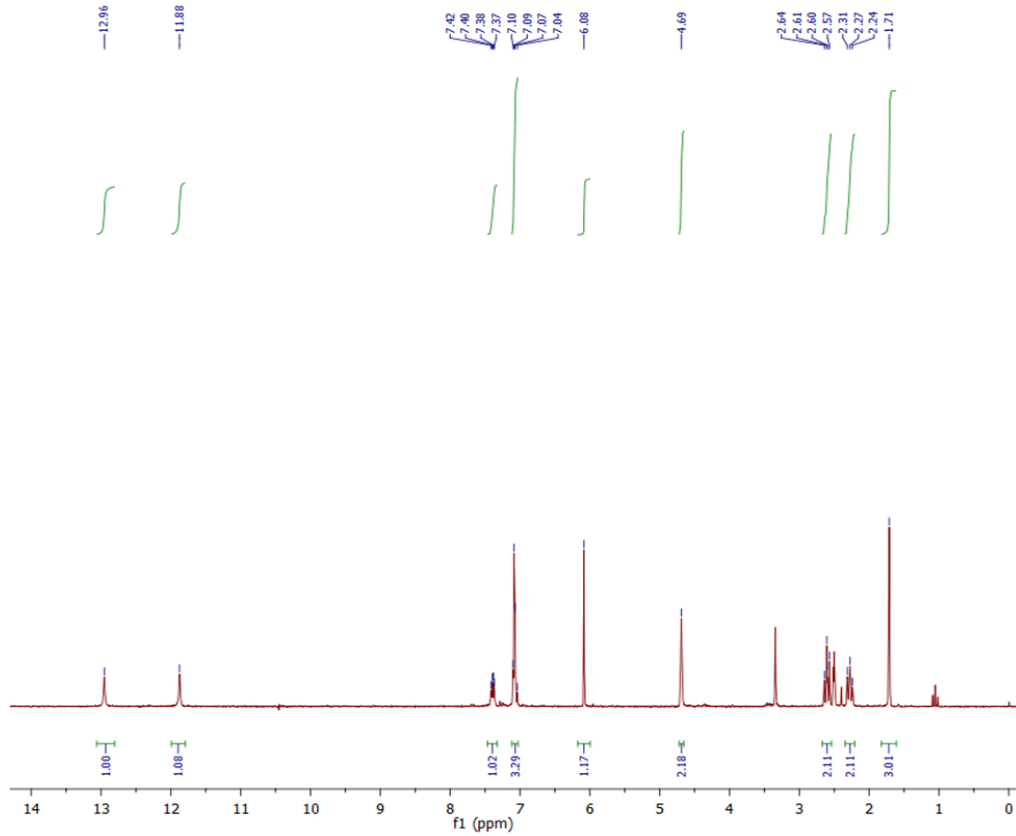
^{13}C NMR спектар једињења **5a**



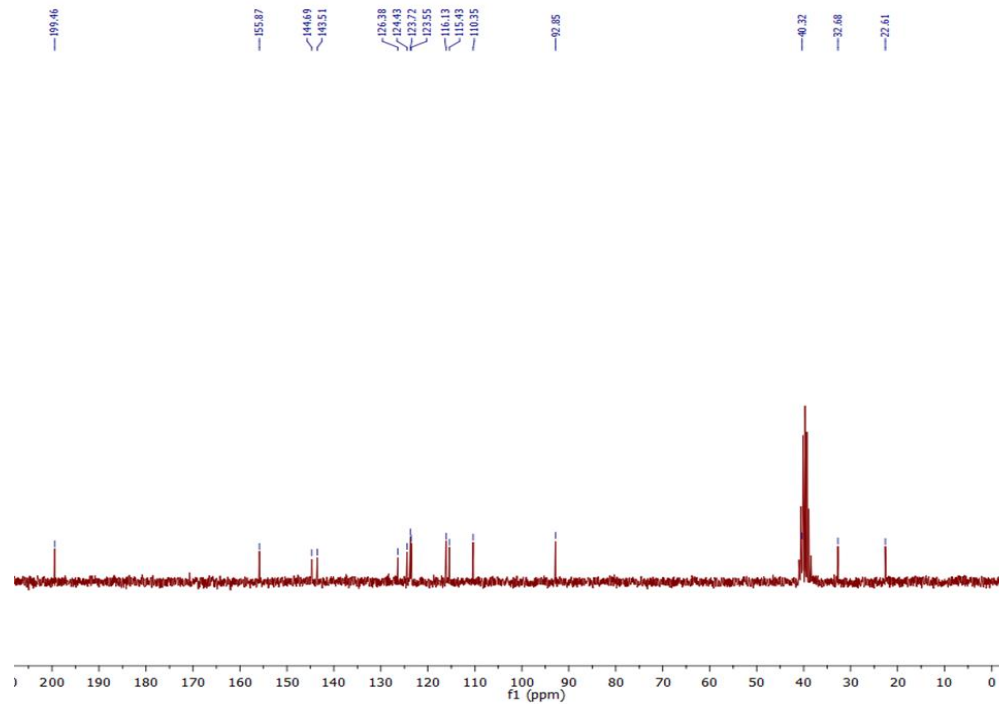
^1H NMR спектар једињења **5b**



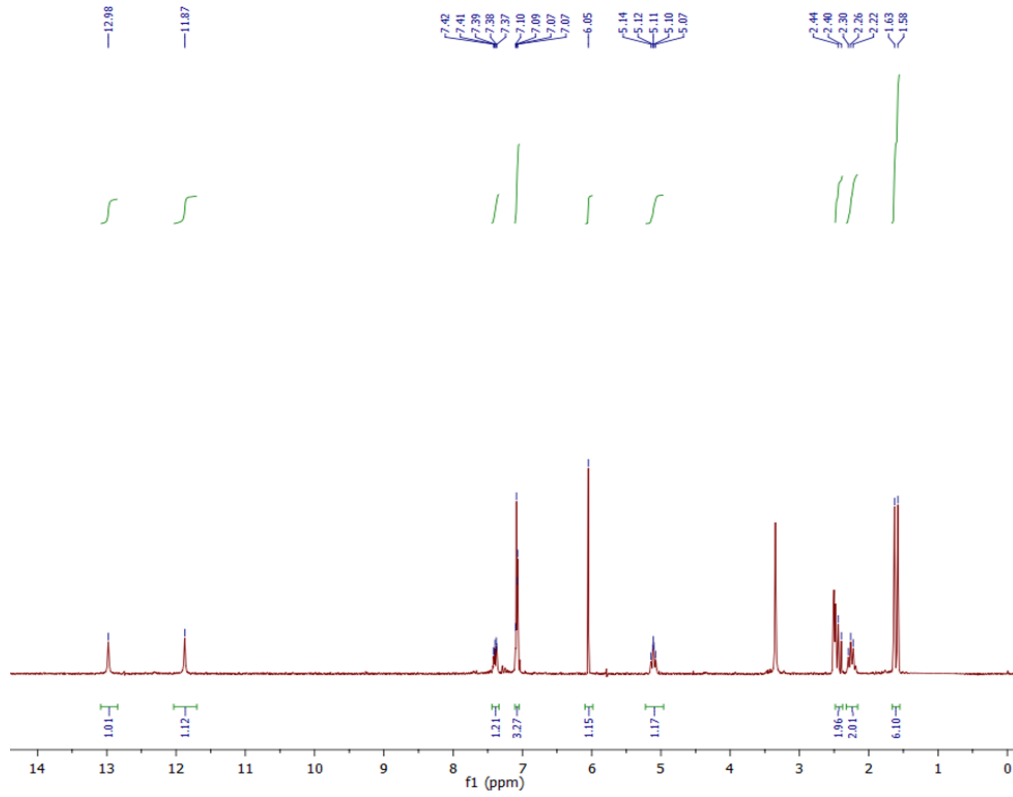
^{13}C NMR спектар једињења **5b**



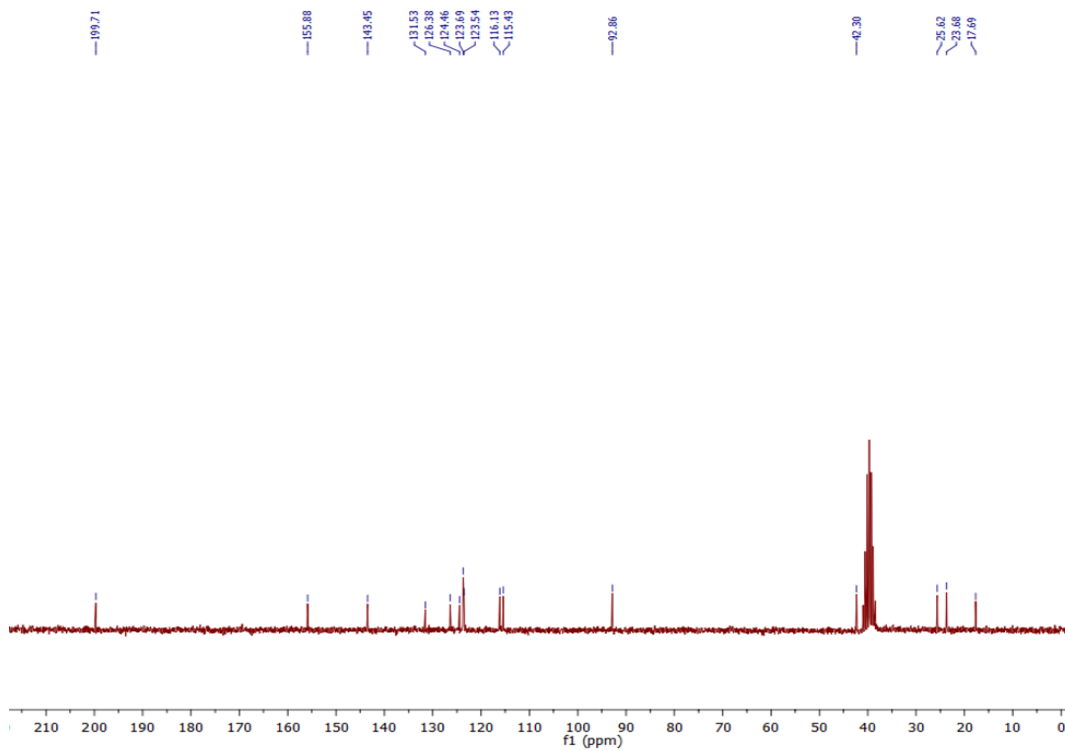
¹H NMR спектар једињења 5c



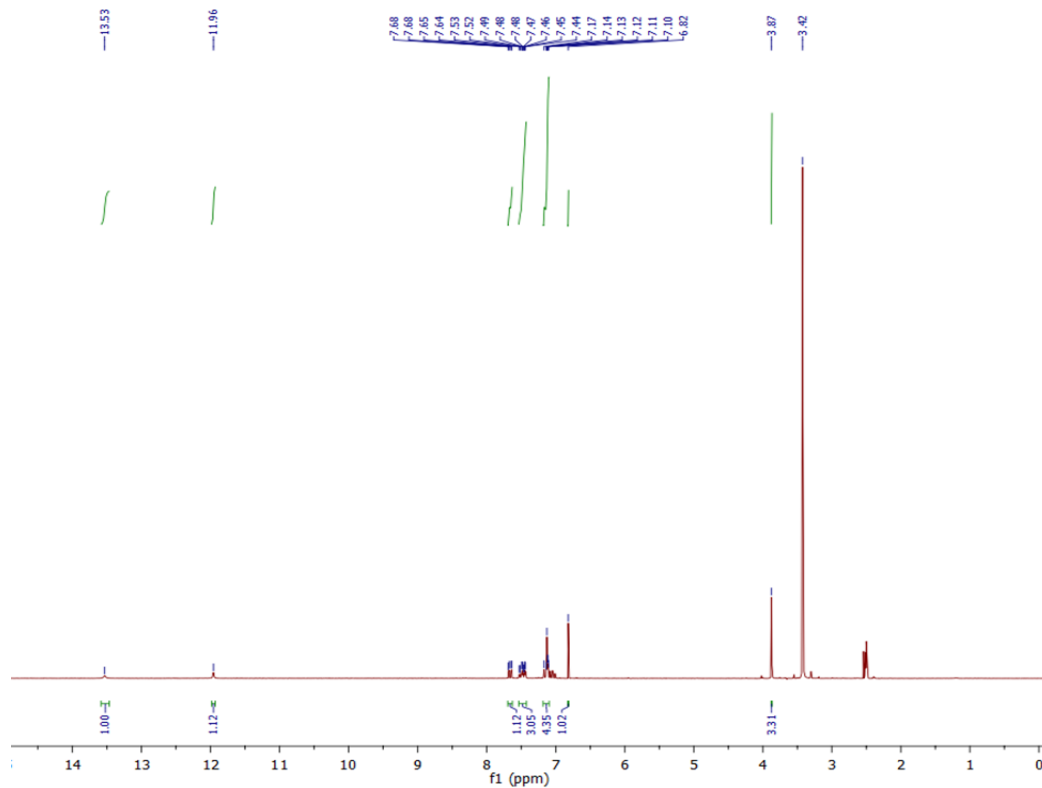
¹³C NMR спектар једињења 5c



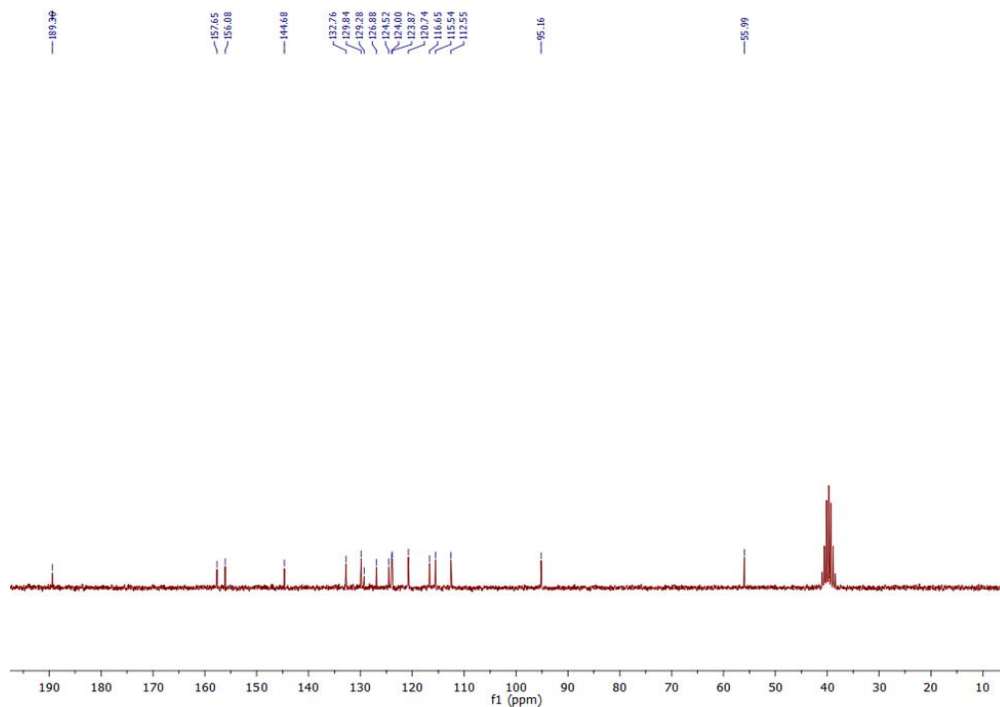
¹H NMR спектар једињења **5d**



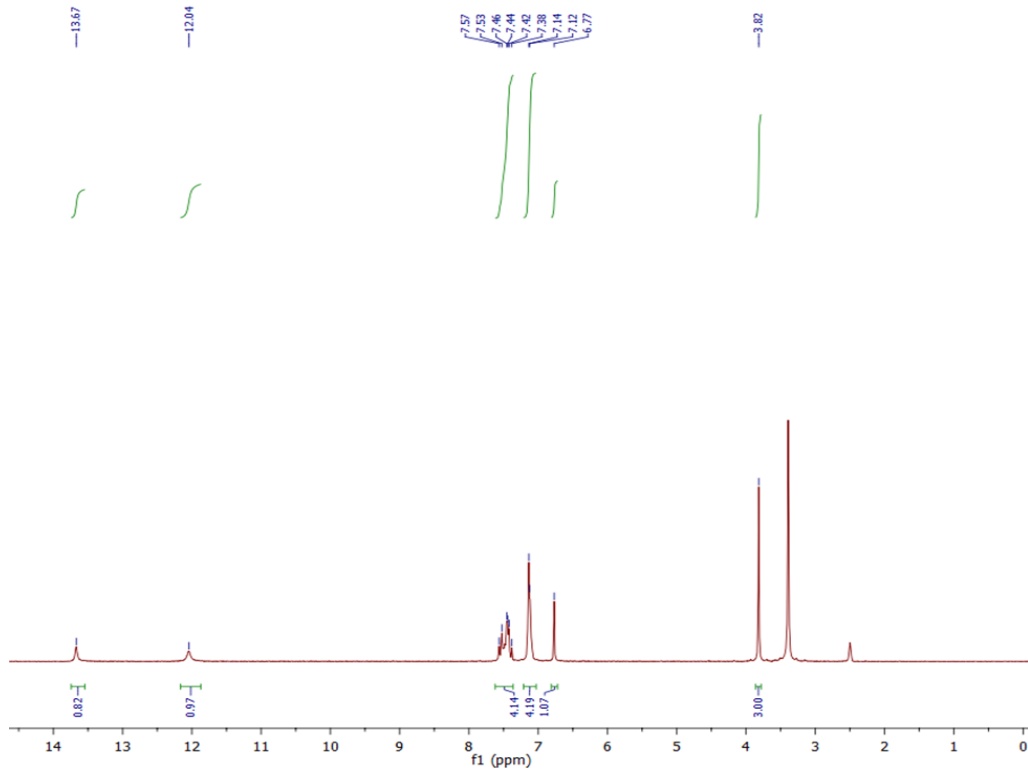
¹³C NMR спектар једињења **5d**



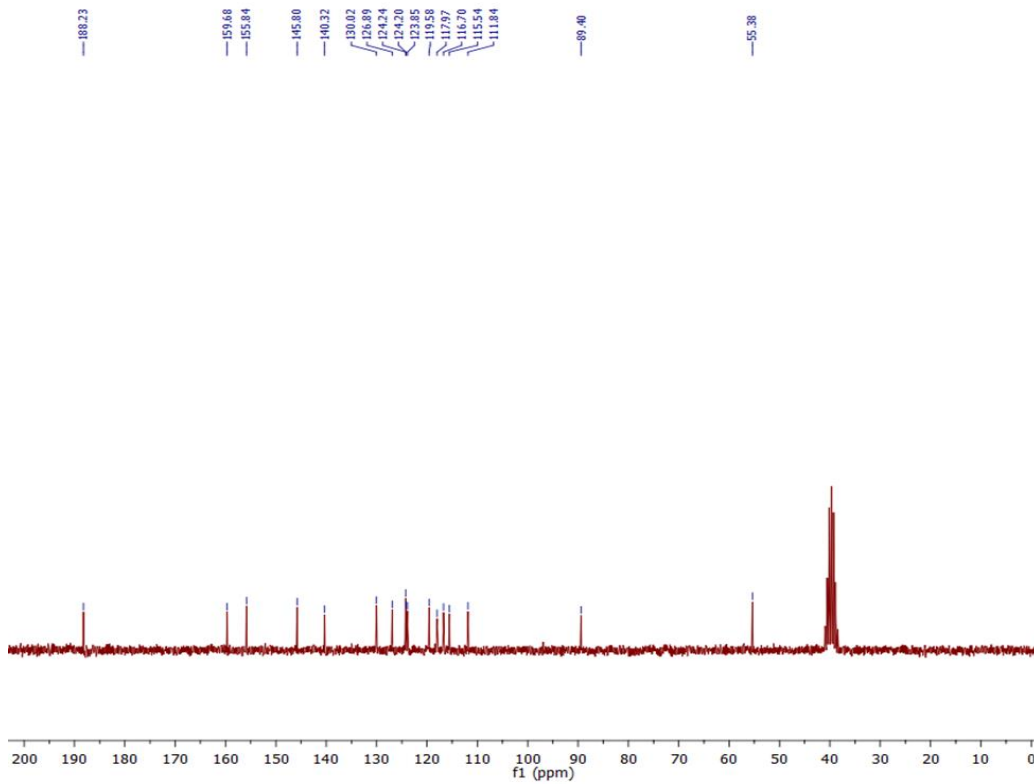
^1H NMR спектар једињења **5e**



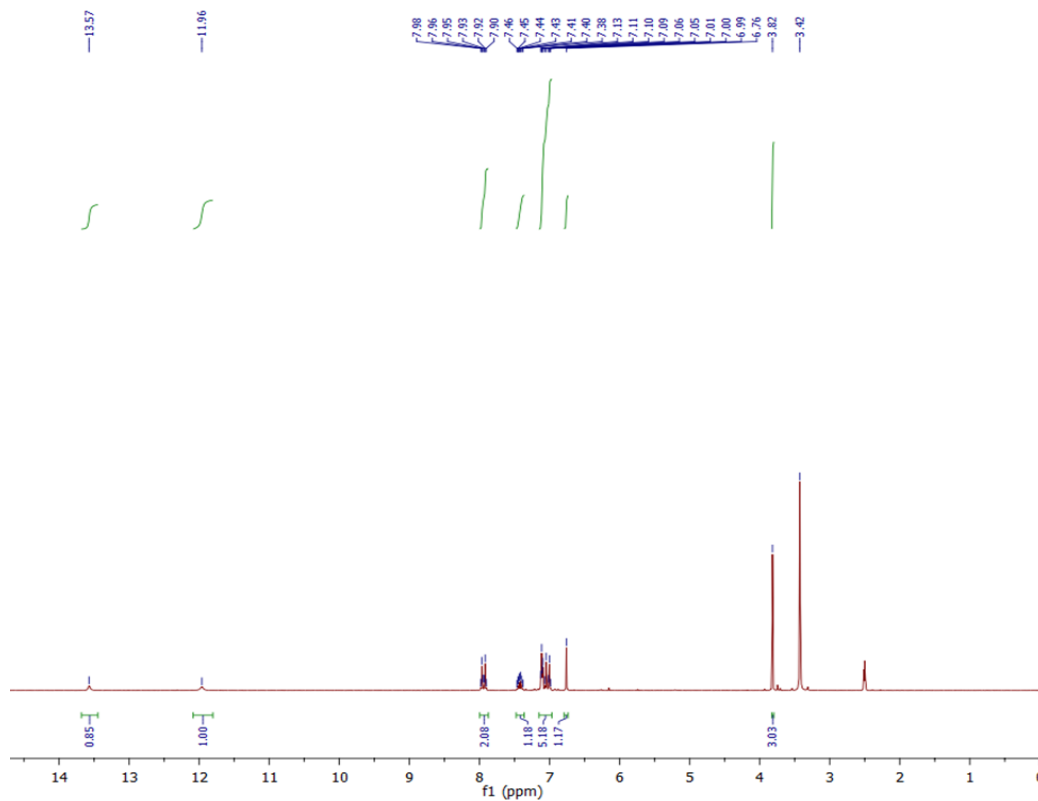
^{13}C NMR спектар једињења **5e**



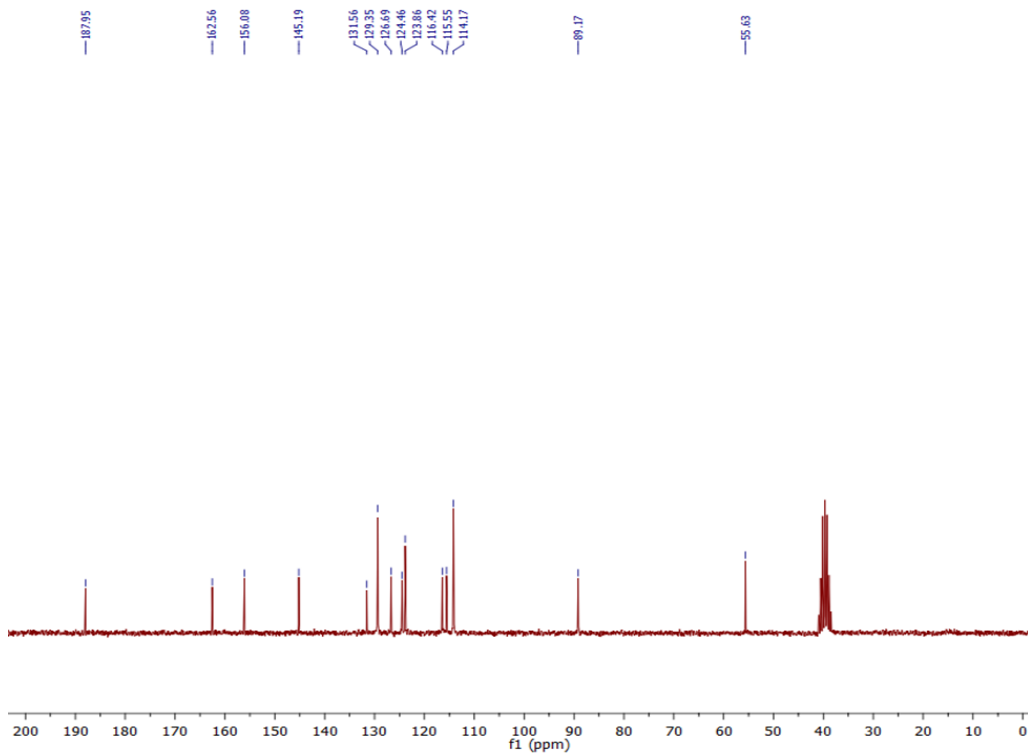
^1H NMR спектар једињења **5f**



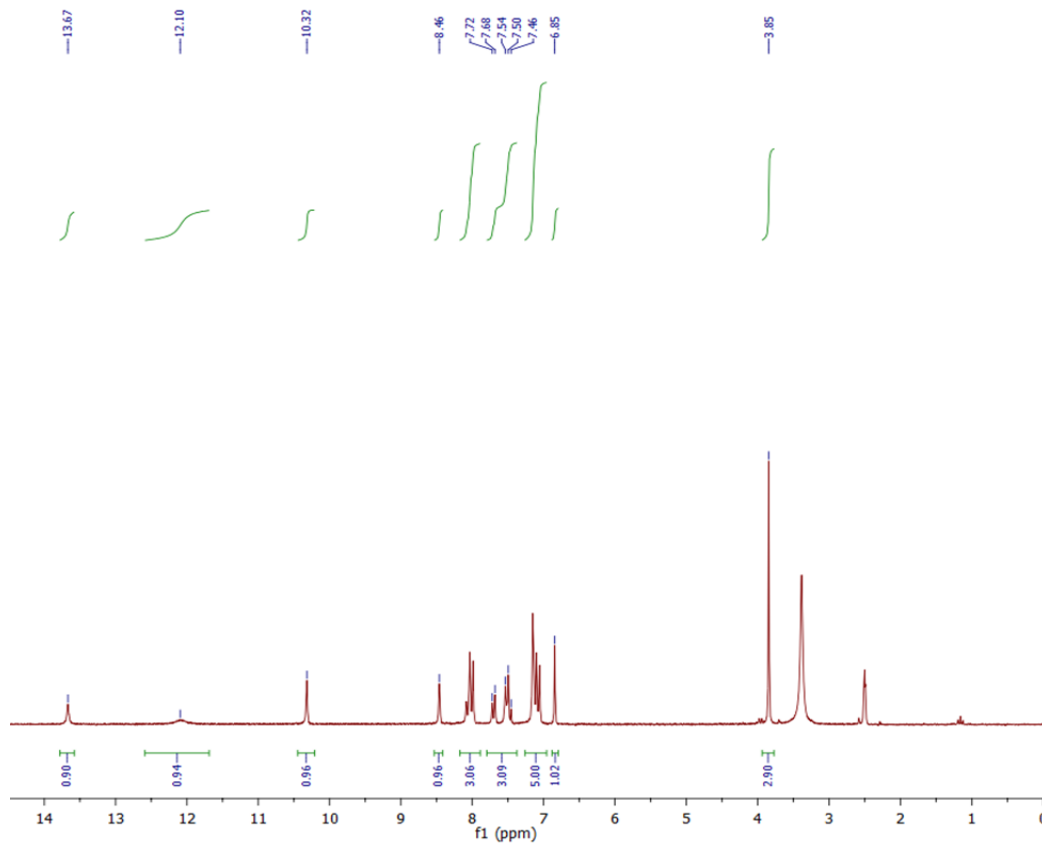
^{13}C NMR спектар једињења **5f**



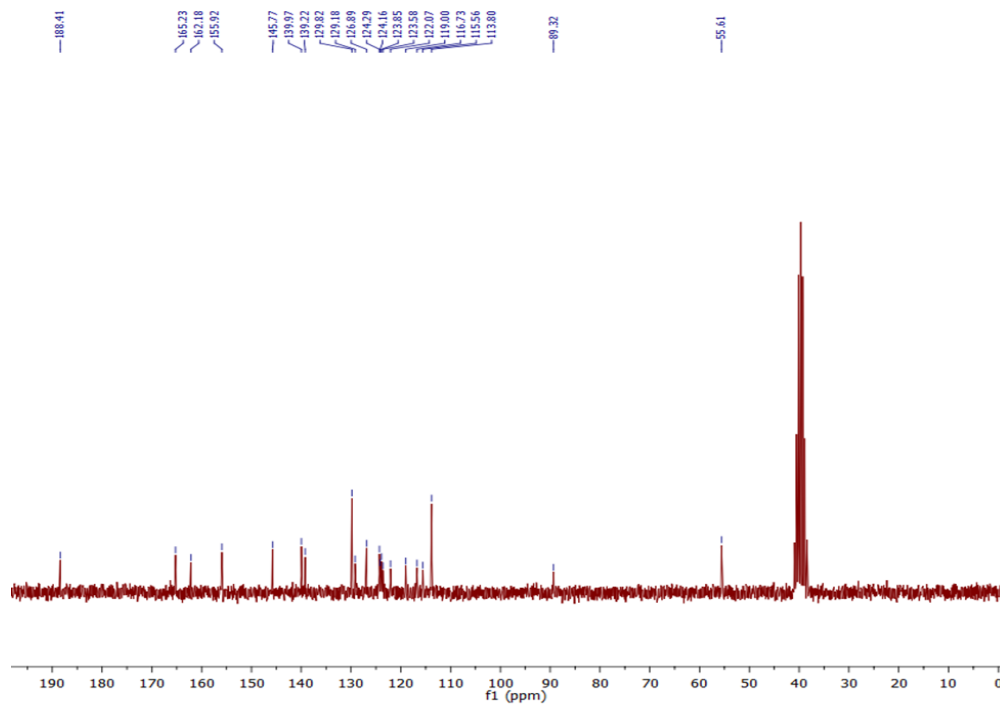
^1H NMR спектар једињења **5g**



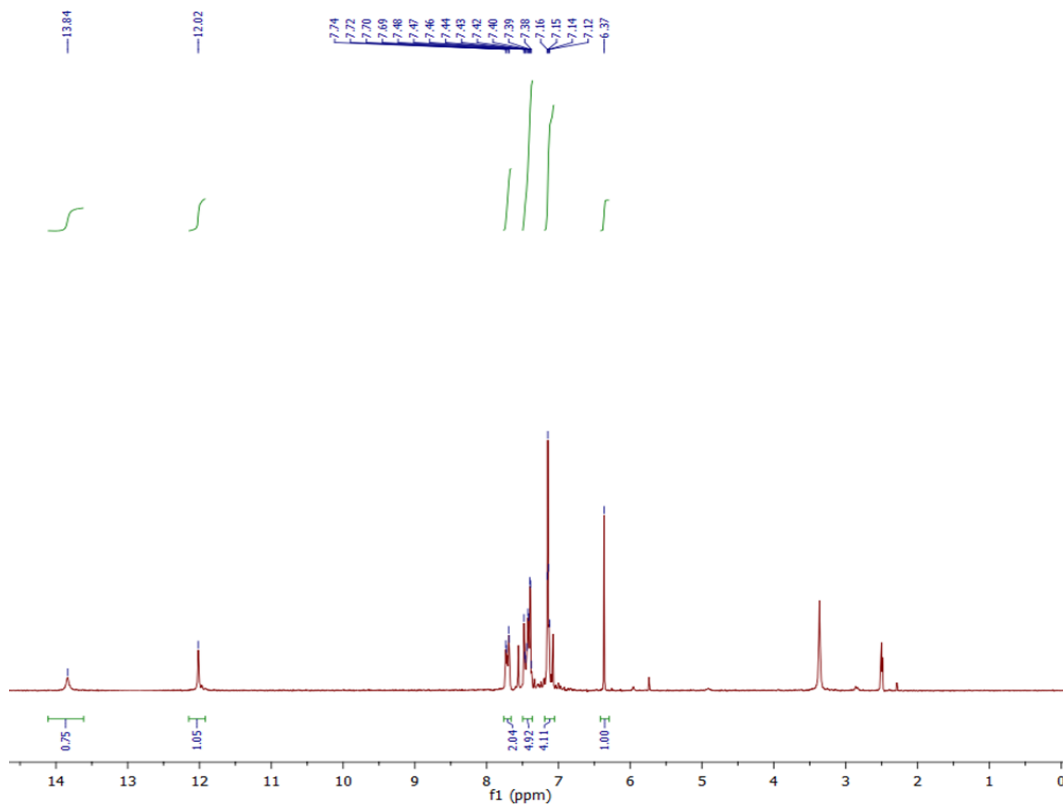
^{13}C NMR спектар једињења **5g**



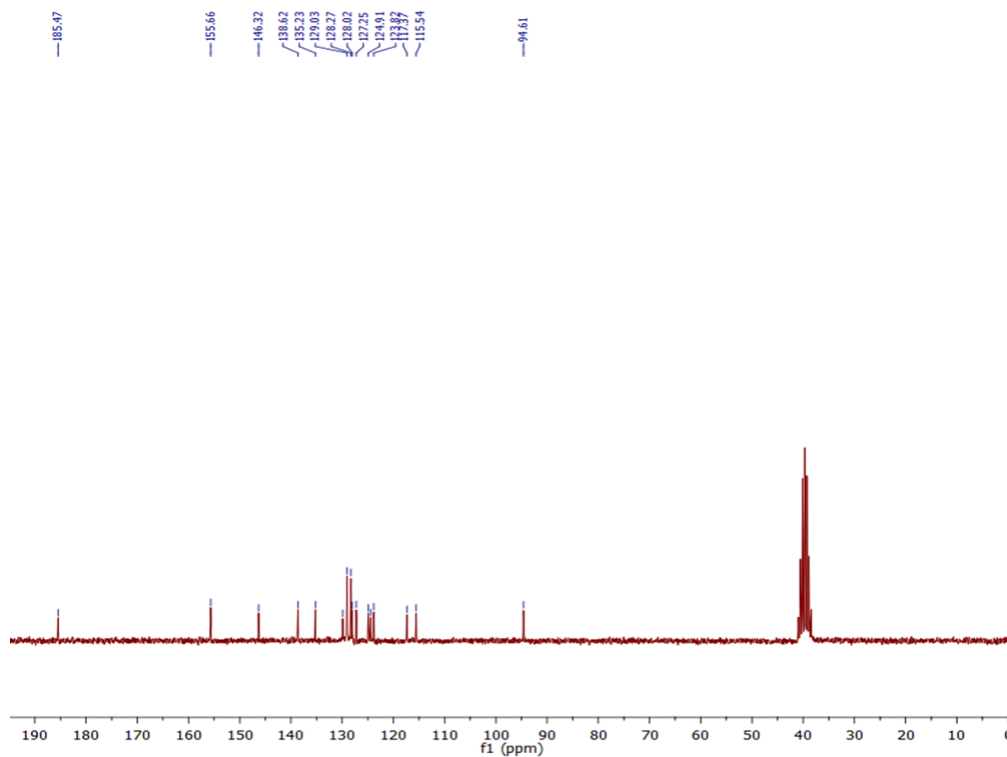
^1H NMR спектар једињења **5h**



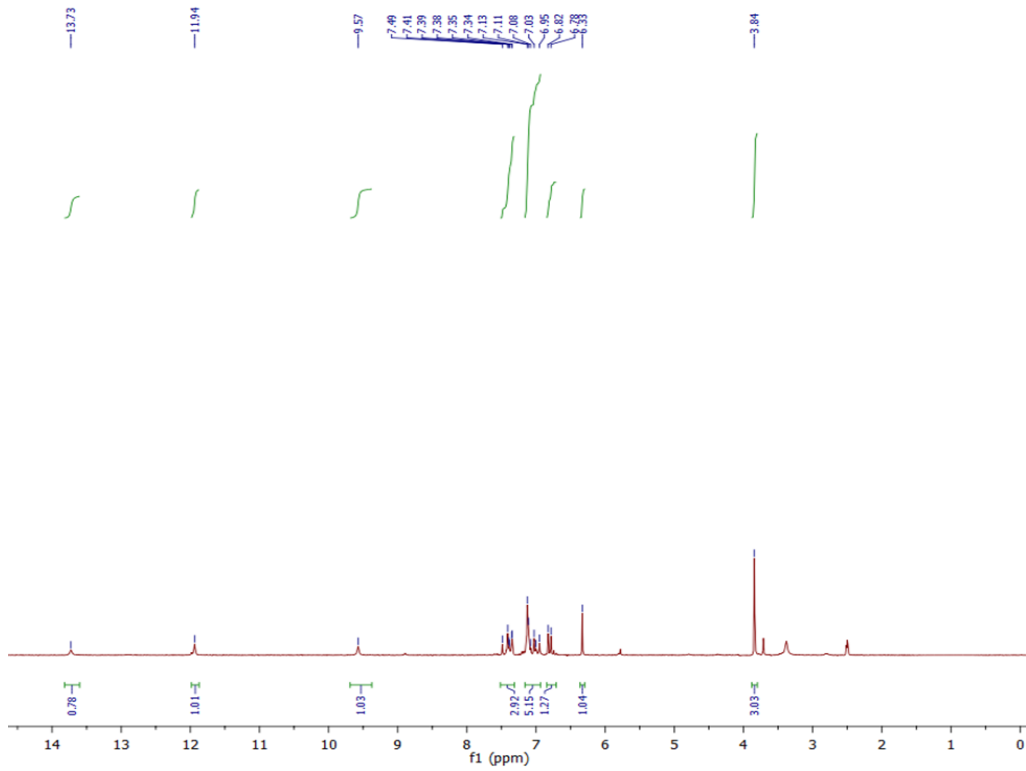
^{13}C NMR спектар једињења **5h**



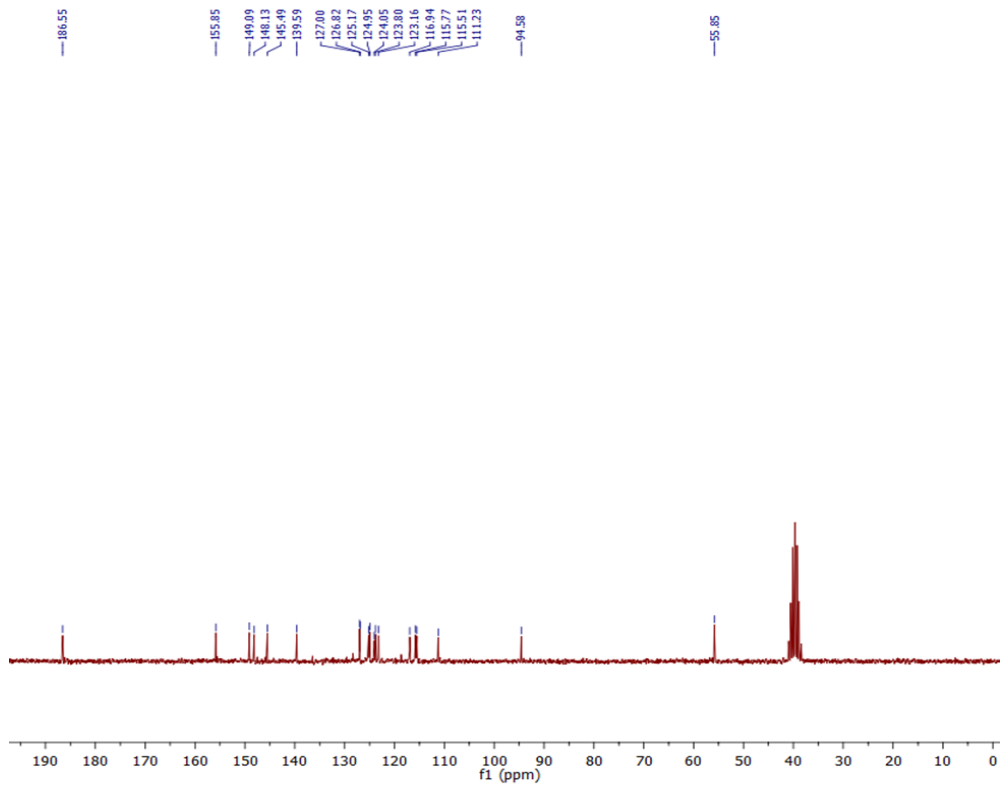
^1H NMR спектар једињења **5i**



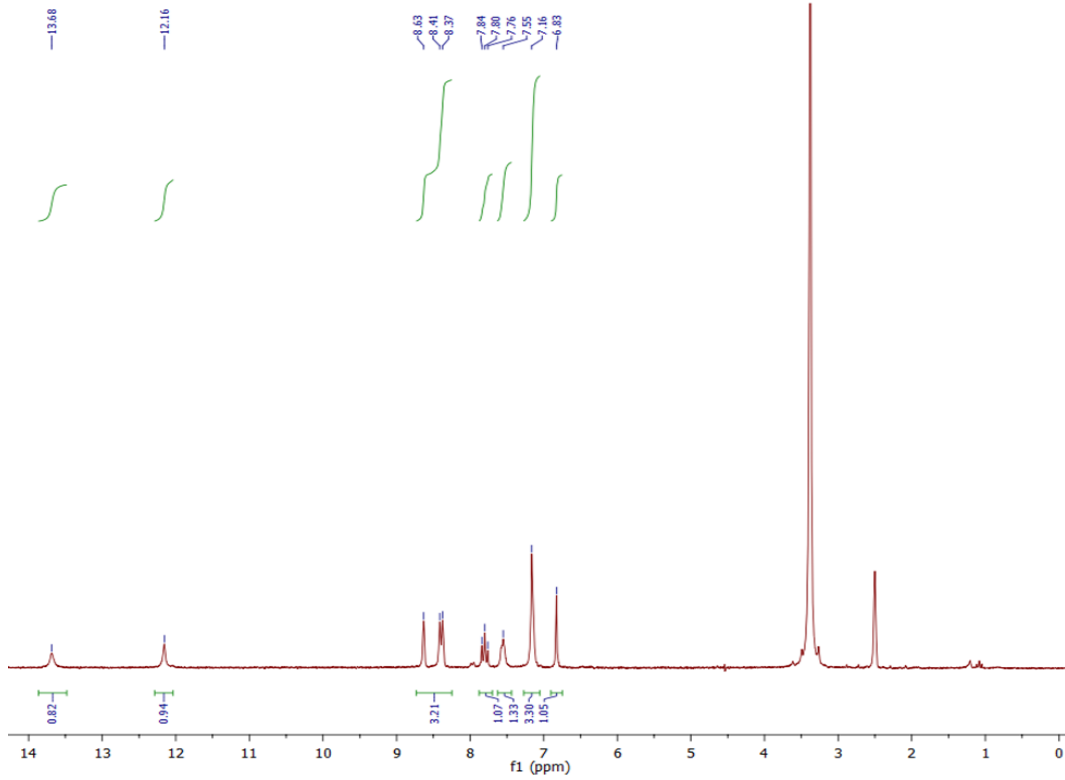
^{13}C NMR спектар једињења **5i**



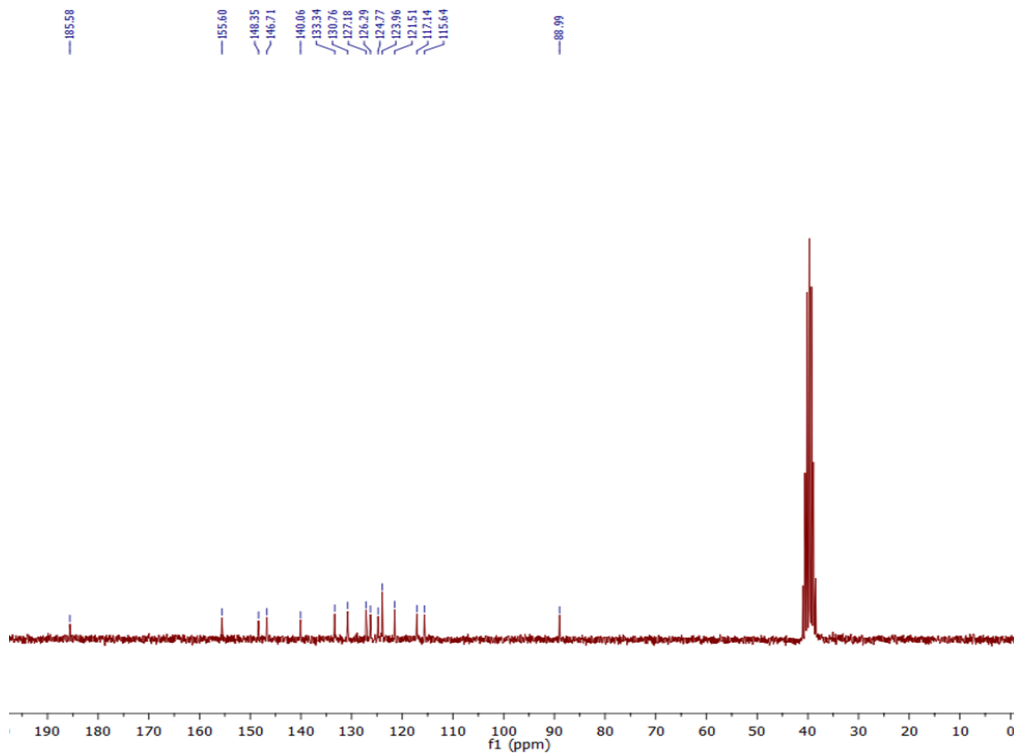
^1H NMR спектар једињења **5j**



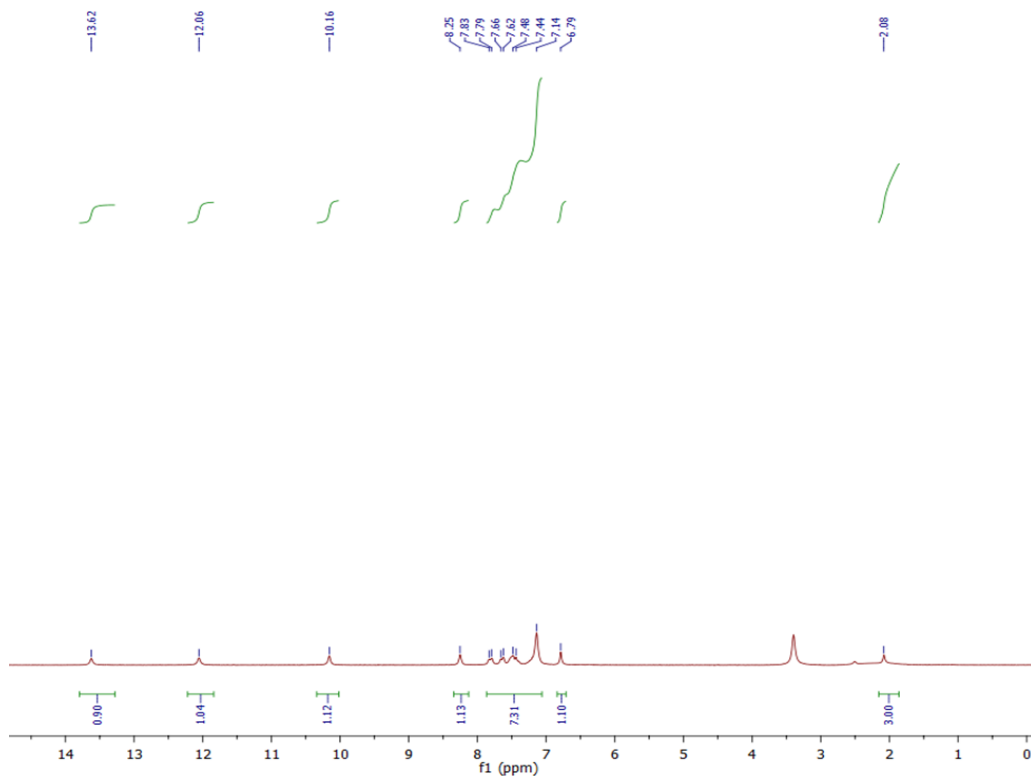
^{13}C NMR спектар једињења **5j**



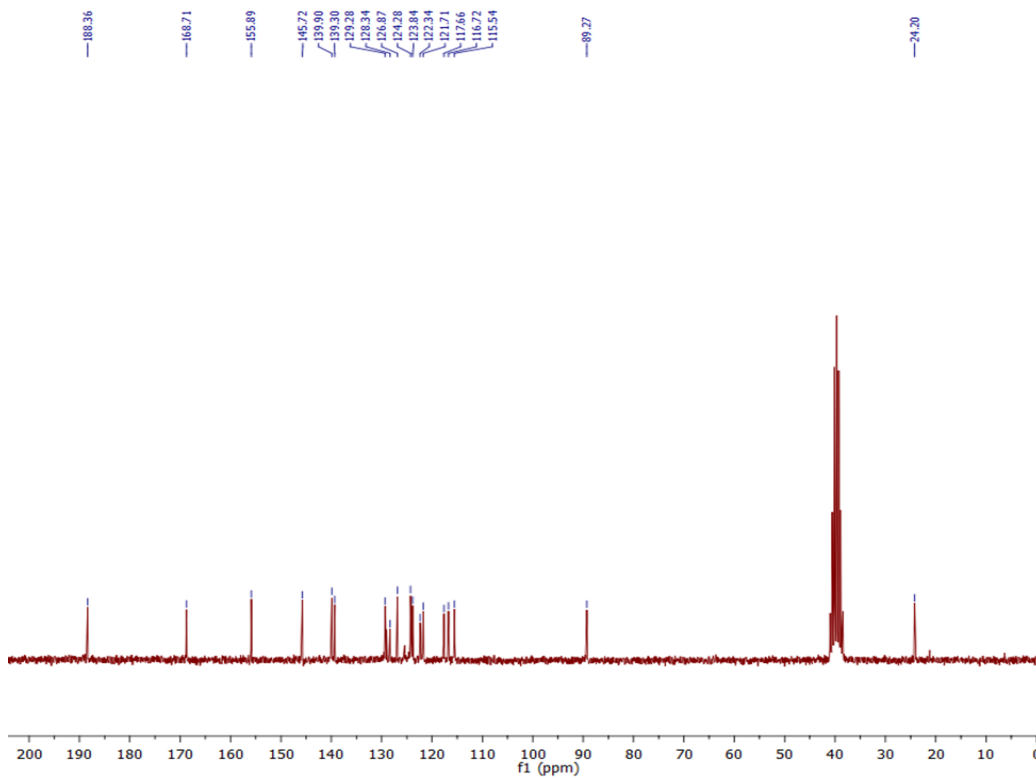
^1H NMR спектар једињења **5k**



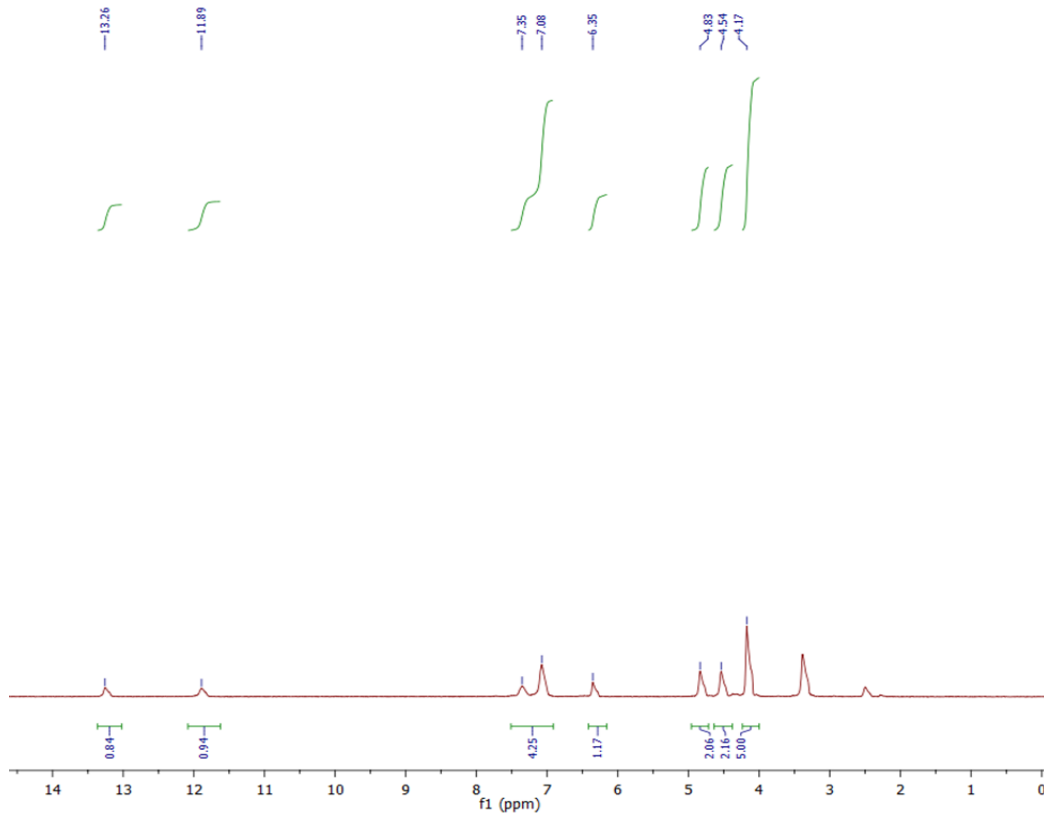
^{13}C NMR спектар једињења **5k**



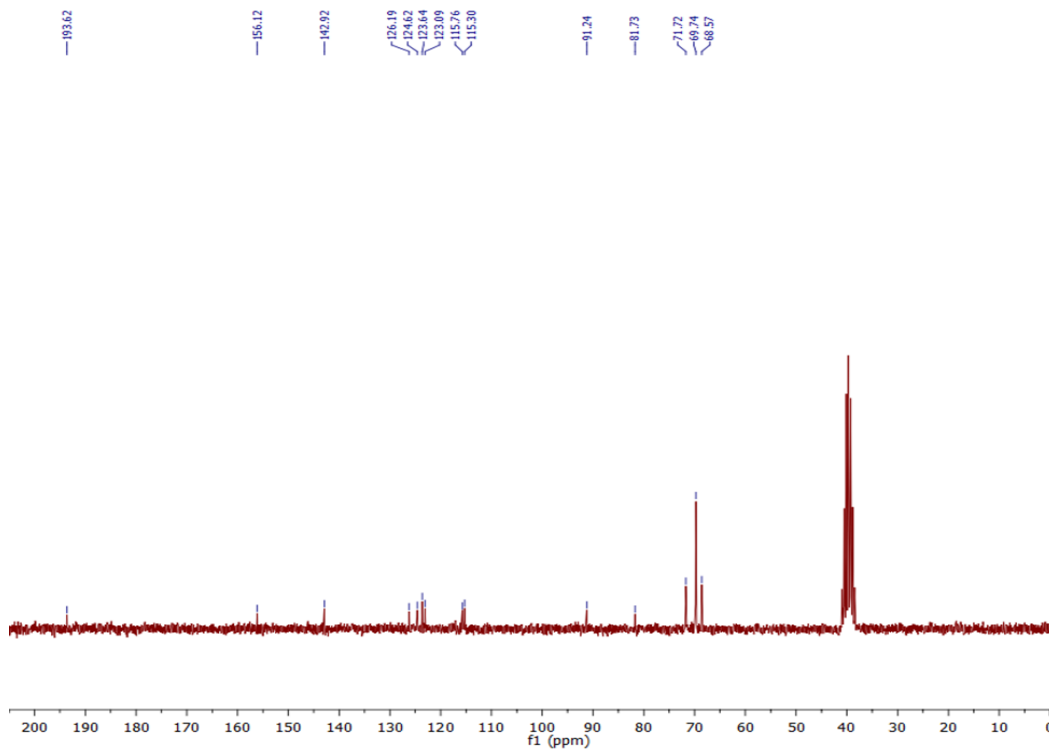
^1H NMR спектар једињења **51**



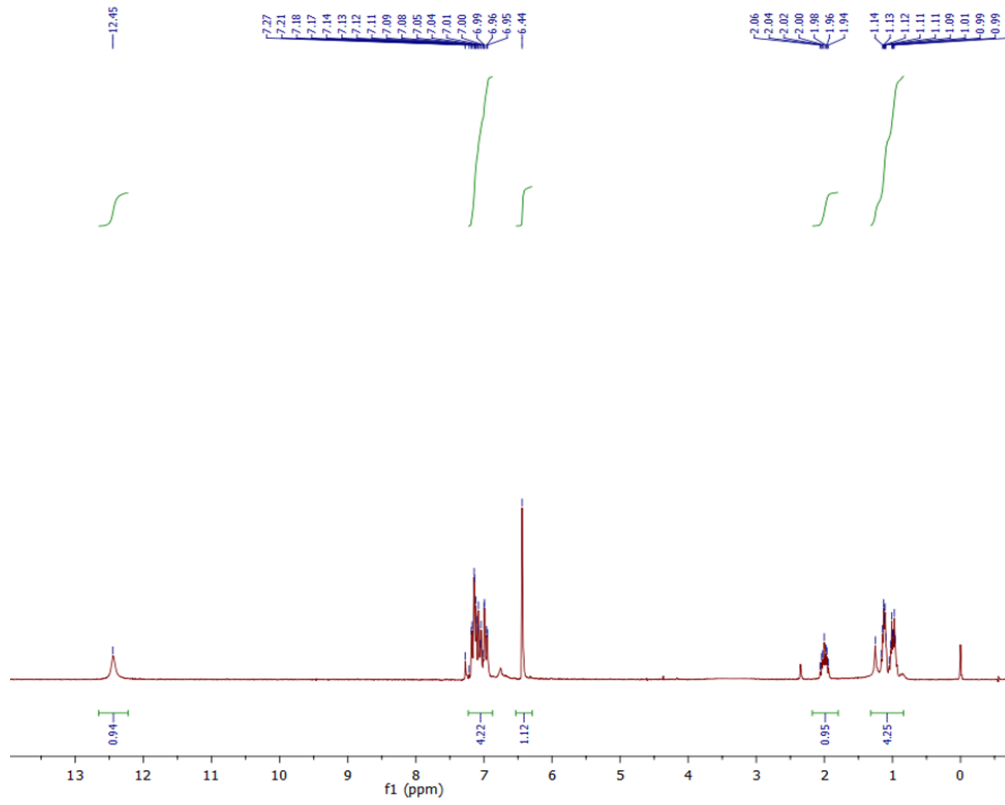
^{13}C NMR спектар једињења **51**



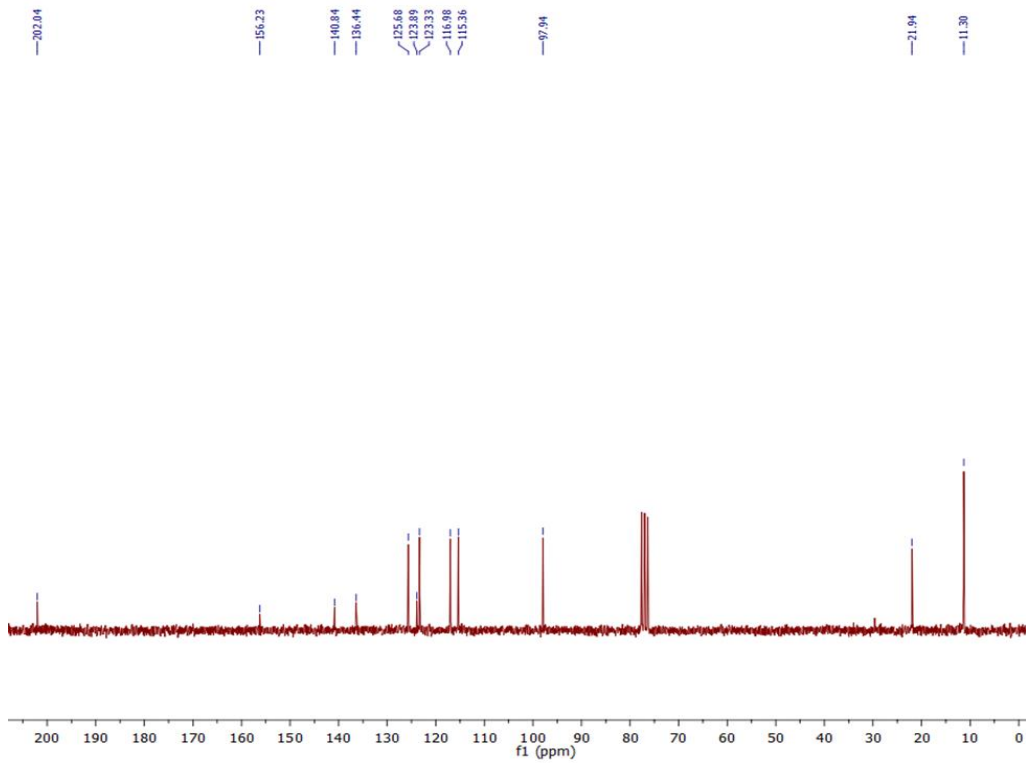
^1H NMR спектар једињења **5m**



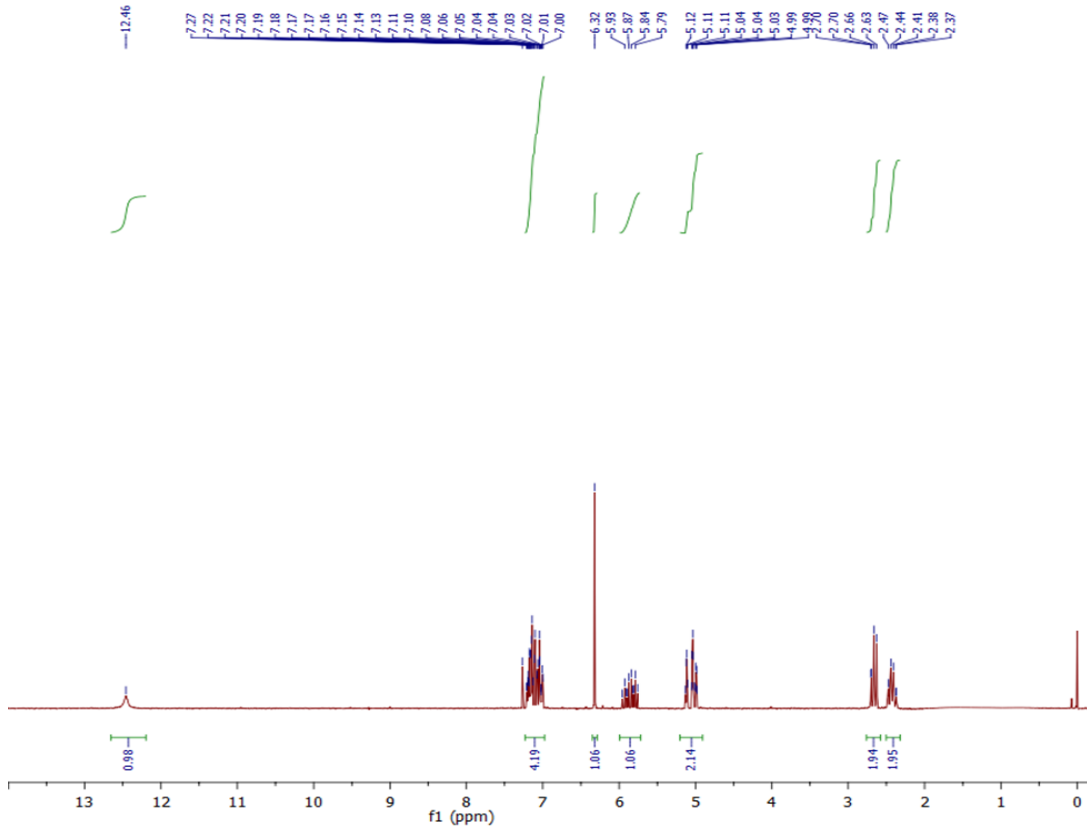
^{13}C NMR спектар једињења **5m**



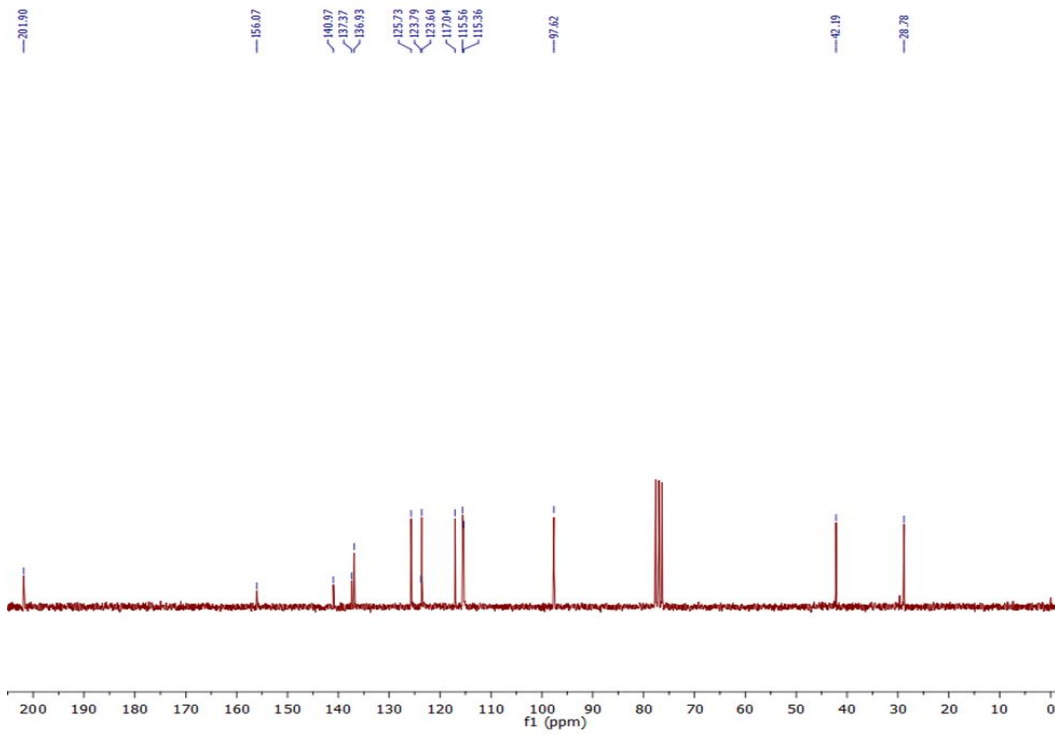
¹H NMR спектар једињења **6a**



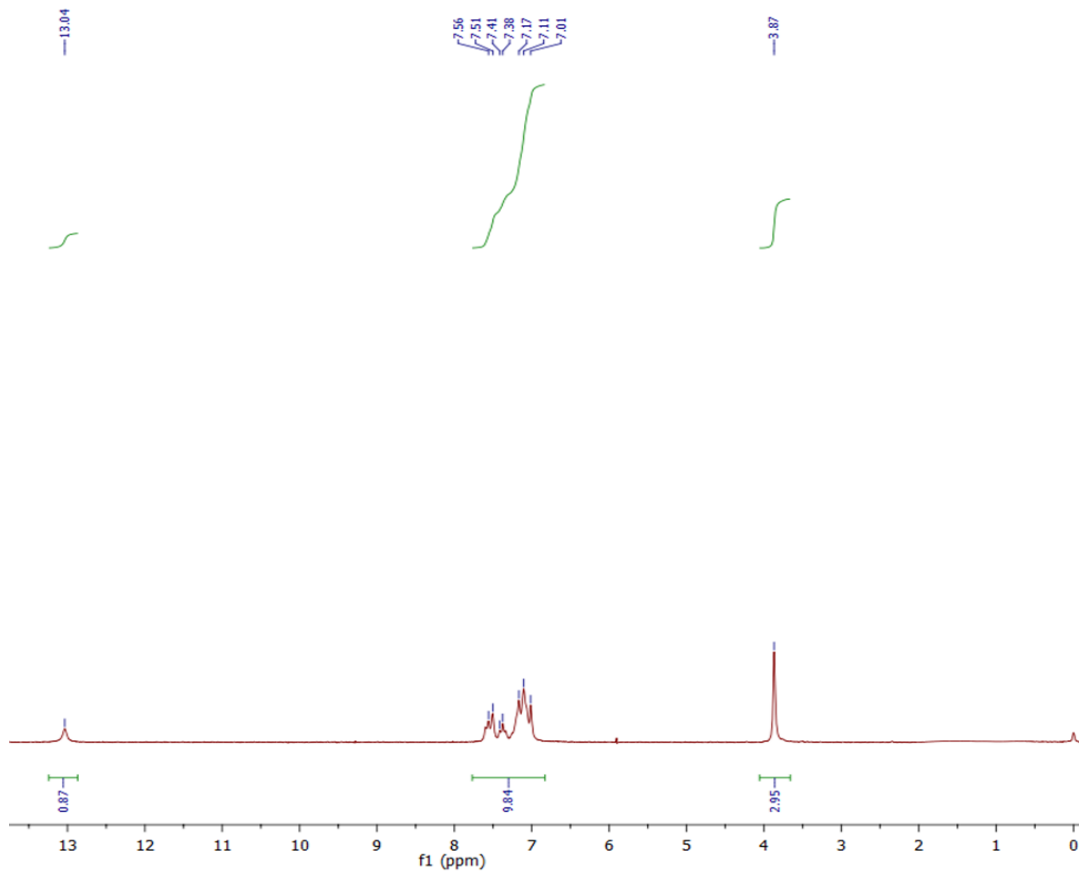
¹³C NMR спектар једињења **6a**



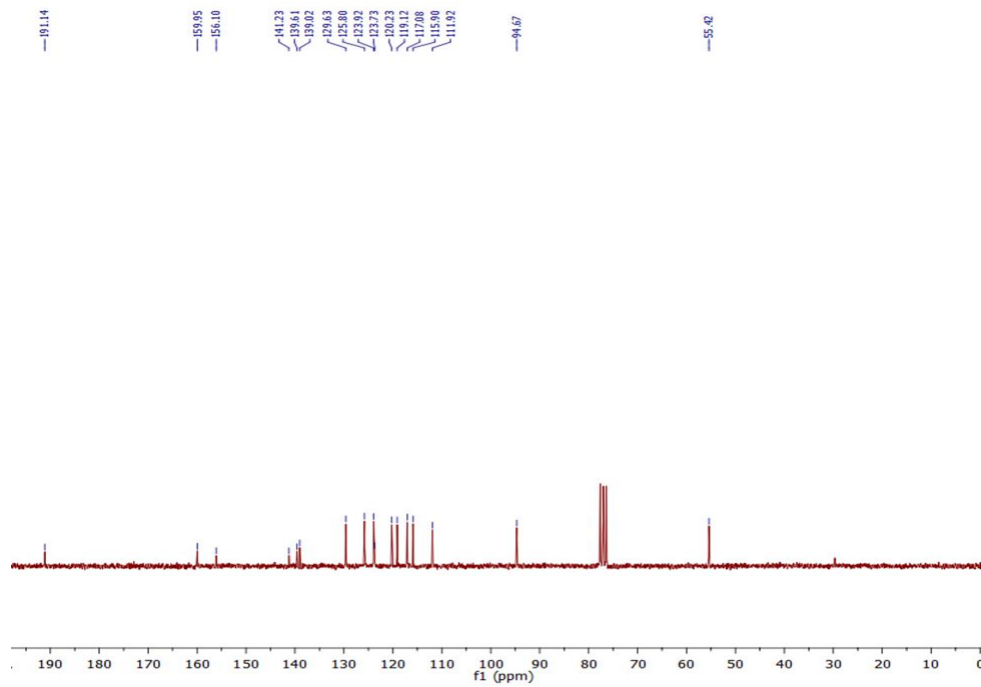
¹H NMR спектар једињења **6b**



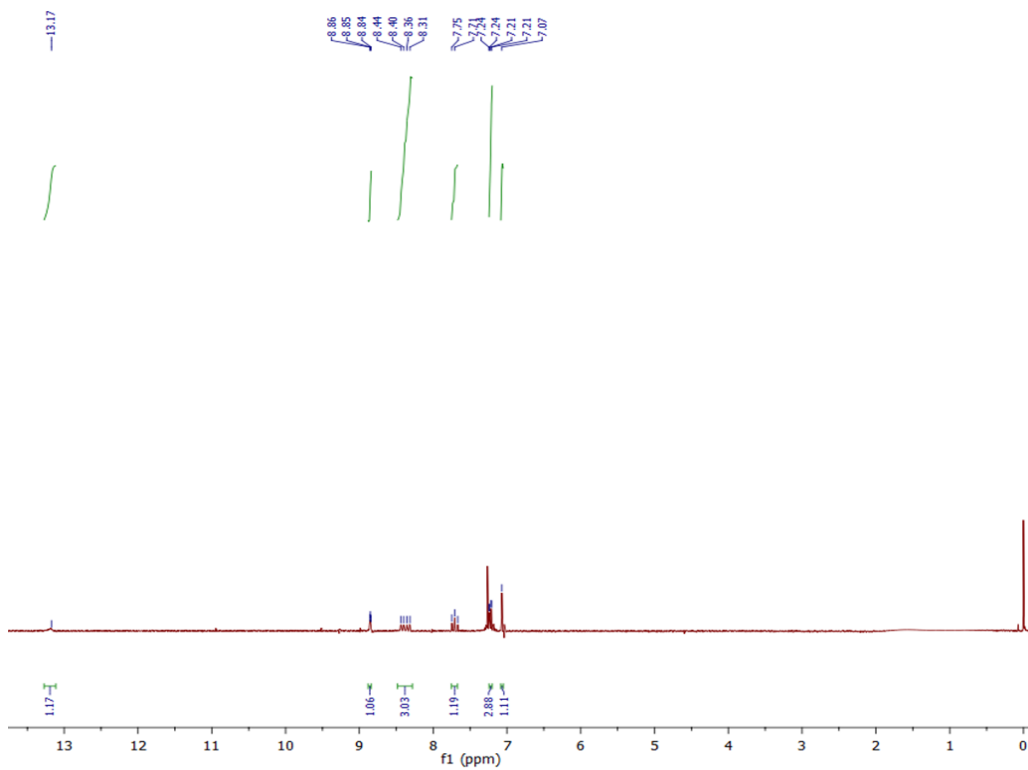
¹³C NMR спектар једињења **6b**



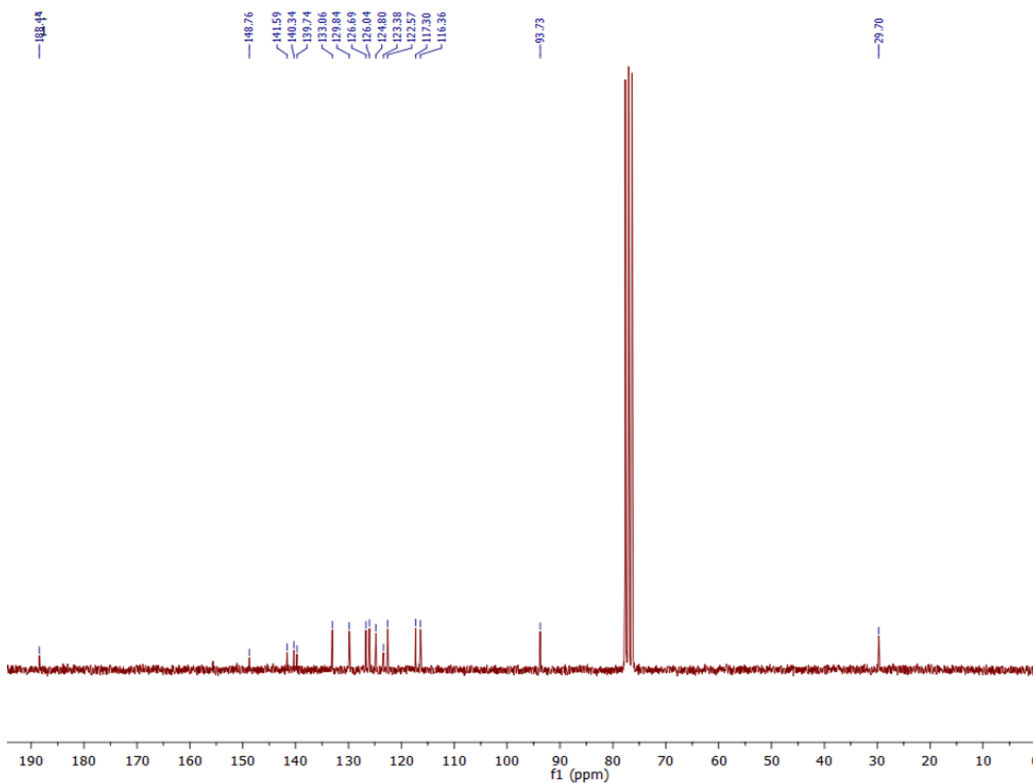
^1H NMR спектар једињења **6f**



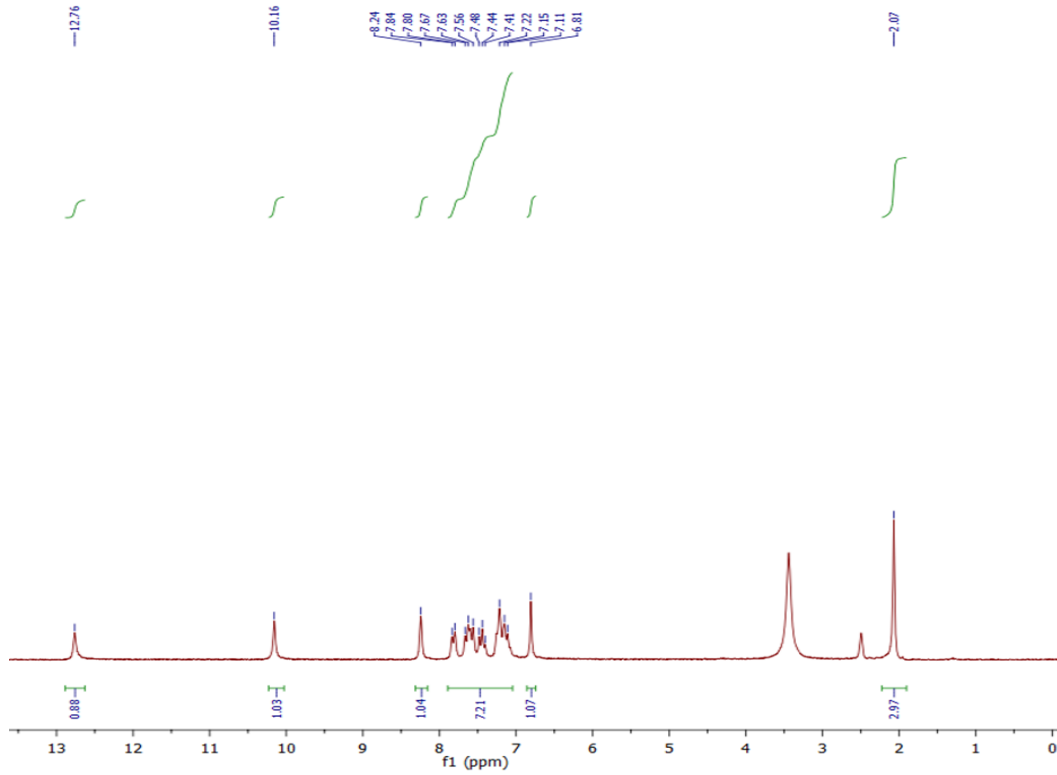
^{13}C NMR спектар једињења **6f**



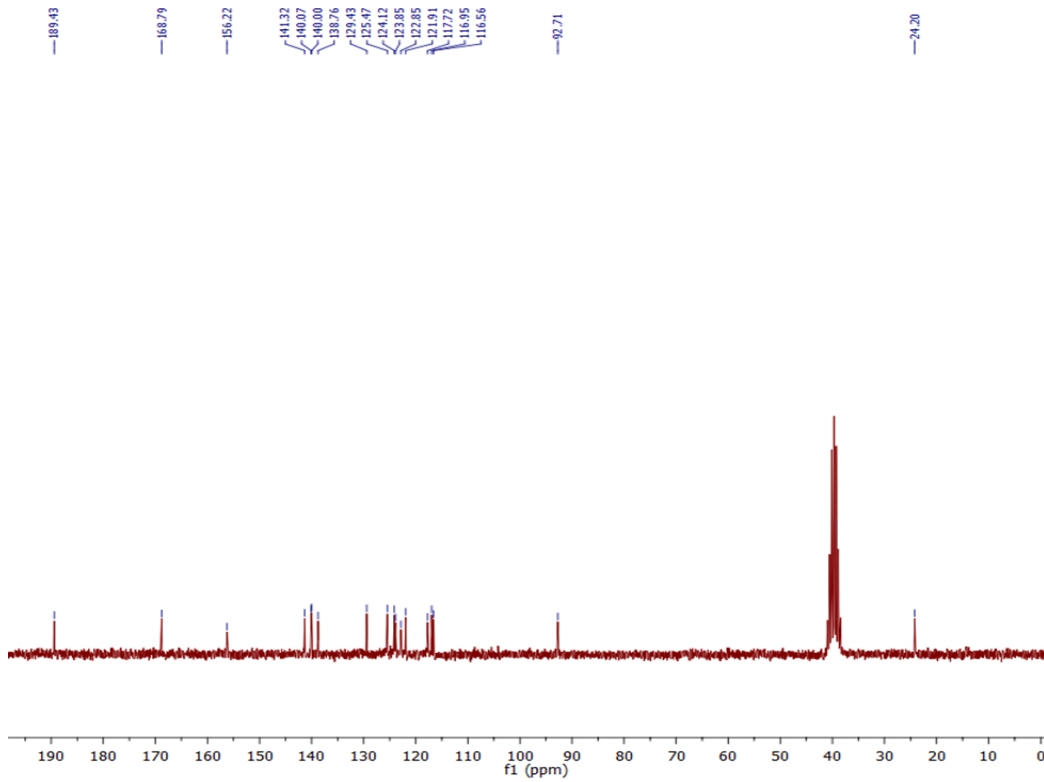
¹H NMR спектар једињења **6k**



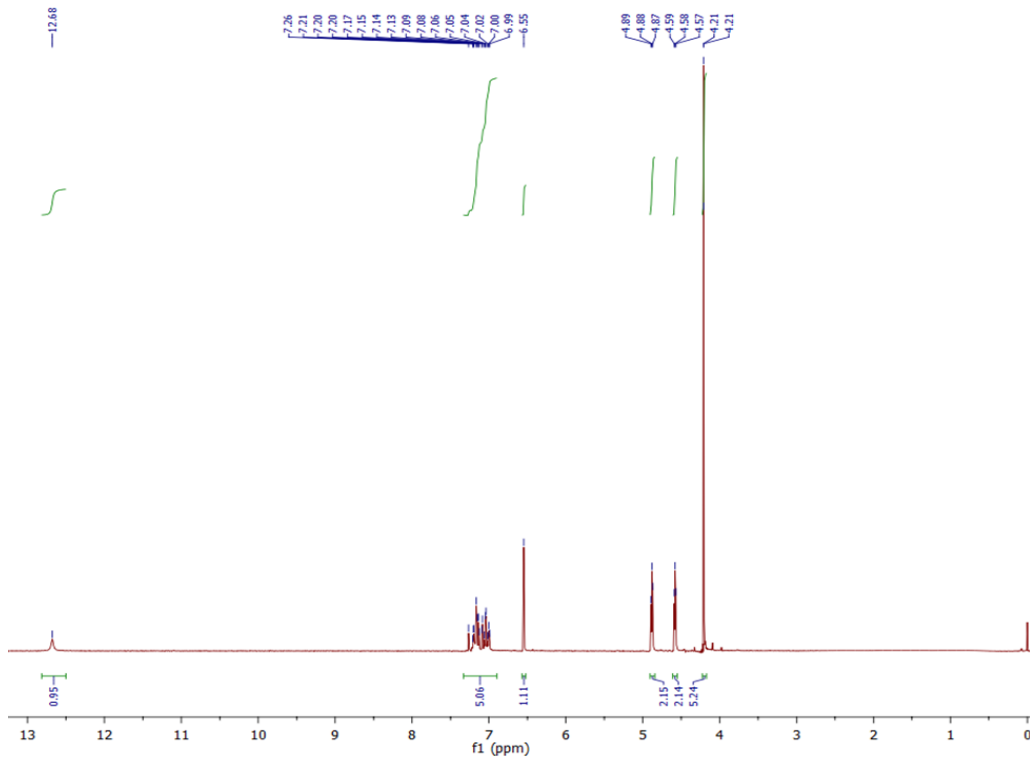
¹³C NMR спектар једињења **6k**



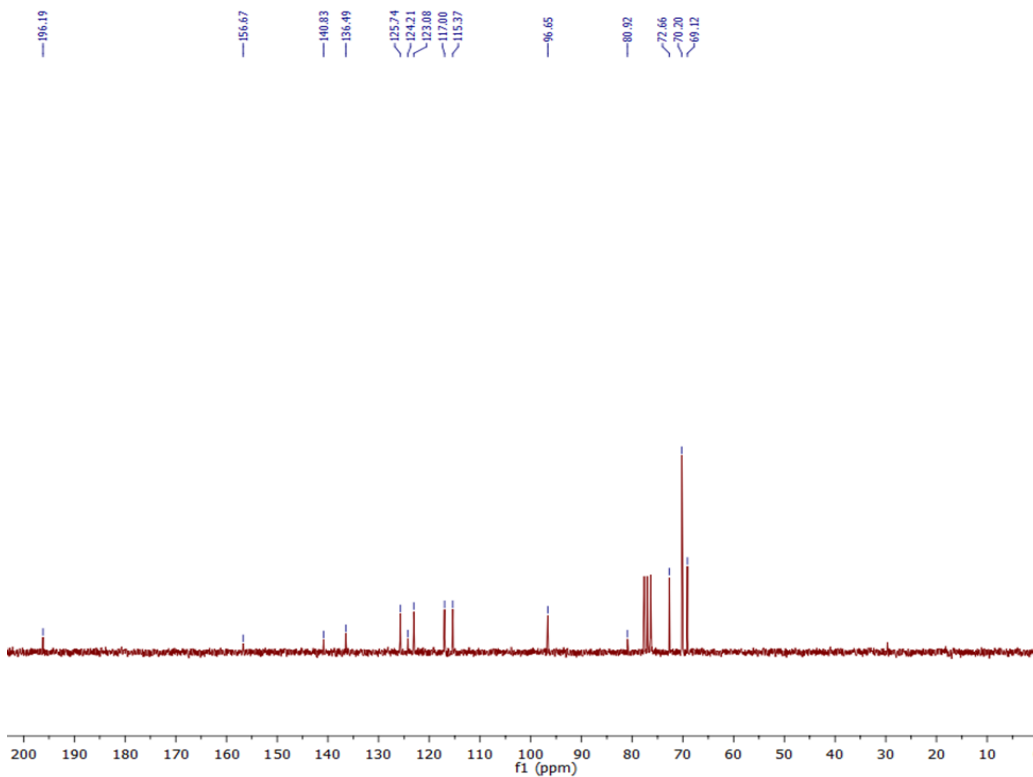
¹H NMR спектар једињења 6I



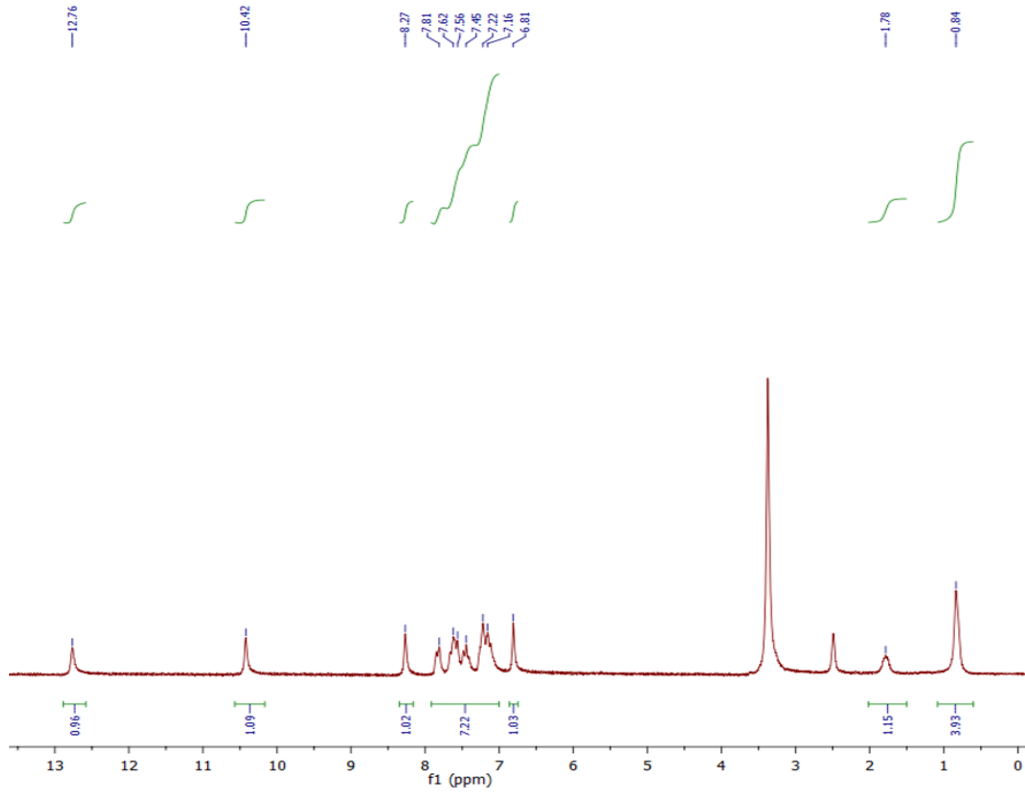
¹³C NMR спектар једињења 6I



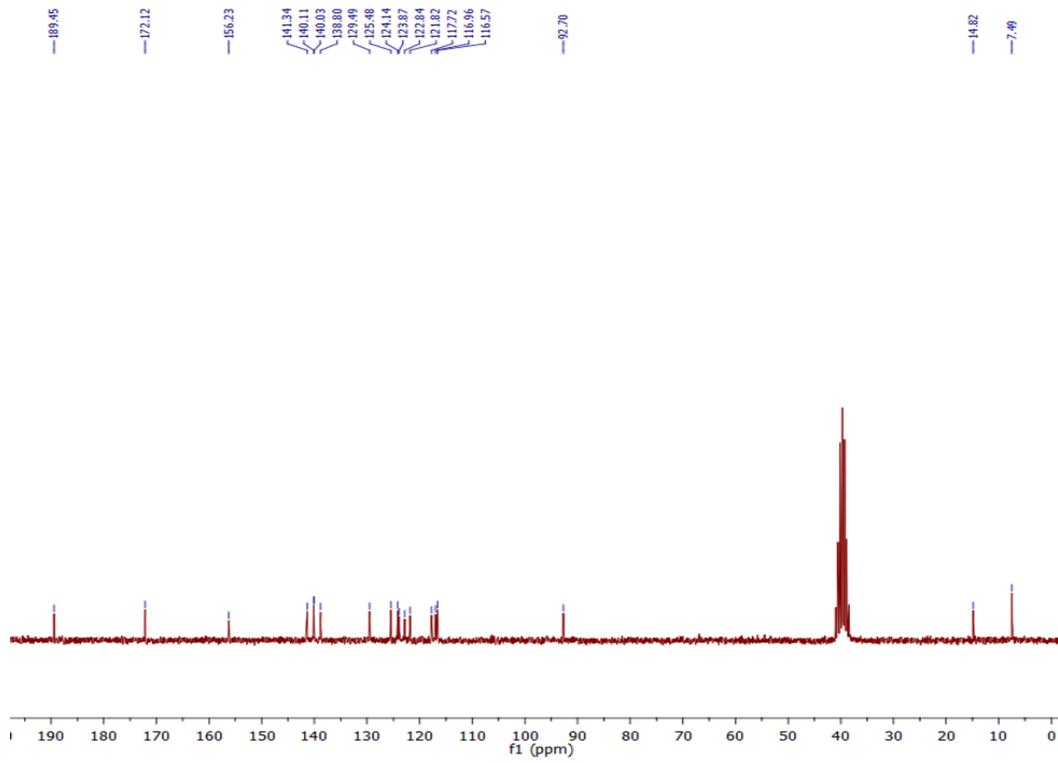
¹H NMR спектар једињења **6m**



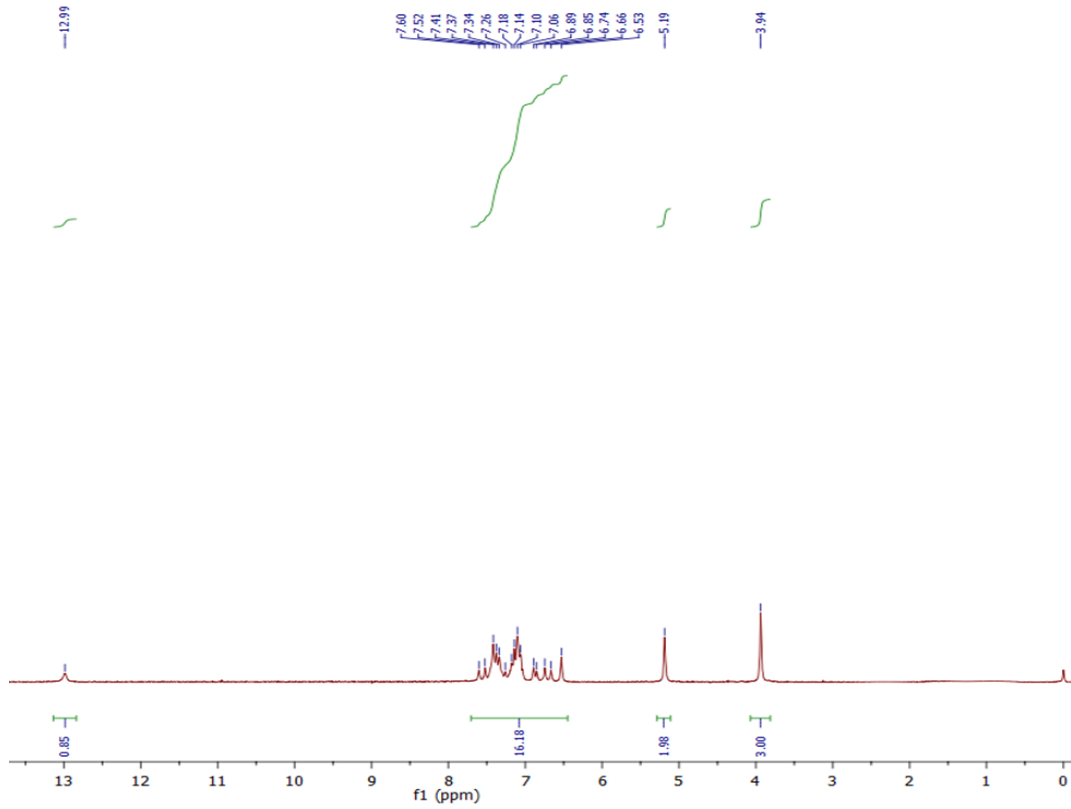
¹³C NMR спектар једињења **6m**



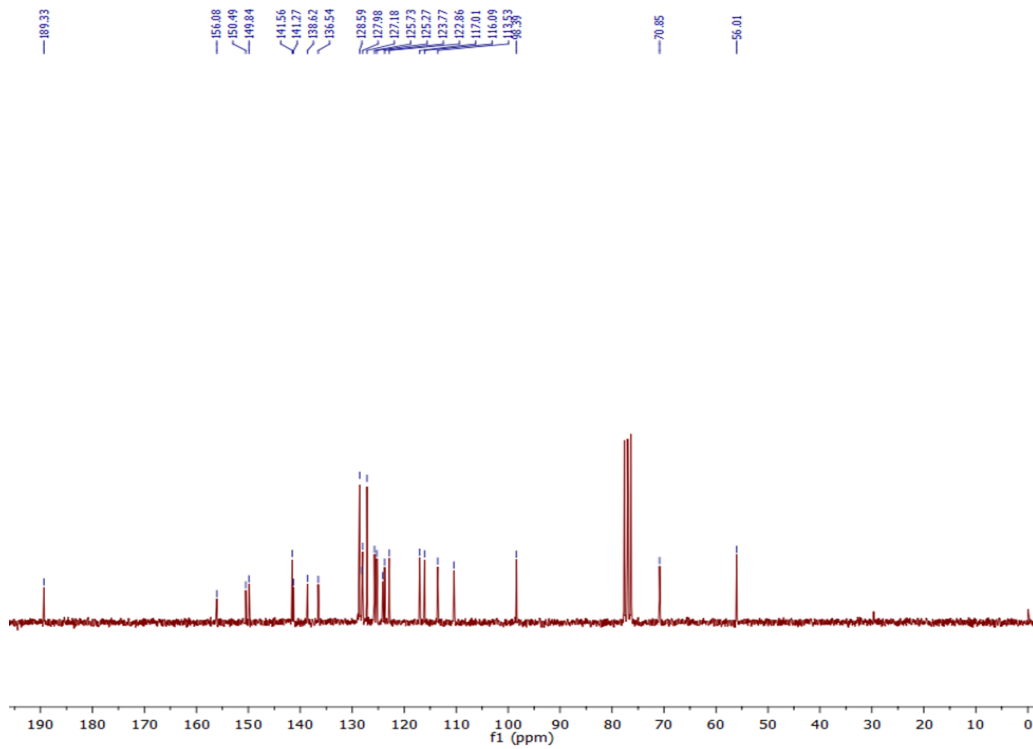
^1H NMR спектар једињења **6n**



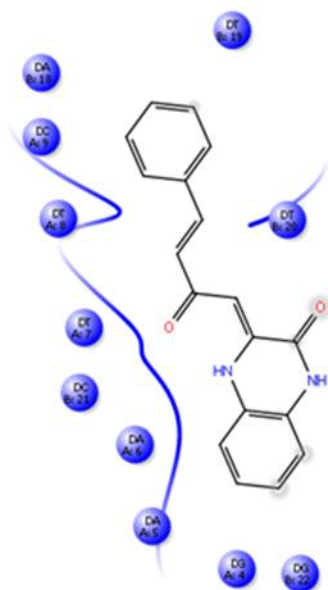
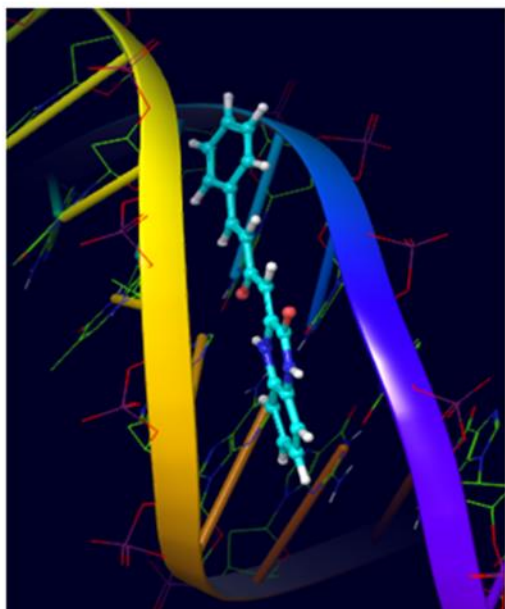
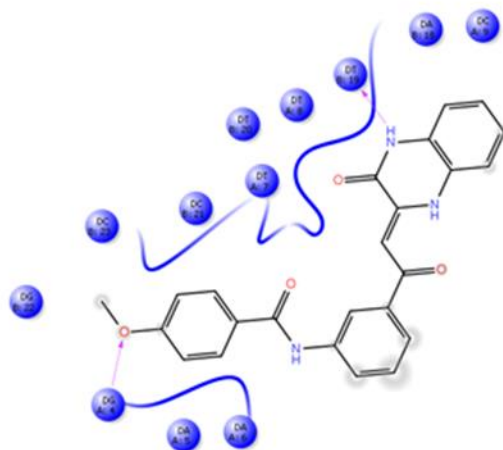
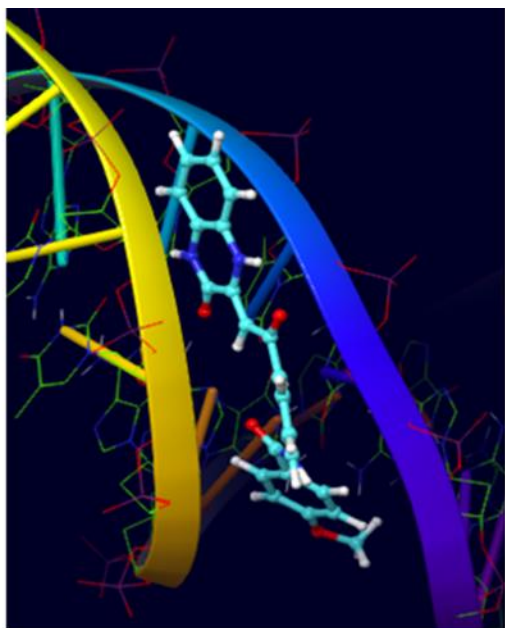
^{13}C NMR спектар једињења **6n**



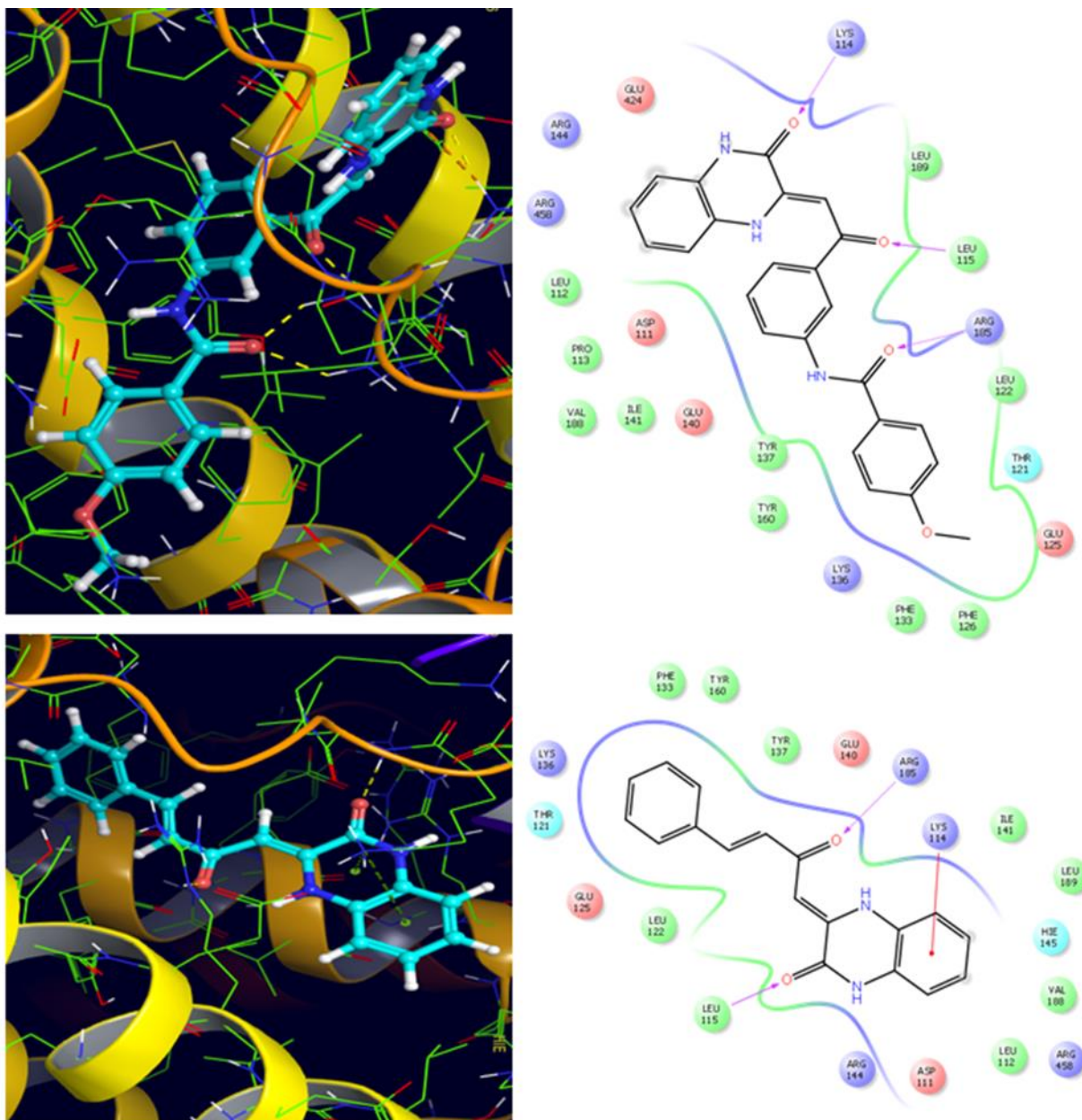
¹H NMR спектар једињења **60**



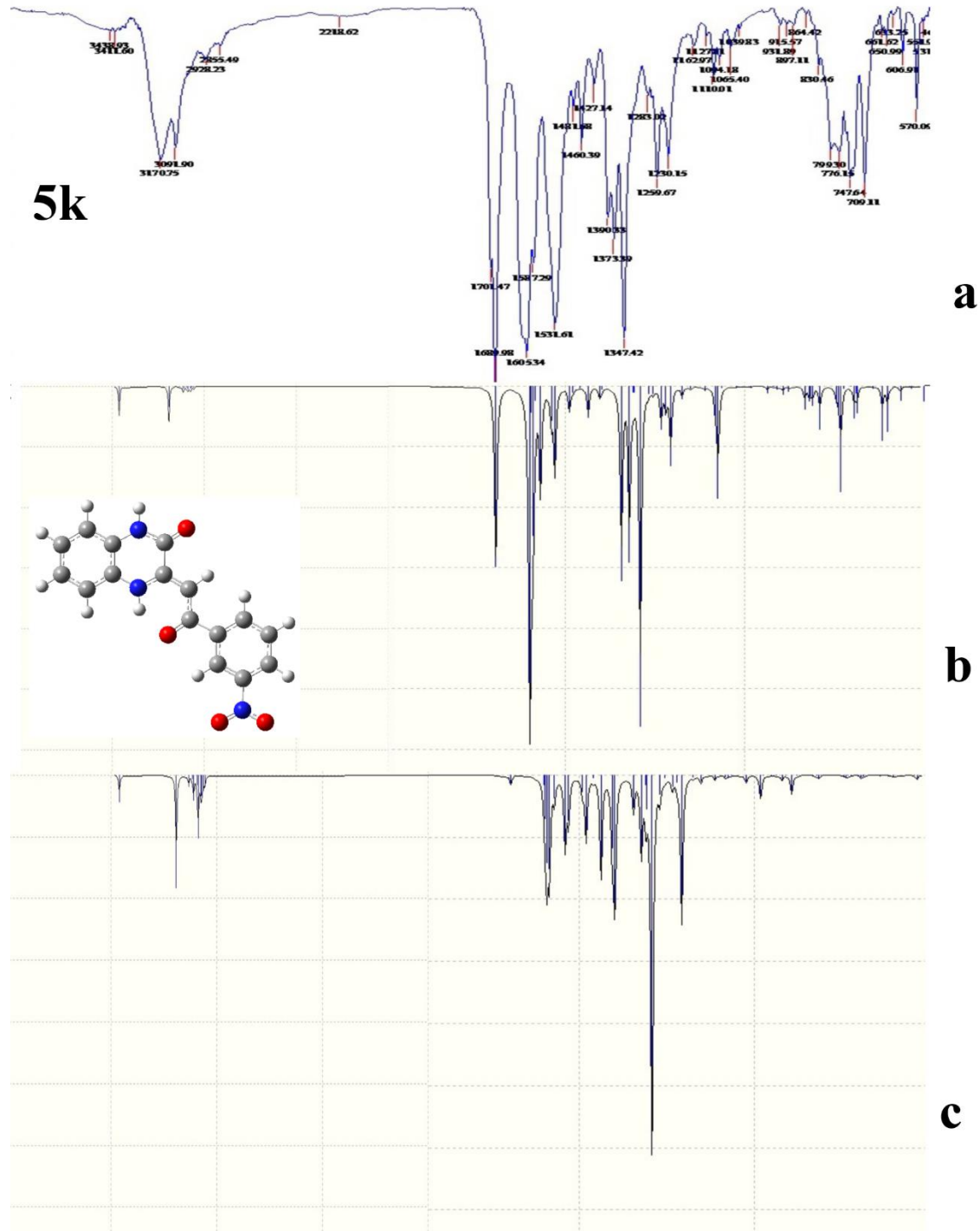
¹³C NMR спектар једињења **60**



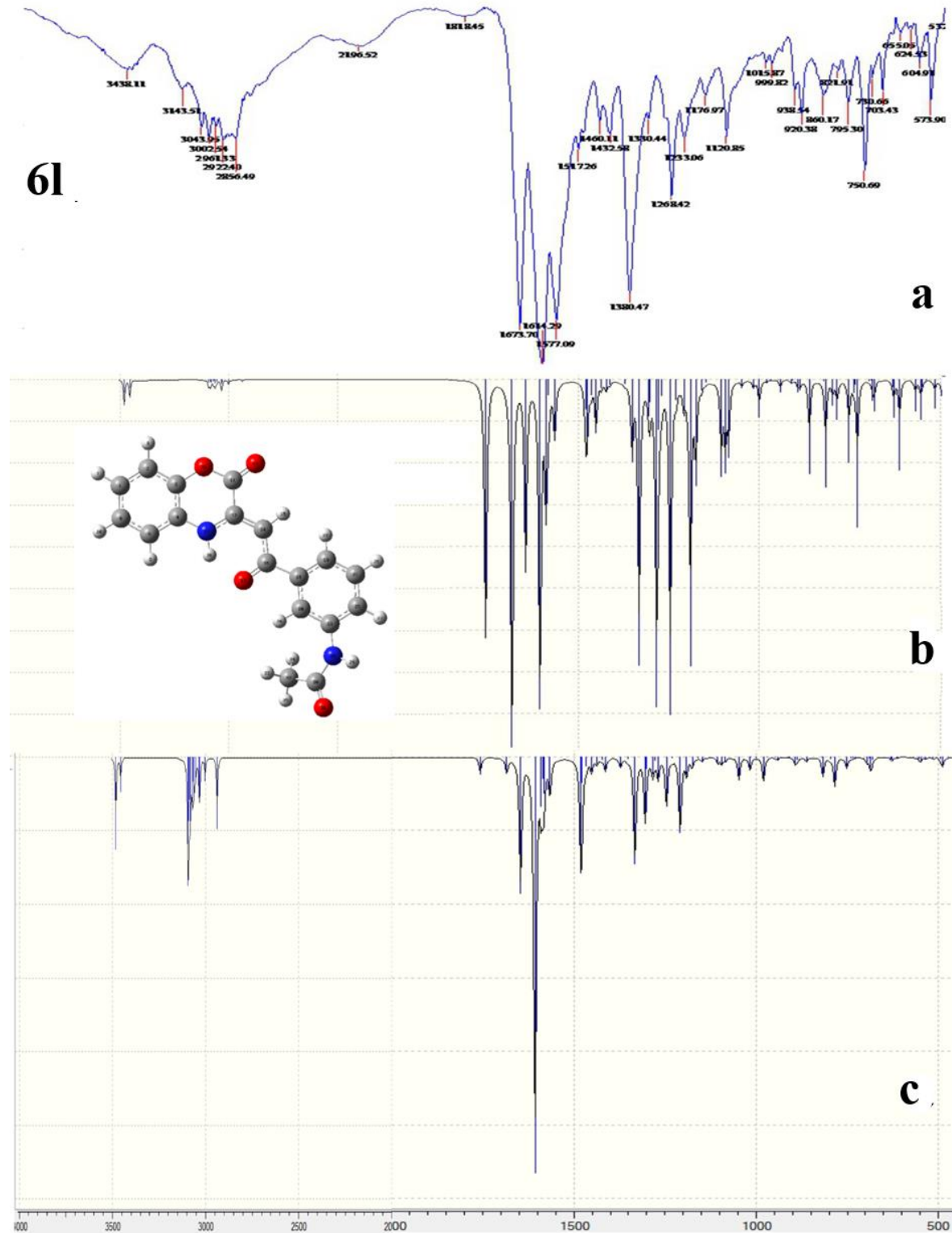
Слика III. Резултати докинг студије лиганда **5h** и **5i** са ДНК



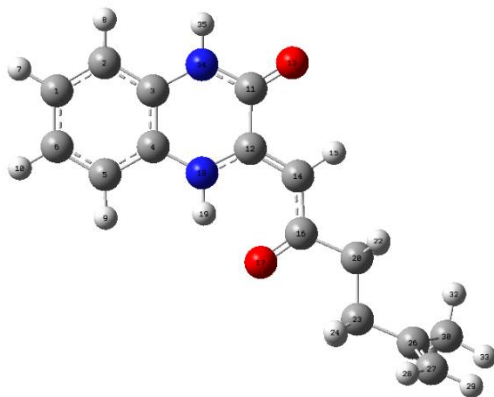
Слика П2. Резултати докинг студије лиганда **5h** и **5i** са БСА



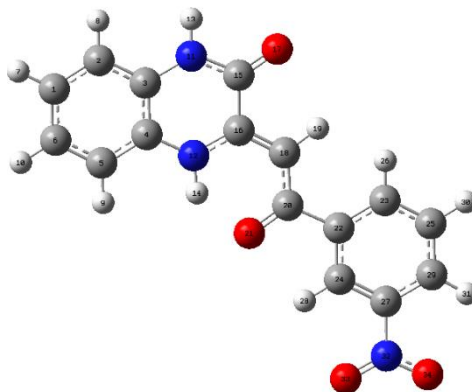
Слика ПЗ. Експериментални (а), израчунати IR (b) и израчунати Рамански (c) спектри за једињење 5k



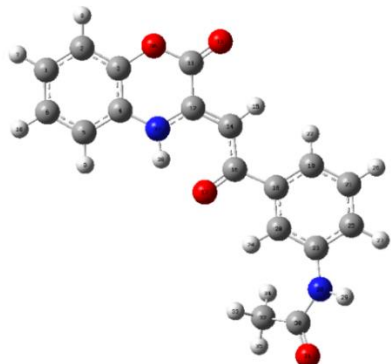
Слика П4. Експериментални (а), израчунати IR (б) и израчунати Рамански (с) спектри за једињење 6I

Табела III. Експерименталне и израчунате вредности ^1H и ^{13}C померања једињења 5c

Атом	Експериментални ^{13}C NMR	Скалиране теоријске вредности ^{13}C NMR (ppm)	Атом	Експериментални ^1H NMR	Скалиране теоријске вредности ^1H NMR (ppm)
C1	124.4	124.1	H3	7.08	8.0
C2	126.4	126.6	H8	7.08	7.9
C4	116.1	114.2	H9	7.40	8.1
C5	115.4	112.6	H10	7.08	8.0
C6	123.7	123.7	H12	11.88	7.7
C7	123.6	120.5	H14	12.96	8.6
C15	155.9	153.6	H19	6.08	6.2
C17	143.5	137.8	H23	2.27	2.4
C18	92.8	104.8	H24	2.60	4.1
C20	199.5	202.7	H26	2.27	2.2
C22	40.3	44.2	H27	2.60	3.5
C25	32.7	35.1	H30	4.69	5.6
C28	144.7	152.6	H31	4.69	5.6
C29	110.4	108.8	H33	1.71	1.9
C32	22.6	24.1	H34	1.71	3.1
			H35	1.71	2.1

Табела П2. Експерименталне и израчунате вредности ^1H и ^{13}C померања једињења 5k

Атом	Експериментални ^{13}C NMR	Скалиране теоријске вредности ^{13}C NMR (ppm)	Атом	Експериментални ^1H NMR	Скалиране теоријске вредности ^1H NMR (ppm)
C1	126.3	124.2	H7	7.6	8.4
C2	115.6	114.8	H8	7.2	8.2
C3	124.7	126.7	H9	7.8	8.6
C4	121.5	124.3	H10	7.8	8.4
C5	117.1	115.5	H13	12.2	9.1
C6	126.3	124.2	H14	13.7	15.5
C15	155.6	153.2	H19	6.8	8.1
C16	146.7	144.2	H26	8.4	9.8
C18	89.0	87.9	H28	8.6	10.7
C20	185.6	180.8	H30	7.8	8.9
C22	140.6	138.6	H31	8.4	9.8
C23	133.3	134.4			
C24	124.0	122.9			
C25	130.8	128.2			
C27	148.4	148.2			
C29	127.2	126.0			

Табела ПЗ. Експерименталне и израчунате вредности ^1H и ^{13}C померања једињења **6l**

Атом	Експериментални ^{13}C NMR	Скалиране теоријске вредности ^{13}C NMR (ppm)	Атом	Експериментални ^1H NMR	Скалиране теоријске вредности ^1H NMR (ppm)
C1	117	121.2	H7	7.1	8.1
C2	117.7	116.2	H8	7.2	8.2
C3	123.8	140.0	H9	7.2	8.0
C4	122.8	125.2	H10	7.4	8.4
C5	116.6	113.7	H12	10.2	7.8
C6	121.9	125.7	H18	6.8	6.7
C14	156.2	153.8	H25	7.7	8.5
C16	141.3	134.9	H27	8.2	9.0
C17	92.7	106.5	H29	7.8	8.8
C19	189.4	193.0	H30	7.6	8.6
C21	138.8	141.9	H32	12.8	7.7
C22	124.1	123.8	H36	2.1	2.7
C23	125.5	124.5	H37	2.1	2.3
C24	129.4	137.6	H38	2.1	2.0
C26	140.1	128.3			
C28	140.0	127.9			
C33	168.8	169.8			
C35	24.2	21.6			



Cite this: *Green Chem.*, 2017, **19**, 707

An enolate ion as a synthon in biocatalytic synthesis of 3,4-dihydro-2(1*H*)-quinoxalinones and 3,4-dihydro-1,4-benzoxazin-2-ones: lemon juice as an alternative to hazardous solvents and catalysts†

Jelena Petronijević,^a Zorica Bugarčić,^a Goran A. Bogdanović,^b Srđan Stefanović^c and Nenad Janković*^a

Innovative, efficient, clean, experimentally simple and environmentally friendly one-pot biocatalytic synthesis of two small libraries of 3,4-dihydro-2(1*H*)-quinoxalinones (**4a–m**) and 3,4-dihydro-1,4-benzoxazin-2-ones (**5a**, **5b**, **5f** and **5k–o**) by heterocyclization of ethyl 2-hydroxy-4-alkyl(aryl)-4-oxo-2-butenates (**1a–o**) or their corresponding salts (**1a'–o'**) with *o*-phenylenediamine (**2**) or *o*-aminophenol (**3**) in lemon juice as a solvent and a catalyst is presented. In all reactions where esters **1a–o** are used for 24 h, very good-to-excellent yields were achieved, but the best yield was realized in the synthesis of **5a** (97%) from **3** and **1a**. The use of enolate salts (**1a'–o'**) instead of the corresponding esters **1a–o** significantly reduced the reaction time (up to 6 h) and good-to-excellent yields were achieved. Groups with electron-donating or -withdrawing effects at the aromatic ring of the ester did not have significant influences on the yield of targeted products. In addition, several selected 3,4-dihydro-2(1*H*)-quinoxalinones and 3,4-dihydro-1,4-benzoxazin-2-ones on a gram-scale in the yields up to 92% were synthesized. The presented synthetic strategy has produced smaller amount of waste without by-products and with excellent values of green chemistry metrics (atom efficiency, reaction mass efficiency, *E*-factor and EcoScale).

Received 19th October 2016,

Accepted 1st November 2016

DOI: 10.1039/c6gc02893d

rsc.li/greenchem

Introduction

The conventional chemical manufacturing processes of different pharmaceuticals and other relevant molecules produce large amounts of waste and toxic by-products.¹ These facts indicate that it is very important to develop methods which satisfy green principles.^{2,3} This means that all chemical transformations should be promoted in an eco-friendly medium with advantages such as: easy work-up, nontoxicity, nonflammability and high heat capacity.⁴ In addition, investigated chemical processes should fulfill EcoScale parameters.¹ In order to realize these requirements, reactions are performed in solvent-free

medium^{5,6} or water,⁷ ionic liquids,⁸ lemon juice,⁹ biobased chemicals¹⁰ and supercritical fluids¹¹ as green solvents.

Quinoxaline^{12,13} and benzoxazine¹⁴ derivatives are a group of very important heterocyclic pharmacophores, which have attracted the attention of a large number of scientists. The quinoxaline moiety is found in a broad range of biologically active molecules with anticancer,^{15,16} antiviral,¹⁷ antifungal,¹⁸ antimicrobial,¹⁹ anti-inflammatory,²⁰ antidiabetic²¹ and anti-tuberculosis²² activities. Also, molecules with a quinoxaline scaffold were used as lifespan altering compounds.²³ Quinoxalines that contain boron difluoride display fluorescent properties and can be used for preparing luminescent materials.²⁴ Compounds that contain benzoxazine scaffolds can be used successfully as anticancer compounds,^{25,26} antimicrobials,²⁷ β 2-adrenoceptor agonists,²⁸ inhibitors of platelet aggregation,²⁹ positive inotropic agents,³⁰ calcium channel modulators,³¹ thrombin inhibitors and glycoprotein receptor antagonists.³²

Bearing in mind these facts, there is a reasonable tendency for the development of novel methods for the synthesis of compounds with the quinoxaline and benzoxazine nucleus. In the last decade, several improved methods with new catalysts

^aFaculty of Science, University of Kragujevac, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia. E-mail: nenad.jankovic@kg.ac.rs


^bVinča Institute of Nuclear Science, University of Belgrade, P.O. Box 522, 11001 Belgrade, Serbia

^cInstitute of Meat Hygiene and Technology, Kačanskog 13, 11000 Belgrade, Serbia

†Electronic supplementary information (ESI) available: Copies of ¹H and ¹³C NMR spectra of **4a–m** and **5a**, **5b**, **5f** and **5k–o**. CCDC 1510178 (**5b**). For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c6gc02893d

FULL PAPER

Biological evaluation of selected 3,4-dihydro-2(1H)-quinoxalinones and 3,4-dihydro-1,4-benzoxazin-2-ones: Molecular docking study

Jelena Petronijević¹ | Nenad Janković¹  | Tatjana P. Stanojković² |
Nenad Joksimović¹ | Nađa Đ. Grozdanić² | Milan Vraneš³ | Aleksandar Tot³ |
Zorica Bugarčić¹

¹ Department of Chemistry, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

² Institute for Oncology and Radiology of Serbia, Belgrade, Serbia

³ Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, University of Novi Sad, Novi Sad, Serbia

Correspondence

Dr. Nenad Janković and Prof. Zorica Bugarčić, Department of Chemistry, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia.
Email: nenad.jankovic@kg.ac.rs (NJ); zoricab@kg.ac.rs (ZB)

Funding information

Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, Grant numbers: 172011, 175011

Abstract

In order to investigate new potential therapeutically active agents, we investigated the biological properties of two small libraries of quinoxalinones and 1,4-benzoxazin-2-ones. The results obtained showed that compounds **5**, **9–11** have good cytotoxic activity against HeLa cells where the lowest IC₅₀ value (10.46 ± 0.82 μM/mL) was measured for compound **10**. Additionally, the most active compounds (**5**, **9–11**) showed much better selectivity for MRC-5 cells (up to 17.4) compared to cisplatin. *In vitro* evaluation of the inhibition of the enzyme α-glucosidase showed that compounds **10** and **11** exert significant inhibition of the enzyme at 52.54 ± 0.09 and 40.09 ± 0.49 μM, respectively. Competitive experiments with ethidium bromide (EB) indicated that all tested compounds have affinity to displace EB from the EB-DNA complex through intercalation, suggesting good competition with EB ($K_{sv} = (3.1 ± 0.2), (5.1 ± 0.1), (5.6 ± 0.2), \text{ and } (6.3 ± 0.2) × 10^3 \text{ M}^{-1}$). A molecular docking study was also performed to better understand the binding modes and to conclude the structure–activity relationships of the synthesized compounds.

KEYWORDS

anticancer, antidiabetic, benzoxazines, DNA and BSA interaction, quinoxalinones

1 | INTRODUCTION

Heterocycles such as quinoxalines^[1,2] and benzoxazines^[3] are structural motifs of wide spectrum of biologically active compounds. Quinoxalines display a broad spectrum of pharmacological activity such as antimicrobial,^[4] anti-inflammatory,^[5] antidiabetic,^[6] antiviral,^[7] anticancer,^[8,9] and antituberculosis.^[10] In fact, one of the primary targets in medicinal chemistry and one of the biggest health problem in society nowadays is cancer. Since cisplatin was involved in clinical practice, platinum-based drugs had been in center of researches as

chemotherapy agents.^[11,12] Use of cisplatin in clinical therapy is limited by several side effects such as neurotoxicity, nephrotoxicity,^[13–15] limited applicability, etc. Development and synthesis of new non-platinum drugs with less side effects is the major interest in medicinal chemistry.^[16] Bearing in mind these facts, we developed synthesis of novel 3,4-dihydro-2(1H)-quinoxalinones (**1–12**) and 3,4-dihydro-1,4-benzoxazin-2-ones (**13–20**) (Figure 1) as potential drugs for cisplatin replacement.^[17] The new synthesized quinoxalinones and oxazines were exposed to antitumor, anti-α-glucosidase and antiangiogenic activities, DNA and BSA binding, and docking study. Investigation of



REGULAR ARTICLE

Experimental and computational analysis (DFT method) of some quinoxalinones and benzoxazinones: spectroscopic investigation (FT-IR, FT-Raman, UV-Vis, NMR)

JELENA PETRONIJEVIĆ^{a,*}, NENAD JOKSIMOVIĆ^a, ZORICA BUGARČIĆ^a,
ELVIRA ĐURĐIĆ^b and NENAD JANKOVIĆ^{a,*}

^aDepartment of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, Kragujevac 34000, Serbia

^bDepartment of Physics, Faculty of Science, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovica 4, Novi Sad 21000, Serbia

E-mail: jelena.petronijevic@pmf.kg.ac.rs; nenad.jankovic@kg.ac.rs

MS received 16 May 2019; revised 15 July 2019; accepted 22 July 2019

Abstract. The selected quinoxalinones and benzoxazinones derivatives, synthesized in our laboratory earlier, were explored by spectroscopic techniques (UV-Vis, IR, Raman and NMR) and theoretical study (DFT calculations). In order to understand the electronic properties of these compounds, the theoretical UV spectra have been investigated by TDDFT/B3LYP method with 6-311+G(d,p) basis set in ethanol as a solvent. For all compounds, the absorption of UV radiation with a wavelength around 415 nm with an oscillator strength $f = 0.90$ induces the intramolecular electronic transition ($n \rightarrow \pi^*$). The frontiers molecular orbitals are calculated, and contributions of the electronic transitions are determined. Also, we did quantum chemical calculations to investigate the corrosion inhibition properties of these molecules. The vibrational analysis was performed at the B3LYP/6-311+G(d,p) level of theory *in vacuo*. Obtained results are in very good agreement with experimental data. The calculated ¹³C NMR shifts in all cases are in good-to-excellent agreement. Also, ¹H NMR predicted shifts are comparable with experimental results, but there are some deviations (for N–H shifts) probably as a consequence of intramolecular interactions.

Keywords. Quinoxalinones; 1,4-benzoxazin-2-ones; vibrational analysis; corrosion inhibition; simulated ¹³C and ¹H spectra.

1. Introduction

The quinoxaline and benzoxazine derivatives are mainly known for their wide range of pharmacological and biological activities.^{1–3} Their ring moieties are part of the chemical structures of various antibiotics such as echinomycin, levomycin and actinomycin.² Such compounds are also known to be active against transplant tumors.⁴ Also, quinoxaline-based compounds have the ability to inhibit the metal corrosion and they are used in electroluminescent materials.^{5,6} Physicochemical properties of inhibitors (e.g., electron density, geometric factors, molecular volume, etc.) determine their effectiveness of corrosion, while the process of adsorption depends on the type of metal, the

nature of inhibitor, and the electrochemical potential at the metal-solution surface.⁷ Many quinoxaline derivatives have been reported as efficient inhibitors of metal corrosion in acidic medium in the last few years.^{8–12} Nowadays, many scientists and engineers are investigating new synthetic routes for the synthesis of novel corrosion inhibitors with even better properties. There are numerous methods available for the synthesis of quinoxaline and benzoxazine derivatives. In recent times, several green methodologies that include recyclable catalysts, microwave-assisted synthesis and reactions in aqueous medium are presented.^{13,14} Bearing in mind the biological, structural, and industrial importance of quinoxaline- and benzoxazine-based compounds, we used these previously

*For correspondence

Electronic supplementary material: The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12039-019-1681-y>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, **Јелена Петронијевић**, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

„Синтеза, карактеризација, биолошко и DFT испитивање хиноксалинона и бензоксазинона”

која је одбрањена на **Природно-математичком факултету**, Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 03.03.2020. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, **Јелена Петронијевић**,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

„Синтеза, карактеризација, биолошко и DFT испитивање хиноксалинона и бензоксазинона”

која је одбрањена на **Природно-математичком факултету**, Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

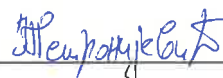
не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 03.03.2020. године,



попис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>