



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Виолета Р. Марковић

**СИНТЕЗА, СПЕКТРАЛНА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И  
МЕХАНИСТИЧКЕ СТУДИЈЕ НОВИХ ПИРАЗОЛСКИХ И  
ПИРАЗОЛОНСКИХ ДЕРИВАТА**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2012.



## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

### *I. Аутор*

Име и презиме: **Виолета Р. Марковић**

Датум и место рођења: **02.07.1985. Меулан, Француска**

Садашње запослење: **Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу**

### *II. Докторска дисертација*

Наслов: **Синтеза, спектрална карактеризација и механистичке студије нових пиразолских и пиразолонских деривата**

Број страница: **146**

Број слика: **17**, Број схема: **69**, Број табела: **19**

Број библиографских јединица: **143**

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

Научна област (УДК): **547, Хемија-Органска хемија**

Ментор: **др Милан Д. Јоксовић**

### *III. Оцена и одбрана*

Датум пријаве теме: 01.03. 2011.

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: 160/ХП-1, 02. 03. 2011

Комисија за оцену подобности теме и кандидата: 662/4, 11. 05. 2011.

1. **др Милан Јоксовић, доцент Природно-математичког факултета у Крагујевцу, научна област Органска хемија, ментор**
2. **др Владимир Павловић, редовни професор Хемијског факултета у Београду, научна област Органска хемија, члан**
3. **др Александар Теодоровић, редовни професор Природно-математичког факултета у Крагујевцу, научна област Органска хемија, члан**
4. **др Светлана Марковић, редовни професор Природно-математичког факултета у Крагујевцу, научна област Физичка хемија, члан**

Комисија за оцену докторске дисертације: 50/ХVI-1, 18. 01. 2012.

1. **др Милан Јоксовић, доцент Природно-математичког факултета у Крагујевцу, научна област Органска хемија, ментор**
2. **др Владимир Павловић, редовни професор Хемијског факултета у Београду, научна област Органска хемија, члан**
3. **др Александар Теодоровић, редовни професор Природно-математичког факултета у Крагујевцу, научна област Органска хемија, члан**
4. **др Светлана Марковић, редовни професор Природно-математичког факултета у Крагујевцу, научна област Физичка хемија, члан**

Комисија за одбрану докторске дисертације: 50/ХVI-1, 18. 01. 2012.

1. **др Милан Јоксовић, доцент Природно-математичког факултета у Крагујевцу, научна област Органска хемија, ментор**
2. **др Владимир Павловић, редовни професор Хемијског факултета у Београду, научна област Органска хемија, члан**
3. **др Александар Теодоровић, редовни професор Природно-математичког факултета у Крагујевцу, научна област Органска хемија, члан**
4. **др Светлана Марковић, редовни професор Природно-математичког факултета у Крагујевцу, научна област Физичка хемија, члан**

Датум одбране дисертације: 22. 06. 2012.



*Мајци Славки и оцу Радовану за све тренутке пажње, стрпљења  
и разумевања...*



*Захваљујем се проф. др Милану Јоксовићу на предложеној теми докторске дисертације, на указаном поверењу, стрпљењу и свесрдној помоћи, на основу које је ова дисертација успешно реализована.*

*Члановима комисије, проф. др Владимиру Павловићу, проф. др Светлани Марковић и проф. др Александру Теодоровићу дугујем захвалност за све корисне сугестије и савете који су допринели бољем квалитету докторске дисертације.*

*На крају, посебну захвалност дугујем Милану који је све тренутке током докторских студија и израде дисертације поделио са мном, као и на пруженој љубави и разумевању.*





# Садржај

Списак слика и схема	1
Списак табела	6
ИЗВОД	7
SUMMARY	9
<b>1. ОПШТИ ДЕО</b>	<b>11</b>
<b>1.1. Пиразоли - историјат и значај</b>	<b>13</b>
1.1.1. Методе за добијање пиразола	14
1.1.2. Синтеза пиразола под Vilsmeier-овим условима	16
1.1.3. Реакције 1,3-дифенилпиразол-4-карбалдехида	22
1.1.4. Таутомерија пиразола	26
1.1.5. Аминопиразоли и њихов значај	28
1.1.5.1. Добијање 3-аминопиразола	29
1.1.5.2. Таутомерија 3(5)-аминопиразола	31
<b>1.2. Пиразолони – историјат и значај</b>	<b>33</b>
1.2.1. Методе за добијање пиразолонских деривата	33
1.2.1.1. Knoog-ова метода за добијање пиразолона	33
1.2.1.2. Трансформација тиадиазола	34
1.2.1.3. Добијање из супституисаних пропенских киселина	35
1.2.1.4. Синтеза без присуства растварача	36
1.2.2. Таутомерија	39
1.2.2.1. Таутомерија несупституисаних пиразолона	39
1.2.2.2. Таутомерија деривата пиразолона са супституентом у положају 3	40
1.2.2.3. Таутомерија деривата пиразолона са супституентима у положају 1 и 3	42

1.2.3.	Хемијске трансформације на пиразолонском прстену	43
1.2.3.1.	Алкиловање и ариловање деривата пиразолона	43
1.2.3.2.	Формиловање деривата пиразолона	45
1.2.3.3.	Ациловање деривата пиразолона	47
1.2.3.3.1.	Добијање 1-ацил-деривата пиразол-5-она	47
1.2.3.3.2.	Добијање 4-ацил-деривата пиразол-5-она	48
1.2.3.3.3.	Таутомерија 4-ацил-пиразолона	48
1.2.3.4.	Алкиловање ацил-пиразолона	49
1.2.3.4.1.	Добијање Schiff-ових база ацил-пиразолона	51
1.2.3.5.	Добијање нитрозил-деривата пиразолона	53
2.	НАШИ РАДОВИ	55
2.1.	Увод	57
2.2.	Синтеза деривата пиразола	59
2.3.	Механистичка студија синтезе 3-аминопиразолског деривата	64
2.4.	Синтеза деривата пиразол-5-она	74
2.5.	Биолошка активност синтетизованих једињења	79
3.	ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	89
3.1.	Физичка мерења	91
3.2.	Поступак за синтезу једињења 1-9	91
3.3.	Поступак за синтезу једињења 10-21	96
3.4.	Поступак за синтезу једињења 22	104
3.5.	Поступак за синтезу једињења 23-49	105
3.6.	Поступак за синтезу једињења 50-64	116
3.7.	Рендгенска структурна анализа	123
3.8.	Рачунарске методе	131

<b>4. ЗАКЉУЧАК</b>	<b>133</b>
<b>5. ЛИТЕРАТУРА</b>	<b>137</b>
<b>6. ПРИЛОГ</b>	<b>147</b>
<b>6.1. NMR спектри</b>	
<b>6.2. Публиковани научни радови у којима су презентовани резултати докторске дисертације</b>	



## Списак слика и схема:

- Слика 1.** Структурна формула пиразола и 1-пиразолил-аланина.
- Слика 2.** Два могућа таутомерна облика пиразола.
- Слика 3.** Разликовање региоизомера помоћу Нуклеарног Overhauser-овог ефекта.
- Слика 4.** Структурна формула пиразол-5-она (**24**).
- Слика 5.** Могући таутомерни облици несупституисаног пиразолона.
- Слика 6.** Таутомерни облици 4-ацилпиразолона.
- Слика 7.** Пиразол-5-они са несупституисаним положајем 3.
- Слика 8.** Разликовање *O*-алкилованих од *N*-алкилованих производа.
- Слика 9.** Кристална структура једињења **46a**.
- Слика 10.** Таутомерни облици 4-нитрозил-деривата пиразолона.
- Слика 11a.** ORTEP приказ<sup>117</sup> за HDMCPI на нивоу вероватноће од 50%, хетероатоми су осенчени.
- Слика 11b.** Димер формиран у структури HDMCPI и везани јодид, организован преко центра симетрије.<sup>118</sup>
- Слика 12.** Оптимизоване структуре хидратисаног таутомера **A (D)** и прелазна стања TS1 и TS2.
- Слика 13.** Репрезентативни граф који показује опстанак HeLa ћелија током 72 h у присуству растућих концентрација једињења **15, 16, 20** и **21**.
- Слика 14.** Репрезентативни граф који показује опстанак K562 ћелија током 72 h у присуству растућих концентрација једињења **15, 16, 20** и **21**.
- Слика 15.** Репрезентативни граф који показује опстанак MDA-MB-361 и MDA-MB-453 ћелијских линија током 72 h у присуству растућих концентрација једињења **39**.
- Слика 16.** Резултати IRC прорачуна за TS4.
- Слика 17.** Резултати IRC прорачуна за TS6.

- Схема 1.** Добијање пиразола из 1,3-дикетона.
- Схема 2.** Региоселективно добијање 1-арил-супституисаних пиразола.
- Схема 3.** Добијање пиразола у реакцији катализованој паладијумом.
- Схема 4.** Добијање етил-4-метил-3-ацетилпиразол-5-карбоксилата (**4**).
- Схема 5.** Реакција циклокондензације асиметричног енаминодикетона са карбоксиметилхидразином.
- Схема 6.** Добијање пиразола из пропиофенон-метилхидразона.
- Схема 7.** Електрофилна супституција помоћу халометилен-иминијумове соли (**7**).
- Схема 8.** Добијање халометилен-иминијумове соли.
- Схема 9.** Добијање пиразол-4-карбалдехида (**8**).
- Схема 10.** Механизам Vilsmeier-овог формиловања ацетофенон-фенилхидразона.
- Схема 11.** Алтернативни механизам формиловања ацетофенон-фенилхидразона.
- Схема 12.** Добијање пиразол-4-карбалдехида (**9**) конвенционалним термичким методама.
- Схема 13.** Синтеза бензопирано[4,3-с]пиразола (**10**).
- Схема 14.** Добијање 1*H*-пиразол-4-карбоксилата **11** из хидразона β-кетоестара.
- Схема 15.** Затварање прстена комерцијалним Vilsmeier-овим реагенсом.
- Схема 16.** Семикарбазони β-кетоестара као супстрати за добијање 1*H*-пиразол-4-карбоксилата (**12**).
- Схема 17.** Реакција 2,4-динитрофенилхидразона 4-арил-3-бутен-2-она са Vilsmeier-овим реагенсом.
- Схема 18.** Механизам реакције 2,4-динитрофенилхидразона 4-арил-3-бутен-2-она са Vilsmeier-овим реагенсом.
- Схема 19.** Синтеза 4-формилпиразола **14** преко двоструког формиловања хидразонског интермедијера.
- Схема 20.** Кондензација 4-формилпиразола са метиларил-кетонима.
- Схема 21.** Оксидација 3-арил-4-формилпиразола.
- Схема 22.** Синтеза аминоксидних киселина **17**.
- Схема 23.** Добијање 4-[2-арил(хетероарил)етенил]пиразола (**18**).
- Схема 24.** Baylis-Hillman-ова реакција.
- Схема 25.** Кондензација пиразол-4-карбалдехида са индолима у присуству киселог катализатора Amberlyst 15.

- Схема 26.** Кондензација пиразол-4-карбалдехида са бенzenом у присуству трифлатне киселине.
- Схема 27.** Претварање фенолних Schiff-ових база 1,3-диарил-1*H*-пиразол-4-карбалдехида у 2-супституисане бензоксазоле **19**.
- Схема 28.** Таутомерија β-дикетона и NH-пиразола **21**.
- Схема 29.** Добијање 3-аминопиразола (**22**).
- Схема 30.** Добијање 3-аминопиразола микроталасним озрачивањем.
- Схема 31.** Реакција 2-ароил-3-(диметиламино)акрилонитрила са хидразин-хидратом.
- Схема 32.** Реакција хидразина са 3-оксо-алкилнитрилима.
- Схема 33.** Реакција хидразоноил-халогенида са активним метиленским једињењима.
- Схема 34.** Синтеза 3-аминопиразола премештањем *N*-аминопиразола у бромоводоничној киселини.
- Схема 35.** Два могућа таутомерна облика 3-аминопиразола (**23A**) и 5-аминопиразола (**23B**).
- Схема 36.** Кноп-ова синтеза пиразолона.
- Схема 37.** Синтеза 3-метил-1-фенилпиразол-5-она (**25**).
- Схема 38.** Синтеза пиразолона трансформацијом тиadiaзола.
- Схема 39.** Синтеза првог пиразолонског деривата комбретастатина А-4 (**26**) и његових прекурсора.
- Схема 40.** Синтеза пиразолона микроталасним озрачивањем.
- Схема 41.** Синтеза 5-аминопиразолона.
- Схема 42.** Синтеза деривата пиразолона помоћу ултразвука.
- Схема 43.** Циклокондензација хидразина са β-кето-естром уз ултразвучно озрачивање.
- Схема 44.** Таутомерни облици 3-супституисаних пиразолона.
- Схема 45.** Могући таутомерни облици 1,3-дисупституисаних пиразолона.
- Схема 46.** Добијање 1-алкилпиразолона.
- Схема 47.** Алкиловање хидроксипиразола **36**; а) BuLi (2 екв.), THF, -78 °C, затим MeI (1 екв.), собна температура; б) MeI, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN, собна температура; с) MeI, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN, рефлукс.
- Схема 48.** а) EDC (1-етил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид), DIPEA (диизопропилетиламин), *N,O*-диметилхидроксиламин, DCM/DMF; б) LDA (литијум-диизопропиламид), EtOAc, THF, -78 °C; с) диметилхидразин,

пиридин, 90 °C; d) Pd(OAc)<sub>2</sub>, CsOAc, DMF, три-(фурил)фосфин, Ar-Br или Ar-I 125 °C; e) NBS, DCM; f) Pd(Dppf)<sub>2</sub> (Dppf = 1,1'-bis(дифенилфосфино)фероцен), диоксан, 2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, арил(хетероарил)боронска киселина.

- Схема 49.** Реакција формиловања 1-алкилпиразолонa.
- Схема 50.** Vilsmeier-ово формиловање пиразолонског једињења.
- Схема 51.** Таутомерни облици формированих деривата пиразол-5-она.
- Схема 52.** Добијање 1-ацил-3-хидрокси-1*H*-пиразола, **39**.
- Схема 53.** Добијање 4-ацил-деривата пиразол-5-она.
- Схема 54.** а) NaOMe/MeOH; б) 2,3-епоксипропанол/диетил азодикарбоксилат/Ph<sub>3</sub>P/THF (Mitsunobu-ови услови); с) епихлорохидрин (у вишку); d) епихлорохидрин (1 екв.), DMF; e) R<sup>2</sup>R<sup>3</sup>NH.
- Схема 55.** Структурни таутомери 4-ацил-пиразолонских Schiff-ових база.
- Схема 56.** Синтеза 4-ацил-пиразолонских Schiff-ових база **46a-e**.
- Схема 57.** Добијање 4-нитрозил-деривата пиразолонa.
- Схема 58.** Реагенси и услови: а) PhNHNH<sub>2</sub>, EtOH; б) POCl<sub>3</sub>/DMF; с) хомогенизација у авану, чврсти NaOH, затим MeOH, рефлукс, 2 h; d) NaBH<sub>4</sub>, 0-5 °C, потом 12 h, r.t., AcOH.
- Схема 59.** Реагенси и услови: а) PhNHNH<sub>2</sub>, EtOH, рефлукс; б) DMF, POCl<sub>3</sub> (3 екв.), с.т.; с) α-амино-киселина, NaOH, хомогенизација у авану, с.т., затим MeOH, рефлукс, 2 h; NaBH<sub>4</sub>, 0-5 °C, потом 12 h, с.т., AcOH.
- Схема 60.** Добијање интермедијера HDMCPI.
- Схема 61.** Два могућа таутомерна облика за HDMCPI у DMSO-d<sub>6</sub> раствору (однос таутомера одређен је интегралњем <sup>1</sup>H NMR сигнала).
- Схема 62.** Таутомерни облици 5-хидрокси-3,5-диметил-1-*S*-метилизотиокарбамоил-2-пиразолинијум-катјона (HDMCP).
- Схема 63.** Механизам формирања карбанјона CA1, CA2 и CA3, преко прелазних стања TS1, TS2 и TS3, респективно.
- Схема 64.** Могући механизам формирања AAMP-a.
- Схема 65.** Таутомерни облици 5-хидрокси-3,5-диметил-1-тиокарбамоил-2-пиразолина. Однос таутомера (**E**), 3,5-диметил-1-тиокарбамоил-2-пиразолина и полазног пиразолинског једињења одређен је интегралњем <sup>1</sup>H NMR-сигнала за метил-групе.



- Схема 66.** Реагенси и услови: а)  $R_1NHNH_2$ , EtOH, рефлукс, 3 h; б) DMF,  $POCl_3$ , загревање, 80 °C, 1,5 h.
- Схема 67.** Реагенси и услови:  $RNH_2$ , *p*-TsOH, EtOH, рефлукс 2 h.
- Схема 68.** Могући таутомерни облици аминотилиденских деривата 4-формил-едаравона.
- Схема 69.** Реагенси и услови: за аминe: *p*-TsOH, EtOH, рефлукс 2 h; за аминокиселине: EtOH, рефлукс 4 h.

## Списак табела:

- Табела 1.** Приказ присуства таутомера у чврстом стању и у DMSO-d<sub>6</sub> раствору.
- Табела 2.** Синтеза пиразолона **28** и тиоанилидског деривата **29** са и без ултразвучног зрачења.
- Табела 3.** <sup>1</sup>H NMR-Спектрални подаци за **30** у различитим растварачима.
- Табела 4.** Експериментални и израчунати, (GIAO-B3LYP), <sup>13</sup>C и <sup>15</sup>N NMR спектри таутомерних облика једињења **30**.
- Табела 5.** <sup>1</sup>H NMR-Хемијска померања за *орто*- и *мета*-циклопентадиенске протоне.
- Табела 6.** Интермолекулске интеракције у кристалној структури HDMCPI-а.
- Табела 7.** *In vitro* цитотоксична активност једињења **1-9**.
- Табела 8.** IC<sub>50</sub> (μg/ml) вредности тестираних једињења и *cis*-платине током 72 h деловања на HeLa, Fem-x и K562 ћелије, одређене МТТ тестом.
- Табела 9.** IC<sub>50</sub> (μg/ml) вредности тестираних једињења и *cis*-платине током 72 h деловања на HeLa, MDA-MB-361, MDA-MB-453, K562 и LS174 ћелије, одређене МТТ тестом.
- Табела 10.** IC<sub>50</sub> (μg/ml) вредности тестираних једињења и *cis*-платине током 72 h деловања на MDA-MB-361 и MDA-MB-453 ћелије, одређене МТТ тестом.
- Табела 11.** Основни кристалографски подаци и подаци везани за прикупљање и решавање структуре једињења **22**.
- Табела 12.** Координате атома и еквивалентни изотропни параметри, U(eq) за једињење **22**.
- Табела 13.** (An)изотропни параметри за једињење **22**.
- Табела 14.** Координате атома водоника и изотропни параметри, U(iso) за једињење **22**.
- Табела 15.** Дужине веза (Å) у једињењу **22**.
- Табела 16.** Углови веза (°) у једињењу **22**.
- Табела 17.** Торзиони углови (°) у једињењу **22**.
- Табела 18.** Растојања (Å) у једињењу **22**.
- Табела 19.** Водоничне везе (Å, °) у једињењу **22**.

## ИЗВОД

У оквиру ове докторске дисертације синтетизована је серија *N*-[(1,3-дифенилпиразол-4-ил)метил]  $\alpha$ -амино-киселина и *N*-[(3-фероценил-1-фенилпиразол-4-ил)метил]  $\alpha$ -амино-киселина, укључујући и оба фенилаланинска енантиомера. У NMR студијама органометалних деривата запажено је да додатно цепање орто- и мета-фероценских сигнала и њихов мултиплицитет зависе од природе  $\alpha$ -амино-киселинског бочног низа и не могу се приписати само хиралности  $\alpha$ -амино-киселине која је везана за пиразолов прстен. Ефекат магнетне нееквивалентности оба орто-протона супституисане циклопентадиенске јединице нарочито је изражен у једињењима са ароматичним или хетероароматичним прстеновима. У серинском деривату добијеном из 3-фероценил-1-фенилпиразол-4-карбалдехида није примећено раздвајање орто-циклопентадиенских сигнала вероватно као последица формирања водоничне везе између хидроксилне и карбоксилне групе, што указује на постојање неке друге конформације са умањеним утицајем хидроксиметил-групе на фероценски систем.

Механистичка студија добијања 4-ацетил-3(5)-амино-5(3)-метилпиразола (ААМР-а) указала је на веома добро слагање између експериментално добијених и израчунатих дужина веза, углова веза и торзионих углова у 5-хидрокси-3,5-диметил-1-*S*-метилизотиокарбамоил-2-пиразолинијум-јодиду (НДМСРЈ), што потврђује да је изабрана рачунарска метода погодна за испитивање реакција овог једињења. Трансформација 5-хидрокси-3,5-диметил-1-*S*-метилизотиокарбамоил-2-пиразолинијум-катјона (НДМСР) у базној воденој средини испитивана је помоћу експерименталних и рачунарских метода. Примећено је да се реакција између НДМСР катјона и хидроксилног анјона одвија лако без активационе баријере, уз значајну стабилизацију система. На овај начин добија се искључиво хидратисани кето-имински таутомер. Активациона енергија потребна за изомеризацију овог облика у кето-енамински таутомер значајно је већа у поређењу са добијањем карбанјона  $CA_2$  у базној средини.  $CA_2$  подлеже даљој циклизацији уз елиминацију  $MeSH$  дајући ААМР. Одсуство ААМР-а као производа у реакцији ацетилацетона са тиосемикарбазидом уместо са *S*-метилизотиосемикарбазидом може се објаснити одсуством кето-иминског облика у таутомерној равнотежи која би омогућила формирање карбанјона потребног за даљу

циклизацију. Овим је потврђена кључна улога кето-иминског таутомера у добијању ААМР-а.

Изведена је и синтеза седамнаест структурно различитих аминометилиденских деривата 4-формиледаравона и извршена карактеризација помоћу спектроскопских метода и елементарне анализе. Поред едаравонске, синтетизована је и серија 4-аминометилиденских деривата 3-фенил-2-пиразолин-5-она и 1,3-дифенил-2-пиразолин-5-она. У реакцији 4-формилпиразолонских прекурсора са аминима присуство каталитичке количине *p*-толуенсулфонске киселине је неопходно да спречи енолизацију карбонилне групе и померање таутомерне равнотеже према таутомерном облику са егзоцикличном двоструком везом.

Резултати антипролиферативне активности показују да нека једињења из пиразолске и пиразолонске серије поседују цитотоксични потенцијал који се може поредити са референтним цитостатицима као што су доксорубицин и *cis*-платина у инхибицији ћелијских линија неких типова канцера.

## SUMMARY

Within this doctoral thesis a series of *N*-[(1,3-diphenylpyrazol-4-yl)methyl]  $\alpha$ -amino acids and *N*-[(3-ferrocenyl-1-phenylpyrazol-4-yl)methyl]  $\alpha$ -amino acids including both phenylalanine enantiomer derivatives were synthesized. NMR studies of the organometallic compounds revealed that additional splitting of the ortho and meta ferrocene signals as well as their multiplicities depend on nature of  $\alpha$ -amino acid side chain and cannot be attributed to the chirality of pyrazole-linked  $\alpha$ -amino acid alone. The effect of magnetic nonequivalence of both ortho protons of substituted cyclopentadiene (Cp) unit is particularly pronounced in compounds containing aromatic or heteroaromatic rings. In serine derivative of 3-ferrocenyl-1-phenylpyrazole-4-carboxaldehyde there is no appearance of splitting of ortho Cp signals probably as a consequence of hydrogen bond formation between hydroxyl and carboxylate group indicating a presence of an alternate conformation with reduced influence of CH<sub>2</sub>OH moiety on ferrocene scaffold.

The mechanistic study of formation of 4-acetyl-3(5)-amino-5(3)-methylpyrazole (AAMP) revealed that the agreement between experimentally obtained and calculated bond distances, bond angles, and torsion angles of 5-hydroxy-3,5-dimethyl-1-*S*-methylisothiocarbamoyl-2-pyrazolinium iodide (HDMCPI) is very good, confirming that the selected computational method is suitable for investigating the reactions of HDMCPI. The transformation of 5-hydroxy-3,5-dimethyl-1-*S*-methylisothiocarbamoyl-2-pyrazolinium cation (HDMCP) in alkaline aqueous solution was investigated using experimental and computational methods. It was shown that the reaction between the HDMCP cation and hydroxide anion proceeds smoothly, without activation barrier, and with significant stabilization of the system. In this way the hydrated keto-imine tautomer is formed, at 100 % yield. The activation energy for the isomerization of this form into keto-enamine tautomer is significantly higher in comparison to the formation of carbanion CA2 in alkaline medium. CA2 undergoes further cyclization and elimination of MeSH, thus yielding AAMP. The absence of AAMP as a product of the reaction between acetylacetone with thiosemicarbazide instead of *S*-methylisothiosemicarbazide can be explained with the absence of keto-imine form in the tautomeric equilibrium, which would allow the formation of a carbanion for

further cyclization. This fact confirms the crucial role of the keto-imine tautomer in the formation of AAMP.

Seventeen structurally different aminomethylidene derivatives of 4-formyledaravone were prepared and characterized using spectroscopic techniques and elemental analysis. Also, a series of 4-aminomethylidene derivatives of 3-phenyl-2-pyrazolin-5-one and 1,3-diphenyl-2-pyrazolin-5-one were synthesized. In the reaction of 4-formylpyrazolone precursor with amines the presence of catalitical amount of *p*-toluenesulfonic acid is necessary to prevent enolization of carbonyl group and a shift of tautomeric equilibria towards tautomeric form with exocyclic double bond.

The results of antiproliferative activity show that certain compounds of the pyrazole and pyrazolone series exhibit a cytotoxic potential comparable to referent cytostatics such as Doxorubicin and cisplatin against different malignant cell lines.

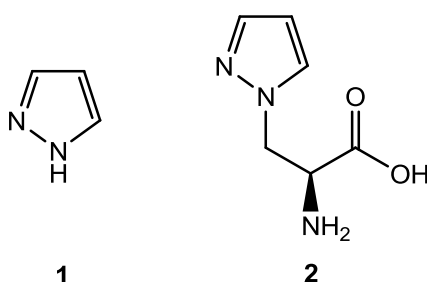
# **1. ОПШТИ ДЕО**





## 1.1. Пиразоли - историјат и значај

Пиразоли представљају класу хетероцикличних ароматичних органских једињења која у прстену садрже два суседна атома азота (**1**, слика 1). Због своје структуре и фармаколошких ефеката сврстани су у групу алкалоида, иако су у природи веома ретки. Први природни пиразол, 1-пиразолил-аланин (**2**, слика 1), изолован је из семенки лубенице 1959. године.<sup>1</sup>



Слика 1. Структурна формула пиразола и 1-пиразолил-аланина.

Пиразолска јединица представља чест структурни сегмент у синтетичким биолошки активним једињењима. Нека од њих проучавана су у циљу лечења неуродегенеративних поремећаја, попут Alzheimer-ове и Parkinson-ове болести. Поред тога, деривати пиразола показују и широк спектар других биолошких активности, као што су антитуморска, антибактеријска и антимикуробна. Шездесетих година прошлог века, обављена је клиничка студија о антитуморском дејству пиразола, али се показало да они имају превише токсичан ефекат на човека. У циљу превазилажења овог проблема, током следећих деценија синтетизован је велики број пиразолских деривата, у којима се манифестује значај овог хетероцикличног фрагмента.

Пиразолска једињења се користе још и као аналгетици (Celecoxib), антипиретици, за лечење реуматоидног артритиса, али и као хербициди, фунгициди и инсектициди, од којих је најпознатији Fipronil, затим у индустрији боја и, на крају, као аналитички реагенси.

### 1.1.1. Методе за добијање пиразола

Пиразоли се могу синтетизовати из 1,3-дикетонских прекурсора. У реакцији ацетилацетона са хидразином добија се 3,5-диметилпиразол (**3**) у приносу од 80% (схема 1).

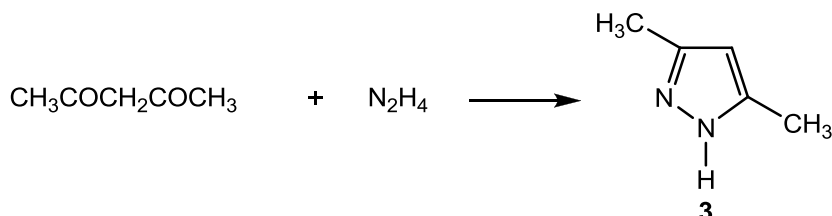


Схема 1. Добијање пиразола из 1,3-дикетона.

Овом методом може се постићи изузетно висока региоселективност при синтези 1-арил-супституисаних пиразола.<sup>2</sup> Реакција између 1,3-дикетона и арилхидразина одвија се на собној температури у *N,N*-диметилацетамиду (DMAc) при чему настаје одговарајући пиразол у добром приносу (схема 2).

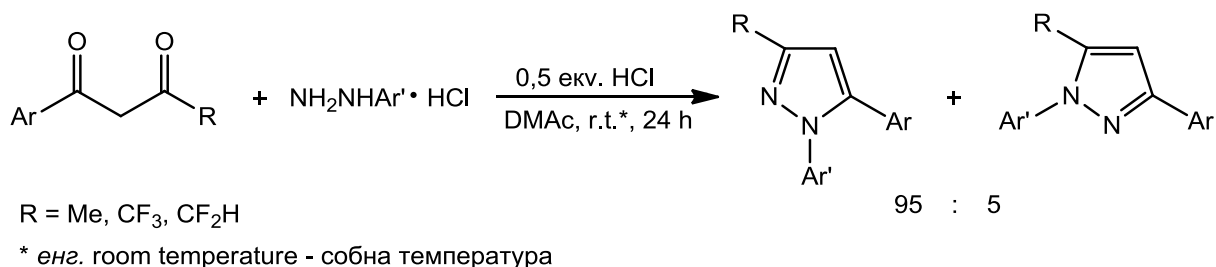


Схема 2. Региоселективно добијање 1-арил-супституисаних пиразола.

Супституисани хидразини могу дати пиразоле и преко четворо-компонентног купловања у реакцији у којој учествују терминални алкин, угљен-моноксид и арил-јодид, уз присуство паладијумовог катализатора (схема 3).<sup>3</sup>

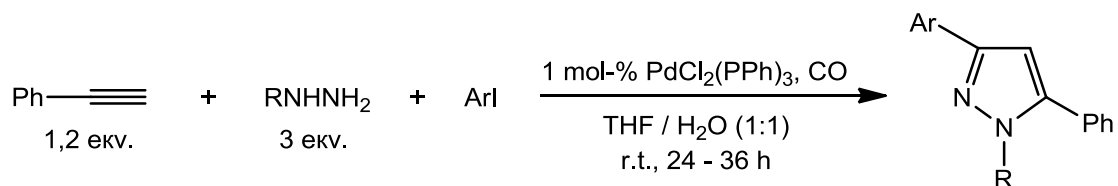
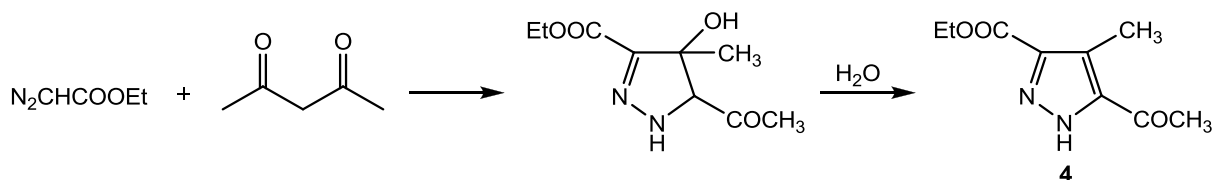


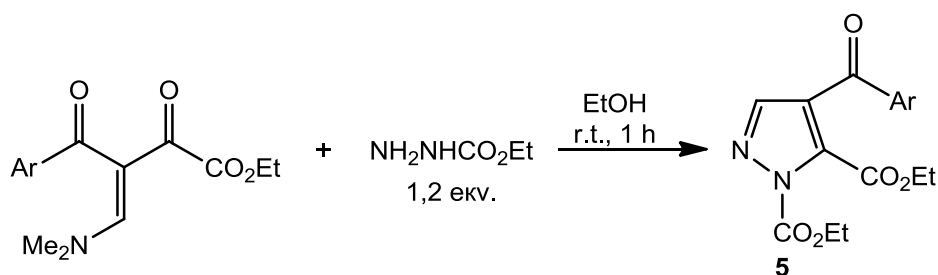
Схема 3. Добијање пиразола у реакцији катализованом паладијумом.

Реакцијом етил-диазоацетата са ацетилацетоном добија се етил-4-метил-3-ацетилпиразол-5-карбоксилат (**4**) преко пиразолинског интермедијера (схема 4).



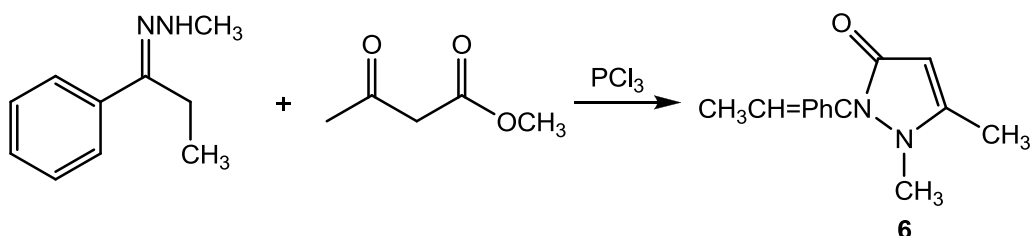
**Схема 4.** Добијање етил-4-метил-3-ацетилпиразол-5-карбоксилата (**4**).

Серија 4-супституисаних 1*H*-пиразол-5-карбоксилата (**5**) добијена је реакцијом циклокондензације асиметричног енаминодикетона са *tert*-бутилхидразин-хидрохлоридом или карбоксиметилхидразином. Реакција је региоспецифична уз веома високе приносе пиразолских деривата (схема 5).<sup>4</sup>



**Схема 5.** Реакција циклокондензације асиметричног енаминодикетона са карбоксиметилхидразином.

Реакција кетон-арил-хидразона са фосфор-трихлоридом и метил-ацетоацетатом даје 2-алкенилпиразол-3(2*H*)-он (**6**, схема 6).



**Схема 6.** Добијање пиразола из пропиофенон-метилхидразона.

### 1.1.2. Синтеза пиразола под Vilsmeier-овим условима

Vilsmeier-ова алдехидна синтеза, односно Vilsmeier-Нааск-ово формиловање уобичајена је метода за добијање алдехида у којој се користи реагенс за формиловање добијен из формамида и  $\text{POCl}_3$ . Она представља посебан тип Friedel-Crafts-ове реакције која подразумева електрофилну супституцију активiranог ароматичног прстена помоћу халометилен-иминијумове соли (7, схема 7).

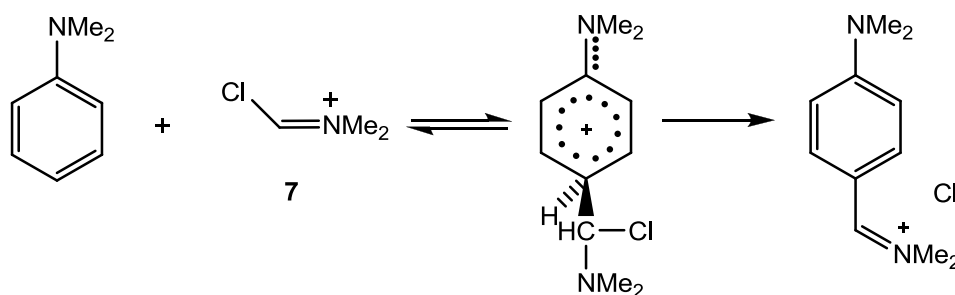


Схема 7. Електрофилна супституција помоћу халометилен-иминијумове соли (7).

Примена Vilsmeier-овог реагенса није ограничена само на реакције ароматичног формиловања. Велики број различитих алкена и активираних метил- и метиленских група показује реактивност према овом реагенсу, као и неки кисеонични и азотни нуклеофили. Извршене су бројне трансформације иминијумових соли у производе различите од алдехида што је узроковало проширење подручја деловања и разноврсности примене Vilsmeier-Нааск-ове реакције. Добијање, структура и природа халометилен-иминијумове соли приказани су на схеми 8.

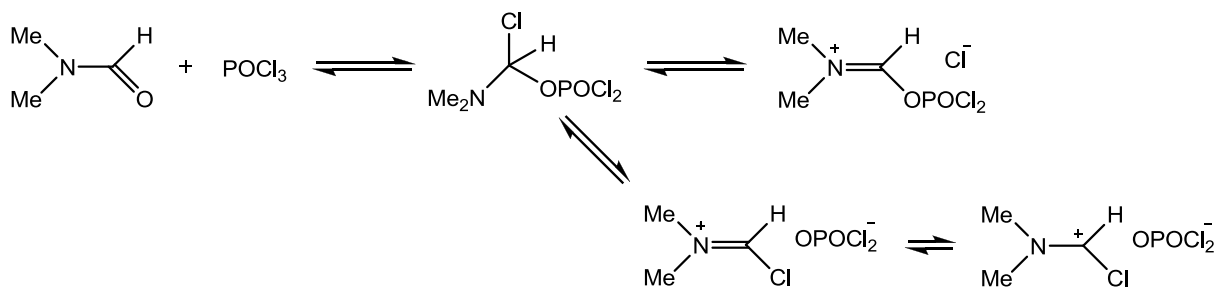


Схема 8. Добијање халометилен-иминијумове соли.

Кира и сарадници извели су синтезу пиразол-4-карбалдехида, **8**, третирањем ацетофенон-фенилхидразона са DMF/ $\text{POCl}_3$  комплексом (схема 9).<sup>5</sup>

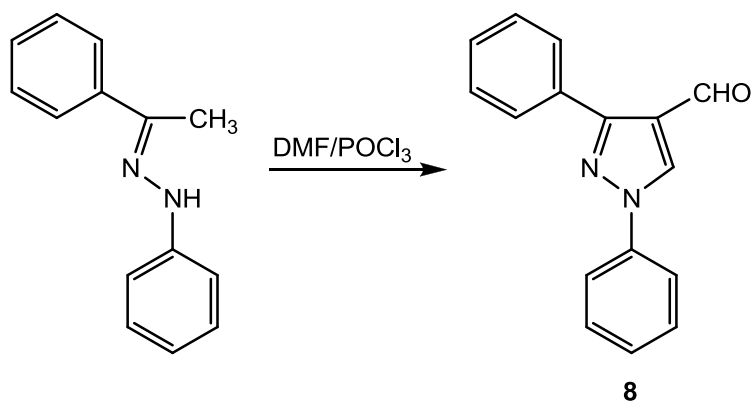


Схема 9. Добијање пиразол-4-карбалдехида (**8**).

Могући механизам ове реакције обухвата две узастопне Vilsmeier-ове реакције на метил-групи ацетофенон-фенилхидразона праћене циклизацијом уз елиминацију диметиламина (схема 10).

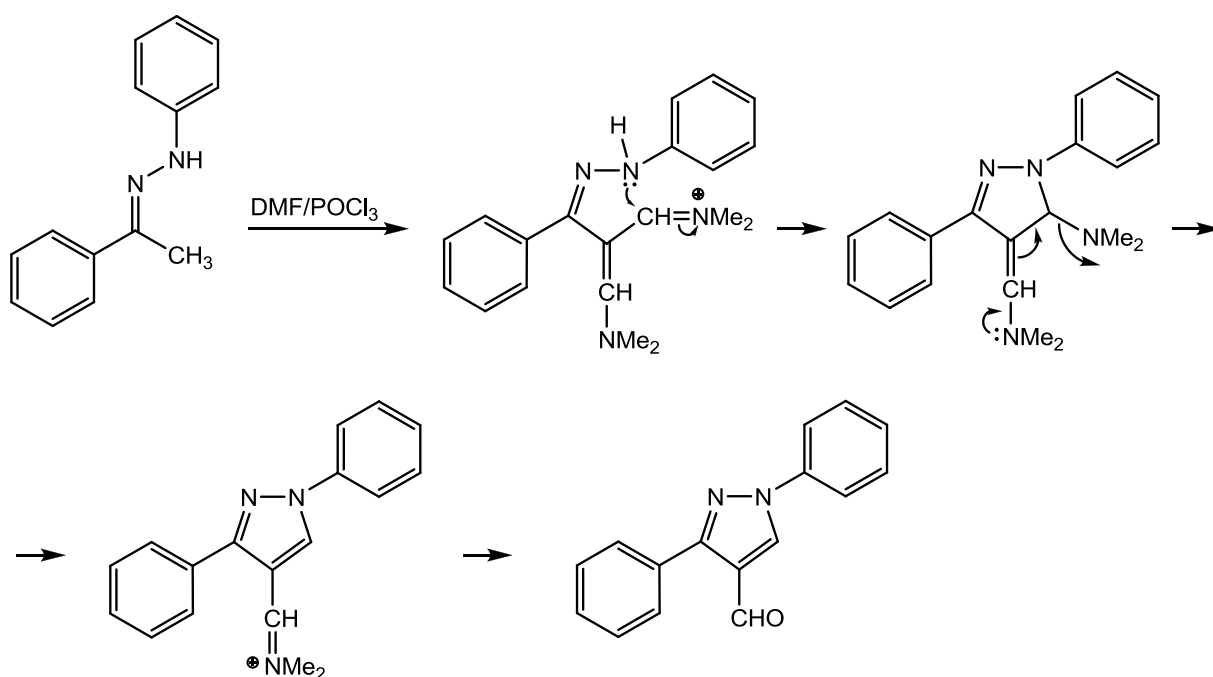


Схема 10. Механизам Vilsmeier-овог формиловања ацетофенон-фенилхидразона.

Алтернативно, већ формиран 1,3-диарилпиразол реагује са електрофилним реагентом омогућавајући формиловање пиразолског система (схема 11).

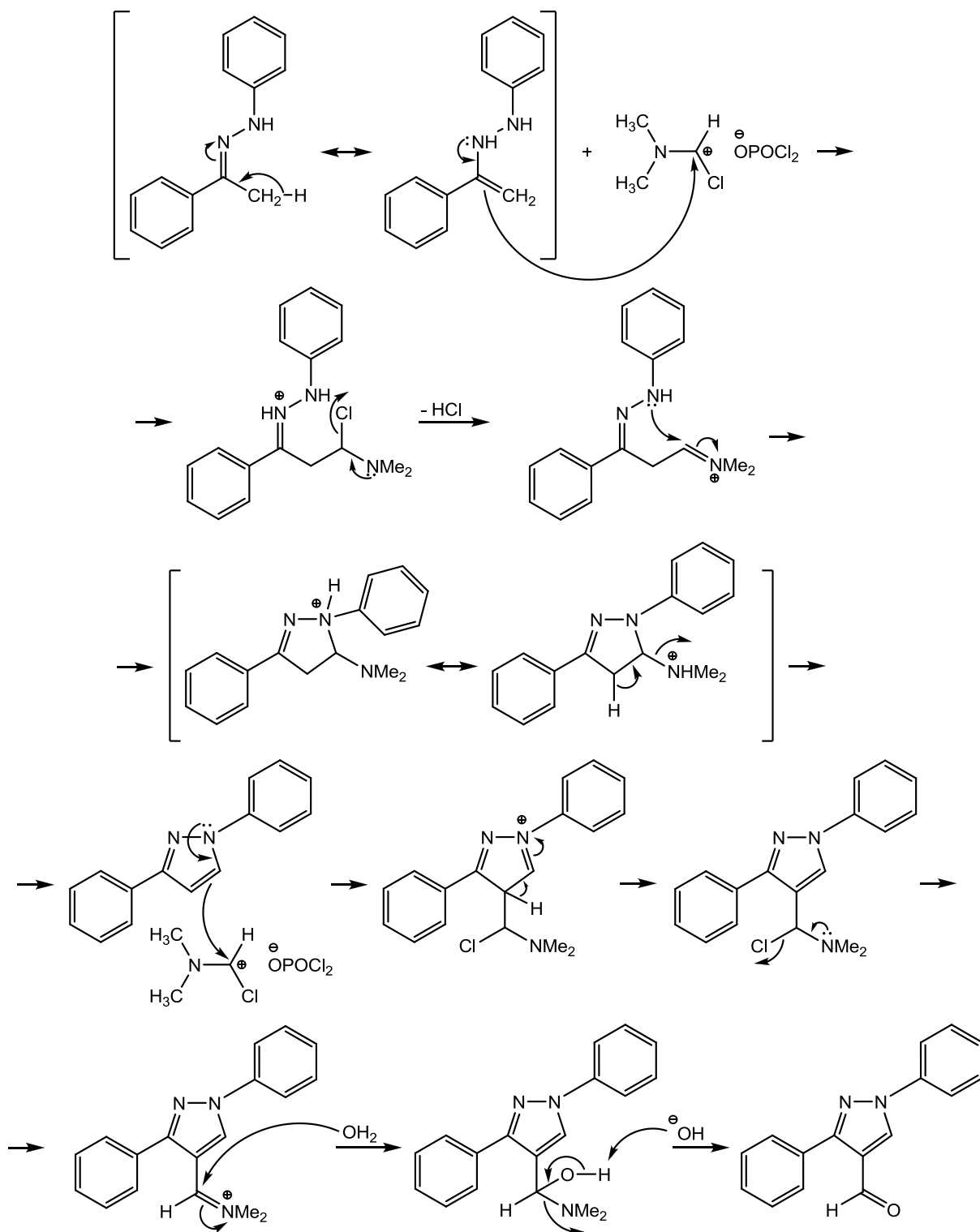
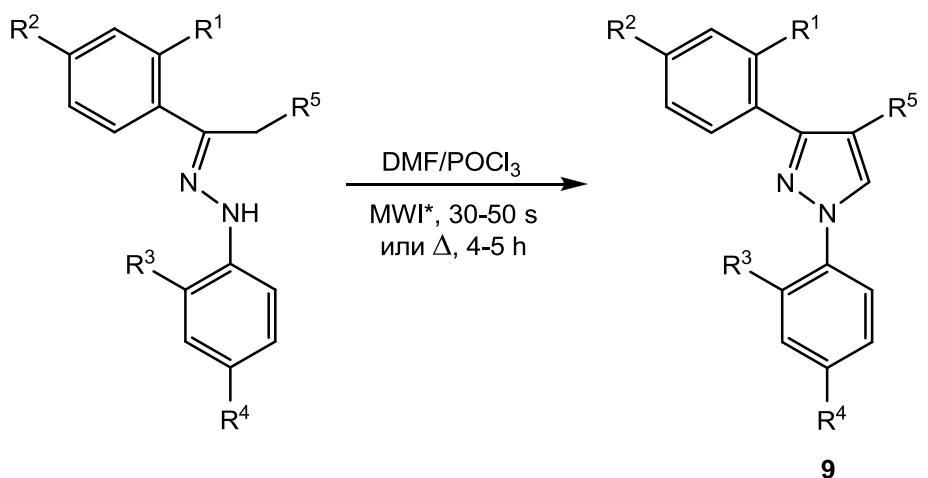


Схема 11. Алтернативни механизам формиловања ацетофенон-фенилхидраzone.

Такође је изведена и синтеза 4-алкил-1,3-диарилпиразола (**9**) са DMF и POCl<sub>3</sub>, користећи конвенционалне термичке методе (схема 12).<sup>6</sup>

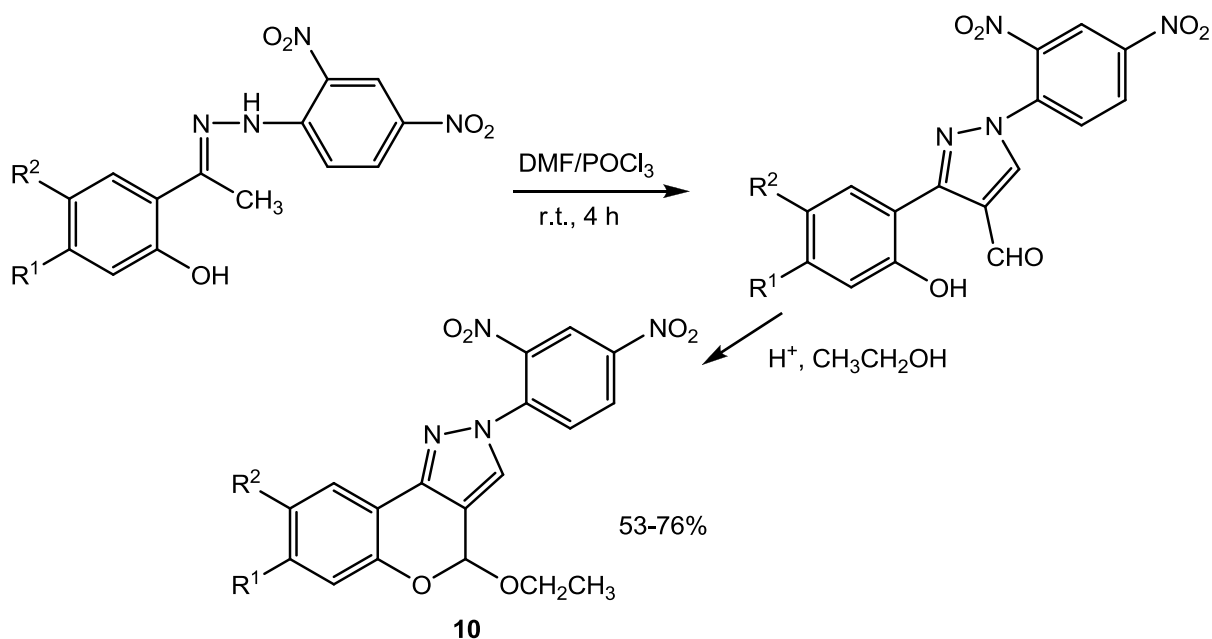


MWI 49-70%; Δ, 41-76%

\* енг. MicroWave Irradiation - микроталасно озрачивање

**Схема 12.** Добијање пиразол-4-карбалдехида (**9**) конвенционалним термичким методама.

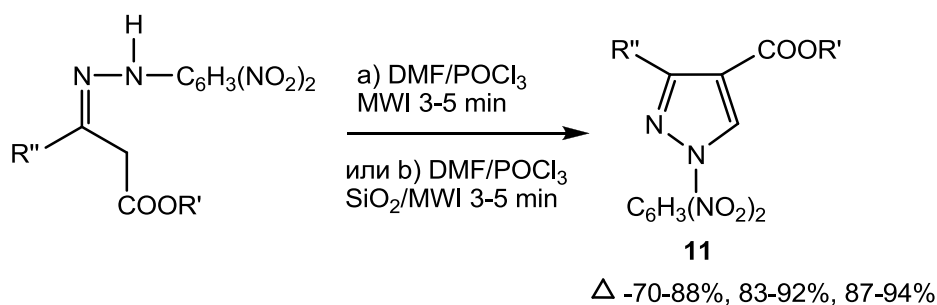
Синтеза бензопирано[4,3-с]пиразола (**10**) омогућена је Vilsmeier-овом циклизацијом *o*-хидроксиацетофенон-фенилхидразона, праћена третирањем добијеног пиразол-4-карбалдехида минералном киселином (схема 13).<sup>7</sup>



**Схема 13.** Синтеза бензопирано[4,3-с]пиразола (**10**).

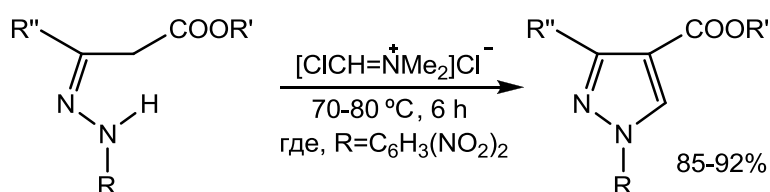
Хидразони β-кетоестера третирањем са три еквивалента Vilsmeier-овог реагенса дају 1*H*-пиразол-4-карбоксилате **11** следећим поступцима:

1. Загревањем на 80 °C 3-4 часа
2. Озрачивањем реакционе смеше у вишку DMF-а
3. Уклањањем растварача испаравањем, које је праћено озрачивањем реакционе смеше на SiO<sub>2</sub> (схема 14).<sup>8</sup>



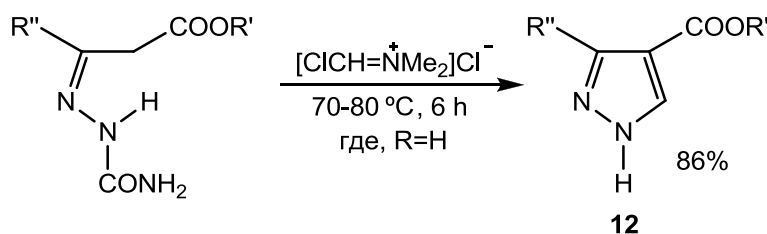
**Схема 14.** Добијање 1*H*-пиразол-4-карбоксилата **11** из хидразона β-кетоестера.

Циклизације су могуће и са комерцијално доступним Vilsmeier-овим реагенсом (схема 15).



**Схема 15.** Затварање прстена комерцијалним Vilsmeier-овим реагенсом.

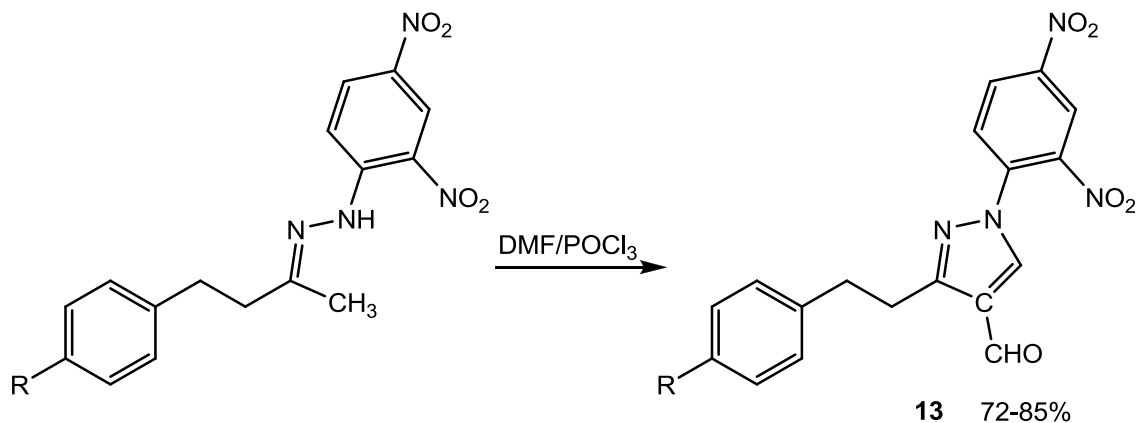
Применом семикарбазона β-кетоестера као супстрата, добијени су 1*H*-пиразол-4-карбоксилати **12** елиминацијом –CONH<sub>2</sub> групе после неутрализације (схема 16).



**Схема 16.** Семикарбазони β-кетоестера као супстрати за добијање 1*H*-пиразол-4-карбоксилата (**12**).

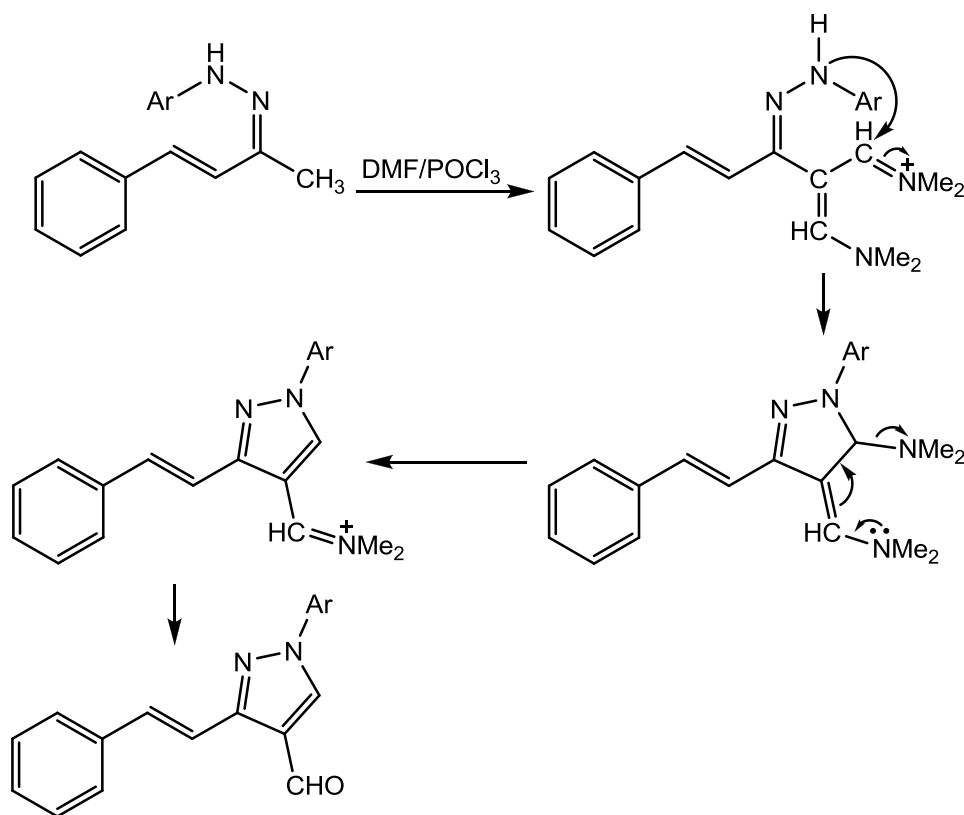


Реакцијом 4-арил-3-бутен-2-он-2,4-динитрофенилхидразона са Vilsmeier-овим реагенсом добијају се одговарајући 1-(2,4-динитрофенил)-3-(2-арилетенил)-1H-пиразол-4-карбалдехиди (**13**) у одличним приносима (схема 17).



**Схема 17.** Реакција 2,4-динитрофенил хидразона 4-арил-3-бутен-2-она са Vilsmeier-овим реагенсом.

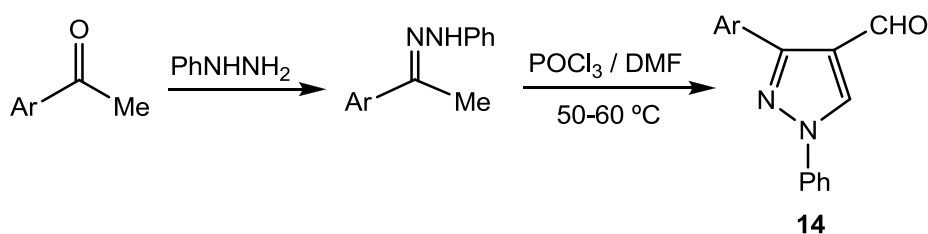
Механизам реакције представљен је на схеми 18.



**Схема 18.** Механизам реакције 2,4-динитрофенилхидразона 4-арил-3-бутен-2-она са Vilsmeier-овим реагенсом.

### 1.1.3. Реакције 1,3-дифенилпиразол-4-карбалдехида

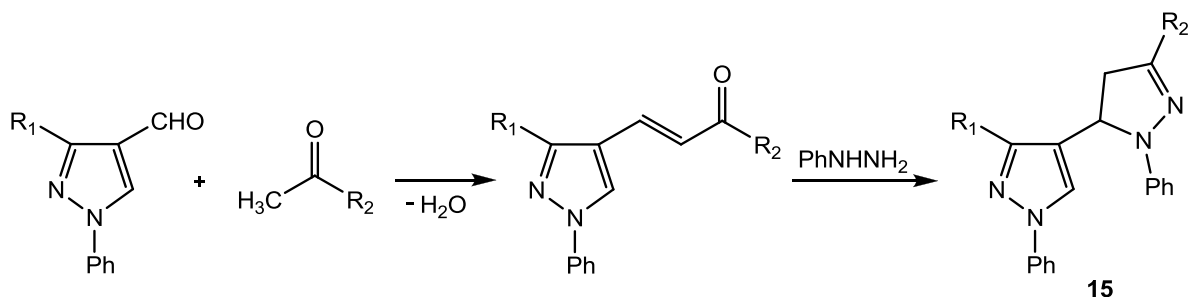
Примена Vilsmeier-Нааск-овог реагенса ( $\text{POCl}_3/\text{DMF}$ ) при формиловању великог броја ароматичних и хетероароматичних једињења детаљно је документована у литератури.<sup>9</sup> Поменути реагенс је интензивно примењиван за различите хемијске трансформације других класа једињења, при чему многе од тих реакција представљају нове и конвенционалне путеве за синтезу различитих хетероцикличних једињења.<sup>10</sup> Један значајан пример примене Vilsmeier-Нааск-овог реагенса у хетероцикличној хемији је синтеза 4-формилпиразола **14** преко двоструког формиловања хидразонског интер-медијера (схема 19).<sup>5</sup>



**Схема 19.** Синтеза 4-формилпиразола **14** преко двоструког формиловања хидразонског интермедијера.

Алдехидна група 4-формилпиразола најчешће је коришћена за модификацију са различитим структурним фрагментима.

Једна од модификација 3-арил-4-формилпиразола заснива се на кондензацији са метиларил-кетонима дајући 1-арил-3-[3-арил-4-пиразолил]пропенон (**15**), који даљом реакцијом са фенилхидразином води до формирања 1-фенил-3-арил-5-(4-пиразолил)-2-пиразолина (схема 20).<sup>11</sup>



**Схема 20.** Кондензација 4-формилпиразола са метиларил-кетонима.

Исти аутори<sup>12</sup> извели су оксидацију 3-арил-4-формилпиразола са калијум-перманганатом у воденом пиридину до одговарајућих 3-арилпиразол-4-карбоксилних киселина **16**, које су, преко киселинских хлорида, конвертоване у амиде (схема 21).

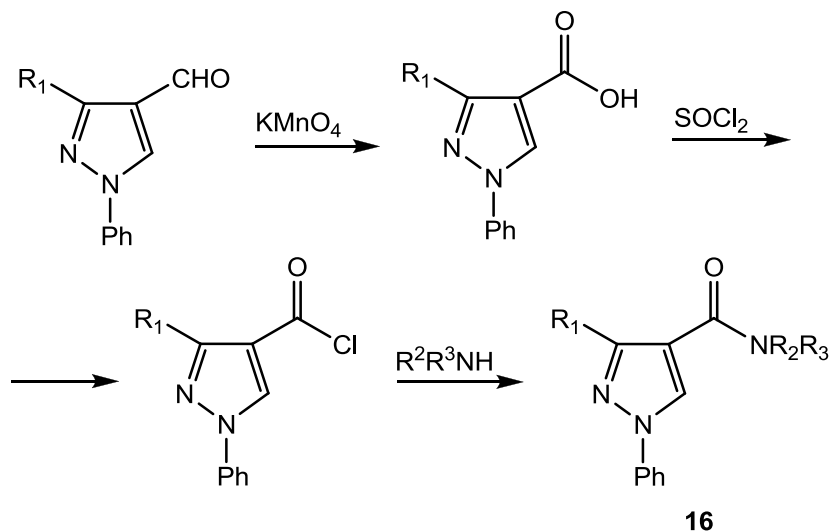


Схема 21. Оксидација 3-арил-4-формилпиразола.

Као наставак својих синтетичких студија о могућностима дериватизације 4-формилпиразола Вратенко и сарадници<sup>13</sup> извели су синтезу аминоксидних киселина **17** у реакцији *N*-бензил[3-арил-4-пиразолил]метанимина са диетилфосфитом при чему настају одговарајући диетилбензиламино[3-арил-4-пиразолил]-4-метилфосфонати који се даље хидролизују до аминоксидних киселина (схема 22).

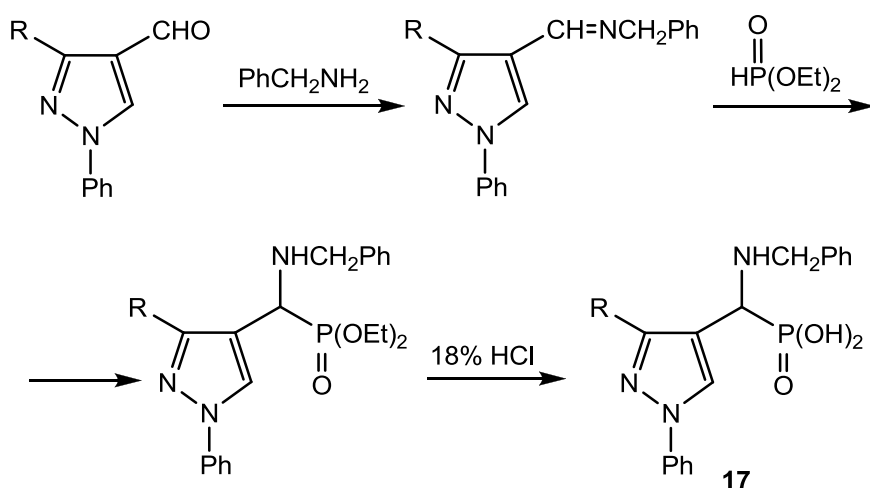


Схема 22. Синтеза аминоксидних киселина **17**.

Још једна дериватизација алдехидне групе води преко редукције са натријум-борхидридом дајући 3-арил-4-хидроксиметилпиразоле који се трансформишу у 4-хлорометил-деривате третманом са тионил-хлоридом (схема 23). Следећи корак подразумева реакцију са трифенилфосфином при чему настаје трифенил(4-пиразолилметил)фосфонијум-хлорид који се, Wittig-овом реакцијом са ароматичним или хетероароматичним алдехидима, трансформише у 4-[2-арил(хетероарил)етенил]пиразол (**18**).<sup>14</sup>

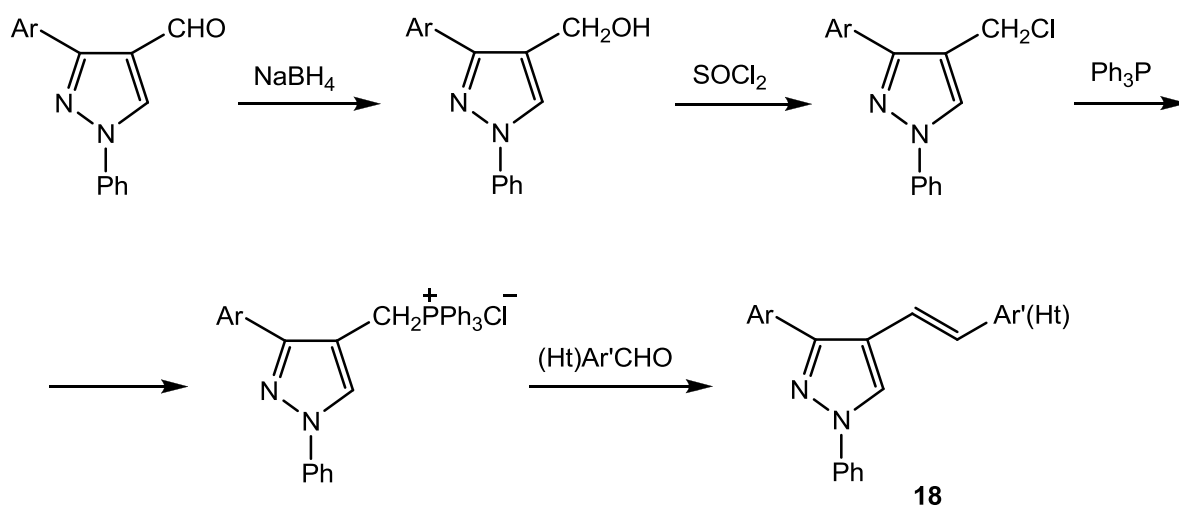
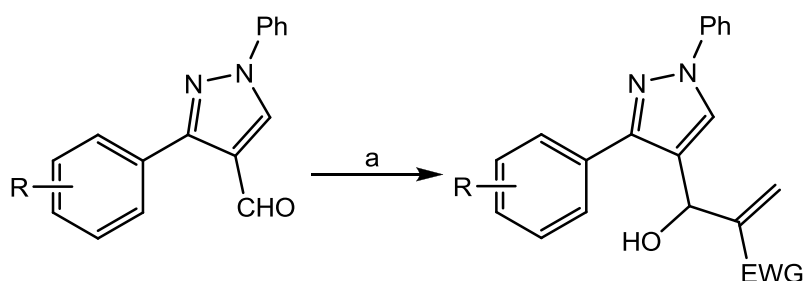


Схема 23. Добијање 4-[2-арил(хетероарил)етенил]пиразола (**18**).

Проучавањем реактивности формил-групе у положају 4 пиразолског прстена дошло се до закључка да је пиразол-4-карбалдехид релативно инертан супстрат за Baylis-Hillman-ову реакцију. У већини случајева ова реакција захтева дуже реакционо време да би се повисили приноси адуката (схема 24).<sup>15</sup>

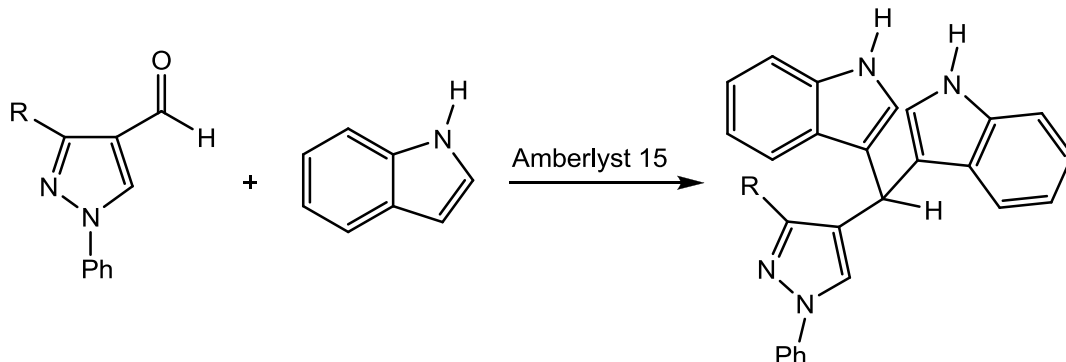


а)  $\text{CH}_2=\text{CHEWG}^*$ , 1,4-диазабицикло[2,2,2]октан, собна температура, време од 4 до 25 дана

\* *енг.* Electron Withdrawing Group - електрон-привлачна група

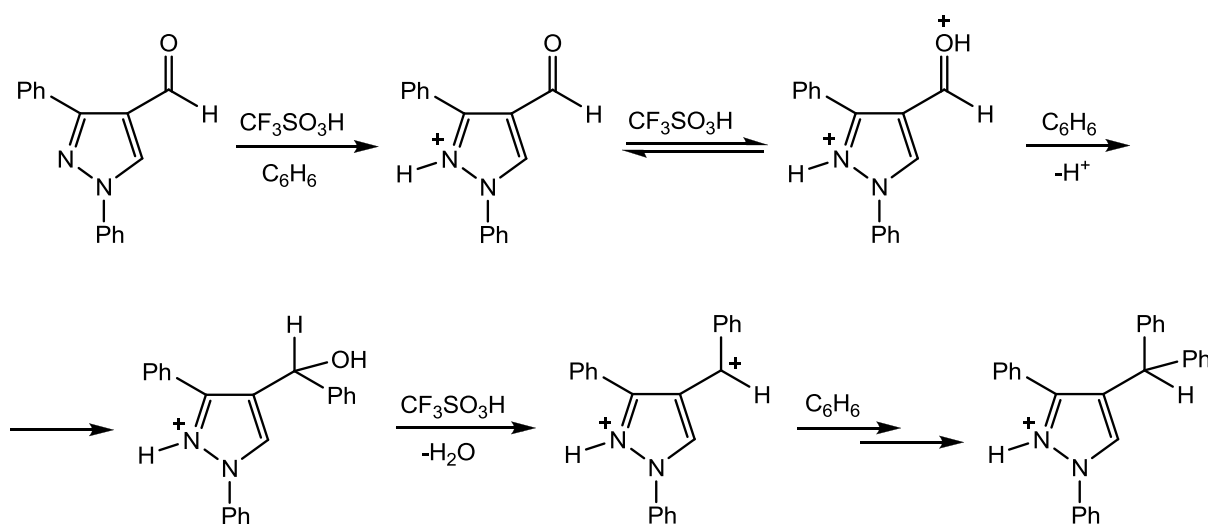
Схема 24. Baylis-Hillman-ова реакција.

Скорије је публиковано да се серија пиразол-4-карбалдехида кондензује са индолима у добрим приносима (77-96 %) користећи киселе катализаторе као што је Amberlyst 15 (схема 25).<sup>16</sup>



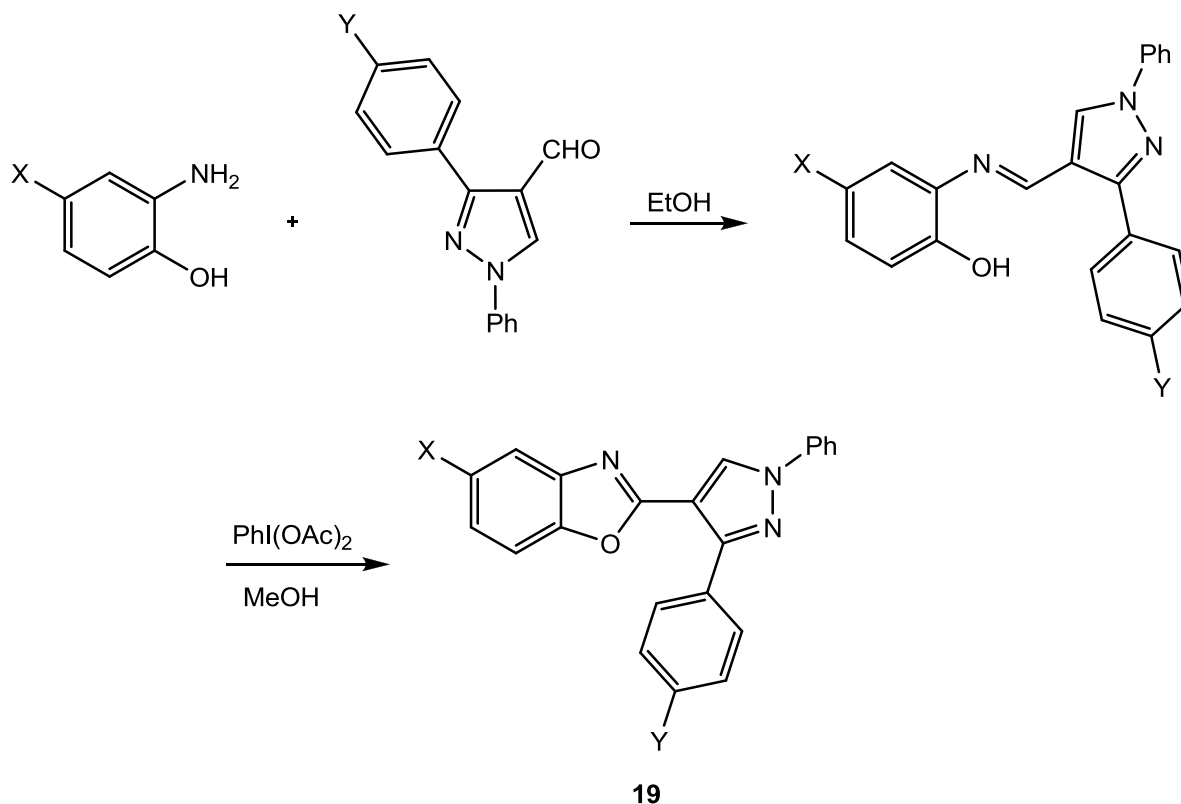
**Схема 25.** Кондензација пиразол-4-карбалдехида са индолима у присуству киселог катализатора Amberlyst 15.

Поред тога, пиразол-4-карбалдехиди могу се кондензовати са бенzenом у присуству трифлатне киселине  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$  у реакцији која представља пример Friedel-Crafts-ове конверзије познате као хидроксиалкиловање (схема 26). Одговарајући супституисани пиразоли подлежу циклизационој реакцији преко дикатјонског електрофилног интермедијера чији је наставак условљен присуством поменуте Brønsted-ове “суперкиселине”.<sup>17</sup>



**Схема 26.** Кондензација пиразол-4-карбалдехида са бенzenом у присуству трифлатне киселине.

Оксидација фенолних Schiff-ових база 1,3-диарил-1*H*-пиразол-4-карбалдехида са јодбензендиацетатом омогућава настајање 2-супституисаних бензоксазола **19** преко интрамолекуларне циклизације (схема 27).<sup>18</sup>



**Схема 27.** Претварање фенолних Schiff-ових база 1,3-диарил-1*H*-пиразол-4-карбалдехида у 2-супституисане бензоксазоле **19**.

#### 1.1.4. Таутомерија пиразола

Методe које се највише користе при одређивању хемијске структуре молекула су нуклеарна-магнетна резонанција (NMR) и рендгенска структурна анализа која се користи за одређивању релативне и апсолутне конфигурације. Остале физичке методе, иако корисне, не пружају довољно информација о структурним особинама једињења.

NMR-Спектроскопија је нашла широку примену и при одређивању структуре пиразолских једињења<sup>19</sup> истовремено омогућавајући свеобухватно истраживање њихове таутомерије. Пре развоја NMR-а коришћене су друге методе за проучавање таутомерије пиразола, као што је одређивање киселинско-базне равнотеже

потенциометријски или спектрофотометријски, али је тек увођењем NMR спектроскопије било могуће потпуније проучавати структуру пиразолских једињења.

Приликом проучавања таутомерије пиразола може се поставити одређена аналогија са  $\beta$ -дикетонима **20** (схема 28), мада постоје и веома јасне разлике.

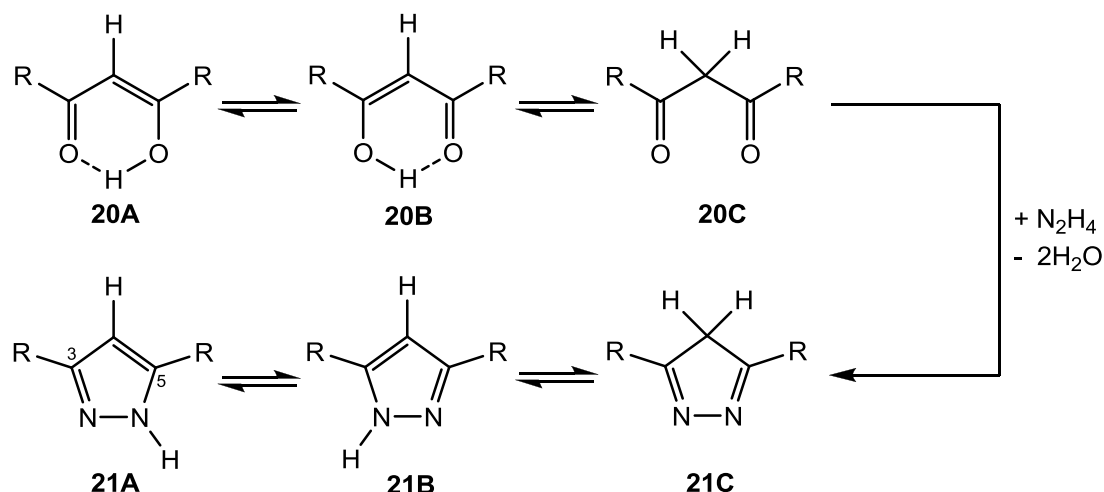
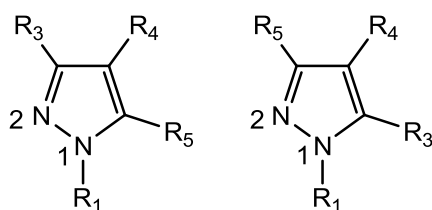


Схема 28. Таутомерија  $\beta$ -дикетона и NH-пиразола **21**.

Једна од најважнијих разлика проистиче из чињенице да пиразолски таутомер **21C** није никада детектован, за разлику од дикето-таутомера. Разлог лежи у томе што су таутомерни облици **21A** и **21B** ароматична једињења за разлику од кето-енолних таутомера **20A** и **20B**. Поред тога, размена протона између два кисеоника у кето-енолима интрамолекулски је процес, док је код пиразола трансфер протона између два атома азота интермолекулски процес.

Код симетричних пиразола ( $R_3 = R_5$ ) без супституента на N1 атому (слика 2), сигнали за протоне у положајима C3 и C5 у  $^1\text{H-NMR}$  спектру су идентични захваљујући управо таутомерији; протон у положају C4 обично је на вишем магнетном пољу. Код *N*-супституисаних пиразола, са различитим супституентима у положајима C3 и C5, NMR-спектроскопија се користи за разликовање два могућа таутомерна облика.<sup>20</sup>

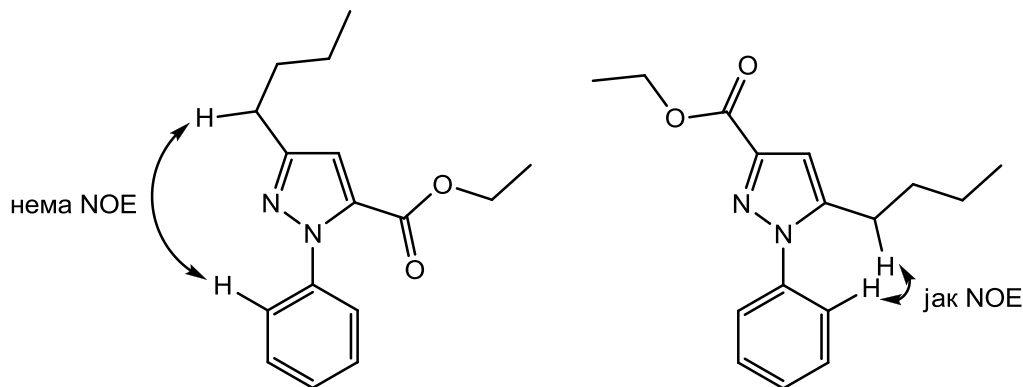


Слика 2. Два могућа таутомерна облика пиразола.

Одређена правила показала су се корисним при одређивању структуре изомерних пиразола. Код једињења где  $R_3 \neq R_5$  и  $R_1 \neq H$ , константа купловања  $^3J_{H4H5}$  већа је од константе  $^3J_{H3H4}$  и расте са порастом електрон-привлачне способности супституента у положају N1. Сигнал који одговара протону у положају C3 обично је широк због нуклеарног квадриполног релаксационог ефекта азота. Када  $R_4 \neq H$ , сигнал за протон у положају C3 мањи је од сигнала протона у положају C5, а када је  $R_4 = H$ , сигнал на C3 показује слабију резолуцију од сигнала на C5.

У  $^{13}C$  NMR-спектру несупституисани пиразол показује један или два пика за C3 и C5, што зависи првенствено од температуре и, у извесној мери, од врсте растварача. Присуство супституената на N1 помера сигнале C3 и C5 ка вишим  $\delta$  вредностима, нарочито са порастом електрон-привлачног карактера супституената. У поређењу са  $^1H$  NMR,  $^{13}C$  NMR-спектроскопија пружа прецизније информације за разликовање два изомера, на пример, 3- $CH_3$  у односу на 5- $CH_3$  или  $N-CH_3$ .

Нуклеарни Overhauser-ов ефекат (NOE) се може искористити за мерење просторних интеракција између протона на C5 атому прстена и протона везаних за супституент у положају N1.<sup>21</sup> Једна од примена овог ефекта је и разликовање два региоизомера<sup>22</sup> као што се може видети на слици 3.



Слика 3. Разликовање региоизомера помоћу Нуклеарног Overhauser-овог ефекта.

### 1.1.5. Аминопиразоли и њихов значај

Хемија аминопиразола последњих је деценија детаљно проучавана<sup>23</sup> пре свега зато што ова једињења представљају прекурсоре за добијање деривата пиразола и азолопиразола са значајном биолошком активношћу.



Један од најзначајнијих хетероцикличних темплата је 5-аминопиразолски систем, који се већ годинама уназад користи у фармацеутској и агрохемијској индустрији, али и као антибактеријски агенс.

Хемија 3-аминопиразола није била довољно испитивана све до открића деривата који су се показали као антитуморски агенси са израженим терапеутским потенцијалом.

### 1.1.5.1. Добијање 3-аминопиразола

Уобичајени начини за добијање 3-аминопиразола су реакције хидразина са  $\alpha,\beta$ -незасићеним нитрилима,<sup>24-26</sup> 3-оксоалкилнитрила са хидразинима<sup>27-30</sup> као и реакција хидразоноил-халида са активним метилен-нитрилима.<sup>31</sup>

Реакција  $\alpha,\beta$ -незасићених нитрила са хидразинима најчешћи је начин за добијање 3-аминопиразола. Сам 3-аминопиразол (**22**) добија се реакцијом акрилонитрила са хидразин-хидратом, праћеном циклизацијом и дехидрогенизацијом, чиме се добија жељено једињење.<sup>32</sup> Исто једињење може се и директно добити из хлоракрилонитрила, као што је и приказано на схеми 29.<sup>33</sup>

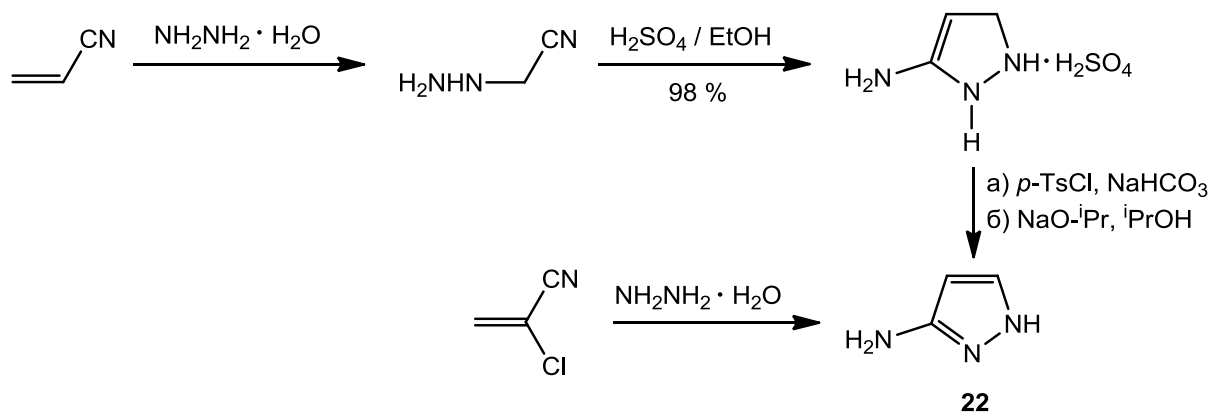
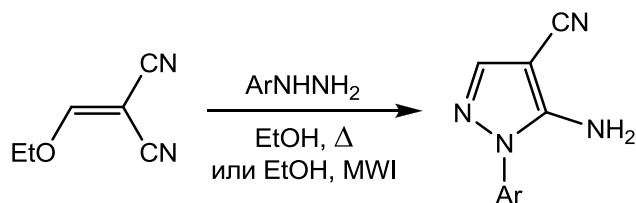


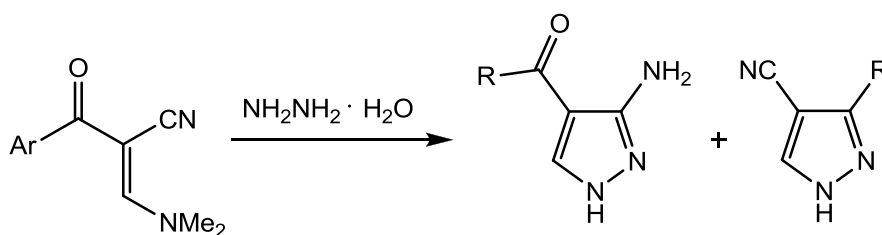
Схема 29. Добијање 3-аминопиразола (**22**).

Последњих година представљена је реакција за добијање 3-аминопиразола из арилхидразина у условима микроталасног озрачивања (схема 30). У овој реакцији забележен је благ пораст приноса у односу на реакцију изведена уз термичко загревање.<sup>34</sup>



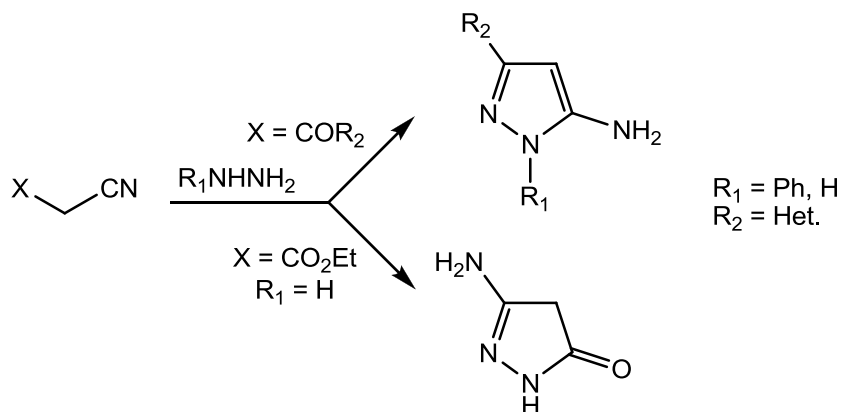
**Схема 30.** Добијање 3-аминопиразола микроталасним озрачивањем.

У реакцији 2-ароил-3-(диметиламино)акрилонитрила са хидразин-хидратом, у зависности од врсте супституента може се добити један од два могућа производа, или њихова смеша (схема 31).<sup>35-37</sup>



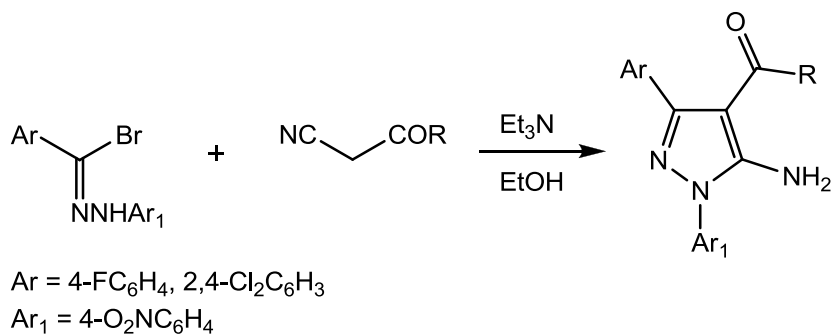
**Схема 31.** Реакција 2-ароил-3-(диметиламино)акрилонитрила са хидразин-хидратом.

Реакција хидразина са 3-оксо-алкил-нитрилима још један је ефикасан начин за добијање аминопиразолоне. При том се добија смеша одговарајућег аминопиразола и аминопиразолоне (схема 32).<sup>38,39</sup>



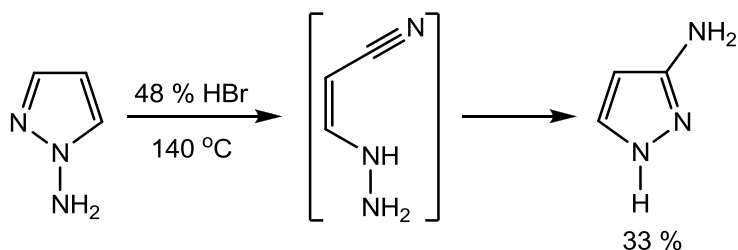
**Схема 32.** Реакција хидразина са 3-оксо-алкилнитрилима.

Реакција хидразиноил-халогенида са активним метиленским једињењима такође је један од уобичајених начина за добијање 3-аминопиразола.<sup>31</sup> Новији пример ове реакције представљен је на схеми 33.<sup>40</sup>



**Схема 33.** Реакција хидразоноил-халогенида са активним метиленским једињењима.

Поред наведених, постоји још начина за синтезу 3-аминопиразола, као што је премештање *N*-аминопиразола у бромоводоничној киселини (схема 34).<sup>41</sup>



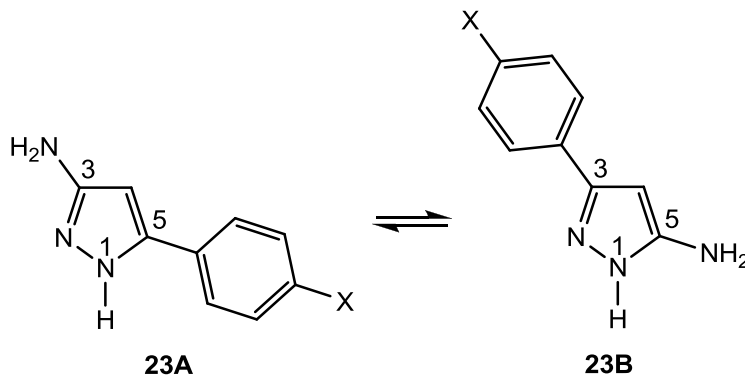
**Схема 34.** Синтеза 3-аминопиразола премештањем *N*-аминопиразола у бромоводоничној киселини.

### 1.1.5.2. Таутомерија 3(5)-аминопиразола

Таутомерија 3(5)-аминопиразола може се посматрати са два аспекта. Први се односи на амино-групу и добро је познато да ова једињења постоје у амино-облику, а никада у облику имиња.<sup>42-44</sup> Други аспект представља ануларна таутомерија, тј. положај NH-протона у прстену. Случај ануларне таутомерије проучаван је на серији 3(5)-аминио-5(3)-арилпиразола **23** у чврстом стању и у раствору.<sup>45</sup> Ова једињења разликују се само по врсти супституента у *para*-положају бензеновог прстена (схема 35).

Одређивање структуре (табела 1) било је могуће захваљујући чињеници да су за пет од шест једињења добијени монокристали за рендгеноструктурну анализу. Три једињења постоје у облику 3-амино-таутомера - **23a**, **23c**, **23d**, једињење **23f** налази се у облику 5-амино-таутомера док се **23e** налази у облику оба таутомера. CPMAS (енг.

Cross Polarization Magic Angle Spin)  $^{13}\text{C}$  NMR-спектри ових једињења у чврстом стању потврдили су кристалографске податке, што је омогућило одређивање структуре преосталог једињења **23b** за које није било могуће добити одговарајући кристал.



**Схема 35.** Два могућа таутомерна облика 3-аминопиразола (**23A**) и 5-аминопиразола (**23B**).

Што се тиче одређивања структуре у раствору, нађено је да  $^{13}\text{C}$  NMR-спектар једињења без супституента на бензеновом прстену, сниман у  $\text{DMSO-d}_6$ , садржи сигнале оба таутомерна облика. Однос два таутомера потврђен је и помоћу  $^1\text{H}$  NMR-спектроскопије, јер је ово једињење дало два сигнала који одговарају  $\text{NH}$  и  $\text{NH}_2$  групама. У табели 1. приказан је проценат 3-амино-таутомера присутног у раствору  $\text{DMSO-d}_6$ , за свако испитивано једињење.

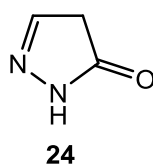
**Табела 1.** Приказ присуства таутомера у чврстом стању и у  $\text{DMSO-d}_6$  раствору.

Једињење	% 3-Амино таутомера у $\text{DMSO-d}_6$ раствору	Таутомер присутан у чврстом стању
<b>23a:</b> X = H	54	3-амино
<b>23b:</b> X = Me	58	3-амино
<b>23c:</b> X = MeO	55	3-амино
<b>23d:</b> X = Cl	42	3-амино
<b>23e:</b> X = Br	34	3-амино + 5-амино
<b>23f:</b> X = $\text{NO}_2$	0-1 %	5-амино

Такође, урађена је и оптимизација геометрије 3- и 5-амино-таутомера на семи-емпиријском нивоу. За сва једињења нађено је да 3-амино-таутомер поседује нижу енергију за приближно  $2 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

## 1.2. Пиразолони – историјат и значај

Пиразолони су хетероциклични лактамаи са два суседна атома азота и карбонилном групом у прстену. Најчешће се под овим називом подразумевају пиразол-5-они, **24**, који се могу још дефинисати и као оксо-једињења изведена из 4,5-дихидропиразола (слика 4). Ово је уједно и најдетаљније проучавана и најзначајнија група пиразолона.



Слика 4. Структурна формула пиразол-5-она (**24**).

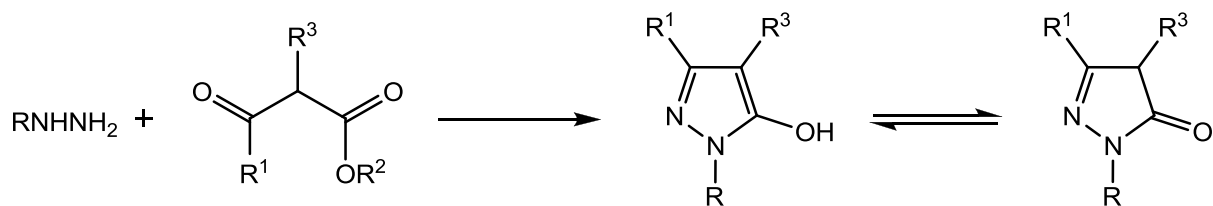
Убрзо након што је Emil Fischer открио фенилхидразин 1883. године, његов асистент Ludwig Knorr је, у покушају да синтетизује хинолински дериват, добио пиразолон који је назван антипирин. У наредних двадесет година, антипирин је постао најпродаванији лек на свету, показавши се као успешан у лечењу грознице и респираторних инфекција.

Деривати пиразолона познати су још и као антипиретици, аналгетици, антиинфламаторни и антитуморски агенси.

### 1.2.1. Методе за добијање пиразолонских деривата

#### 1.2.1.1. Кногг-ова метода за добијање пиразолона

Кногг-ова синтеза представља реакцију између хидразина или супституисаног хидразина и 1,3-дикарбонилног једињења, при чему се може добити пиразолски или пиразолонски дериват.<sup>46</sup> Пиразолони се добијају у реакцији хидразина и  $\beta$ -кетоестера (схема 36). Реакција се обично одвија на температури од 0-100 °C, у поларним протичним растварачима, као што су: метанол, етанол, изопропил-алкохол и вода. У одређеном броју случајева за циклизацију потребан је додаток базе.



R = H, алкил, арил, хетероарил, ацил...

Схема 36. Knorr-ова синтеза пиразолона.

На овај начин је 1883. године добијен 3-метил-1-фенилпиразол-5-он (**25**), реакцијом између фенилхидразина и етил-ацетоацетата (схема 37).

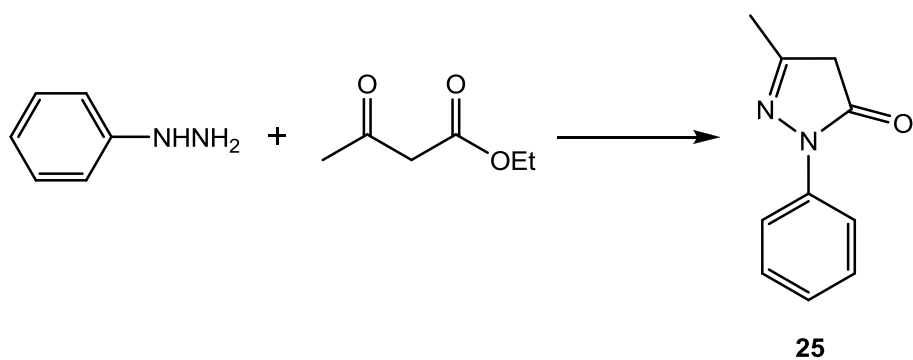


Схема 37. Синтеза 3-метил-1-фенилпиразол-5-она (**25**).

### 1.2.1.2. Трансформација тиадиазола

Тиадиазоли синтетизовани Hurd-Mori-јевом циклизацијом користе се као интермедијери за добијање других хетероцикала.<sup>47</sup>

Киселински хлорид тиадиазола конвертује се помоћу хидразина у одговарајући хидразон. Након третирања базом, хидразон даје пиразолон, који се може алкиловати *in situ* (схема 38).

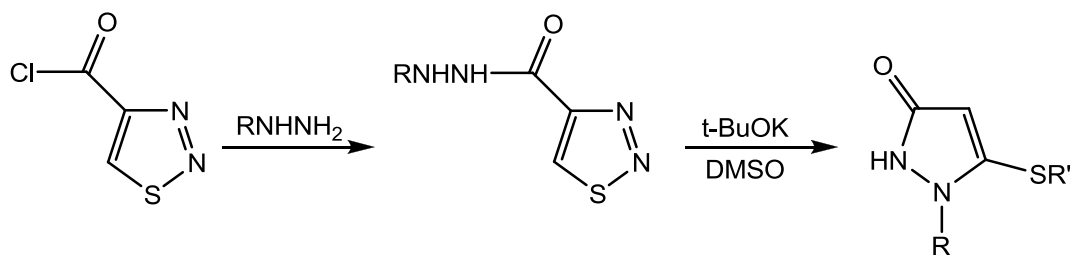
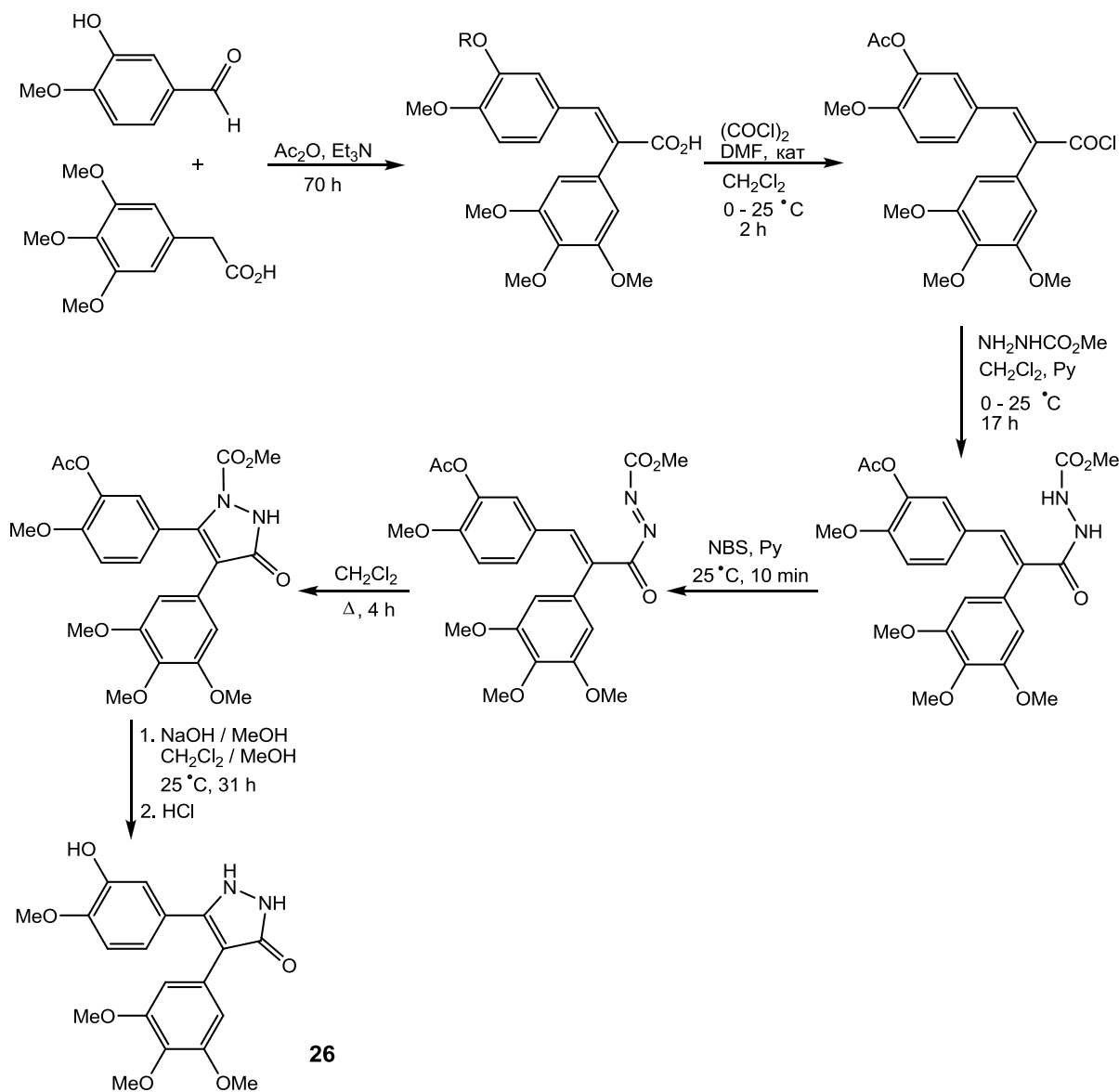


Схема 38. Синтеза пиразолона трансформацијом тиадиазола.

### 1.2.1.3. Добијање из супституисаних пропенских киселина

Пиразолони се могу добити и полазећи од 3-супституисаних или 2,3-дисупституисаних пропенских киселина (схема 39).<sup>48</sup>



**Схема 39.** Синтеза првог пиразолонског деривата комбретастина А-4 (**26**) и његових прекурсора.

Саме киселине добијају се Perkin-овом реакцијом између одговарајућег алдехида и супституисане сирћетне киселине. Да би се наставило са даљим извођењем реакције, неопходно је заштитити евентуално присутне функционалне групе. У овом

случају извршена је заштита фенолне групе ацетиловањем. Добијена киселина се затим претвара у хлорид, који са метилкарбазатом даје дисупституисани хидразид, а његовом оксидацијом добија се одговарајући диазен. Циклизација диазена се може извршити помоћу  $ZrCl_4$  на собној температури. Међутим, показало се да за затварање прстена није неопходна Lewis-ова киселина, већ се циклизација може извршити и рефлуктовањем у метилен-хлориду. Последњи кораци су хидролиза естарске групе и декарбоксилација праћена ослобађањем заштитне групе, чиме се добија пиразолонски дериват комбретастатина, **26**.

Комбретастатин А-4 познат је по високој цитотоксичности према хуманим канцерогеним ћелијама.<sup>49</sup> Његов главни недостатак је могућност изомеризације *cis*-облика  $C=C$  везе у мање активан *trans*-облик. Да би се задржала жељена стереохемија, извршено је спајање комбретастатинске  $C=C$  везе са петочланим пиразолонским прстеном, чиме је онемогућена изомеризација.

#### 1.2.1.4. Синтеза без присуства растварача

Већина познатих метода за добијање деривата пиразолонске укључују кондензацију  $\beta$ -кетоестара или  $\beta$ -кеталдехида са супституисаним или несупституисаним хидразинима.<sup>50</sup> Ова методологија, премда погодна за добијање разноврсних деривата пиразолонске, најчешће захтева рефлуктовање и дуга реакциона времена, у најбољем случају 3-10 часова. Изнад свега, коришћење растварача у вишку и његова регенерација могу представљати велики еколошки проблем, пре свега када се синтетизују велике количине производа. Из тог разлога, улагани су велики напори у изналажењу алтернативних начина синтезе биолошки и синтетички значајних једињења. Микроталасна синтеза једна је од области у којој је остварен значајан напредак.<sup>51</sup> Њена најважнија примена остварена је у случају реакција без присуства растварача. Ради се о алтернативном приступу у ком се смеша реактаната без растварача излаже микроталасним зрацима. Вреди нагласити да се на овај начин елиминише могућност разарања реактаната или производа реакције, до којег иначе долази при класичном загревању без присуства растварача. Највеће предности оваквог начина синтезе су повећани приноси, краћа реакциона времена и једноставније пречишћавање добијених производа.

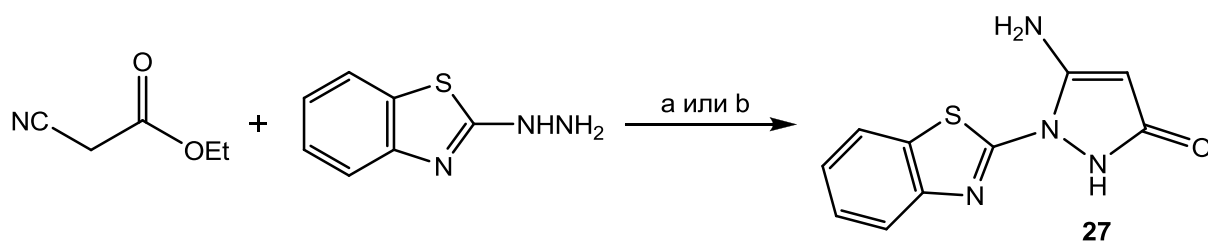


На овај начин пиразолони се могу добити микроталасним озрачивањем етил-ацетата и фенилхидразина, у односу 1:1 (схема 40).<sup>52</sup>



**Схема 40.** Синтеза пиразолона микроталасним озрачивањем.

Реакција траје 2 минута, а принос је побољшан продужавањем реакционог времена на 4 минута. Покушај даљег побољшања приноса повећањем улазне снаге микроталасног зрачења довео је до његовог снижавања, највероватније проузрокованог делимичним распадом насталог производа. Ради поређења, иста реакција изведена у конвенционалним условима, рефлуктовањем у метанолу, захтева 10 часова. Мада микроталасна синтеза у овом случају не доноси новине по питању природе производа и приноса, она значајно скраћује време реакције, а избегава се и коришћење растварача, као и дуго загревање. Микроталасним озрачивањем могу се добити и 5-аминопиразолони реакцијом еквимоларних количина етил-цијаноацетата и 2-хидразинбензотиазола.<sup>53</sup> Смеса се излаже зрачењу 2 минута, дајући производ у високом приносу (88 %, схема 41, а). Идентична реакција изведена при уобичајеном термичком загревању трајала је 4 часа и дала производ **27** у нешто нижем приносу (80 %, схема 41, б).



а : без растварача, MWI, 2 min, 130 °C (88%)  
 б : без растварача, уљано купатило, 4 h, (80%)

**Схема 41.** Синтеза 5-аминопиразолона.

Поред микроталаса, још један начин синтезе без присуства растварача јесте и коришћење ултразвучне ирадијације, захваљујући којој је последњих година велики

број органских реакција побољшан у смислу приноса, реакционог времена и блажих услова.<sup>54</sup> На овај начин могу се добити и одговарајући пиразолони. У условима ултразвучног озрачивања етил-бензоилацетат третиран је метилхидразином дајући као производ 3-фенил-1-метил-2-пиразолин-5-он (**28**, схема 42), у одличном приносу и за краће реакционо време у односу на уобичајене реакционе услове (табела 2).<sup>55</sup> Добијено једињење се може даље дериватизовати такође помоћу ултразвучног зрачења (схема 42). Тако се, са фенилизотиоцијанатом, у DMF-у, у присуству KOH, на собној температури добија адукт у облику калијумове соли. Третманом са разблаженом хлороводоничном киселином добија се одговарајући дериват тиокарбоканилида **29**.

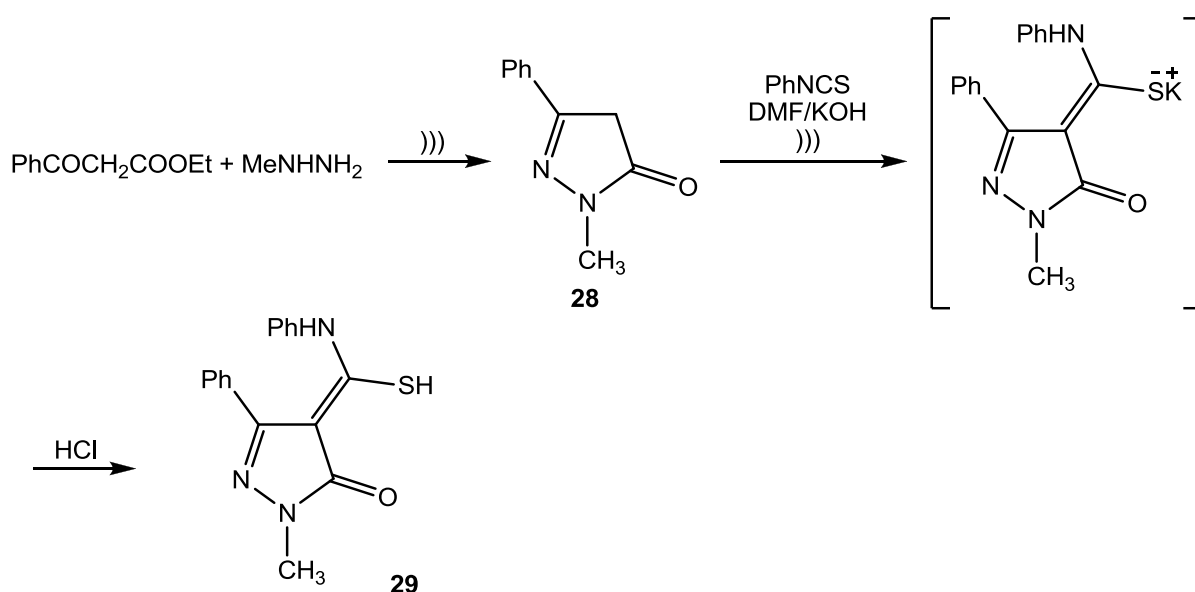


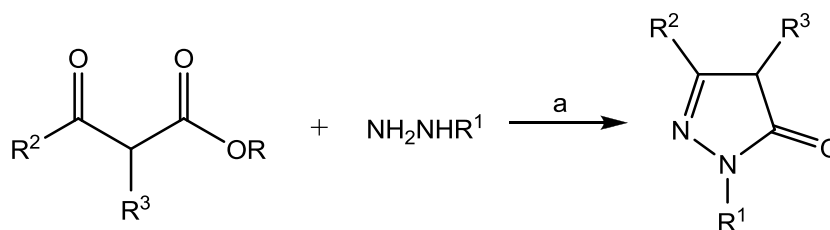
Схема 42. Синтеза деривата пиразолоне помоћу ултразвука.

Табела 2. Синтеза пиразолоне **28** и тиоанилидског деривата **29** са и без ултразвучног зрачења.

Једињење	Ултразвучно зрачење		Класична синтеза	
	Време (мин)	Принос (%)	Време (h)	Принос (%)
<b>28</b>	2	97	1	80
<b>29</b>	60	92	24	70

Постоји још доста примера циклокондензације хидразина са  $\beta$ -кетоестрима уз ултразвучно озрачивање<sup>56</sup> (схема 43). При еквимоларним количинама реактаната

реакција траје 2-20 минута уз интензитет зрачења у опсегу од 40-90%, помоћу инструмента са фреквенцијом од 24 kHz и снагом од 460 W.



R = Et; R<sup>1</sup> = H, Ph, 2,4-(O<sub>2</sub>N)<sub>2</sub>-Ph, 4-Cl-Ph, CONH<sub>2</sub>

R<sup>2</sup> = Me, Pr, *i*-Pr, Ph, CF<sub>3</sub>, тиен-2-ил

R<sup>3</sup> = H, Et; R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-

a : без растварача, ултразвук, 2-20 min (84-95%)

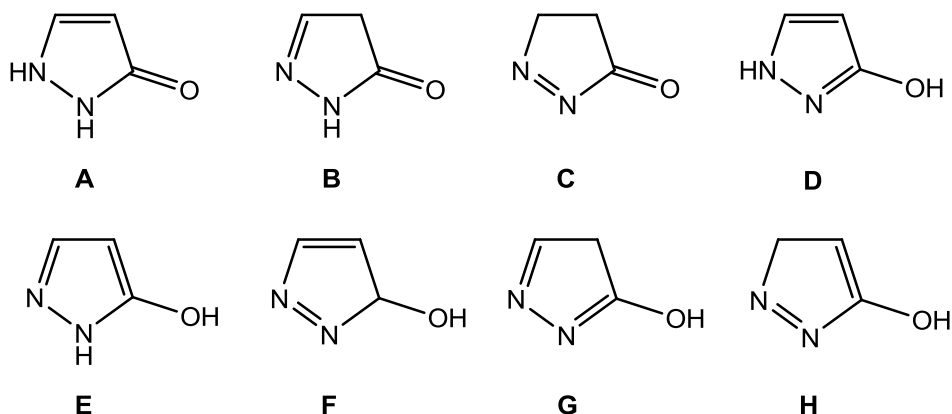
**Схема 43.** Циклокондензација хидразина са β-кетоестром уз ултразвучно озрачивање.

## 1.2.2. Таутомерија

Физичке, хемијске, али и биолошке карактеристике пиразолонских деривата зависе од могућих таутомерних форми. На пример, нуклеофилни карактер и базност азотових атома у 3-фенилпиразол-5-ону се мења у зависности од таутомерног облика.<sup>57</sup> Већина пиразолонских деривата испољава таутомерију у прстену, а у зависности од врсте супституената, и у бочном низу. Проучавање таутомерије пиразолонских једна је од најстаријих примена NMR-а, пре свега <sup>1</sup>H NMR-а, у ове сврхе. Први рад на ову тему објављен је 1966. године,<sup>58</sup> а затим су уследила и даља проучавања,<sup>59</sup> која се данас сматрају основном литературом у овој области.

### 1.2.2.1. Таутомерија несупституисаних пиразолонских

Одређивање таутомерног састава несупституисаног пиразолонског отежано је постојањем осам различитих таутомерних облика (слика 5).<sup>60</sup>



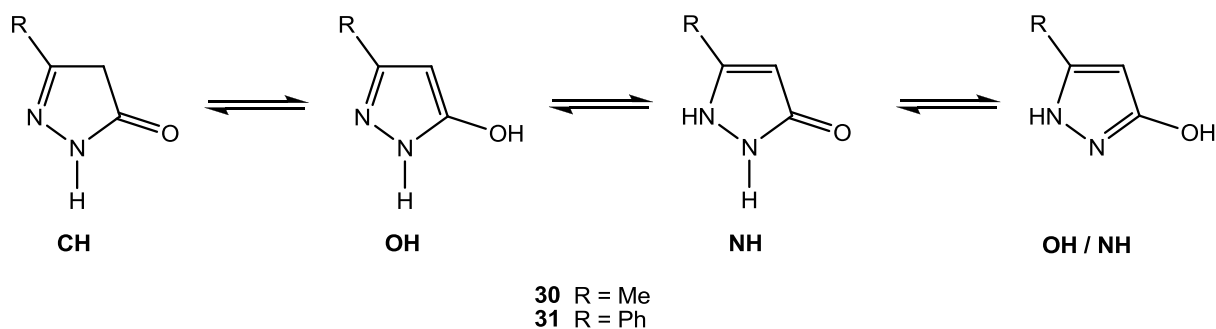
Слика 5. Могући таутомерни облици несупституисаног пиразолоне.

На основу сигнала у  $^{13}\text{C}$  NMR-спектру искључено је присуство таутомера **B**, **C**, **F**, **G** и **H**. Даље, хемијска померања у  $^{15}\text{N}$  NMR-спектру ( $-126,5$  ppm и  $-192,0$  ppm) елиминисала су таутомер **A**, јер се у овом случају за  $=\text{CH}-\underline{\text{N}}\text{H}-$  атом очекује знатно ниже хемијско померање.<sup>61</sup> Разликовање **D** и **E** облика такође није једноставно. Поређењем хемијских померања у  $^{13}\text{C}$ - и  $^{15}\text{N}$  NMR-спектрима, као и  $^3J(\text{H},\text{H})$  константи купловања са одговарајућим *N*-фенил-аналозима<sup>62</sup>, закључено је да у раствору  $\text{DMSO}-d_6$ , **D** таутомер преовлађује. Ипак, присуство других таутомера, у мањој мери, није искључено.

### 1.2.2.2. Таутомерија деривата пиразолоне са супституентом у положају 3

За пиразолоне са супституентом у положају 3 могу се написати четири таутомерне структуре (схема 44).<sup>63</sup> На основу података добијених из  $^{13}\text{C}$  NMR-спектра ( $\text{DMSO}-d_6$ ) за једињења **30** и **31**, дошло се до закључка да у раствору постоје као  $\text{OH}$ -таутомери. С друге стране, користећи  $^{15}\text{N}$  NMR и теоријска израчунавања за **30**, добијено је да се  $\text{OH}/\text{NH}$  таутомер боље слаже са свим прикупљеним подацима. На основу сличних хемијских померања за **31**, претпостављено је да и он постоји у  $\text{OH}/\text{NH}$  облику.

Таутомерија 3-метилпиразол-5-она (**30**) детаљно је проучавана користећи различите технике, као што су  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$  NMR, али и DFT ("Density Functional Theory") студија.<sup>57</sup>  $^{15}\text{N}$  NMR-Спектроскопија има велику примену у изучавању таутомерије код хетероцикличних једињења која садрже азот.<sup>64</sup>



**Схема 44.** Таутомерни облици 3-супституисаних пиразолонеа.

DFT прорачуни показали су да је најстабилнији таутомер CH. Различити солватациони ефекти утичу на померање таутомерне равнотеже тако да су у поларним растварачима врсте са већим диполарним моментом стабилније. Микросолватациони ефекти, преко водоничних веза, више стабилизују хидрокси-таутомере OH и OH/NH. Ово се може установити снимањем  $^1\text{H}$  NMR-спектра у различитим растварачима. У табели 3. приказана су хемијска померања добијена снимањем у DMSO,  $\text{CDCl}_3$  и смеси ова два растварача.

**Табела 3.**  $^1\text{H}$  NMR-Спектрални подаци за **30** у различитим растварачима.

Асигнација	$\text{CDCl}_3$ (ppm)	DMSO- $d_6$ (ppm)	$\text{CDCl}_3/\text{DMSO-}d_6$ (ppm)
OH	Није детектован	10,43 (широк)	10,25 (широк)
NH		10,43 (широк)	6,5 (веома широк)
=CH		5,31	5,33
$-\text{CH}_2$	3,11		3,12
$-\text{CH}_3$	2,09	2,17	2,19/2,07

У деутерохлороформу установљена је само једна таутомерна врста која даје два сигнала на 3,11 и 2,09 ppm. Ови сигнали су приписани метиленској и метил-групи CH-таутомера. У смеси растварача детектована су два таутомера. Први је CH-таутомер, а другом одговарају два сигнала на 5,33 и 2,19 ppm, који припадају олефинском протону и метил-групи. Таутомер са олефинским протоном одговара хидрокси-облику. У диметилсулфоксиду детектован је само хидрокси-таутомер. Због брзе измене протона између таутомера, или пак због присуства трагова воде у растварачу, за NH и OH

детектован је само један сигнал на 10,43 ppm. Ова измена такође утиче и на ширину сигнала.

Природа ових таутомерних врста испитивана је и помоћу  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$  NMR. У табели 4. приказана су експериментално добијена и теоријски израчуната хемијска померања у растварачу високе поларности (DMSO- $d_6$ ).

**Табела 4.** Експериментални и израчунати, (GIAO-B3LYP),  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$  NMR-спектри таутомерних облика једињења 30.

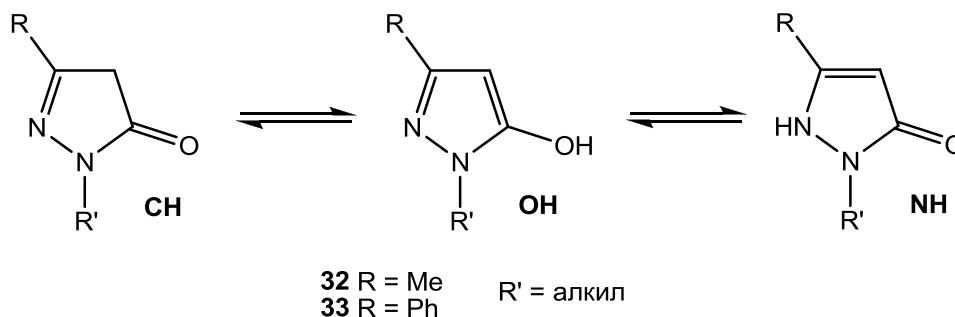
Асигнација	CH	OH	OH/NH	NH	Експериментални подаци
N1	73,7	67,7	165,7	37,8	143,2
N2	229,7	181,2	76,4	10,9	80,0
C3	159,6	153,8	140,2	144,7	139,9
C4	40,0	84,2	89,0	100,1	89,1
C5	159,6	156,8	167,3	163,8	161,3
C6	16,8	13,8	10,3	11,2	11,3

На основу података из табеле 4 може се закључити да је доминантна врста хидрокси-таутомер (OH/NH). Експериментални и израчунати подаци показали су добро поклапање, а једина велика разлика је присутна за N1 (22,5 ppm). Узрок могу бити солватациони ефекти, као и велика концентрација раствора који је коришћен за снимање спектра. У концентрованим растворима важну улогу игра формирање агрегата у облику димера. Тако, између доносског протона попут хидроксилног и N1 атома може доћи до интеракције преко водоничне везе. Формирање водоничне везе доводи до померања сигнала, чиме се може објаснити разлика за N1 у OH/NH таутомеру.

### 1.2.2.3. Таутомерија деривата пиразолона са супституентима у положају 1 и 3

За 1,3-дисупституисане пиразол-5-оне постоје само три таутомера (схема 45).<sup>63</sup>  $^{13}\text{C}$  NMR-подаци ( $\text{CDCl}_3$ ) показали су да добијена једињења постоје у облику CH-

таутомера. Ово је потврђено и помоћу DEPT и  $^1\text{H}$  спектара у ком се два протона метиленске групе суседне карбонилној групи јављају у виду синглета.



**Схема 45.** *Могуће таутомерни облици 1,3-дисупституисаних пиразолонеа.*

За ова једињења снимљени су и  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ -спектри у поларнијем растварачу DMSO- $d_6$ , у коме се она налазе у облику ОН-таутомера. Сигнал на око 85 ppm одговара C4 угљениковом атому. На основу DEPT спектра утврђено је да се ради о СН-групи, што потврђује и синглет између 5 и 6 ppm у протонском спектру. Поменути сигнали корелишу се у СН COSY спектру.

### 1.2.3. Хемијске трансформације на пиразолонском прстену

#### 1.2.3.1. Алкиловање и ариловање деривата пиразолонеа

У литератури се највише података о пиразолонима односи на 1-фенилпиразолоне, јер се они веома лако добијају већ описаном реакцијом  $\beta$ -кетоестра и фенилхидразина.<sup>65</sup> С друге стране, 1-алкилпиразолони нису ни приближно толико проучавани, јер се алкилхидразини тешко добијају<sup>66</sup> и мало је оних који су комерцијално доступни. Једноставнији начин за добијање 1-алкилпиразолонеа јесте алкиловање пиразолонеа добијених Кногг-овом методом (схема 46).<sup>63</sup> У реакцији етил-ацетоацетата, односно, етил-бензоилацетата са хидразином добијају се 3-метил-5-пиразолон (**34**) и 3-фенил-5-пиразолон (**35**), респективно. Алкиловање се врши загревањем смеше пиразолонеа и алкил-бромида у диоксану до кључања. Алкиловањем једињења **34** добијено је око 70 %, а за једињење **35** око 40 % производа. Покушаји да

се ови приноси повећају променом растварача (етанол, DMF), као и продужавањем реакционог времена били су неуспешни. Теоријска израчунавања су показала да је N1 слабији нуклеофил у 3-фенил, него у 3-метилпиразол-5-ону. Ово је вероватно резултат замене  $sp^3$  хибридизованог C-атома метил-групе електронегативнијим  $sp^2$  хибридизованим.

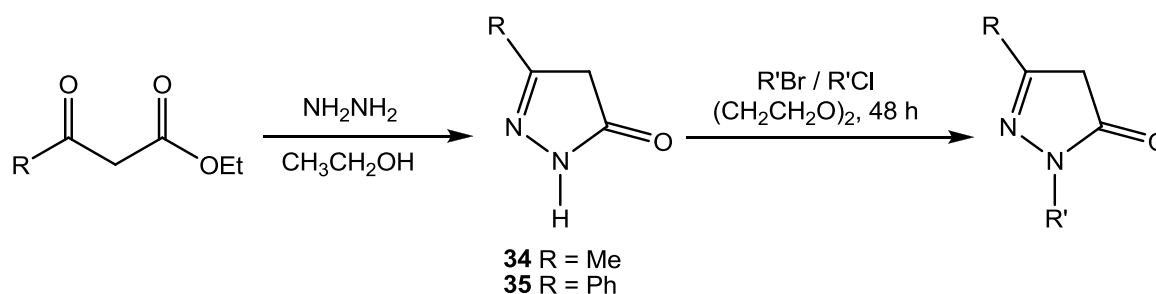


Схема 46. Добијање 1-алкилпиразолоне.

Алкиловањем хидроксипиразола **36** (схема 47) помоћу једног еквивалента алкил-халогенида на собној температури у ацетонитрилу добија се смеша N1- и O3- алкилованих производа **36a,b**.

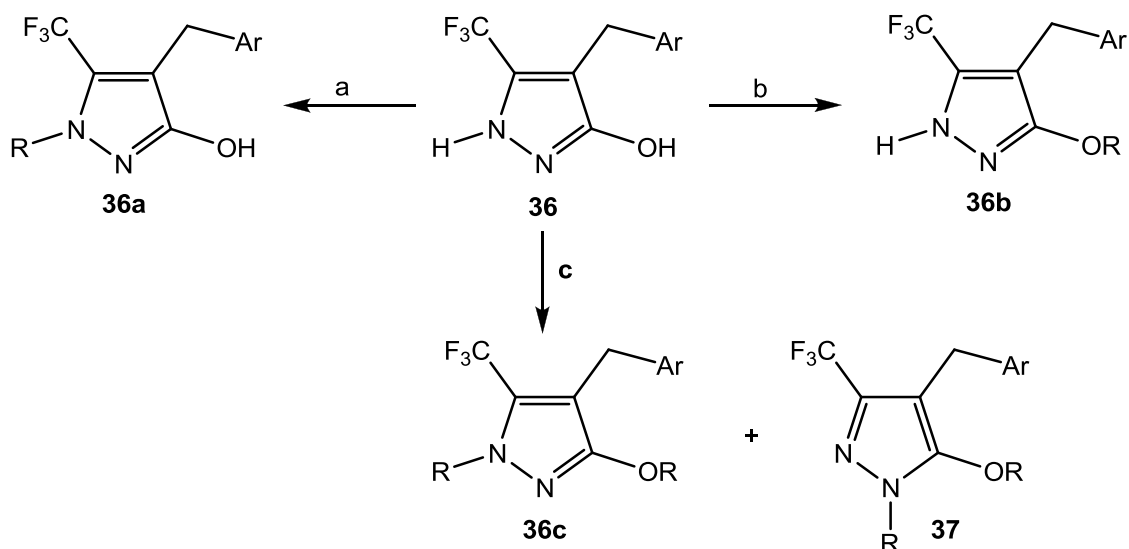
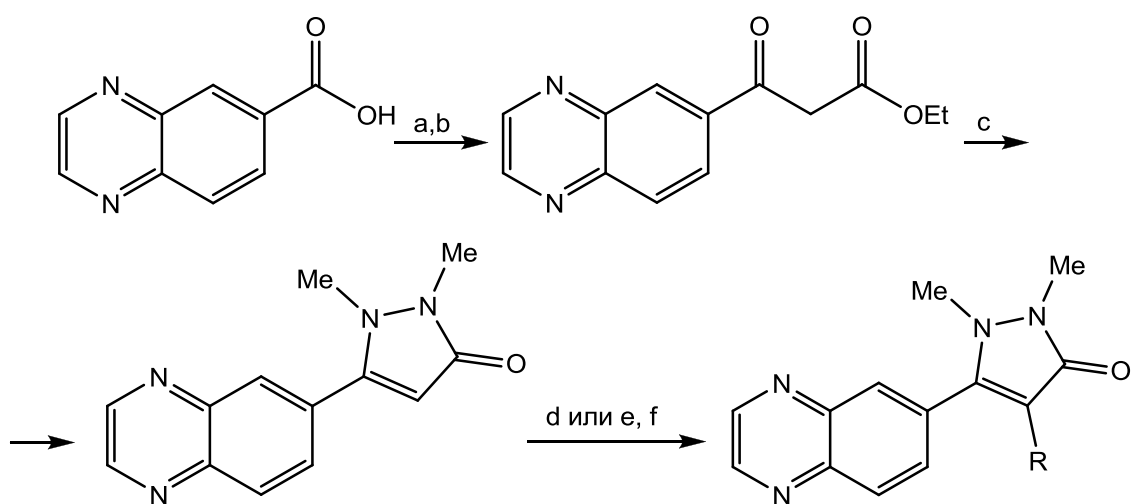


Схема 47. Алкиловање хидроксипиразола **36**; а) BuLi (2 екв.), THF,  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ , затим MeI (1 екв.), собна температура; б) MeI,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , собна температура; в) MeI,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , рефлукс.



Танкослојна хроматографија је показала да се на почетку ствара *N1*-алкиловани производ, док после 5-48 часова преовлађује *O*-алкиловани производ. Уколико се реагенс за алкиловање налази у вишку и температура повиси до рефлукса, добија се смеша *N1,O3*- (**36c**) и *N1,O5*- (**37**) диалкилованих производа, при чему се први налази у вишку.

Ариловање пиразолоне може се извршити брмовањем пиразолоне помоћу NBS-а, праћеним Suzuki-јевим купловањем или нешто директнијим приступом, путем активације C–H везе пиразолоне помоћу паладијума у присуству арил-бромида или арил-јодида (схема 48).<sup>67</sup>



**Схема 48.** *a*) EDC (1-етил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид), DIPEA (диизопро-пилетиламин), *N,O*-диметилхидроксиламин, DCM/DMF; *b*) LDA (литијум-диизопро-пиламид), EtOAc, THF,  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; *c*) диметилхидразин, пиридин,  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; *d*) Pd(OAc)<sub>2</sub>, CsOAc, DMF, три-(фурил)фосфин, Ar-Br или Ar-I  $125\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; *e*) NBS, DCM; *f*) Pd(Dppf)<sub>2</sub> (Dppf = 1,1'-bis(дифенилфосфино)фероцен), диоксан, 2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, арил(хетероарил)боронска киселина.

### 1.2.3.2. Формиловање деривата пиразолоне

Формиловање 1-алкилпиразолоне врши се помоћу хлороформа у базној средини (схема 49).<sup>63</sup> Приноси се крећу у распону између 40 и 65 %, независно од врсте деривата.

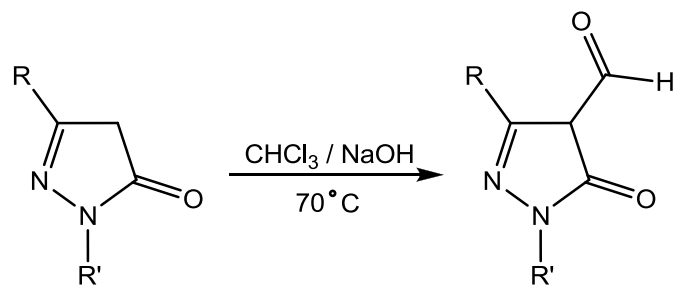


Схема 49. Реакција формиловања 1-алкилпиразолонa.

Деривати пиразолонa без супституената у положају 4, такође подлежу Vilsmeier-овом формиловању.<sup>68</sup> На схеми 50 приказано је формиловање антипирина.

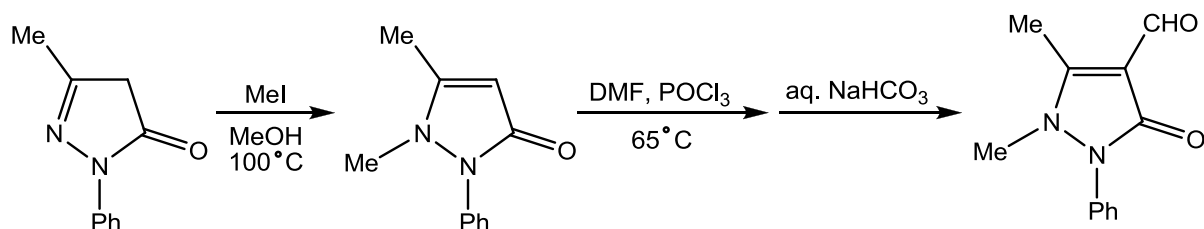


Схема 50. Vilsmeier-ово формиловање пиразолонског једињења.

За формил-деривате могу се написати четири таутомерна облика (схема 51). У деутерохлороформу ( $\text{CDCl}_3$ ) они постоје у облику CO/OH таутомера. Ово је донекле изненађујуће, јер 4-ацетил- и 4-бензоил-деривати пиразолонa постоје у облику OH-таутомера.<sup>69</sup>

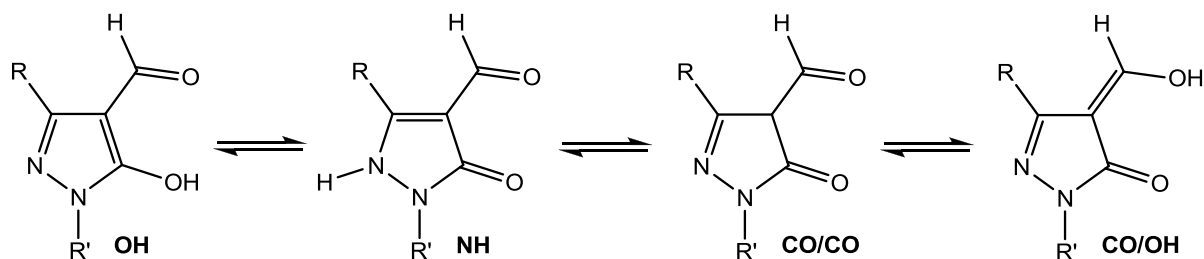


Схема 51. Таутомерни облици формилваних деривата пиразол-5-она.

Формил-деривати растворени у  $\text{DMSO-d}_6$  такође имају CO/OH структуру, са веома малом разликом у хемијским померањима узрокованим променом растварача. Замена метил-групе у положају 3 фенил-групом, нема никакав утицај на претходно представљену таутомерну равнотежу.

### 1.2.3.3. Ациловање деривата пиразолона

#### 1.2.3.3.1. Добијање 1-ацил-деривата пиразол-5-она

Метода за добијање 1-ацил-3-хидрокси-1*H*-пиразола заснива се на реакцији хидразина са оксазолонским дериватима **38**, при чему се добијају хидразино-метиленоксазол-5(4*H*)-они и одговарајући пиразолонски деривати.<sup>70</sup> На основу тога, у случају хидразида, очекивано је било да се добију 1-ацил-1*H*-пиразол-5(2*H*)-они, пошто је неколико стабилних једињења овог типа већ било познато.<sup>67</sup> Међутим, након извођења реакције оксазолонског деривата **38** са одабраним хидразидима, изоловани су производи премештања, 1-ацил-3-хидрокси-1*H*-пиразоли **39**, у високом приносу (схема 52).<sup>71</sup> Наведена једињења постоје у 3-ОН-таутомерном облику, што је у складу са претходно објављеним резултатима према којима је овај облик доминантан у кристалном облику и у апротичним растварачима.<sup>43</sup> Постојање овог облика додатно је доказано помоћу <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C NMR експеримената.

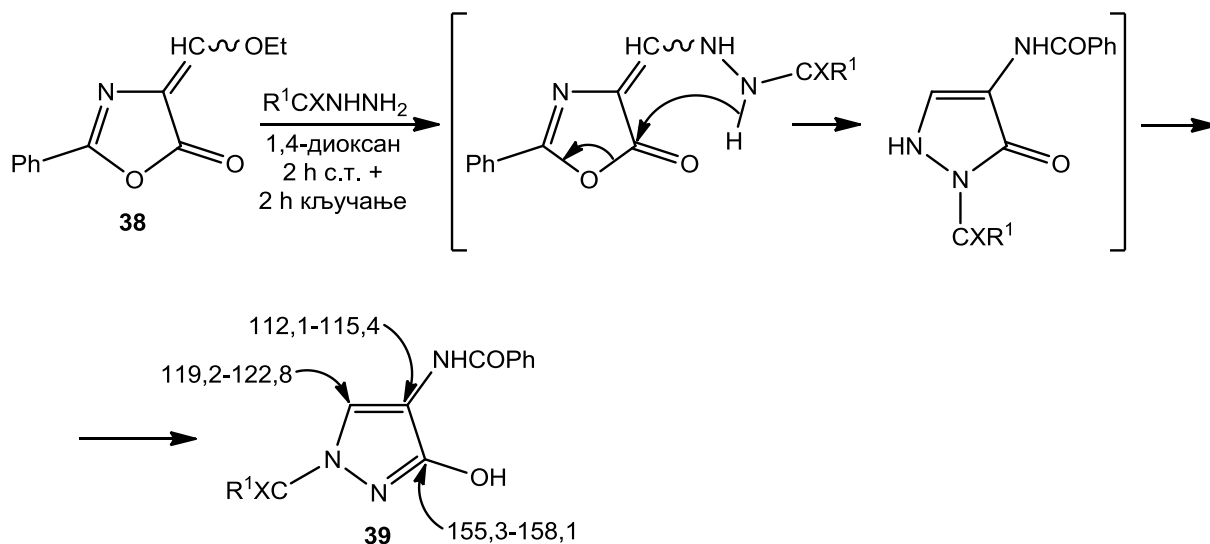


Схема 52. Добијање 1-ацил-3-хидрокси-1*H*-пиразола, **39**.

### 1.2.3.3.2. Добијање 4-ацил-деривата пиразол-5-она

4-Ацил-деривати пиразол-5-она могу се добити Claisen-овом кондензацијом естара са пиразол-5-он-ом, у присуству натријумове соли сирћетне киселине или натријум-етоксида као катализатора.<sup>72</sup> Међутим, на овај начин је само оксалил-дериват добијен у добром приносу, док је за остале, као што су ацетил- и бензоил-деривати, принос био веома низак.

Зато је развијена друга метода за добијање ових деривата.<sup>73</sup> Најпре је разматрано Fries-ово премештање *O*5-ацил-деривата до *C*4-ацил-деривата помоћу анхидрованог цинк-хлорида. *O*5-Ациловани деривати пиразолонa могу се лако добити Schotten-Baumann-овим ациловањем. Иако су жељени производи добијени на овај начин, количина добијених споредних производа била је велика.

Показало се да суспензија калцијум-хидроксида у диоксану, уз врло мали додатак воде, може једнако добро, ако не и боље, да послужи као катализатор.<sup>74</sup> На тај начин дошло се до директне синтезе у једном кораку, третирањем раствора пиразол-5-она у диоксану, који садржи суспендовани калцијум-хидроксид као катализатор, са хлоридом или анхидридом киселине (схема 53).<sup>75</sup> Овом методом добија се комплекс калцијума са 4-ацилпиразолонима који је стабилан у базној средини и штити добијени дериват од накнадних реакција.

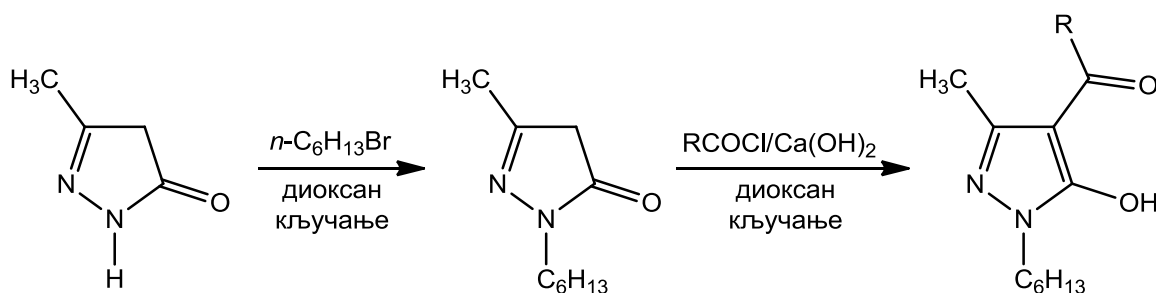
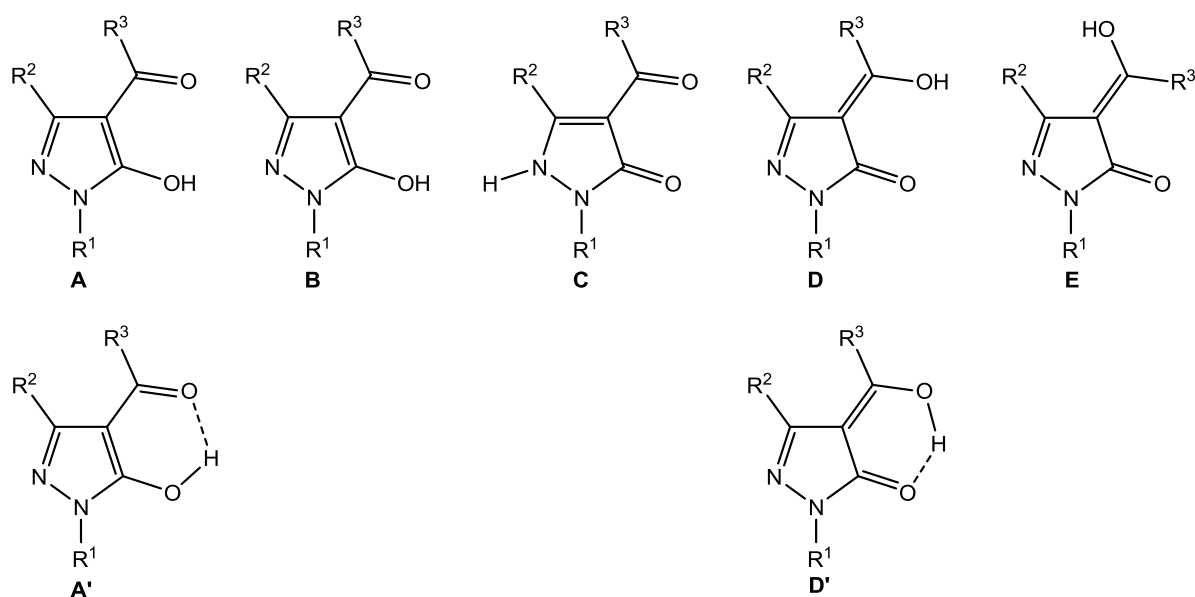


Схема 53. Добијање 4-ацил-деривата пиразол-5-она.

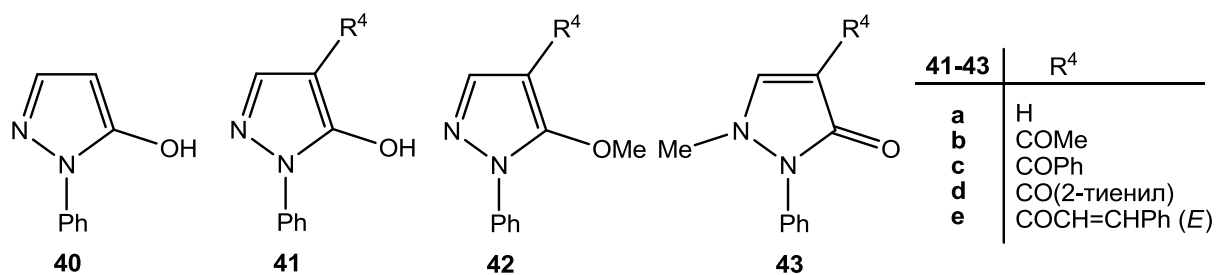
### 1.2.3.3.3. Таутомерија 4-ацилпиразолонa

Код 4-ацилпиразолонa супституент у положају 4 такође може да учествује у таутомерији, као и у стабилизацији преко интрамолекулских водоничних веза, због чега се морају узети у обзир и додатни таутомерни облици (слика 6).<sup>62</sup>



Слика 6. Таутомерни облици 4-ацилпиразолоне.

Случај када је положај 3 несупституисан (слика 7) веома је специфичан јер водоников атом у овом положају може бити у NOE експериментима укључен у различита  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  спинска купловања. Вредност одговарајућих константи купловања и промене узроковане структурним изменама, могу дати бројне корисне информације.



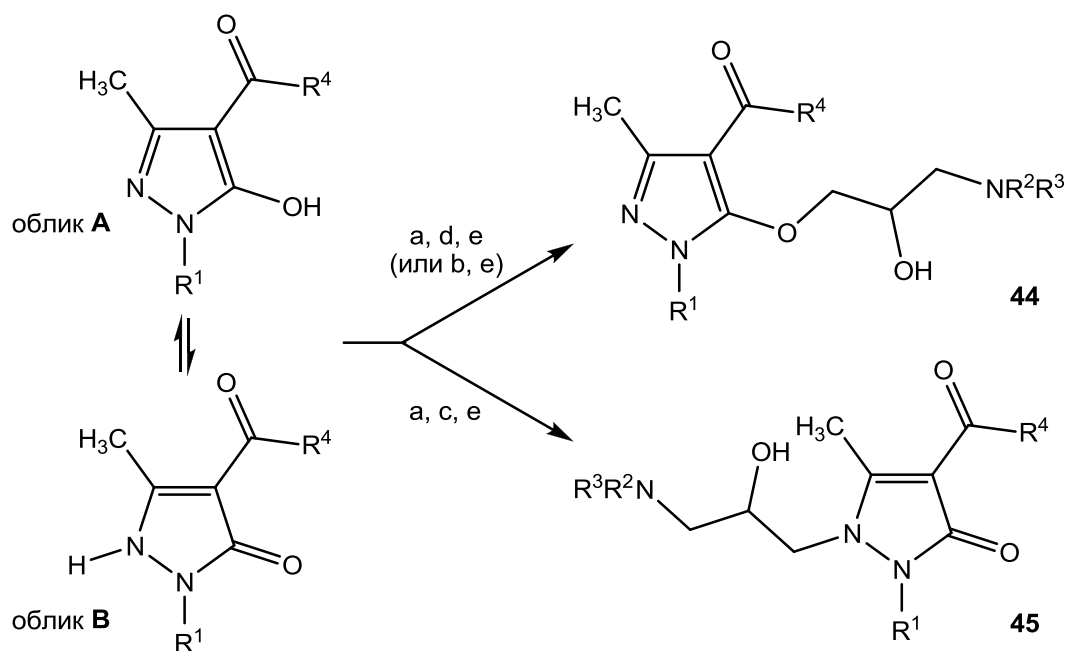
Слика 7. Пиразол-5-они са несупституисаним положајем 3.

#### 1.2.3.4. Алкиловање ацил-пиразолоне

Алкиловањем 4-ацилпиразолоне могу се добити различити супституциони производи, где региоселективност реакције зависи од супстрата, реагенса за

алкиловање и реакционих услова (схема 54), при чему се често добијају смесе производа.<sup>76</sup>

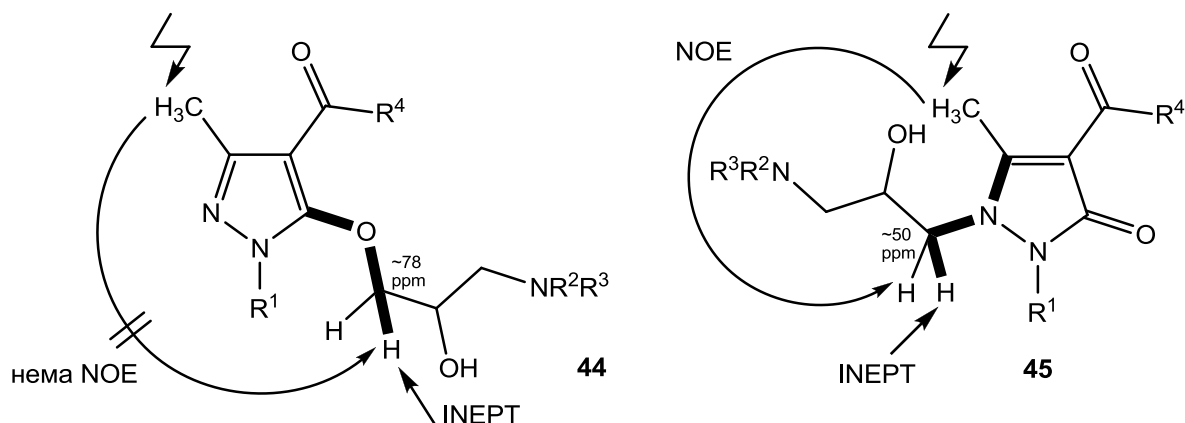
У реакцији ацилпиразолоне (у облику натријумових соли) са епихлорхидрином у вишку и сукцесивним третирањем интермедијерног епоксида са амином добијају се *N*-супституисани пиразолони. С друге стране, у реакцији са еквивалентном количином епихлорхидрина у DMF-у, и накнадним третирањем амином, добијају се *O*-алкиловани производи, **44**. Објашњење за овакво понашање може бити то што у случају равнотежних услова (вишак реагенса) долази до стварања стабилнијег производа. Семиемпиријска МО (молекулско-орбитална) израчунавања показала су да су *N*-алкиловани производи, **45**, термодинамички стабилнији, док су *O*-алкиловани производи кинетички фаворизованији.



R1=Me, Ph; R2=R3=iPr; R2=H, R3=iPr, nPr, nBu, tBu; R4=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph, Ph, 2-тиенил

**Схема 54.** а) NaOMe/MeOH; б) 2,3-епоксипропанол/диетил азодикарбоксилат /Ph<sub>3</sub>P/THF (Mitsunobu-ови услови); с) епихлорохидрин (у вишку); д) епихлорохидрин (1 екв.), DMF; е) R<sup>2</sup>R<sup>3</sup>NH.

Разликовање *O*-алкилованих од *N*-алкилованих производа могуће је захваљујући <sup>13</sup>C NMR хемијским померањима, разлици у NOE експериментима и селективним INEPT експериментима (<sup>3</sup>J(C-5, 5-OCH<sub>2</sub>) за **44** и <sup>3</sup>J(C-5, N1-CH<sub>2</sub>) за **45**) (слика 8).



Слика 8. Разликовање *O*-алкилованих од *N*-алкилованих производа.

### 1.2.3.4.1. Добијање Schiff-ових база ацил-пиразолонa

Schiff-ове базе пиразолонских деривата посебно су занимљиве за проучавање, јер многе од њих испољавају кето-енолну таутомерију, због чега поседују интересантне структурне и спектроскопске особине.<sup>77</sup>

Schiff-ове базе добијене из 1-арил-4-ацилпиразолонa и ариламина могу постојати у пет таутомерних облика (схема 55):

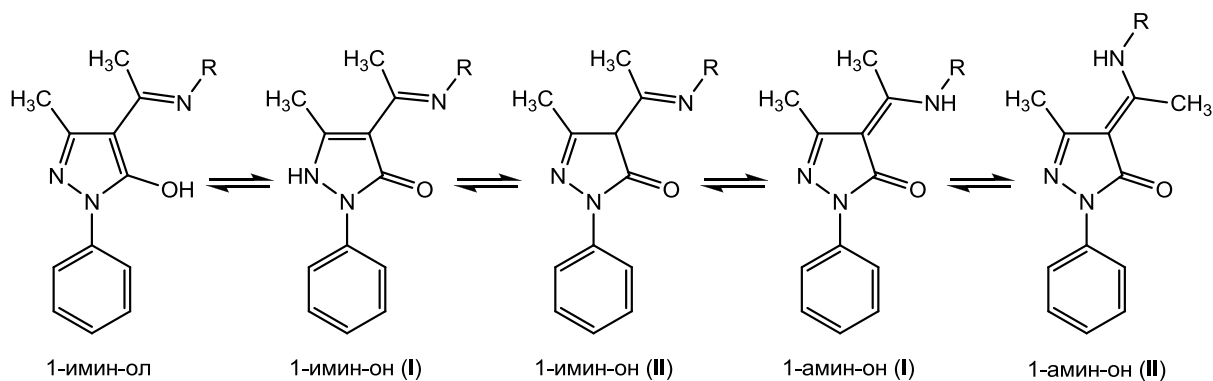


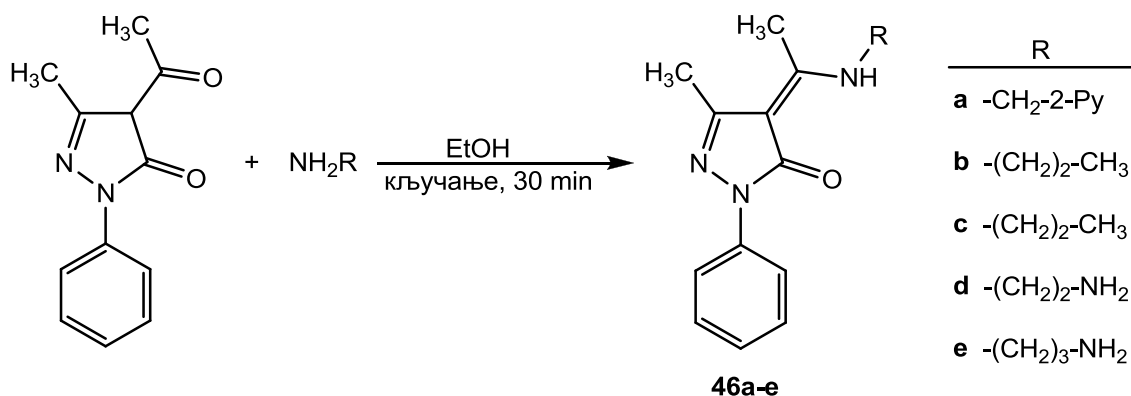
Схема 55. Структурни таутомери 4-ацил-пиразолонских Schiff-ових база.

Таутомерне молекулске структуре које постоје у раствору обично се одређују NMR методама, мада је ово одређивање често отежано истовременим присуством неколико таутомерних облика, или детекцијом просечних сигнала добијених због брзих интерконверзија.

Анализом  $^1\text{H-NMR}$  спектара сниманих у  $\text{CDCl}_3$  детектован је синглет заједнички за сва једињења у области  $\delta = 12,96\text{--}13,12$  ppm. Додатком  $\text{D}_2\text{O}$  овај синглет се губи што указује да је у питању ОН- или NH-протон. Интеграцијом сигнала показало се да он одговара тачно једном протону, што значи да ова једињења у раствору постоје само у облику једног таутомера. На основу проучавања таутомерије у чврстом стању овај сигнал приписан је NH-протону, мада се не може са сигурношћу искључити ни могућност да се ипак ради о ОН-протону.

Кристалографском анализом монокристала одређене су молекулске структуре једињења. Ови подаци су веома битни јер показују у ком се таутомерном облику дато једињење налази када је у чврстом стању. На основу дужина веза утврђено је да се ради о кето (амин-он) облику (**I**).

За Schiff-ове базе 1-арил-4-ацилпиразолона, добијене кондензацијом са алкиламинима (схема 56), такође важе таутомерни облици приказани у схеми 55.<sup>78</sup>



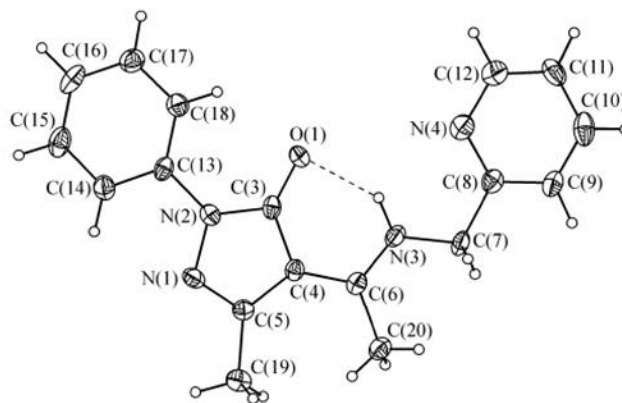
**Схема 56.** Синтеза 4-ацил-пиразолонских Schiff-ових база **46a-e**.

Структура добијених једињења у раствору  $\text{CDCl}_3$  идентификована је као амин-он (**I**) форма, користећи  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HMQC и HMBC NMR спектроскопске методе.

Интересантно је истаћи да могуће слабије водоничне везе које потичу од азотових (**46a,d,e**) односно кисеоникових атома (**46c**) алкил-групе Schiff-ове базе, имају мали или никакав ефекат на геометрију, односно таутомерију датих једињења.

Да би се одредила структура молекула у чврстом стању, извршена је кристалографска анализа монокристала једињења **46a** (слика 9). На основу добијених података дошло се до закључка да се ради о амин-он (**I**) структури, истом таутомерном облику која постоји и у раствору (схема 55).





Слика 9. Кристална структура једињења 46а.

Кристалнографски подаци, такође подржавају теорију да јака водонична веза између аминског водоника, N(3)H, и кисеоника карбонилне групе, O1, помаже стабилизацију овог таутомерног облика.

### 1.2.3.5. Добијање нитрозил-деривата пиразолона

Увођење нитрозил-групе врши се помоћу натријум-нитрита у киселој средини (схема 57).<sup>79</sup> У случају алкилпиразолона неопходан услов који се мора испунити да би до реакције дошло јесте тај да се пре додатка натријум-нитрита супстрат мора охладити на 0 °C.

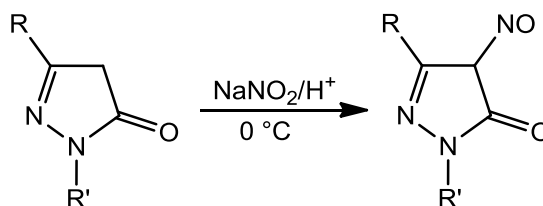


Схема 57. Добијање 4-нитрозил деривата пиразолона.

За ова једињења могућа су три таутомерна облика (слика 10). <sup>13</sup>C NMR-Спектри показују сигнал на 157 ppm (C5), на основу кога се може закључити да је ОН-облик доминантан. <sup>1</sup>H NMR-Спектри садрже сигнал на око 15 ppm, који одговара хидроксилној групи која гради водоничну везу са NO-супституентом. Ово је доказано снимањем протонских спектра при различитим концентрацијама, при чему није дошло до промене хемијског померања.



**Слика 10.** Таутомерни облици 4-нитрозил-деривата пиразолона.

## **2. НАШИ РАДОВИ**



## 2.1. Увод

Захваљујући широком спектру фармаколошке активности, пиразолски и пиразолонски фрагменти имају значајну улогу у биолошки активним једињењима,<sup>80-101</sup> па самим тим добијање нових деривата ових хетероцикала заузима посебно место у органској синтези. Комбинација органских и органометалних једињења која садрже хетероцикличну јединицу са биомолекулима као што су DNK, угљени хидрати, аминокиселине и пептиди последњих година се налази у фокусу органских синтетичара. Овакви биокоњугати, нарочито са аминокиселинама или пептидима од великог су интереса као структурни миметици природних пептида.

У светлу поменутих запажања, у оквиру ове дисертације синтетизоване су нове *N*-супституисане дифенил-пиразолске и фероценил-пиразолске  $\alpha$ -амино-киселине у добрим приносима.<sup>102,103</sup> Установљена је релативно једноставна синтетичка методологија која највећим делом обухвата кондензацију пиразолског алдехида и  $\alpha$ -амино-киселина без присуства растварача а затим и борхидридну редукцију у метанолу без изоловања интермедијерног имиња. Комплетна асигнација свих  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR сигнала урађена је на бази дводимензионалне хомо- и хетерокорелационе NMR-спектроскопије.

Увођење ацетил-групе у положај 4 3-аминопиразолских деривата има посебан синтетички значај, с обзиром на то да према нашем литературном сазнању постоји још само један начин синтезе 4-ацетил-3(5)-амино-5(3)-метилпиразола (ААМР) полазећи од диацетил-кетен-*N,S*-ацетала и хидразин-хидрата.<sup>104</sup> У том циљу је детаљно испитиван механизам реакције у којој ААМР настаје отварањем цикличног 5-хидрокси-3,5-диметил-1-*S*-метилизотиокарбамоил-2-пиразолинијум-јодида у базној средини. Постојање кето-иминског таутомера који је неопходан предуслов за настајање крајњег производа, утврђено је NMR-спектроскопијом и објашњено DFT (Density Functional Theory) методом.<sup>105</sup>

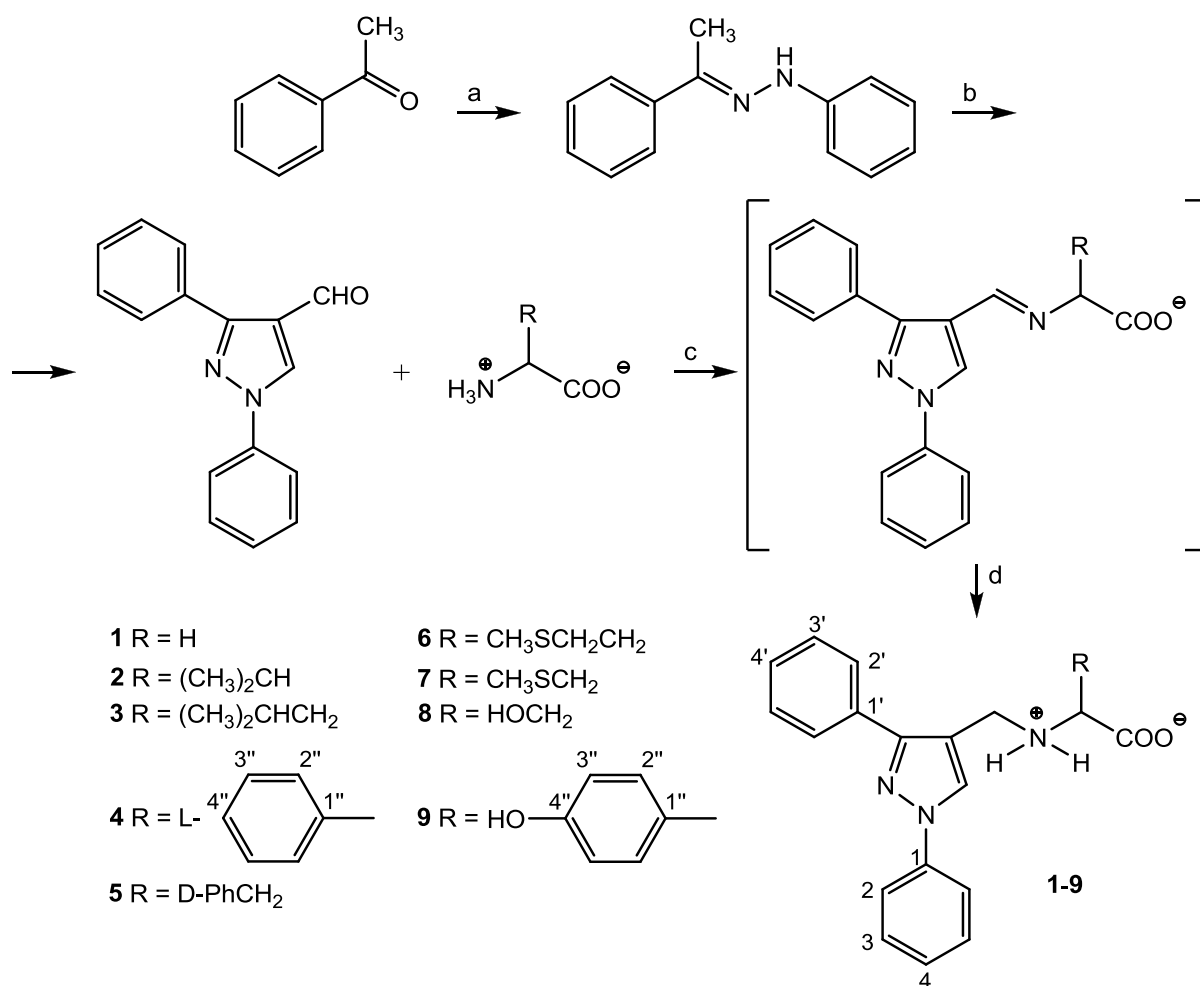
Три структурно различита и фармаколошки значајна деривата пиразол-5-она формилована су у положају 4 у условима Vilsmeier-Нааск-ове реакције. Разрађена је ефикасна синтетичка методологија за кондензацију добијених алдехида са примарним аминима и  $\alpha$ -амино-киселинама којом настају 4-аминометилиденски деривати пиразол-

5-она. Посебна пажња посвећена је проучавању таутомерије ових једињења у чврстом стању и у раствору DMSO-d<sub>6</sub> помоћу IR и NMR-спектроскопије.<sup>106,107</sup>

На крају, имајући у виду биолошки потенцијал свих синтетизованих једињења, извршено је испитивање њихове антипролиферативне активности на различитим ћелијским линијама неких врста канцера, при чему су у неким случајевима добијени резултати упоредиви са стандардним цитостатицима доксорубицином и *cis*-платином.

## 2.2. Синтеза деривата пиразола

Кондензацијом  $\alpha$ -амино-киселина са 1,3-дифенилпиразол-4-карбалдехидом у присуству NaOH добијене су интермедијерне Schiff-ове базе. Пошто су  $\alpha$ -амино-киселине слабо растворне у алкохолним растварачима, формирање Schiff-ове базе је споро, уз добијање ниских приноса чак и после рефлуковања смесе. Да би се кондензација убрзала, коришћена је метода без растварача,<sup>108</sup> третманом алдехида,  $\alpha$ -амино-киселине и NaOH у порцеланском авану све до видљивог престанка издвајања воде и стварања хомогене беле прашкасте супстанце. Кондензација је потом довршена додатним рефлуковањем током 2 сата у сувом метанолу (схема 58).



**Схема 58.** Реагенси и услови: а) PhNHNH<sub>2</sub>, EtOH; б) POCl<sub>3</sub>/DMF; в) хомогенизација у авану, чврсти NaOH, затим MeOH, рефлукс, 2 h; д) NaBH<sub>4</sub>, 0-5 °C, потом 12 h, r.t., AcOH.

Стабилност добијених Schiff-ових база зависи од више фактора, попут поларности аминокиселинског бочног низа,<sup>109</sup> метала, рН, растварача и температуре.<sup>110</sup> Проблем стабилности се може избећи њиховом редукцијом, чиме се добијају много флексибилнији амини, уместо ригидних, планарних једињења. Управо из тог разлога извршена је редукција Schiff-ових база, без изоловања, помоћу вишка  $\text{NaBH}_4$ , при чему су настале нове *N*-[(1,3-дифенилпиразол-4-ил)метил]  $\alpha$ -аминокиселине (**1-9**).

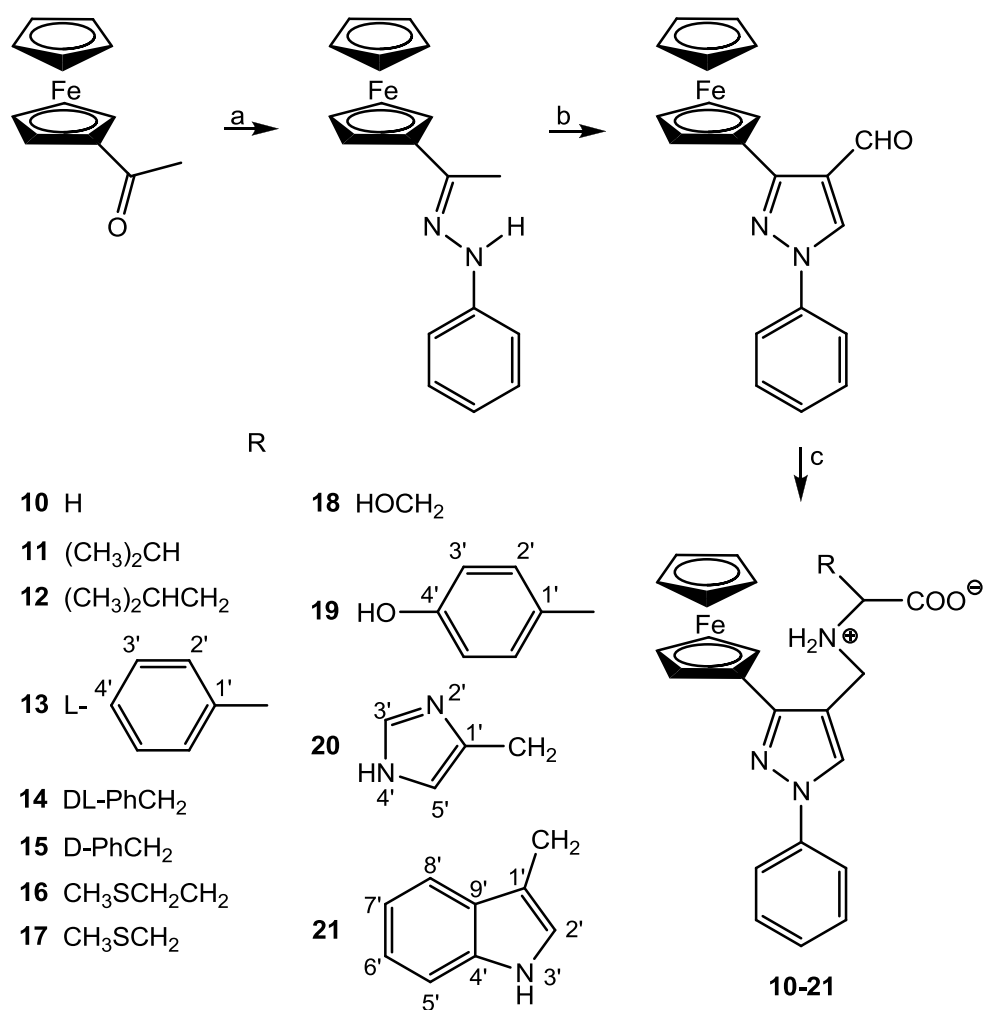
Структура свих нових једињења потврђена је њиховим спектралним подацима (IR,  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR) и елементарном анализом. IR-Спектри су потврдили присуство валенционих вибрација  $\text{NH}_2^+$  између 2650 и 2300  $\text{cm}^{-1}$  у облику веома широке траке са више пикова у нискофреквентној области која се наставља до око 2200  $\text{cm}^{-1}$ , што указује на њихову zwitter-јонску природу. Асиметричне вибрације  $\nu_{\text{as}}$  (COO) детектоване су у виду интензивне, широке траке која се налази између 1628 и 1601  $\text{cm}^{-1}$ , док симетричне валенционе вибрације  $\nu_{\text{s}}$ (COO) одговарају траци средњег интензитета на око 1410  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>111</sup> Друге карактеристичне веома јаке траке у IR-спектрима приписане су пиразолском прстену:  $\nu(\text{C}=\text{C})$  и  $\nu(\text{C}=\text{N})$  између 1601 и 1547  $\text{cm}^{-1}$  као и  $\delta(\text{C}=\text{C})$  око 1503  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>112</sup>

$^1\text{H}$  NMR свих једињења садржи карактеристичан АВ систем, осим код једињења **1**, и АВХ систем за **4**, **5**, **7**, **8** и **9**. Такође, запажено је присуство карактеристичног синглета који је приписан пиразолском прстену између 7,97 и 8,67 ppm, зависно од примењеног система растварача. Комплетна анализа свих сигнала ( $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR) која је дата у експерименталном делу изведена је помоћу 1D и 2D хомо- и хетеро-нуклеарне корелационе NMR-спектроскопије (Прилог, слика П1).

Синтеза једињења **10-21** изведена је према схеми 59. Алдехидни прекурсор 3-фероценил-1-фенилпиразол-4-карбалдехид који је коришћен за кондензацију са  $\alpha$ -аминокиселинама добијен је из ацетилфероцен-фенилхидразона помоћу Vilsmeier-Нааск-овог формиловања, по претходно описаном поступку.<sup>113</sup> У последњој фази употребљена је метода без растварача<sup>108</sup> слична претходно описаној третманом алдехида,  $\alpha$ -аминокиселине и NaOH у порцеланском авану до формирања хомогене наранџасте прашкасте супстанце. Кондензација је довршена додатним рефлуковањем током 2 h у сувом метанолу. Могући проблем са нестабилношћу Schiff-ових база отклоњен је непосредном редукцијом са  $\text{NaBH}_4$ , добијајући тако жељена једињења у



задовољавајућем приносу, 41-84 %. Структуре свих нових једињења су потврђене IR-спектроскопијом, дводимензионалном NMR анализом и елементарном анализом.



**Схема 59.** Реагенси и услови: а) PhNHNH<sub>2</sub>, EtOH, рефлукс; б) DMF, POCl<sub>3</sub> (3 екв.), r.t.;  
 с) α-амино-киселина, NaOH, хомогенизација у авану, r.t., затим MeOH, рефлукс, 2 h;  
 NaBH<sub>4</sub>, 0-5 °C, потом 12 h, r.t., AcOH.

Област у IR-спектру између 2300 и 3600 cm<sup>-1</sup> карактеристична је за валенционе вибрације водонично везаних O-H и NH<sub>2</sub><sup>+</sup> група са фином структуром мултиплитета. Слабе траке смештене на 2300-2600 cm<sup>-1</sup> односе се на мање вероватне прелазе па су спектралне линије слабијег интензитета, док је група апсорпционих трака у делу од 2600-2800 cm<sup>-1</sup> вероватно последица комбинованих вибрација.<sup>114</sup> Јаке траке лоциране између 1630 и 1612 cm<sup>-1</sup> могу бити приписане асиметричним вибрацијама анјонске карбоксилне групе. Ова трака је карактеристична за zwitter-јонски облик N-супсти-

туисаних  $\alpha$ -амино-киселина јер недвосмислено показује да је карбоксилна група присутна у јонизованом  $\text{COO}^-$  облику. У IR-спектрима свих једињења постоје и веома јаке карактеристичне апсорпционе траке које одговарају пиразолском прстену:  $\nu(\text{C}=\text{C})$  и  $\nu(\text{C}=\text{N})$  између  $1600$  и  $1553 \text{ cm}^{-1}$  као и  $\delta(\text{C}=\text{C})$  на око  $1505 \text{ cm}^{-1}$ .<sup>112</sup>

У  $^1\text{H}$  NMR-спектру глицинског деривата **10** два протона метиленске групе везане за пиразолски систем присутна су у облику синглета на  $3,98 \text{ ppm}$  (Прилог, слика П2). У свим осталим дериватима, као последица хиралног угљениковог атома везане  $\alpha$ -амино-киселине, ова два протона су дијастереотопна и дају АВ систем са великом геминалном константом купловања ( $13,51\text{--}14,01 \text{ Hz}$ ). Из истог разлога присуство хиралног угљеничног центра у  $\alpha$ -амино-киселини ствара две хемијски нееквивалентне дијастереотопне стране молекула, па протони и атоми угљеника супституисаног циклопентадиенског прстена дају више пикова у поређењу са глицинским дериватом.<sup>115</sup> Чак и на  $500 \text{ MHz}$  нису сви сигнали за циклопентадиенске протоне у  $^1\text{H}$  NMR спектру једнако добро раздвојени, па су у већини деривата (**12**, **16**, **17**, **19** и **20**) запажена три сложена сигнала са сложеним купловањима и интензитетима  $1:1:2$ , док фенилаланински и триптофански деривати (**13-15** и **21**) дају четири раздвојена сигнала са интензитетима  $1:1:1:1$  (Прилог, слика П3). Ово додатно цепање *орто*- и *мета*-фероценских сигнала, као и њихов мултиплицитет, такође зависи од природе  $\alpha$ -амино-киселинског бочног низа и не може се приписати само хиралности  $\alpha$ -амино-киселине повезане са пиразолом. Ефекат магнетне нееквивалентности оба *орто*-протона супституисане циклопентадиенске јединице нарочито је изражен у једињењима са ароматичним или хетероароматичним прстеновима (табела 5). Утицај  $\pi$ -електронског система на хемијско померање, цепање и мултиплицитет *орто*- и *мета*-циклопентадиенских протона зависи од више фактора, као што су индуктивни ефекат, могућност резонанције и допринос магнетне анизотропије. Занимљиво је да није примећено раздвајање *орто*-циклопентадиенских сигнала у серинском деривату (**18**) вероватно као последица формирања водоничне везе између хидроксилне и карбоксилне групе, што указује на постојање додатне конформације са умањеним утицајем  $\text{CH}_2\text{OH}$  групе на фероценски остатак (Прилог, слика П4). Атоми водоника несупституисаног циклопентадиенског прстена јављају се у облику синглета за сва једињења.

Табела 5.  $^1\text{H}$  NMR хемијска померања за орто- и мета-циклопентадиенске протоне.

Једињење	орто-Н <sub>1</sub>	орто-Н <sub>2</sub>	$\Delta\delta_{\text{орто}}$	мета-Н <sub>1</sub>	мета-Н <sub>2</sub>	$\Delta\delta_{\text{мета}}$
<b>10</b>	4.827		-	4.344		-
<b>11</b>	4.910		-	4.321		-
<b>12</b>	4.876	4.887	0.011	4.329		-
<b>13</b>	4.669	4.707	0.038	4.241	4.263	0.022
<b>16</b>	4.875	4.885	0.010	4.331		-
<b>17</b>	4.849	4.877	0.028	4.334		-
<b>18</b>	4.848		-	4.336		-
<b>19</b>	4.648	4.701	0.053	4.286		-
<b>20</b>	4.731	4.779	0.048	4.295		-
<b>21</b>	4.388	4.553	0.165	4.100	4.165	0.065

$^{13}\text{C}$  NMR-Мерења указују да хемијска померања орто- и мета-С-атома супституисаног и несупституисаног циклопентадиенског прстена дају сигнале који се не разликују значајно у односу на врсту  $\alpha$ -амино-киселине. Међутим, пет различитих сигнала у већини деривата указују на магнетно нееквивалентне С-атоме супституисане циклопентадиенске јединице због присуства хиралног центра у  $\alpha$ -амино-киселинском делу молекула. Сви остали сигнали у  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR-спектрима свих једињења налазе се у очекиваним областима  $\delta$ -вредности (Прилог, слика П5).

### 2.3. Механистичка студија синтезе 3-аминопиразолског деривата

Иако је синтеза 4-ацетил-3(5)-амино-5(3)-метилпиразола (ААМР) објављена још пре две деценије,<sup>116</sup> данашњи фармаколошки и медицински значај иницирао је потребу детаљнијег проучавања механизма његовог добијања из релативно једноставних прекурсора. Овај 3-аминопиразолски дериват представља прекурсор за добијање великог броја различитих деривата са потенцијалном способношћу инхибиције киназа, захваљујући различитим могућностима за трансформацију ацетил-групе везане за пиразолски прстен.

Синтеза 4-ацетил-3(5)-амино-5(3)-метилпиразола (ААМР) од ацетилацетона и *S*-метилизотиосемикарбазид-хидројодида још је раније објављена,<sup>116</sup> али је интермедијер погрешно окарактерисан само на основу елементарне анализе као ацетилацетон моно-*S*-метилизотиосемикарбазон. Захваљујући добијеним монокристалима погодним за рендгенску структурну анализу и помоћу спектроскопских метода, интермедијер је карактерисан као циклично једињење 5-хидрокси-3,5-диметил-1-*S*-метилизотиокарбамоил-2-пиразолинијум-јодид (HDMCPI, **22**, схема 60; Прилог, слика П6).

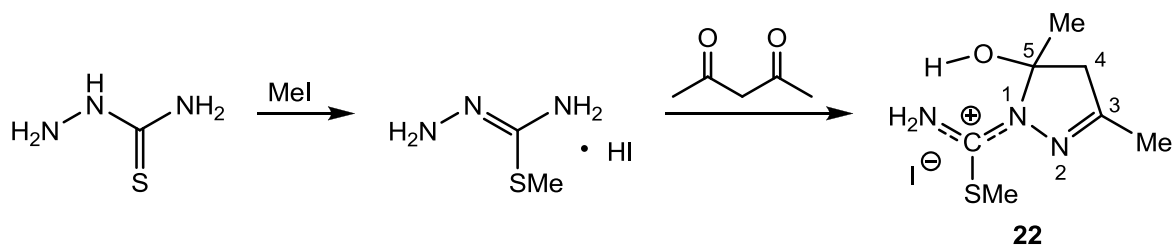
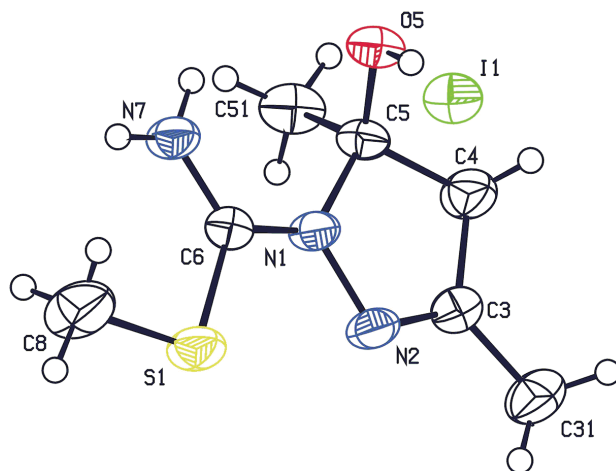
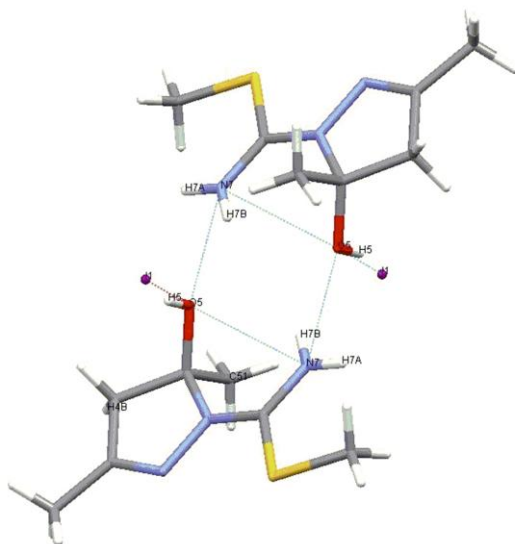


Схема 60. Добијање интермедијера HDMCPI (**22**).

На основу кристалографске анализе утврђено је да је јодидни анјон водоничном везом повезан са органским делом преко O5-H5...I1 и N7-H7A...I1 интеракција (слика 11a, табела 6). Коефицијент паковања је 65,7 %. Основна градивна јединица кристала је димер организован преко центра симетрије (слика 11b, табела 6). Н7В је водоников атом који учествује и у интрамолекулским и у интермолекулским водоничним везама са O5 атомима кисеоника. Суседни димери се држе заједно преко слабих C-H...O интеракција.



Слика 11а. ORTEP приказ<sup>117</sup> за HDMCPI на нивоу вероватноће од 50%, хетероатоми су осенчени.



Слика 11б. Димер формиран у структури HDMCPI и везани јодид, организован преко центра симетрије.<sup>118</sup>

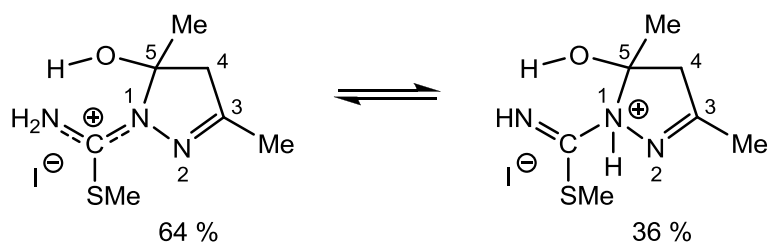
Табела 6. Интермолекулске интеракције у кристалној структури HDMCPI-а.

D–H...A	Тип	D–H [Å]	H...A [Å]	D...A [Å]	D– H...A [°]	Операција симетрије
N7–H7B...O5	Интра	0.86	2.37	2.903(3)	121	
O5–H5...I1	У асим. јединици	0.82	2.62	3.399(3)	159	
N7–H7A...I1	Интер	0.86	2.83	3.612(3)	153	$x, 1+y, z$
N7–H7B...O5	Интер	0.86	2.23	3.003(3)	149	$1-x, 1-y, 1-z$
C51– H51A...I1	Интер	0.96	3.05	3.993(4)	167	$-1/2+x, 1/2-y,$ $-1/2+z$
C8–H8A...I1	Интер	0.96	3.05	3.886(5)	146	$1/2-x, 1/2+y, 3/2-z$

Структура HDMCPI репродукована је коришћењем DFT (Density Functional Theory) прорачуна, са циљем да се тестира подобност примењене рачунарске методе. Добијене дужине веза, углови веза и диедарски углови дати су у Експерименталном делу (табеле 15-17). Средња релативна грешка за углове веза, односно диедарске углове износи 0,89 и 0,45 %, респективно. Средња релативна грешка за дужине веза између неводоничних атома је 0,99 %. Овакво слагање између експерименталне и израчунате структуре HDMCPI потврђује подобност коришћене DFT методе.

Вредности дужина веза између угљеника и два азотова атома *S*-метилизотиокарбамоил-групе указују на делокализацију позитивног наелектрисања преко сва три атома у чврстом стању. Поред тога, NBO (Natural Bond Orbital) анализа HDMCPI-а показује јаку делокализацију *p*-орбитала N7 и S атома у  $\pi^*$  антивезивну N1-C6 орбиталу, и  $sp^{0,45}$  орбитале атома S у  $\sigma^*$  антивезивну C6-N7 орбиталу, што потврђује делокализацију у *S*-метилизотиокарбамоилној групи. Међутим, у раствору DMSO- $d_6$ ,  $^1\text{H}$  NMR-спектри изузев два синглета (C3-Ме и C5-Ме) и једног АВ система од протона пиразолинског прстена, садрже и два синглета од S-Ме протона, као и две групе сигнала на нижем пољу. Прва група, односно два широка синглета, један већи на 7,73 ppm и један мањи на 7,52 ppm релативног интензитета 1, могу бити приписани двома различитим хидроксилним протонима. Друга група од три широка пика, једног већег

на 8,80 ppm и два мања на 8,96 и 9,42 ppm, укупног релативног интензитета 2, могу бити приписани азотовим протонима. Однос интензитета три мања пика је 1:1:1, док су већи сигнали на 8,80 и 7,73 ppm у односу 2:1, респективно. Ове чињенице указују да у DMSO-у не постоји само једна форма HDMCPI-а. Да би се разматрала објашњења ове  $^1\text{H}$  NMR сложености, мора се узети у обзир постојање других таутомера са могућним различитим NMR спектрима, а чија концентрација варира у зависности од изабраног деутерисаног растварача. На пример, протон се може померити са егзоцикличног азота на азот у прстену, дајући структуру са три хемијски нееквивалентна протона са истим интензитетима (схема 61).



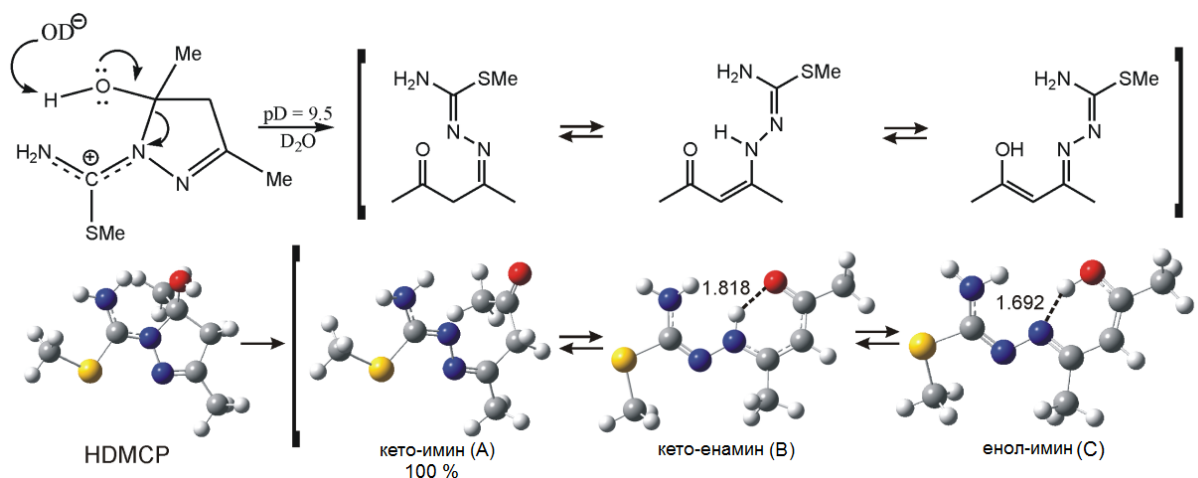
**Схема 61.** Два могућа таутомерна облика за HDMCPI у DMSO- $d_6$  раствору (однос таутомера одређен је интегралом  $^1\text{H}$  NMR сигнала).

Додатком  $\text{D}_2\text{O}$  у DMSO- $d_6$  долази до преласка АВ система у синглет и нестанка N-H и O-H протона због њихове брзе измене са  $\text{D}_2\text{O}$ . У исто време, један синглет приписан S-Me протонима присутан је уместо два синглета у DMSO- $d_6$  раствору. На крају, у чистом  $\text{D}_2\text{O}$  раствору сви сигнали појављују се само као синглети (Прилог, слика П7).

Растварањем HDMCPI у базном воденом раствору ( $\text{pH} > 13$ ) неочекивано се добија ААМР после око 15 часова стајања на собној температури, у облику белих игличастих кристала. Да би се реакција успорила ради праћења преко  $^1\text{H}$  NMR, HDMCPI је растворен у  $\text{D}_2\text{O}$  и рД подешен на 9,5 пажљивим додатком NaOD. Имајући у виду да су тиосемикарбазони 1,3-дикарбонилних једињења комплексни системи са више таутомера, могла се очекивати равнотежна смеша више отворених таутомерних облика у раствору, укључујући и цикличну, са доминацијом кето-енаминског облика. 119,120

Познато је такође, да су таутомерне равнотеже веома осетљиве на рН и поларност растварача.<sup>121</sup> Међутим, после анализе  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR спектра на рН = 9,5

запажено је да је једињење у D<sub>2</sub>O присутно само у облику кето-иминског таутомера **A** (Схема 62).



**Схема 62.** Таутомерни облици 5-хидрокси-3,5-диметил-1-*S*-метилизотиокарбамоил-2-пиразолинијум катјона (HDMCP).

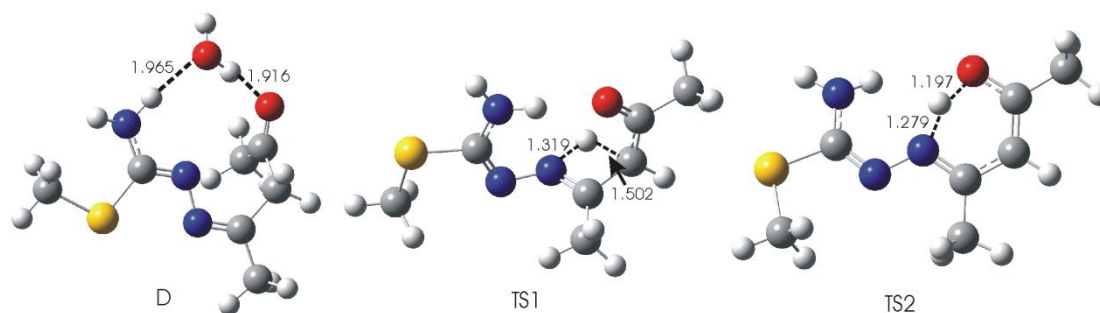
Присуство кетоиминског таутомера **A** у раствору потврђено је <sup>13</sup>C NMR-спектром, у ком се резонанциони сигнал на високој δ вредности од 214,3 ppm налази у области карактеристичној за алифатичне кетоне, а не кето-енаминске или енол-иминске облике.<sup>122</sup> Даљи докази који потврђују структуру **A** долазе од изомерних пикова метил-групе типичне за *S*-алкиловане тиосемикарбазоне, због *cis/trans*-изомерије од C=N двоструке везе (Прилог, слика П8).<sup>123</sup> <sup>13</sup>C NMR-Спектар такође садржи сложен, широк сигнал на 50,1 ppm који одговара угљенику између карбонилне и имино-групе. Остали детаљи <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C NMR спектра одговарају кето-иминској таутомерној форми.

Ове чињенице су подстакле истраживање механизма настајања облика **A** из HDMCP катјона користећи DFT прорачуне. Ако се Gibbs-ова слободна енергија ( $G^{298}$ ) узме као мера таутомерне стабилности, произилази да је **A** мање стабилан од **B** и **C**, за 18,1 и 2,8 kJ/mol, респективно.  $G^{298}$ -Вредности у складу су са основним хемијским разматрањем заснованим на чињеници да су **B** и **C** стабилизовани јаким водоничним везама. На основу овога, присуство таутомера **A** као јединог облика у таутомерној равнотежи није очекивано.

Да би се објаснила ова неочекивана експериментална открића, разматране су могуће интеракције између HDMCP катјона и хидроксидног анјона. Истраживања нису



открила ниједно прелазно стање за реакциони пут између НДМСП катјона и хидроксидног анјона. С друге стране, покушај оптимизације структуре која се састоји од НДМСП катјона и хидроксидног анјона резултовао је у спонтаном преносу протона (тј. без активационе баријере) са хидроксилне групе НДМСП катјона на  $\text{OH}^-$  анјон. Ово премештање укључује отварање прстена и формирање структуре **D** (слика 12), уз стабилизацију система за 143,2 кЈ/mol. Вредно је напоменути да је структура **D** у ствари хидратисани облик таутомера **A**. Облик **A** може бити трансформисан у **B** преко прелазног стања TS1, које захтева активациону баријеру од 185,0 кЈ/mol, док се **B** може преместити у **C** преко прелазног стања TS2, захтевајући активациону енергију од 14,8 кЈ/mol (слика 12). Реакциони пут за трансформацију **A** у **C** није откривен. На основу датих активационих енергија може се закључити да је једини пут трансформације НДМСП катјона у базној средини формирање таутомера **A**. На овај начин објашњено је присуство **A** као јединог облика у таутомерној равнотежи.

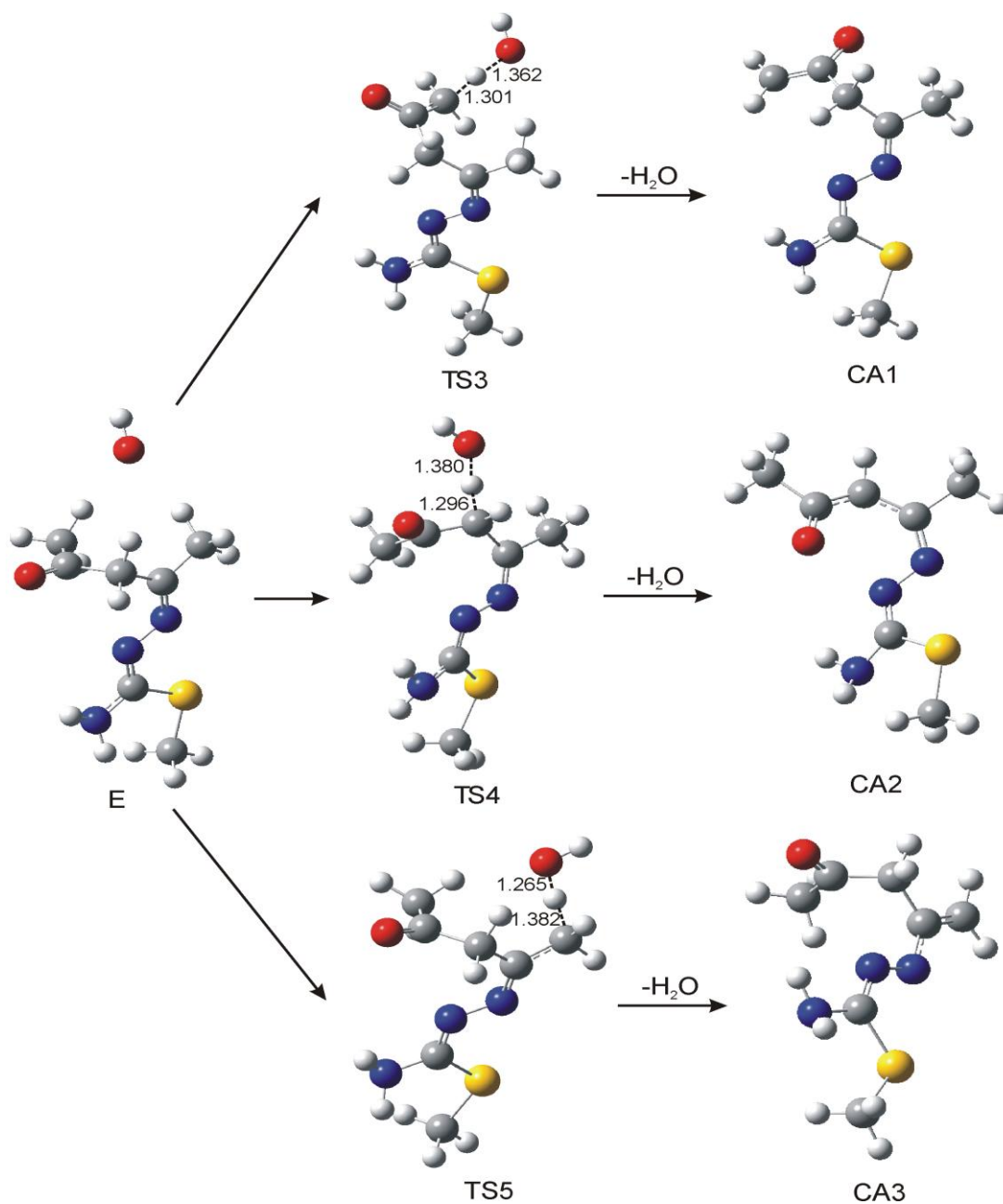


**Слика 12.** Оптимизоване структуре хидратисаног таутомера **A** (**D**) и прелазна стања TS1 и TS2.

Наше истраживање показује да у базној средини таутомер **A** може подлећи формирању карбанјона. Наиме, кисели протони облика **A** могу делокализовати наелектрисање хидроксидног анјона формирајући структуру **E** (схема 63). Три реакциона пута откривена су за трансформацију **E**, при чему се формирају карбанјони CA1, CA2 и CA3. Активационе енергије за формирање CA1, CA2 и CA3 износе 4,9, 8,8 и 31,3 кЈ/mol, респективно.

Као што је и очекивано  $G^{298}$  за CA2 ниже је од CA1 и CA3, за 27,1 и 61,3 кЈ/mol, респективно. Узимајући у обзир ниску активациону енергију и изразиту стабилност CA2, претпоставка је да је главни реакциони пут за трансформацију **A** формирање

CA2. Дакле, постојање таутомерног облика **A** главни је услов за добијање карбанјона CA2 у базној средини.



**Схема 63.** Механизам формирања карбанјона CA1, CA2 и CA3, преко прелазних стања TS1, TS2 и TS3, респективно.

NRA-Анализа (енг. Natural Resonance Analysis) за CA2 открила је могућност његове резонанционе стабилизације. Главне резонанционе структуре за CA2 приказане су у схеми 64. Бројеви испод резонанционих структура представљају резонанциону

тежину у равнотежној геометрији SA2. Очигледно је да резонанциона структура са 25,3 % резонанционе тежине доминира у резонанционом хибриду, омогућујући услове за нуклеофилни напад и даљу циклизацију.

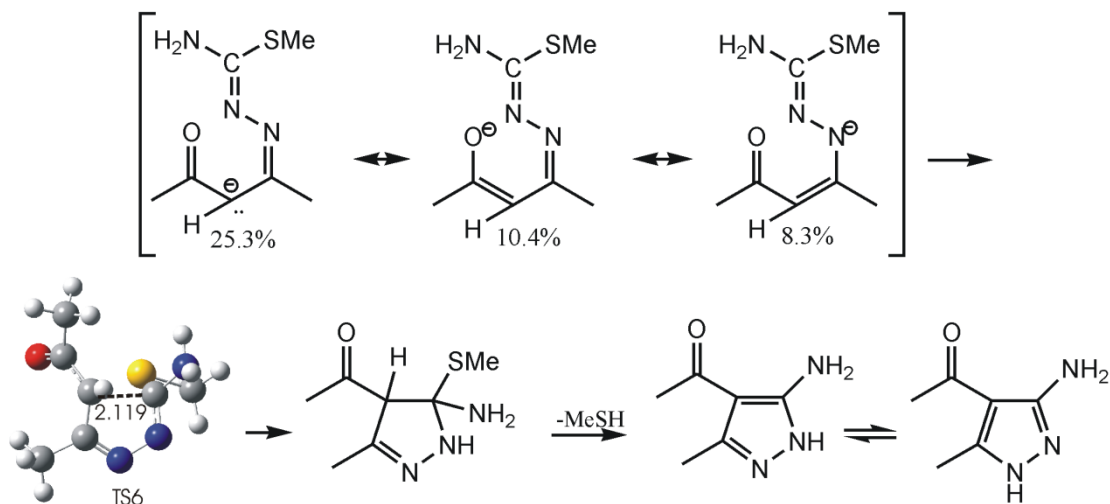


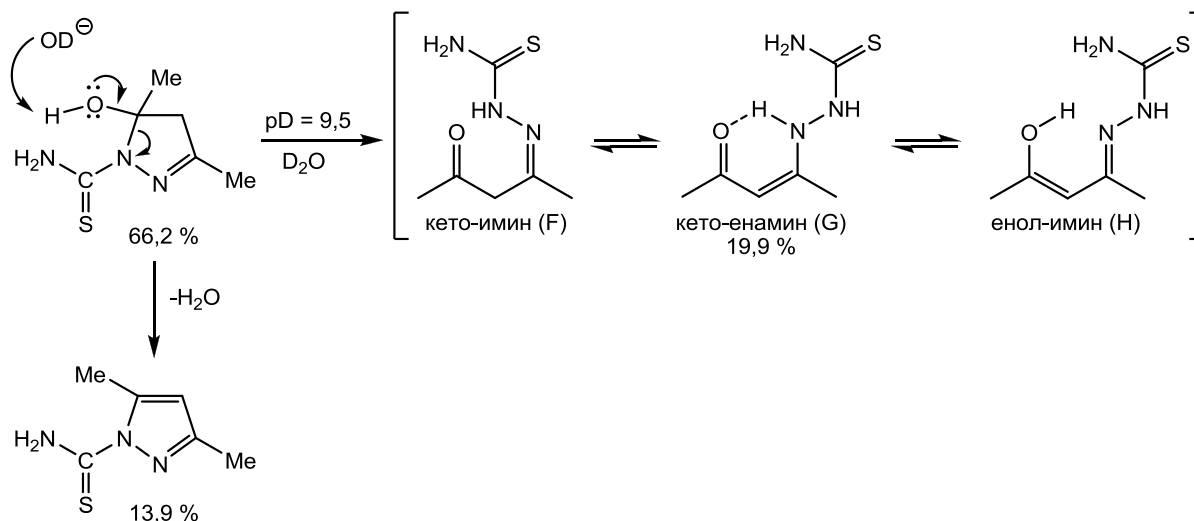
Схема 64. Могући механизам формирања ААМР-а.

Карбањонска структура пружа могућност интрамолекуларног нуклеофилног напада на веома електрофилан угљеник C=N групе, који води ка формирању одговарајућег цикличног пиразолинског једињења. Овај реакциони корак одвија се преко прелазног стања TS6 (схема 64) и захтева активациону баријеру од 115,7 kJ/mol. Елиминација MeSH лако се одвија у алкалној средини, праћена непријатним мирисом меркаптана, дајући таутомерну равнотежу одговарајућих пиразола.<sup>124</sup>

Да би потврдили хипотезу о кључној улози кето-иминског таутомера, експеримент је поновљен са тиосемикарбазидом уместо S-метилизотиосемикарбазида у реакцији са ацетилацетоном, при чему настаје његов циклични аналог 5-хидрокси-3,5-диметил-1-тиокарбамоил-2-пиразолин (схема 65) по познатом поступку.<sup>119</sup> После 15 h стајања у јако алкалном раствору (pH > 13) није било ни трагова ААМР-а. Затим је рD подешен на 9,5 и готово квантитативно настала бела супстанца анализирана је помоћу <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C NMR метода у истим условима ради поређења са S-метилованим дериватом. Установљено је да је главни облик у равнотежном стању у раствору DMSO-d<sub>6</sub> полазно циклично једињење (схема 65).

Кето-енамински облик (G) у NMR-спектру смесе присутан је у облику сигнала од винилног протона на 6,48 ppm, α-атома винилне групе на 84,98 и сигнала који

потиче од С-атома коњуговане карбонилне групе на 183,04 ppm. Ови подаци су у сагласности са спектралним подацима многих енамина.<sup>122,125</sup>



**Схема 65.** Таутомерни облици 5-хидрокси-3,5-диметил-1-тиокарбамоил-2-пиразолина.

Однос таутомера (G), 3,5-диметил-1-тиокарбамоил-2-пиразолина и полазног пиразолинског једињења одређен је интегралњем  $^1H$  NMR-сигнала за метил-групе.

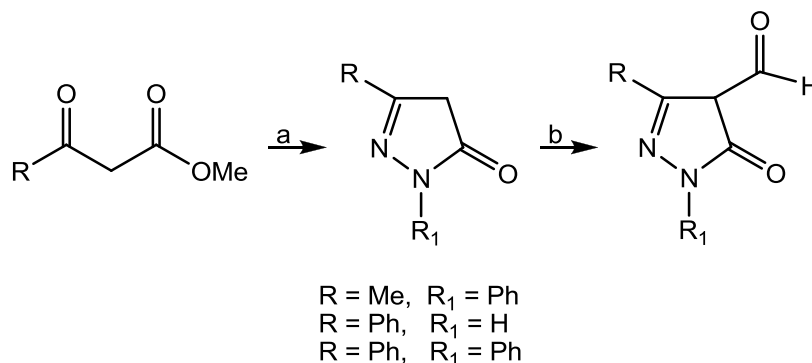
Очигледно је да одсуство кето-иминског облика (F) у таутомерној равнотежи не дозвољава никакву могућност формирања карбанјона за нуклеофилни напад и даљу циклизацију. Такође, детектован је 3,5-диметилпиразол-1-тиокарбоксамида који настаје као последица дехидратације пиразолинолског једињења. Структура овог једињења потврђена је упоређивањем његових NMR-спектра са спектрима аутентичног узорка. Приметно је да је циклични пиразолинол (схема 65) веома нестабилно једињење, чак и у чврстом стању. Његово распадање почиње после неколико часова да би се, после две недеље стајања, потпуно трансформисао у 3,5-диметилпиразол-1-тиокарбоксамида.

Слагање између експериментално добијених и израчунатих дужина веза, углова веза и торзионих углова 5-хидрокси-3,5-диметил-1-S-метилизотиокарбамоил-2-пиразолинијум-јодида (HDMCPI) веома је добро, што потврђује да је изабрана рачунарска метода погодна за проучавање реакција овог једињења. Показано је да реакција између HDMCP катјона и хидроксидног анијона тече лако, без активационе баријере и са значајном стабилизацијом система. На овај начин формира се хидратисани кето-имински таутомер A, у приносу од 100 %. Активациона енергија

потребна за изомеризацију **A** у кето-енамински таутомер **B** значајно је већа у поређењу са енергијом активације за формирање карбанјона  $CA_2$  у базној средини.  $CA_2$  подлеже даљој циклизацији и елиминацији  $MeSH$ , дајући 4-ацетил-3(5)-амино-5(3)-метилпиразол (ААМР). Његово одсуство као производа реакције између ацетилацетона и тиосемикарбазида уместо *S*-метилизотиосемикарбазида, може се објаснити одсуством кето-иминског облика у таутомерној равнотежи, који би омогућио формирање карбанјона за даљу циклизацију. Ова чињеница потврђује кључну улогу кето-иминског таутомера **A** у формирању ААМР-а.

## 2.4. Синтеза деривата пиразол-5-она

Пиразол-5-они коришћени за синтезу једињења **23-64** добијени су према познатој реакцији кондензације  $\beta$ -кето-естара и фенилхидразина. Под Vilsmeier-овим условима пиразол-5-он трансформисан је у формировани дериват реакцијом са  $\text{POCl}_3$  и DMF (схема 66).<sup>126</sup>

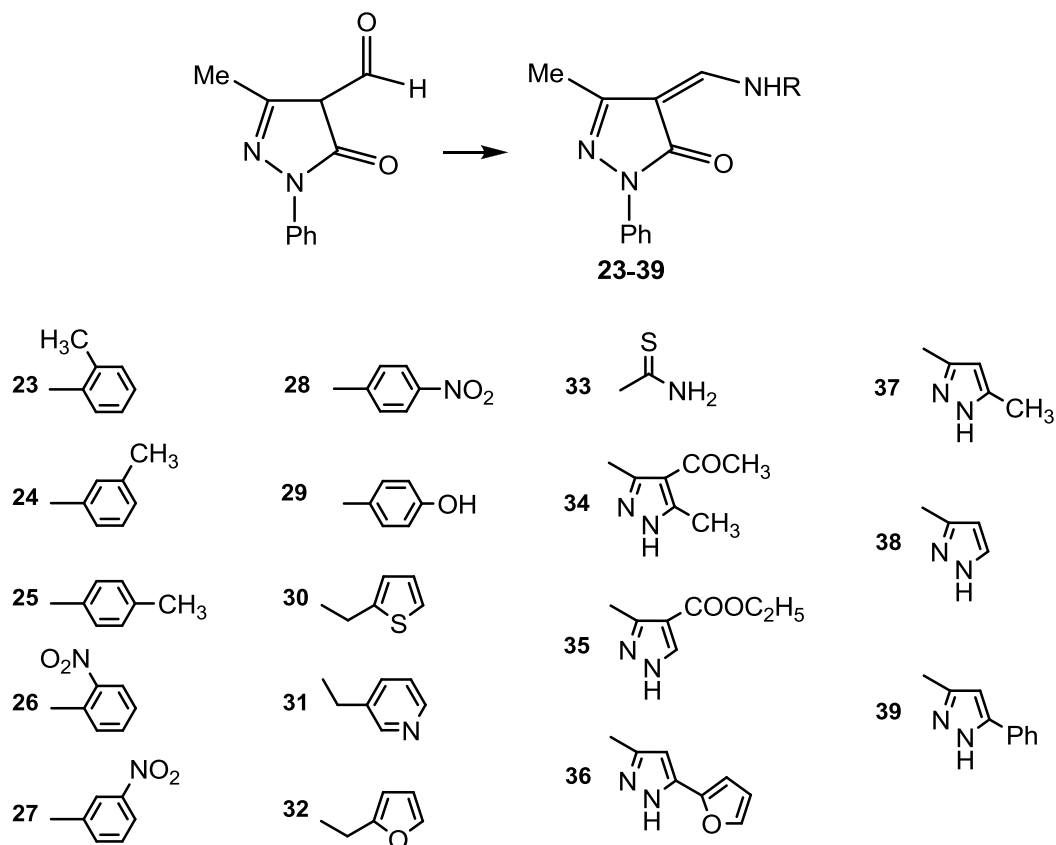


**Схема 66.** Реагенси и услови: а)  $\text{R}_1\text{NHNH}_2$ ,  $\text{EtOH}$ , кување, 3 h; б)  $\text{DMF}$ ,  $\text{POCl}_3$ , загревање,  $80^\circ\text{C}$ , 1,5 h.

Једињења **23-39** добијена су према схеми 67. Алдехидни прекурсор реаговао је са изабраним примарним аминима дајући жељене аминометилиденске деривате 4-формиледаравона (**23-39**) у добрим до одличним приносима.

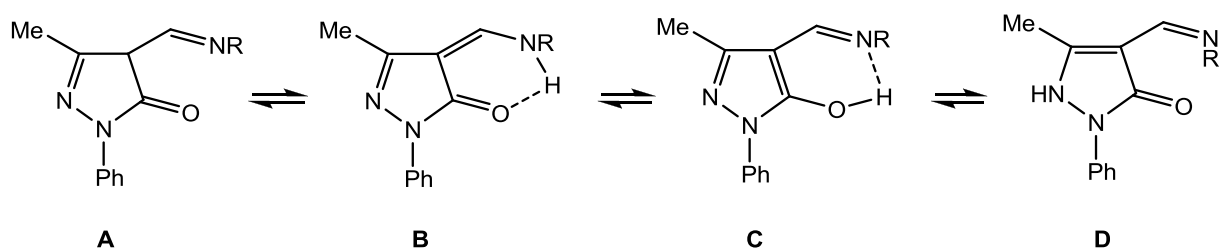
Добијање аминометилиденских деривата 4-формиледаравона задовољавајуће чистоће није било могуће класичном реакцијом кондензације између алдехида и амина у еквимоларном односу или у присуству благог вишка једног од реактаната. Наиме, постојање четири таутомерна облика 4-формиледаравона<sup>127</sup> може изазвати потешкоће у добијању 4-аминометилиденских деривата **23-39** у високим приносима и без даљег пречишћавања. На почетку, реакција алдехида са примарним амином изведена је у присуству благог вишка аминског реагенса (10 %) али је главни производ контаминиран хидроксиметилинским таутомером полазног алдехида. Када је реакција изведена са аминима у облику њихових хидрохлоридних соли, добијена је велика количина хидроксиметилинског таутомера и врло мало жељеног производа. Даље, реакција је испитивана у алкалним условима користећи 1 еквивалент  $\text{LiOH}$  и чврста супстанца је пречишћена стубном хроматографијом да би се добило чисто једињење. Међутим, када је реакција изведена са два еквивалента примарног амина у присуству каталитичке

количине *p*-толуенсулфонске киселине (*p*-TsOH), изолована су чиста једињења у добром до одличном приносу без присуства било којег таутомерног облика полазног алдехида или аминског реагенса. Такође, изведен је закључак да је етанол најбољи растварач за извођење реакције у присуству *p*-TsOH као киселог катализатора.



**Схема 67.** Реагенси и услови:  $RNH_2$ , *p*-TSA, EtOH, кување, 2 h.

Као и алдехидни прекурсор, аминотилиденски деривати 4-формиледаравона **23-39** могу постојати у четири таутомерна облика (схема 68) у зависности од експерименталних услова.



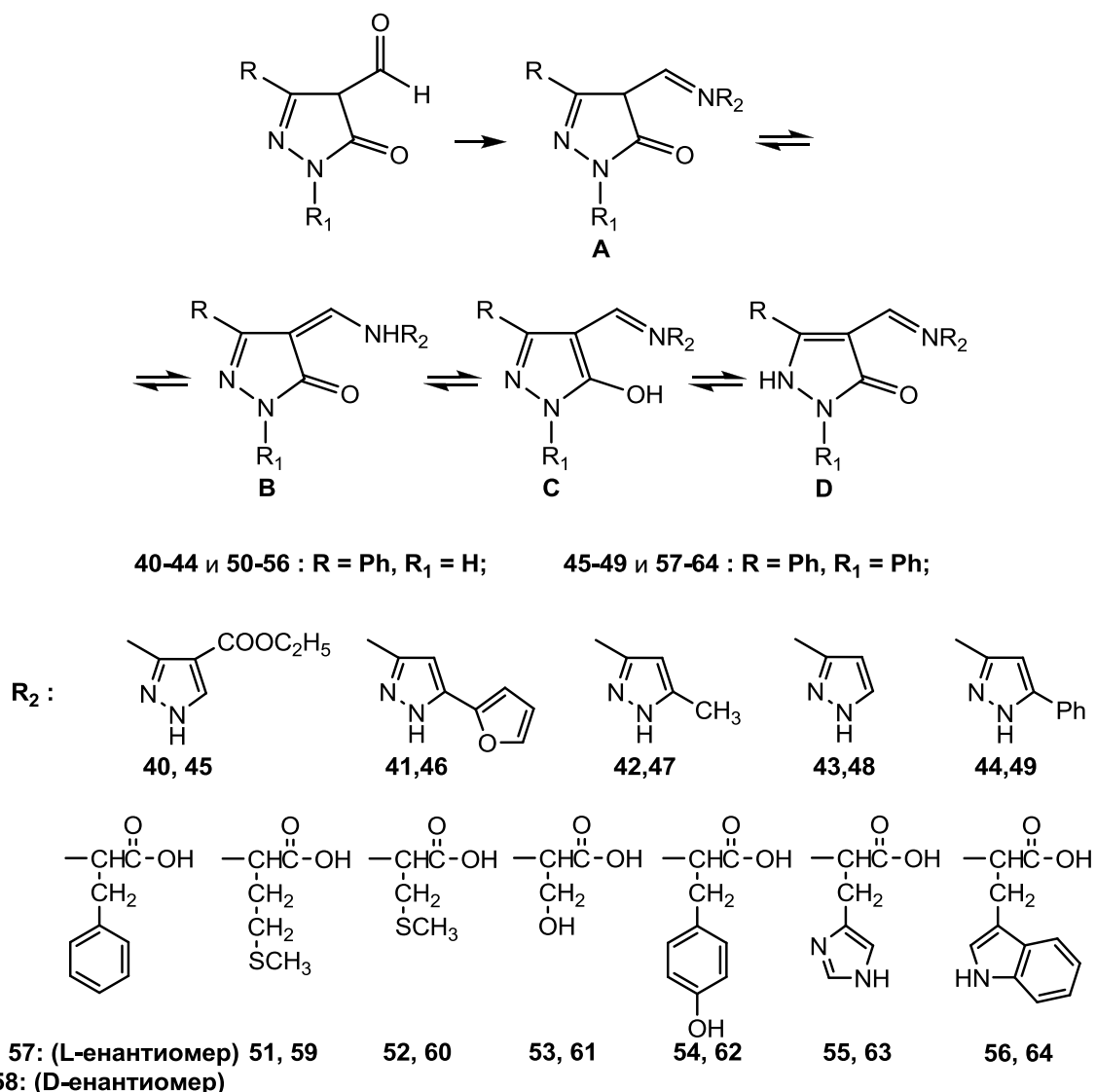
**Схема 68.** Могући таутомерни облици аминотилиденских деривата 4-формиледаравона.

IR-Спектри свих једињења **23-39** садрже јаку траку коњуговане карбонилне групе између  $1658$  и  $1674\text{ cm}^{-1}$ , заједно са широком апсорпционом траком валенционе вибрације интрамолекулски водонично везаног N–H на око  $3440\text{ cm}^{-1}$ , указујући да је таутомер **B** доминантни облик у чврстом стању. Ова запажања за N–H валенционе вибрације у сагласности су са IR-спектрима неких аминометилиденских деривата пиразол-5-она са егзоцикличном двоструком везом на положају C4.<sup>74</sup> Рендгенска структурна анализа сличних једињења добијених кондензацијом 4-формиледаравона и 2-аминоетанола потврђује постојање кето-аминских таутомерних облика у чврстом стању.<sup>128</sup>

Подаци добијени из  $^1\text{H}$  NMR спектра у DMSO- $d_6$  раствору су показали да једињења **23-35** постоје у највећој мери у облику структуре **B** стабилизоване интрамолекулским водоничним везама. Дублет који се јавља као последица купловања између протона на егзоцикличном угљениковом атому и амино-протона потврђује ову хипотезу и искључује присуство других таутомерних структура. Иако цепање егзоцикличних CH протона није добро разложено код свих једињења, иста структура би требало да буде присутна због истог или веома блиског хемијског померања овог протона. Шта више, могућа је брза равнотежна измена између **B** и **C** таутомера, што резултује појавом просечног NMR-сигнала. Једињења **36-39** показују интензиван, оштар синглет који потиче од егзоцикличног CH-протона и јако развучен сигнал, измењив са D<sub>2</sub>O, на нижем пољу, што указује на постојање таутомерне структуре **C** као доминантне у DMSO- $d_6$  раствору. Ова вредност хемијског померања искључује таутомер **D** јер би у том случају било очекивано присуство азотовог протона из прстена на знатно вишем пољу.



Други деривати пиразол-5-она, који се од едаравона разликују на основу R и R<sub>1</sub> супституената **40-64**, добијени су према схеми 69.



**Схема 69.** Реагенси и услови: за амине: *p*-TsOH, EtOH, кување, 2 h; за аминокиселине: EtOH, кување 4 h.

Добијени алдехиди су даље реаговали са 3-аминопиразолима и аминокиселинама дајући жељене 4-аминометилиденске деривате пиразол-5-она, **40-64**, у добрим и одличним приносима. У реакцији 4-формилпиразолонског прекурсора са 3-аминопиразолима присуство каталитичке количине *p*-толуенсулфонске киселине неопходно је да спречи енолизацију карбонилне групе и померање таутомерне равнотеже ка полазном таутомерном облику са егзоцикличном двоструком везом.

Аминометилиденски деривати 4-формилпиразол-5-она **40-64** могу постојати у четири таутомерна облика као што је приказано на схеми 69, у зависности од положаја и врсте супституента на пиразолонском језгру, структуре 3-аминопиразолског остатка и поларности растварача.

IR-Спектри аминских деривата садрже две карактеристичне траке у области од  $3415-3436\text{ cm}^{-1}$  и  $1656-1680\text{ cm}^{-1}$ , које могу бити приписане валенционим вибрацијама  $\nu(\text{N-H})$  и  $\nu(\text{C=C})$ , респективно, што указује да је таутомер **B** са егзоцикличном двоструком везом доминантан. Као код амина, у IR-спектрима амино-киселинских деривата присуство најјаче апсорпционе траке на  $1650-1670\text{ cm}^{-1}$  приписано је  $\nu(\text{C=O})$  вибрацијама пиразолонског прстена потврђујући постојање таутомерних облика **B** у чврстом стању. Такође, амино-киселински деривати дају широку траку валенционих вибрација O-H групе у области од  $3220-3285\text{ cm}^{-1}$ , док су карбонилне валенционе вибрације присутне у облику траке средњег интензитета између  $1710$  и  $1736\text{ cm}^{-1}$ . Ова запажања су у складу са IR спектрима неких аминометилиденских деривата пиразол-5-она<sup>74</sup> која су потврђена рендгенским структурним анализама сличних једињења.<sup>128</sup>

На основу података добијених из  $^1\text{H}$  NMR-спектара аминских деривата у DMSO- $d_6$  раствору, може се закључити да само једињење **45** постоји у таутомерном облику **B** због појаве дублета егзоцикличних CH и NH протона, као резултат њиховог узајамног купловања са релативно великом геминалном константом купловања од 13,0 Hz. Сви остали амински деривати оба пиразол-5-она и амино-киселински деривати 3-фенил-2-пиразолин-5-она присутни су у облику OH (**C**) или NH (**D**) таутомера. NH (**D**)-Таутомер захтева присуство сигнала на вишем пољу<sup>74</sup> који није примећен у спектрима, премда присуство просечног сигнала не може бити искључено као последица брзе хемијске измене између OH (**C**) или NH (**D**) таутомера.<sup>62</sup> Важно је истаћи да је овај сигнал у већини случајева био јако развучен због интрамолекуларског водоничног везивања са другим N/O атомима.

Међутим, амино-киселински деривати 1,3-дифенил-2-пиразолин-5-она постоје искључиво у таутомерном облику **B**. Сва ова једињења дају дублет за егзоциклични CH-протон и вицинални NH-протон. Штавише, код метинског протона амино-киселинског остатка долази до додатног цепања дублета дублета (dd) у ddd због купловања са вициналним NH-протоном, уместо очекиваног присуства dd за било који други таутомерни облик (Прилог, слике П9 и П10).

## 2.5. Биолошка активност синтетизованих једињења

За новосинтетизована једињења **1-9** испитана је *in vitro* анти-пролиферативна активност на ћелије хумане леукемије (K562), аденокарцинома дебелог црева (HT-29), карцинома цервикса (HeLa) и нормалног феталног фибропласта плућа (MRC-5) користећи сулфородамин-В (SRB) тест<sup>129</sup> и Doxorubicin (Dox) као референтни цитостатик. Резултати су приказани у табели 7.

Табела 7. *In vitro* цитотоксична активност једињења 1-9.

Једињење	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>			
	K562	HeLa	HT29	MRC-5
<b>1</b>	8,89	> 100	> 100	> 100
<b>2</b>	> 100	9,21	> 100	> 100
<b>3</b>	4,17	> 100	72,31	> 100
<b>4</b>	1,02	14,43	8,31	> 100
<b>5</b>	0,97	11,97	6,45	> 100
<b>6</b>	6,37	> 100	> 100	> 100
<b>7</b>	> 100	7,64	> 100	> 100
<b>8</b>	4,69	96,34	> 100	> 100
<b>9</b>	3,25	> 100	67,32	> 100
Dox	0,36	1,17	0,51	0,32

<sup>a</sup> Концентрација тестираног једињења потребна за инхибицију раста ћелије за 50%

Малигна ћелијска линија K562 била је најосетљивија, при чему је значајна цитотоксичност запажена код седам од девет тестираних једињења. Једињења са бензил-групом (**4** и **5**) показала су најјачу цитотоксичну активност према ћелијској линији хумане леукемије, K562. Заменом бензил-групе у једињењу **4** са хидрофобном изобутил-групом, чиме је добијено једињење **5**, задржава се могућност хидрофобног везивања, уз одређене стерне разлике. Поређење цитотоксичности једињења **4** и **5** са једињењем **3** указује да су **4** и **5** активнији у инхибицији ових ћелија. Када се бочни ланац замени са изопропил-групом (**2**) једињење је потпуно неактивно према K562.

Умерена активност се постиже увођењем додатног хетероатома у бочни низ (**6**). Ове разлике у цитотоксичности могу бити повезане са њиховом конформацијом и величином супституента. Волуминозна изопропил-група (**2**) и атом сумпора (**7**) смештени у близини аминокарбоксилатног скелета узрокују смањење цитотоксичне активности, вероватно спречавајући стварање интермолекулске интеракције са ћелијским рецептором. Поређењем цитотоксичности једињења добијених из различитих енантиомера фенилаланина види се да D-фенилаланин показује сличну активност у односу на L-фенилаланински енантиомер. Такође се може претпоставити да су **4** и **5** најактивнији због своје планарности и хидрофобних особина. Ови резултати указују на то да просторни ефекти и дужина бочног ланца морају бити значајан фактор при планирању будућих молекула. Занимљиво је истаћи да једињења **8** и **9** са поларним хидроксилним групама имају слабију активност од **4** и **5**, указујући да електронски карактер може бити мање значајан у односу на хидрофобне захтеве аминокиселинског дела молекула. Једињења **4** и **5** такође су активна према HeLa и HT-29 ћелијским линијама, респективно, али је њихова активност значајно нижа у односу на Doxogubicin. С друге стране, ниједно једињење није показало цитотоксичност против MRC-5 ћелијске линије. Дакле, хидрофобни карактер и стерни ефекти аминокиселинског дела представљају кључне параметре демонстриране активности према K562 ћелијској линији.

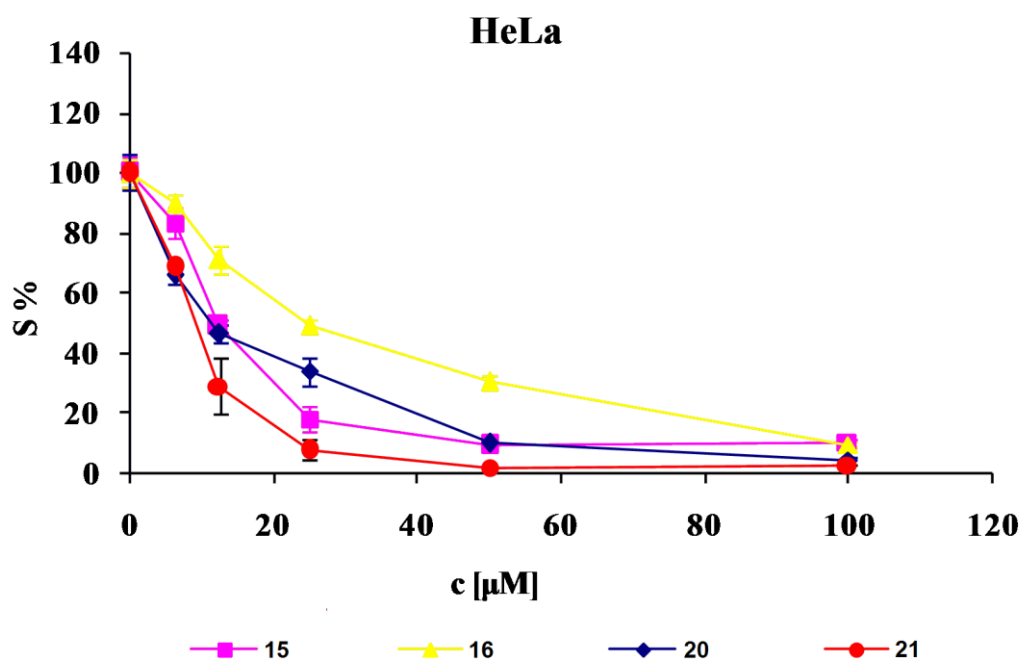
*In vitro* антитуморска активност једињења **10-21** одређена је помоћу МТТ теста према HeLa, меланому (Fem-x) и хуманој леукемији (K562).<sup>130,131</sup> Табела 8 представља резултате цитотоксичне активности, док су на сликама 13 и 14 дате цитотоксичне криве из МТТ теста које показују опстанак HeLa и K562 ћелија током 72 h у присуству растућих концентрација D-фенилаланинског (**15**), метионинског (**16**), хистидинског (**20**) и триптофанског (**21**) деривата.

Сам фуроцен нема антитуморску активност, али увођење N-фенилпиразолске јединице даје производ са израженим цитотоксичним особинама. Модификацијом алдехидног прекурсора (схема 59) са различитим  $\alpha$ -амино-киселинама, добијају се производи са побољшаном цитотоксичном активношћу у поређењу са полазним материјалом. Као што је приказано у табели 8, малигна ћелијска линија K562 веома је осетљива. Најактивнија једињења су метионински, хистидински и триптофански деривати **16**, **20** и **21**, респективно, који се одликују бољим цитотоксичним

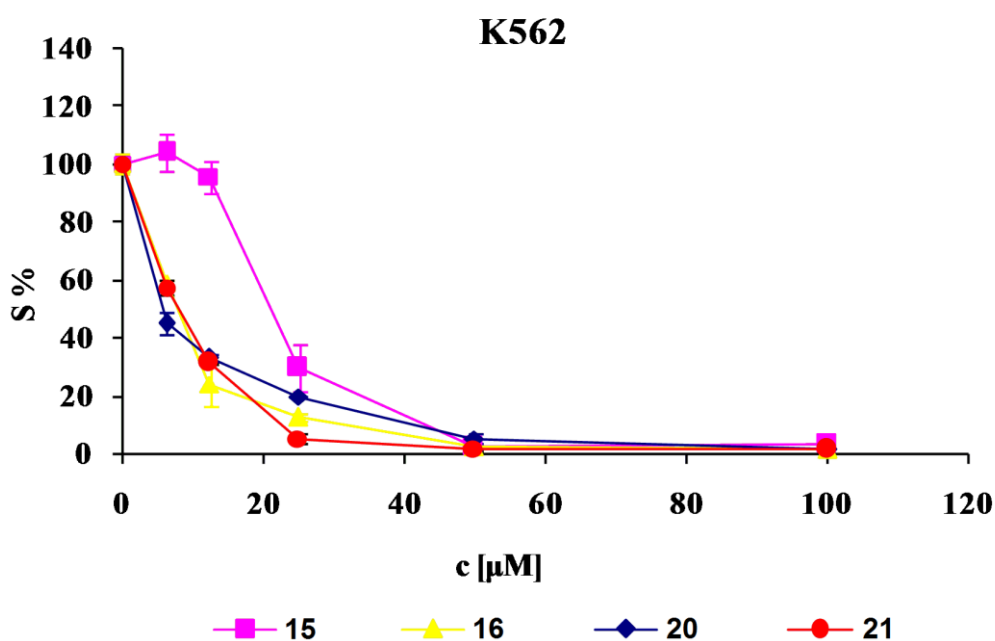
потенцијалом у поређењу са полазним прекурсором 3-фероценил-1-фенилпиразол-4-карбалдехидом (FPCA).

**Табела 8.**  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) вредности тестираних једињења и *cis*-платине током 72 h деловања на HeLa, Fem-x и K562 ћелије, одређене MTT тестом.

Једињење	HeLa	FemX	K562
	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )		
<b>10</b>	46,71 $\pm$ 5,94	41,42 $\pm$ 2,91	41,01 $\pm$ 1,56
<b>11</b>	48,52 $\pm$ 1,18	67,04 $\pm$ 4,92	61,24 $\pm$ 11,37
<b>12</b>	25,13 $\pm$ 7,33	17,36 $\pm$ 4,62	11,78 $\pm$ 4,63
<b>13</b>	10,69 $\pm$ 5,00	19,14 $\pm$ 1,16	7,29 $\pm$ 2,86
<b>14</b>	11,51 $\pm$ 2,93	16,82 $\pm$ 2,31	6,92 $\pm$ 2,04
<b>15</b>	10,92 $\pm$ 2,38	16,67 $\pm$ 1,43	7,78 $\pm$ 2,84
<b>16</b>	21,71 $\pm$ 2,88	12,66 $\pm$ 3,59	6,29 $\pm$ 1,15
<b>17</b>	31,80 $\pm$ 4,56	22,16 $\pm$ 2,11	11,64 $\pm$ 5,92
<b>18</b>	24,91 $\pm$ 1,04	16,37 $\pm$ 5,69	12,67 $\pm$ 2,07
<b>19</b>	20,95 $\pm$ 2,16	19,88 $\pm$ 2,08	8,13 $\pm$ 2,65
<b>20</b>	10,08 $\pm$ 1,30	16,76 $\pm$ 4,43	6,16 $\pm$ 0,43
<b>21</b>	7,95 $\pm$ 1,42	9,78 $\pm$ 0,27	6,34 $\pm$ 1,24
Фероцен	> 100	> 100	> 100
FPCA	15,68 $\pm$ 0,03	10,11 $\pm$ 0,27	7,91 $\pm$ 0,43
<i>Cis</i> -платина	2,10 $\pm$ 0,20	4,70 $\pm$ 0,20	5,90 $\pm$ 0,20



Слика 13. Репрезентативни граф који показује опстанак HeLa ћелија током 72 h у присуству растућих концентрација једињења 15, 16, 20 и 21.



Слика 14. Репрезентативни граф који показује опстанак K562 ћелија током 72 h у присуству растућих концентрација једињења 15, 16, 20 и 21.

Раније је објављено да пораст липофилног карактера код фероцена резултује бољом цитотоксичном активношћу.<sup>132</sup> У нашим експериментима, супротно овим закључцима, нађено је да серински и тирозински деривати **18** и **19** са поларним хидроксилним групама имају слабију активност од једињења са ароматичним и нарочито хетероароматичним прстеном, што указује да липофилни карактер има мањи значај у односу на потребу за планарним ароматичним аминокиселинским делом молекула. Нека интересантна открића саопштена су за серију *N*-(фероценил)бензоилдипептидних естара, указујући на снижење цитотоксичне активности у зависности од пораста дужине алкилног ланца  $\alpha$ -амино-киселине.<sup>133</sup> Међутим, сви ови подаци долазе од различитих канцерогених ћелијских линија што отежава поређење са нашим резултатима. Пад цитотоксичне активности за **11** и **17** у поређењу са **12** и **16**, респективно, може бити у вези са величином и стерним факторима просторно велике изопропил-групе (**11**) и волуминозног атома сумпора (**17**) у близини аминокарбоксилног остатка. Цитотоксичне активности једињења добијених из оба енантиомера фенилаланина, укључујући и рацемат, показују да нема значајне разлике у њиховој активности у односу на све три тестиране врсте ћелијских линија. Ови резултати су потврдили значај природе аминокиселинског остатка и стерних ефеката за потенцијал спречавања раста К562 ћелијске линије. Хистидински и триптофански деривати **20** и **21** показали су најбољу инхибицију све три врсте канцерогених ћелијских линија, али је активност **21** на Fem-х малигне ћелије била готово идентична са FPCA. Сва остала једињења су била умерено активна према HeLa и Fem-х ћелијама.

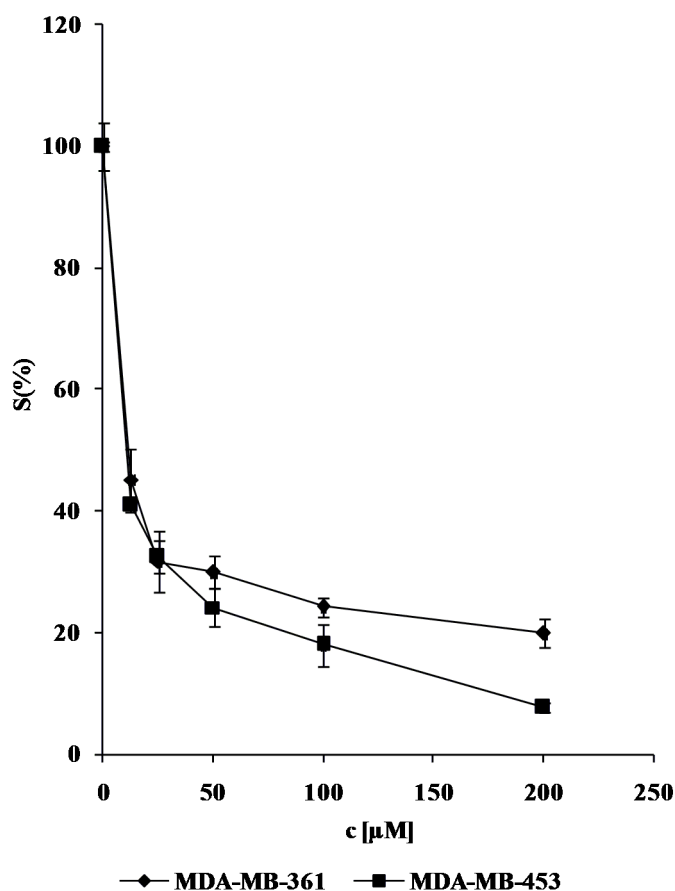
За синтетизована једињења **23-39** испитивана је антипролиферативна активност према HeLa, К562, хуманом канцеру дојке (MDA-MB-361 и MDA-MB-453) и хуманом карциному дебелог црева (LS174), са *cis*-платином (*cis*-DDP) као референтним цитостатиком. Табела 9 садржи резултате цитотоксичне активности, док слика 15 представља цитотоксичне криве добијене помоћу МТТ теста и показују опстанак MDA-MB-361 и MDA-MB-453 ћелија током 72 h, у присуству растућих концентрација једињења **39**.

**Табела 9.**  $IC_{50}$  ( $\mu g/ml$ ) вредности тестираних једињења и *cis*-платине током 72 h деловања на HeLa, MDA-MB-361, MDA-MB-453, K562 и LS174 ћелије, одређене МТТ тестом.

Једињења	HeLa	MDA-MB-361	MDA-MB-453	K562	LS174
	$IC_{50}(\mu M)$				
<b>23</b>	185,67±0,02	н.т.	>200	154,50±0,96	н.т.
<b>24</b>	72,91±0,78	н.т.	91,53±0,06	72,79±2,21	н.т.
<b>25</b>	86,32±0,96	н.т.	>200	137,08±1,65	н.т.
<b>26</b>	>200	н.т.	169,20±1,76	168,02±1,80	н.т.
<b>27</b>	183,75±0,21	н.т.	176,74±4,02	115,62±0,93	н.т.
<b>28</b>	184,15±1,43	н.т.	>200	167,26±1,08	н.т.
<b>29</b>	180,06±1,11	н.т.	>200	185,15±2,35	н.т.
<b>30</b>	62,76±0,25	н.т.	110,90±0,53	87,18±1,08	н.т.
<b>31</b>	148,58±1,84	н.т.	98,18±0,23	80,51±6,24	н.т.
<b>32</b>	69,18±1,69	н.т.	117,42±1,59	86,82±1,18	н.т.
<b>33</b>	>200	н.т.	>200	158,92±1,39	н.т.
<b>34</b>	188,97±0,11	н.т.	178,47±0,43	187,18±0,95	>200
<b>35</b>	124,10±0,34	н.т.	74,24±0,24	75,65±2,89	88,165±3,55
<b>36</b>	83,71±1,22	н.т.	44,75±0,12	79,91±0,69	64,825±3,70
<b>37</b>	130,56±2,23	н.т.	91,06±5,11	79,77±0,65	89,61±1,27
<b>38</b>	174,19±0,98	н.т.	88,84±1,72	166,39±0,24	126,81±1,44
<b>39</b>	35,79±2,35	13,63±3,56	10,51±0,09	22,13±3,85	169,48±1,01
Едаравон	195,28±0,33	н.т.	99,36±0,22	108,59±1,35	92,87±5,34
<i>Cis</i> -платина	2,41±0,14	14,74±0,36	3,75±0,12	7,9±0,20	7,95±0,32

н.т.: није тестирано





Слика 15. Репрезентативни граф који показује опстанак MDA-MB-361 и MDA-MB-453 ћелијских линија током 72 h у присуству растућих концентрација једињења 39.

Таутомерија би могла да има важну улогу у антитуморској активности свих тестираних једињења према неколико ћелијских линија. Уопштено говорећи, једињења 36 и 39 која садрже 3-аминопиразолски остатак и која постоје у таутомерној форми С показују најјачу антипролиферативну активност, нарочито према ћелијама хуманог карцинома дојке. Једињење 39 је испољило јачу цитотоксичност у инхибицији MDA-MB-361 типа ћелијских линија у поређењу са *cis*-платином. Други важан услов за сузбијање раста ћелија јесте врста супституента на положају С5 пиразолског прстена 3-аминопиразолске фармакофоре. Очигледно је да хетероароматични и планарни ароматични прстенови у положају С5 пиразолске јединице (36 и 39) ефикасније инхибирају раст MDA-MB-453 ћелија са  $IC_{50}$  вредностима 2 и 9 пута, респективно, нижим од вредности за једињење 37 које садржи метил-групу у положају С5.

Поређењем једињења **34** и **35** у истом таутомерном облику **B**, запажено је да метил-група на положају C5 има драстичан тренд смањења цитотоксичне активности према свим ћелијским линијама. Интересантно је још истаћи да сам едаравон показује знатно нижу активност од једињења **39**.

Антипролиферативна активност једињења **40-64** одређена је тестирањем према MDA-MB-361 (естроген-зависне) и MDA-MB-453 (естроген-независне) хуманим канцерогеним ћелијама дојке, са *cis*-платином (*cis*-DDP) као референтним цитостатиком. Важно је истаћи да је MDA-MB-361 ћелијска линија отпорна према широко коришћеним цитостатацима као што су Paclitaxel, Doxorubicin и 5-fluorouracil.<sup>134</sup> У табели 10 представљене су вредности цитотоксичне активности.

Једињења добијена из 1,3-дифенил-2-пиразолин-5-она (**45-49** и **57-64**) имала су најјачу антипролиферативну активност према двама ћелијским линијама. Једињења **46**, **47**, **49**, **57**, **58**, **59** и **60** показала су јачу цитотоксичност према MDA-MB-361 ћелијској линији од *cis*-платине, са једињењем **47** као најактивнијим. Естроген-независна канцерогена ћелијска линија MDA-MB-453 била је мање осетљива на примену ове групе једињења, али је релативна активност једињења одржана. У овом случају, најактивније је било једињење **49**, које у својој структури садржи 5-фенилпиразолски остатак, са IC<sub>50</sub> вредношћу око 2 пута већом од *cis*-платине. С друге стране, једињења добијена из 3-фенил-2-пиразолин-5-она (**40-44** и **50-56**) показала су знатно нижу активност према обема ћелијским линијама. Цитотоксичност расте само по увођењу фенил-групе у пиразолски остатак (**44**). Наравно, не може се искључити ни утицај таутомерије на антипролиферативну активност, али резултати који су овде изложени показују да увођење друге фенил-групе може надвладати утицај таутомерије на цитотоксичност, указујући на потребу за планарним ароматичним групама ради побољшања активности. У дифенилпиразолонским дериватима присуство додатне фенил-групе може довести и до појачаног утицаја аминокиселинског остатка са атомом сумпора, што доводи до бољих могућност за интеракцију са разним активним центрима. Ово је аргументовано вишом IC<sub>50</sub> вредношћу за метионински и S-метилицтеински дериват **51** и **52** у односу на одговарајуће **59** и **60**.

Табела 10.  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) вредности тестираних једињења и *cis*-платине током 72 h деловања на MDA-MB-361 и MDA-MB-453 ћелије, одређене МТТ тестом.

Једињења	MDA-MB-361	MDA-MB-453
	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	
40	120,57±6,44	74,61±4,41
41	63,71±2,69	20,86±2,01
42	96,05±1,17	93,00±2,83
43	95,34±3,16	74,86±0,98
44	42,66±2,71	11,53±0,96
45	24,65±0,36	19,35±2,90
46	13,36±1,31	12,36±2,23
47	9,98±1,35	10,24±0,41
48	51,01±2,93	34,66±1,51
49	12,17±0,07	8,75±0,08
50	67,05±5,62	94,78±3,40
51	105,11±5,33	42,15±2,35
52	97,36±1,33	105,23±0,31
53	104,61±6,77	23,69±0,09
54	61,06±1,39	29,77±2,75
55	113,33±0,71	73,89±4,88
56	93,63±2,02	41,66±5,11
57	11,53±0,66	10,43±1,74
58	11,88±0,28	9,66±2,14
59	12,47±1,35	9,43±0,74
60	14,22±1,78	9,46±1,05
61	52,75±3,97	49,01±3,31
62	24,79±2,88	10,92±0,43
63	87,24±1,66	71,11±0,58
64	33,86±0,87	9,75±1,01
<i>Cis</i> -платина	14,74±0,36	3,75±0,12

Пошто ова једињења нису показала довољно високу антиоксидативну активност, претпостављено је да њихов механизам деловања није повезан са слободно-радикалском активношћу. Зато је механизам деловања испитиван цитофлуориметријском анализом. Репрезентативна анализа ћелијског циклуса канцерогених ћелијских линија указује да тестирана једињења индукују апоптозу.

### **3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО**



### 3.1. Физичка мерења

Тачке топљења свих синтетизованих једињења одређене су на Mel-Temp апарату, модел 1001 и нису кориговане. Оптичка ротација је одређена на Rudolph Research Analytical аутоматском полариметру Autopol IV. Елементарна анализа (C, H, N, S) свих једињења урађена је помоћу стандардних метода у Центру за Инструменталне анализе, Хемијског факултета у Београду. Инфрацрвени спектри снимани су на Perkin Elmer Spectrum One FT-IR спектрофотометру са KBr диском. Сви  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  нуклеарно-магнетно-резонанциони (NMR) спектри снимани су на Varian Gemini 200 и Bruker Avance III 500 MHz спектрометрима. Хемијска померања дата су у односу на TMS (триметилсилан).

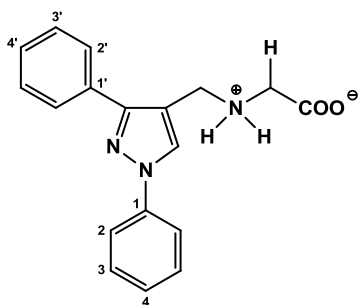
### 3.2. Поступак за синтезу једињења 1-9

Раствор ацетофенона (30 g, 0,25 mol) и фенилхидразина (27 g, 0,25 mol) у 60 ml EtOH загреван је 1 час на воденом купатилу (70 °C). Након хлађења, добијени талог је процеђен, испран са мало хладног EtOH и осушен у ексикатору преко анхидрованог  $\text{CaCl}_2$ . Принос: 45,7 g (87 %). Добијени ацетофенон-фенилхидразон (36,08 g, 0,17 mol) растворен је у 34 ml DMF-а и лагано додаван смеси DMF (32,7 ml, 0,42 mol) и  $\text{POCl}_3$  (38,8 ml, 0,42 mol) уз хлађење на 0 °C. Реакција је довршена загревањем на температури од 70-80 °C током 5 часова. Смеса је након хлађења разблажена водом и хидролизована додавањем засићеног раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Добијени талог је процеђен, испран са великом количином воде и осушен у ексикатору преко анхидрованог  $\text{CaCl}_2$ . Принос: 35,0 g (83 %).

1,3-Дифенилпиразол-4-карбалдехид (0,62 g, 2,5 mmol),  $\alpha$ -амино-киселина (2,75 mmol) и NaOH (0,11 g, 2,75 mmol, за **9** 0,22g, 5,50 mmol) мешани су у порцеланском авану ради добијања хомогене беле прашкасте супстанце све док није престало издвајање воде. Добијена смеса је преливена у балону са 50 ml сувог метанола и рефлуктована током 2 сата. После хлађења у леденом купатилу, додат је натријум-борхидрид (0,11 g, 3 mmol) из више порција уз мешање. Раствор је мешан још 2 часа на собној температури, затим је разблажен са 50 ml дејонизоване воде и остављен да стоји још 12 часова. После тога, пажљивим додавањем глацијалне сирћетне киселине

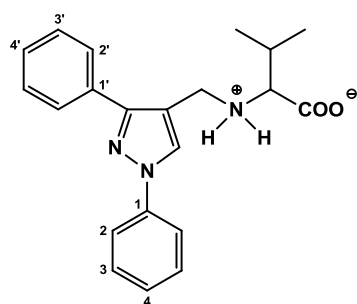
добијен је бели талог. Чврсти производ је пречишћен растварањем у 1М NaOH и поновним таложењем помоћу глацијалне сирћетне киселине. Добијени бели талог је процеђен на Büchner-овом левку, испран са доста воде и осушен у ексикатору преко анхидрованог CaCl<sub>2</sub>.

### 3.2.1.



**1:** Бела аморфна супстанца; принос: 0,56 g (73%); Т.Т. 190-191 °C (разлагање); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3063 ν (C-H)<sub>Ar</sub>, 2960 и 2820 ν (C-H)<sub>Al</sub>, 2650–2400 ν (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 1626 ν<sub>as</sub> (COO<sup>-</sup>), 1601 ν (C=C)<sub>Ar</sub>, 1547 ν (C=N)<sub>Ar</sub>, 1502 δ (C=C)<sub>Ar</sub>, 1453 δ (C=N)<sub>Ar</sub>, 1412 ν<sub>s</sub> (COO<sup>-</sup>), 1066 δ (C-H)<sub>ip</sub>, 758 δ (C-H)<sub>oop</sub>; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, пиридин-d<sub>5</sub>/D<sub>2</sub>O, 9/1 v/v): 4,19 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-COO), 4,74 (s, 2H, Pz-CH<sub>2</sub>), 7,40-7,71 (m, 6H, 1H на C-4, 1H на C-4', 2H на C-3/5 и 2H на C-3'/5'), 7,97 (d, 2H на C-2/6, J = 8,00 Hz), 8,00 (d, 2H на C-2'/6', J = 8,00 Hz), 8,94 (s, 1H, Pz); <sup>13</sup>C NMR (пиридин-d<sub>5</sub>/D<sub>2</sub>O, 9/1 v/v): 41,87 (Pz-CH<sub>2</sub>), 50,13 (CH<sub>2</sub>-COO), 113,09 (C-4, Pz), 119,15 (C-2/6), 127,31 (C-4), 128,66 (C-2'/6'), 129,08 (C-4'), 129,46 (C-3'/5'), 130,02 (C-3/5), 130,40 (C-5, Pz), 132,42 (C-1'), 139,72 (C-3, Pz), 152,50 (C-1), 170,83 (COO). Израчунато: C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (307,35 g/mol): C, 70,34; H, 5,58; N, 13,67; Нађено: C, 70,12; H, 5,62; N, 13,55.

### 3.2.2.

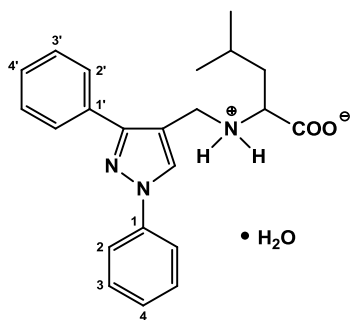


**2:** Бела аморфна супстанца; принос: 0,72 g (82%); Т.Т. 198 °C (разлагање); [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +12,77 (c = 1,096 · 10<sup>-3</sup> g/cm<sup>3</sup>, пиридин/H<sub>2</sub>O, 9/1 v/v); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3059 ν (C-H)<sub>Ar</sub>; 2965 и 2876 ν (C-H)<sub>Al</sub>; 2600–2400 ν (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>); 1614 ν<sub>as</sub> (COO<sup>-</sup>); 1600 ν (C=C)<sub>Ar</sub>, 1550 ν (C=N)<sub>Ar</sub>, 1504 δ (C=C)<sub>Ar</sub>, 1451 δ (C=N)<sub>Ar</sub>, 1411 ν<sub>s</sub> (COO<sup>-</sup>), 1069 δ (C-H)<sub>ip</sub>, 756 δ (C-H)<sub>oop</sub>; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, пиридин-d<sub>5</sub>/D<sub>2</sub>O, 9/1 v/v): 1,16 (d, 3H, J = 6,62 Hz, CH<sub>3</sub>), 1,19 (d, 3H, J = 6,56 Hz, CH<sub>3</sub>), 2,31 (m, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 3,55 (d, 1H, J = 5,46 Hz, CH-COO), δ<sub>A</sub> = 4,31 и δ<sub>B</sub> = 4,01 (AB систем, 2H, J<sub>AB</sub> = 13,50 Hz, Pz-CH<sub>2</sub>), 7,33-7,62 (m, 6H, 1H на C-4, 1H на C-4', 2H на C-3/5 и 2H на C-3'/5'), 8,02 (d, 2H на C-2/6, J = 8,00 Hz), 8,36 (d, 2H на C-2'/6', J = 8,00 Hz), 8,55 (s, 1H, Pz); <sup>13</sup>C NMR (пиридин-d<sub>5</sub>/D<sub>2</sub>O, 9/1



v/v): 18,81 (CH<sub>3</sub>), 19,95 (CH<sub>3</sub>), 31,78 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 43,25 (Pz-CH<sub>2</sub>), 67,49 (CH-COO), 118,80 (C-2/6), 120,14 (C-4, Pz), 126,46 (C-4), 128,33 (C-4'), 128,56 (C-2'/6'), 128,98 (C-3'/5'), 129,14 (C-5, Pz), 129,85 (C-3/5), 134,13 (C-1'), 140,46 (C-3, Pz), 151,93 (C-1), 177,01 (COO). Израчунато: C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (349,43 g/mol): C, 72,18; H, 6,63; N, 12,03; Нађено: C, 72,02; H, 6,68; N, 11,86.

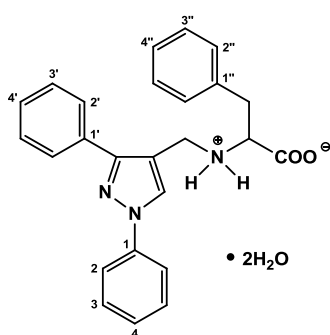
### 3.2.3.



**3:** Бела аморфна супстанца; принос: 0,82 g (86%); Т.Т. 184 °C (разлагање);  $[\alpha]_D^{20} = -6.09$  ( $c = 1,313 \cdot 10^{-3}$  g/cm<sup>3</sup>, пиридин/H<sub>2</sub>O, 9/1 v/v); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3065 ν (C-H)<sub>Ar</sub>, 2956 и 2869 ν (C-H)<sub>Al</sub>, 2550–2300 ν (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 1612 ν<sub>as</sub> (COO<sup>-</sup>), 1600 ν (C=C)<sub>Ar</sub>, 1560 ν (C=N)<sub>Ar</sub>, 1503 δ (C=C)<sub>Ar</sub>, 1454 δ (C=N)<sub>Ar</sub>, 1412 ν<sub>s</sub> (COO<sup>-</sup>), 1076 δ (C-H)<sub>ip</sub>,

755 δ (C-H)<sub>oop</sub>; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, пиридин-d<sub>5</sub>/D<sub>2</sub>O, 9/1 v/v): 0,92 (d, 3H,  $J = 6,72$  Hz, CH<sub>3</sub>), 0,96 (d, 3H,  $J = 6,74$  Hz, CH<sub>3</sub>), 1,89 (m, 2H, CH-CH<sub>2</sub>-CH), 2,16 (m, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 3,87 и 3,90 (2d, 1H,  $J = 6,36$  Hz и  $J = 6,60$  Hz, NH-CH-COO), δ<sub>A</sub> = 4,42 и δ<sub>B</sub> = 4,15 (AB систем, 2H,  $J_{AB} = 13,50$  Hz, Pz-CH<sub>2</sub>), 7,32-7,61 (m, 6H, 1H на C-4, 1H на C-4', 2H на C-3/5 и 2H на C-3'/5'), 8,03 (d, 2H на C-2/6,  $J = 8,00$  Hz), 8,36 (d, 2H на C-2'/6',  $J = 8,00$  Hz), 8,67 (s, 1H, Pz); <sup>13</sup>C NMR (пиридин-d<sub>5</sub>/D<sub>2</sub>O, 9/1 v/v): 21,17 (CH<sub>3</sub>), 21,94 (CH<sub>3</sub>), 24,14 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 41,38 (CH-CH<sub>2</sub>-CH), 41,62 (Pz-CH<sub>2</sub>), 59,50 (CH-COO), 117,67 (C-2/6), 118,20 (C-4, Pz), 125,36 (C-4), 127,23 (C-4'), 127,43 (C-2'/6'), 127,67 (C-3'/5'), 128,22 (C-5, Pz), 128,71 (C-3/5), 132,66 (C-1'), 139,28 (C-3, Pz), 150,78 (C-1), 176,47 (COO). Израчунато: C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (381,48 g/mol): C, 69,27; H, 7,13; N, 11,02; Нађено: C, 68,99; H, 7,21; N, 10,89.

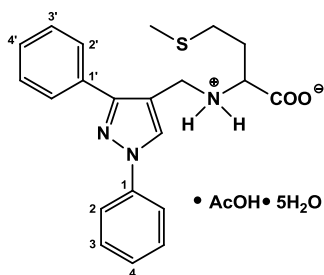
### 3.2.4.



**4** (L-Енантиомер) и **5** (D-енантиомер): Бела аморфна супстанца; принос: 0,95 g за **4** и 0,93 g за **5** (88% за **4** и 86% за **5**); Т.Т. 185-186 °C (разлагање);  $[\alpha]_D^{20} = -1,82$  ( $c = 1,100 \cdot 10^{-3}$  g/cm<sup>3</sup>, пиридин/H<sub>2</sub>O, 9/1 v/v) за **4** и  $[\alpha]_D^{20} = +1,82$  ( $c = 1,100 \cdot 10^{-3}$  g/cm<sup>3</sup>, пиридин/H<sub>2</sub>O, 9/1 v/v) за **5**; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3062 ν (C-H)<sub>Ar</sub>, 2972 и 2853 ν (C-H)<sub>Al</sub>,

2620–2380  $\nu$  ( $\text{NH}_2^+$ ), 1619  $\nu_{\text{as}}$  ( $\text{COO}^-$ ), 1599  $\nu$  ( $\text{C}=\text{C}$ )<sub>Ar</sub>, 1553  $\nu$  ( $\text{C}=\text{N}$ )<sub>Ar</sub>, 1503  $\delta$  ( $\text{C}=\text{C}$ )<sub>Ar</sub>, 1453  $\delta$  ( $\text{C}=\text{N}$ )<sub>Ar</sub>, 1412  $\nu_{\text{s}}$  ( $\text{COO}^-$ ), 1072  $\delta$  ( $\text{C}-\text{H}$ )<sub>ip</sub>, 754  $\delta$  ( $\text{C}-\text{H}$ )<sub>oop</sub>;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, пиридин- $d_5/\text{D}_2\text{O}$ , 9/1 v/v):  $\delta_{\text{A}} = 3,42$ ,  $\delta_{\text{B}} = 3,21$  и  $\delta_{\text{X}} = 4,04$  (ABX систем, 3H,  $J_{\text{AB}} = 13,59$  Hz,  $J_{\text{AX}} = 5,15$  Hz,  $J_{\text{BX}} = 8,26$  Hz,  $\text{CH}-\text{CH}_2$ ),  $\delta_{\text{A}} = 4,29$  и  $\delta_{\text{B}} = 3,99$  (AB систем, 2H,  $J_{\text{AB}} = 13,50$  Hz, Pz- $\text{CH}_2$ ), 7,28-7,62 (m, 11H, Ar-H), 7,93 (d, 2H на C-2/6,  $J = 8,00$  Hz), 8,20 (d, 2H на C-2'/6',  $J = 8,00$  Hz), 8,29 (s, 1H, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (пиридин- $d_5/\text{D}_2\text{O}$ , 9/1 v/v): 40,10 (Ph- $\text{CH}_2$ ), 42,88 (Pz- $\text{CH}_2$ ), 63,30 (CH-COO), 118,77 (C-2/6), 120,66 (C-4, Pz), 126,36 (C-4''), 126,78 (C-4), 128,19 (C-4'), 128,50 (C-2'/6'), 128,69 (C-3''/5''), 128,75 (C-5, Pz), 128,96 (C-3'/5'), 129,78 (C-3/5), 130,05 (C-2''/6''), 134,18 (C-1'), 139,35 (C-1''), 140,48 (C-3, Pz), 151,76 (C-1), 176,98 (COO). Израчунато:  $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4$  (433,51 g/mol): C, 69,27; H, 6,28; N, 9,69; Нађено: C, 69,51; H, 6,31; N, 9,74.

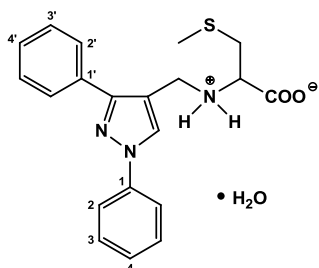
### 3.2.5.



**6:** Бела аморфна супстанца; принос: 1,18 g (89 %); Т.Т. 185–186 °C (разлагање);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -6,94$  ( $c = 1,296 \cdot 10^{-3}$  g/cm<sup>3</sup>, пиридин/ $\text{H}_2\text{O}$ , 9/1 v/v); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3291  $\nu$  (O-H, широк), 3060  $\nu$  ( $\text{C}-\text{H}$ )<sub>Ar</sub>; 2916 и 2853  $\nu$  ( $\text{C}-\text{H}$ )<sub>Al</sub>, 2600-2440  $\nu$  ( $\text{NH}_2^+$ ), 1681  $\nu$  ( $\text{C}=\text{O}$ ), 1607  $\nu_{\text{as}}$  ( $\text{COO}^-$ ), 1598  $\nu$  ( $\text{C}=\text{C}$ )<sub>Ar</sub>,

1558  $\nu$  ( $\text{C}=\text{N}$ )<sub>Ar</sub>, 1504  $\delta$  ( $\text{C}=\text{C}$ )<sub>Ar</sub>, 1452  $\delta$  ( $\text{C}=\text{N}$ )<sub>Ar</sub>, 1412  $\nu_{\text{s}}$  ( $\text{COO}^-$ ), 1067  $\delta$  ( $\text{C}-\text{H}$ )<sub>ip</sub>, 756  $\delta$  ( $\text{C}-\text{H}$ )<sub>oop</sub>;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, пиридин- $d_5/\text{D}_2\text{O}$ , 9/1 v/v): 2,04 (s, 3H,  $\text{CH}_3-\text{S}$ ), 2,43 (s, 3H,  $\text{CH}_3-\text{COO}$ ), 2,53 (m, 2H,  $\text{CH}-\text{CH}_2$ ), 3,00 (t, 2H,  $J = 6,09$  Hz,  $\text{CH}_2-\text{S}$ ); 4,13 (t, 1H,  $J = 5,60$  Hz,  $\text{CH}-\text{CH}_2$ ),  $\delta_{\text{A}} = 4,58$  и  $\delta_{\text{B}} = 4,35$  (AB систем, 2H,  $J_{\text{AB}} = 13,50$  Hz, Pz- $\text{CH}_2$ ), 7,36-7,70 (m, 6H, 1H на C-4, 1H на C-4', 2H на C-3/5 и 2H на C-3'/5'), 8,03 (d, 2H на C-2/6,  $J = 8,00$  Hz), 8,21 (d, 2H на C-2'/6',  $J = 7,52$  Hz); 8,66 (s, 1H, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (пиридин- $d_5/\text{D}_2\text{O}$ , 9/1 v/v): 14,92 ( $\text{CH}_3-\text{S}$ ), 23,38 ( $\text{CH}_3-\text{COO}$ ), 30,91 ( $\text{S}-\text{CH}_2$ ), 32,70 ( $\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ), 42,28 (Pz- $\text{CH}_2$ ), 62,92 (CH-COO), 117,35 (C-4, Pz), 118,95 (C-2/6), 126,74 (C-4), 128,59 (C-2'/6'), 128,64 (C-4'), 129,18 (C-3'/5'), 129,90 (C-3/5), 130,05 (C-5, Pz), 133,35 (C-1'), 140,11 (C-3, Pz), 152,10 (C-1), 177,02 (COO), 177,39 ( $\text{CH}_3-\text{COO}$ ). Израчунато:  $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_9\text{S}$  (531,63 g/mol): C, 51,96; H, 7,02; N, 7,90; S, 6,03; Нађено: C, 51,86; H, 6,94; N, 7,82; S, 5,93.

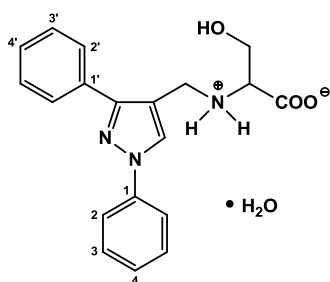
3.2.6.



**7:** Бела аморфна супстанца; принос: 0,88 g (92 %); Т.Т. 187 °С (разлагање);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -11,04$  ( $c = 1,177 \cdot 10^{-3} \text{ g/cm}^3$ , пиридин/ $\text{H}_2\text{O}$ , 9/1 v/v); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3051  $\nu$  (C-H)<sub>Ar</sub>, 2923 и 2853  $\nu$  (C-H)<sub>Al</sub>; 2601–2388  $\nu$  ( $\text{NH}_2^+$ ), 1628  $\nu_{\text{as}}$  ( $\text{COO}^-$ ), 1599  $\nu$  (C=C)<sub>Ar</sub>, 1549  $\nu$  (C=N)<sub>Ar</sub>, 1504  $\delta$  (C=C)<sub>Ar</sub>,

1451  $\delta$  (C=N)<sub>Ar</sub>, 1413  $\nu_{\text{s}}$  ( $\text{COO}^-$ ), 1067  $\delta$  (C-H)<sub>ip</sub>, 757  $\delta$  (C-H)<sub>oop</sub>;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, пиридин- $\text{d}_5/\text{D}_2\text{O}$ , 9/1 v/v): 2,20 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-S}$ ),  $\delta_{\text{A}} = 3,25$ ,  $\delta_{\text{B}} = 3,16$  и  $\delta_{\text{X}} = 4,01$  (ABX систем, 3H,  $J_{\text{AB}} = 13,50 \text{ Hz}$ ,  $J_{\text{AX}} = 5,73 \text{ Hz}$ ,  $J_{\text{BX}} = 7,27 \text{ Hz}$ ,  $\text{CH-CH}_2$ ),  $\delta_{\text{A}} = 4,34$  и  $\delta_{\text{B}} = 4,14$  (AB систем, 2H,  $J_{\text{AB}} = 13,50 \text{ Hz}$ , Pz- $\text{CH}_2$ ), 7,29 (t, 1H,  $J = 7,50 \text{ Hz}$ , C-4), 7,44 (t, 1H,  $J = 7,50 \text{ Hz}$ , C-4'), 7,50 (t, 2H,  $J = 7,50 \text{ Hz}$ , C-3/5), 7,57 (t, 2H,  $J = 7,50 \text{ Hz}$ , C-3'/5'), 8,01 (d, 2H,  $J = 8,00 \text{ Hz}$ , C-2/6), 8,35 (d, 2H,  $J = 8,00 \text{ Hz}$ , C-2'/6'), 8,53 (s, 1H, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (пиридин- $\text{d}_5/\text{D}_2\text{O}$ , 9/1 v/v): 16,35 ( $\text{CH}_3\text{-S}$ ), 38,08 (S- $\text{CH}_2$ ), 43,02 (Pz- $\text{CH}_2$ ), 61,60 (CH), 118,93 (C-2/6), 120,69 (C-4, Pz), 126,52 (C-4), 128,41 (C-4'), 128,74 (C-2'/6'), 128,98 (C-5, Pz), 129,12 (C-3'/5'), 129,95 (C-3/5), 134,43 (C-1'), 140,75 (C-3, Pz), 151,96 (C-1), 175,98 ( $\text{COO}$ ). Израчунато:  $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$  (385,48 g/mol): C, 62,32; H, 6,01; N, 10,90; S, 8,32; Нађено: C, 62,49; H, 5,99; N, 10,92; S, 8,35.

3.2.7.

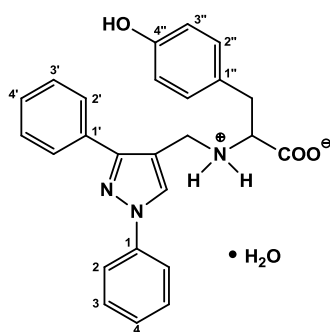


**8:** Бела аморфна супстанца; принос: 0,71 g (80%); Т.Т. 190-191 °С (разлагање);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +3,96$  ( $c = 1,263 \cdot 10^{-3} \text{ g/cm}^3$ , пиридин/ $\text{H}_2\text{O}$ , 9/1 v/v); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3445  $\nu$  (O-H, широк), 3055  $\nu$  (C-H)<sub>Ar</sub>, 2961 и 2853  $\nu$  (C-H)<sub>Al</sub>, 2600–2390  $\nu$  ( $\text{NH}_2^+$ ), 1628  $\nu_{\text{as}}$  ( $\text{COO}^-$ ), 1600  $\nu$  (C=C)<sub>Ar</sub>, 1547  $\nu$

(C=N)<sub>Ar</sub>, 1504  $\delta$  (C=C)<sub>Ar</sub>; 1452  $\delta$  (C=N)<sub>Ar</sub>, 1417  $\nu_{\text{s}}$  ( $\text{COO}^-$ ), 1074  $\delta$  (C-H)<sub>ip</sub>, 752  $\delta$  (C-H)<sub>oop</sub>;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, NaOD/ $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta_{\text{A}} = 3,71$ ,  $\delta_{\text{B}} = 3,65$  и  $\delta_{\text{X}} = 3,17$  (ABX систем, 3H,  $J_{\text{AB}} = 11,50 \text{ Hz}$ ,  $J_{\text{AX}} = 4,66 \text{ Hz}$ ,  $J_{\text{BX}} = 6,09 \text{ Hz}$ ,  $\text{CH-CH}_2$ ),  $\delta_{\text{A}} = 3,37$  и  $\delta_{\text{B}} = 3,62$  (AB систем, 2H,  $J_{\text{AB}} = 13,50 \text{ Hz}$ , Pz- $\text{CH}_2$ ), 7,35 (t, 1H,  $J = 7,50 \text{ Hz}$ , C-4), 7,44-7,52 (m, 5H, 2H на C-3/5, 1H на C-4' и 2H на C-3'/5'), 7,58 (d, 2H на C-2/6,  $J = 8,00 \text{ Hz}$ ), 7,60 (d, 2H на C-2'/6',  $J = 8,00 \text{ Hz}$ ), 8,05 (s, 1H, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (NaOD/ $\text{D}_2\text{O}$ ): 43,88 (Pz- $\text{CH}_2$ ); 65,67 ( $\text{CH}_2\text{-OH}$ ), 67,22 (CH), 121,65 (C-4, Pz), 122,09 (C-2/6), 129,75 (C-4), 130,69 (C-2'/6'), 131,32 (C-4'), 131,58 (C-3'/5'), 132,13 (C-5, Pz), 132,33 (C-3/5), 134,68 (C-1'), 141,78 (C-3, Pz), 154,57 (C-1), 181,84

(COO). Израчунао: C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (355,39 g/mol): C, 64,21; H, 5,96; N, 11,82; S, 8,32; Нађено: C, 64,40; H, 5,94; N, 11,81.

3.2.8.



**9:** Бела аморфна супстанца; принос: 0,85 g (79%); Т.Т. 190-191 °С (разлагање);  $[\alpha]_D^{20} = -6,00$  ( $c = 1,166 \cdot 10^{-3}$  g/cm<sup>3</sup>, пиридин/H<sub>2</sub>O, 9/1 v/v); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3418  $\nu$  (O-H, широк), 3061  $\nu$  (C-H)<sub>Ar</sub>, 2957 и 2812  $\nu$  (C-H)<sub>Al</sub>, 2622–2400  $\nu$  (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 1611  $\nu_{as}$  (COO<sup>-</sup>), 1597  $\nu$  (C=C)<sub>Ar</sub>, 1559  $\nu$  (C=N)<sub>Ar</sub>, 1504  $\delta$  (C=C)<sub>Ar</sub>, 1451  $\delta$  (C=N)<sub>Ar</sub>, 1410  $\nu_s$  (COO<sup>-</sup>), 1072  $\delta$  (C-H)<sub>ip</sub>, 757  $\delta$  (C-H)<sub>oop</sub>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, NaOD/D<sub>2</sub>O):  $\delta_A = 2,80$ ,  $\delta_B = 2,63$  и  $\delta_X = 3,28$  (ABX систем, 3H,  $J_{AB} = 13,75$  Hz,  $J_{AX} = 5,67$  Hz,  $J_{BX} = 7,83$  Hz, CH-CH<sub>2</sub>),  $\delta_A = 3,75$  и  $\delta_B = 3,54$  (AB систем, 2H,  $J_{AB} = 13,50$  Hz, Pz-CH<sub>2</sub>), 6,54 (d, 2H на 3'',  $J = 8,00$  Hz), 6,91 (d, 2H на 2'',  $J = 8,50$  Hz), 7,37 (t, 1H на C-4,  $J = 7,50$  Hz), 7,49 (m, 7H, 2H на C-3/5, 1H на C-4', 2H на C-3'/5' и 2H на C-2/6), 7,61 (d, 2H на C-2'/6',  $J = 8,00$  Hz), 7,97 (s, 1H, Pz); <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, NaOD/D<sub>2</sub>O): 40,84 (Ph-CH<sub>2</sub>), 43,62 (Pz-CH<sub>2</sub>), 67,60 (CH), 121,38 (3''), 121,64 (C-4, Pz), 122,24 (C-2/6), 126,28 (1''), 129,81 (C-4), 130,72 (C-2'/6'), 131,35 (C-4'), 131,63 (C-3'/5'), 132,15 (C-5, Pz), 132,39 (C-3/5), 133,03 (2''), 134,60 (C-1'), 141,83 (C-3, Pz), 154,77 (C-1), 167,28 (4''), 184,13 (COO). Израчунао: C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (431,48 g/mol): C, 69,59; H, 5,84; N, 9,74; Нађено: C, 69,69; H, 5,82; N, 9,74.

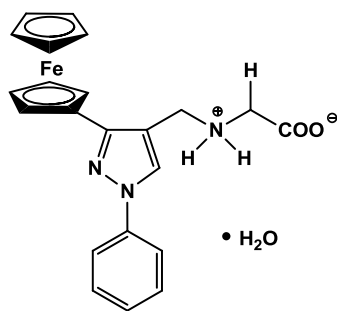
### 3.3. Поступак за синтезу једињења 10-21

Раствор ацетилфероцена (2,28 g, 10.00 mmol) и фенилхидразина (1,15 g, 1,25 mmol) у 10 ml EtOH уз додатак две капи глацијалне АсОН рефлукован је 1,5 h и потом охлађен на собну температуру. Добијени талог (2,96 g, 93 %) је филтриран, испран хладним EtOH (5 ml), осушен у ексикатору преко анхидрованога СаСl<sub>2</sub> током једног часа, растворен у DMF-у (15 ml) у инертној атмосфери аргона и охлађен у леденом купатилу. У охлађен раствор укапаван је POCl<sub>3</sub> (2,25 ml, 27,22 mmol). Након 30 min купатило је уклоњено и реакциона смеша је мешана 18 h на собној температури. Затим је смеша преливена у суд са ледом (30 g) и водом (30 ml), хидролизована лаганим

додавањем  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (40 g) раствореног у 100 ml воде и мешана током 3 часа на собној температури. Добијени талог 3-фероценил-1-фенилпиразол-4-карбалдехида је процеђен, испран са великом количином воде, суспендован у води (100 ml) и екстрахован толуеном. После сушења (анхидровани  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), растварач је испарен и чврсти остатак прекристалисан из EtOH. Принос: 2,99 g, (84 %).

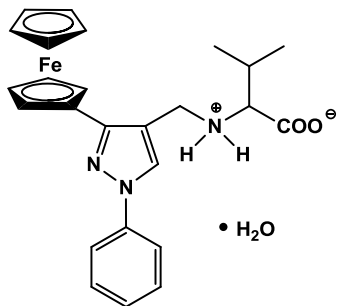
3-Фероценил-1-фенилпиразол-4-карбалдехид (0,445 g, 1,25 mmol)  $\alpha$ -аминокиселина (1,375 mmol) и NaOH (0,055 g, 1,375 mmol, for **19** 0,11 g, 2,75 mmol) мешани су у порцеланском авану ради добијања хомогене наранџасте прашкасте супстанце све док није престало издвајање воде. Добијена смеша преливена је у балону са 25 ml сувог метанола и рефлугована током 2 часа. После хлађења у леденом купатилу, додат је натријум-борхидрид (0,057 g, 1,5 mmol) из више порција уз мешање. Раствор је мешан још 2 часа на собној температури, затим је разблажен са 25 ml дејонизоване воде и остављен да стоји још 12 часова. После тога, додавањем глацијалне сирћетне киселине добијен је наранџасти талог. За једињења **10-21** производ високе чистоће добијен је растварањем у метанолском раствору са 1 еквивалентом NaOH и поновним таложењем помоћу глацијалне сирћетне киселине.

### 3.3.1.



**10**: Жуто-браон аморфна супстанца; принос: 0,40 g (74%); Т.Т. 140-141 °C (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3430  $\nu(\text{O-H})$ , 3084  $\nu(\text{C-H})_{\text{Ar}}$ , 2926 и 2852  $\nu(\text{C-H})_{\text{Al}}$ , 2791–2379  $\nu(\text{NH}_2^+)$ , 1628  $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ , 1599  $\nu(\text{C=C})_{\text{Ar}}$ , 1556  $\nu(\text{C=N})_{\text{Ar}}$ , 1504  $\delta(\text{C=C})_{\text{Ar}}$ , 1464  $\delta(\text{C=N})_{\text{Ar}}$ , 1407  $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ , 1059  $\delta(\text{C-H})_{\text{ip}}$ , 757  $\delta(\text{C-H})_{\text{oop}}$ , 507 и 489  $\nu_{\text{as}}(\text{Cp-Fe-Cp})$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Na-co): 3,34 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{-COO}$ ), 3,98 (s, 2H,  $\text{Pz-CH}_2$ ), 4,12 (s, 5H, Fc), 4,34 (t, 2H,  $J = 2,00$  Hz, мета-Fc.), 4,83 (t, 2H,  $J = 2,00$  Hz, орто-Fc), 7,29 (t, 1H,  $J = 7,50$  Hz,  $p$ -фенил), 7,48 (t, 2H,  $J = 7,50$  Hz,  $m$ -фенил), 7,75 (d, 2H,  $J = 7,50$  Hz,  $o$ -фенил), 8,16 (s, 1H, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Na-co): 44,83 ( $\text{Pz-CH}_2$ ), 54,10 ( $\text{CH}_2\text{-COO}$ ), 68,58 (2C, орто-Fc), 69,96 (2C, мета-Fc), 70,57 (5C, Fc), 79,02 (Fc, ипсо), 120,08 (2C,  $o$ -фенил), 120,72 (C-4, Pz), 127,40 ( $p$ -фенил), 129,23 (C-5, Pz), 130,68 (2C,  $m$ -фенил), 141,51 (C-3, Pz), 151,63 (N-супст. фенил), 179,06 (COO). Израчунато:  $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3\text{Fe}$  (433,28 g/mol): C, 60,99; H, 5,35; N, 9,70; Нађено: C, 60,78; H, 5,37; N, 9,67.

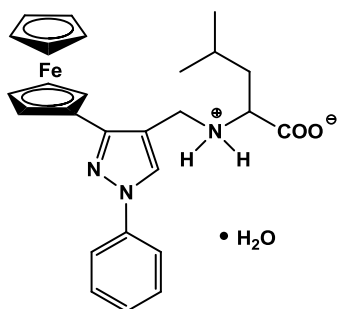
3.3.2.



**11:** Наранцасто-браон аморфна супстанца; принос: 0,50 g (84%); Т.Т. 163 °С (разлагање);  $[\alpha]_D^{20} = + 17,02$  ( $c = 1,116 \cdot 10^{-3} \text{ g/cm}^3$ , MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1/1 v/v); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3435  $\nu$ (O-H), 3093  $\nu$ (C-H)<sub>Ar</sub>, 2965 и 2876  $\nu$ (C-H)<sub>Al</sub>, 2642–2386  $\nu$ (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 1630  $\nu_{as}$ (COO<sup>-</sup>), 1599  $\nu$ (C=C)<sub>Ar</sub>, 1570  $\nu$ (C=N)<sub>Ar</sub>, 1505  $\delta$ (C=C)<sub>Ar</sub>, 1466  $\delta$ (C=N)<sub>Ar</sub>, 1403  $\nu_s$ (COO<sup>-</sup>),

1061  $\delta$ (C-H)<sub>ip</sub>, 757  $\delta$ (C-H)<sub>oop</sub>, 507 и 486  $\nu_{as}$ (Cp-Fe-Cp); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Na-co): 1,03 (d, 3H, J = 6,50 Hz, CH<sub>3</sub>), 1,05 (d, 3H, J = 6,50 Hz, CH<sub>3</sub>), 1,93 (octet, 1H, J = 6,50 Hz, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 2,97 (d, 1H, J = 6,50 Hz, CH-COO),  $\delta_A = 4,02$  и  $\delta_B = 3,80$  (AB систем, 2H, J<sub>AB</sub> = 13,51 Hz, Pz-CH<sub>2</sub>), 4,11 (s, 5H, Fc), 4,32 (m, 2H, мета-Fc), 4,91 (m, 2H, орто-Fc), 7,29 (t, 1H, J = 7,50 Hz, p-фенил), 7,48 (t, 2H, J = 7,50 Hz, m-фенил), 7,74 (dd, 2H, J = 7,50 и 1,00 Hz, o-фенил), 8,13 (s, 1H, Pz); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Na-co): 20,02 (CH<sub>3</sub>), 20,60 (CH<sub>3</sub>), 33,02 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 44,32 (Pz-CH<sub>2</sub>), 68,79 (орто-Fc), 68,81 (орто-Fc), 69,81 (мета-Fc), 69,83 (мета-Fc), 70,52 (5C, Fc), 71,87 (CH-COO), 79,19 (Fc, ипсо), 120,08 (2C, o-фенил), 121,65 (C-4, Pz), 127,28 (p-фенил), 129,51 (C-5, Pz), 130,65 (2C, m-фенил), 141,57 (C-3, Pz), 152,00 (N-супст. фенил), 182,41 (COO). Израчунато: C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>Fe (475,36 g/mol): C, 63,17; H, 6,15; N, 8,84; Нађено: C, 63,27; H, 6,13; N, 8,83.

3.3.3.

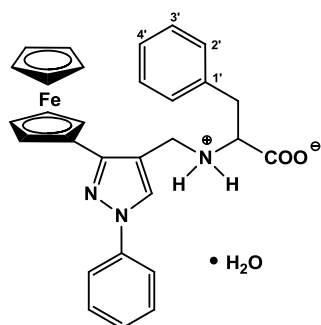


**12:** Наранцасто-браон аморфна супстанца; принос: 0,48 g (78%); Т.Т. 149 °С (разлагање);  $[\alpha]_D^{20} = + 45,45$  ( $c = 1,078 \cdot 10^{-3} \text{ g/cm}^3$ , MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1/1 v/v); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3435  $\nu$ (O-H), 3084  $\nu$ (C-H)<sub>Ar</sub>, 2958 и 2869  $\nu$ (C-H)<sub>Al</sub>, 2673–2391  $\nu$ (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 1622  $\nu_{as}$ (COO<sup>-</sup>), 1600  $\nu$ (C=C)<sub>Ar</sub>, 1555  $\nu$ (C=N)<sub>Ar</sub>, 1505  $\delta$ (C=C)<sub>Ar</sub>, 1466  $\delta$ (C=N)<sub>Ar</sub>, 1409  $\nu_s$ (COO<sup>-</sup>),

1059  $\delta$ (C-H)<sub>ip</sub>, 755  $\delta$ (C-H)<sub>oop</sub>, 507 и 486  $\nu_{as}$ (Cp-Fe-Cp); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Na-co): 0,95 (d, 3H, J = 6,50 Hz, CH<sub>3</sub>), 1,00 (d, 3H, J = 6,50 Hz, CH<sub>3</sub>), 1,48 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH), 1,58 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH), 1,87 (nonet, 1H, J = 6,50 Hz, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 3,28 (t, 1H, J = 6,50 Hz, CH-COO),  $\delta_A = 4,04$  и  $\delta_B = 3,82$  (AB систем, 2H, J<sub>AB</sub> = 13,51 Hz, Pz-CH<sub>2</sub>), 4,12 (s, 5H, Fc), 4,33 (m, 2H, мета-Fc), 4,88 (m, 1H, орто-Fc), 4,89 (m, 1H, орто-Fc), 7,29 (t, 1H, J = 7,50 Hz, p-фенил), 7,48 (dd, 2H, J = 7,50 и 1,00 Hz, m-фенил), 7,74 (dd, 2H, J = 7,50 и

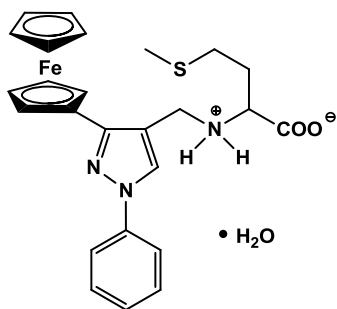
1,00 Hz, *o*-фенил), 8,15 (s, 1H, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Na-co): 23,45 ( $\text{CH}_3$ ), 23,57 ( $\text{CH}_3$ ), 26,50 ( $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ ), 43,81 (Pz- $\text{CH}_2$ ), 44,92 ( $\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}$ ), 64,53 ( $\text{CH}-\text{COO}$ ), 68,66 (орто-Fc), 68,77 (орто-Fc), 69,85 (мета-Fc), 69,91 (мета-Fc), 70,55 (5C, Fc), 79,10 (Fc, ипсо), 120,08 (2C, *o*-фенил), 121,28 (C-4, Pz), 127,32 (*p*-фенил), 129,40 (C-5, Pz), 130,66 (2C, *m*-фенил), 141,55 (C-3, Pz), 151,82 (N-супст. фенил), 183,20 (COO). Израчунато:  $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_3\text{Fe}$  (489,39 g/mol): C, 63,81; H, 6,38; N, 8,59; Нађено: C, 63,80; H, 6,37; N, 8,59.

### 3.3.4.



**13** (L-Енантиомер), **14** (DL) и **15** (D-енантиомер): Жуто-наранцасте аморфне супстанце; приноси: 0,50 g за **13**, 0,49 g за **14** и 0,49 g за **15** (76% за **13**, 75% за **14** и 75% за **15**); Т.Т. 156-157 °C (разлагање);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +13,99$  ( $c = 1,072 \cdot 10^{-3} \text{ g/cm}^3$ , MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1/1 v/v) за **13** и  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -14,13$  ( $c = 1,054 \cdot 10^{-3} \text{ g/cm}^3$ , MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1/1 v/v) за **15**; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3447  $\nu(\text{O-H})$ , 3085  $\nu(\text{C-H})_{\text{Ar}}$ , 2926 и 2854  $\nu(\text{C-H})_{\text{Al}}$ , 2731–2389  $\nu(\text{NH}_2^+)$ , 1621  $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ , 1600  $\nu(\text{C=C})_{\text{Ar}}$ , 1568  $\nu(\text{C=N})_{\text{Ar}}$ , 1504  $\delta(\text{C=C})_{\text{Ar}}$ , 1456  $\delta(\text{C=N})_{\text{Ar}}$ , 1410  $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ , 1060  $\delta(\text{C-H})_{\text{ip}}$ , 755  $\delta(\text{C-H})_{\text{oop}}$ , 507 и 486  $\nu_{\text{as}}(\text{Cr-Fe-Cp})$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Na-co): 2,82 (dd, 1H,  $J = 8,50$  и  $13,50$  Hz, Ph- $\text{CH}_2$ ), 3,12 (dd, 1H,  $J = 5,50$  и  $13,50$  Hz, Ph- $\text{CH}_2$ ), 3,47 (dd, 1H,  $J = 5,50$  и  $8,50$  Hz, CH),  $\delta_{\text{A}} = 3,96$  и  $\delta_{\text{B}} = 3,77$  (AB систем, 2H,  $J_{\text{AB}} = 14,01$  Hz, Pz- $\text{CH}_2$ ), 4,05 (s, 5H, Fc), 4,24 (m, 1H, мета-Fc), 4,26 (m, 1H, мета-Fc), 4,67 (m, 1H, орто-Fc), 4,71 (m, 1H, орто-Fc), 7,19 (t, 1H,  $J = 7,50$  Hz, 1H на 4'), 7,27 (m, 3H, 2H на 3' и *p*-фенил), 7,34 (dd, 2H,  $J = 7,50$  и  $1,00$  Hz, 2H на 2'), 7,46 (t, 2H,  $J = 7,50$  Hz, *m*-фенил), 7,63 (dd, 2H,  $J = 7,50$  и  $1,00$  Hz, *o*-фенил), 7,82 (s, 1H, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Na-co): 41,71 (Ph- $\text{CH}_2$ ), 43,92 (Pz- $\text{CH}_2$ ), 67,31 ( $\text{CH}-\text{COO}$ ), 68,59 (орто-Fc), 68,62 (орто-Fc), 69,80 (мета-Fc), 69,85 (мета-Fc), 70,50 (5C, Fc), 79,01 (Fc, ипсо), 120,09 (2C, *o*-фенил), 121,34 (C-4, Pz), 127,29 (*p*-фенил), 127,40 (4'), 129,19 (C-5, Pz), 129,47 (2C, 3'), 130,59 (2C, *m*-фенил), 130,71 (2C, 2'), 141,08 (1'), 141,45 (C-3, Pz), 151,76 (N-супст. фенил), 181,92 (COO). Израчунато:  $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3\text{Fe}$  (523,40 g/mol): C, 66,55; H, 5,58; N, 8,03; Нађено: C, 66,43; H, 5,60; N, 8,05.

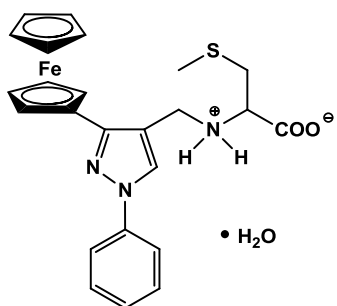
3.3.5.



**16:** Наранцасто-браон аморфна супстанца; принос: 0,49 g (77%); Т.Т. 155-156 °С (разлагање);  $[\alpha]_D^{20} = + 41,21$  ( $c = 1,092 \cdot 10^{-3}$  g/cm<sup>3</sup>, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1/1 v/v); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3436  $\nu$ (O-H), 3082  $\nu$ (C-H)<sub>Ar</sub>, 2918 и 2853  $\nu$ (C-H)<sub>Al</sub>, 2658-2406  $\nu$ (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 1619  $\nu_{as}$ (COO<sup>-</sup>), 1600  $\nu$ (C=C)<sub>Ar</sub>, 1558  $\nu$ (C=N)<sub>Ar</sub>, 1505  $\delta$ (C=C)<sub>Ar</sub>, 1464  $\delta$ (C=N)<sub>Ar</sub>, 1409  $\nu_s$ (COO<sup>-</sup>),

1059  $\delta$ (C-H)<sub>ip</sub>, 756  $\delta$ (C-H)<sub>oop</sub>, 507 и 486  $\nu_{as}$ (Cp-Fe-Cp); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Na-co): 1,92 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>), 2,00 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>), 2,10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-S), 2,67 (t, 2H, J = 7,50 Hz, CH<sub>2</sub>-S), 3,34 (t, 1H, J = 6,50 Hz, CH-CH<sub>2</sub>),  $\delta_A = 4,04$  и  $\delta_B = 3,84$  (AB систем, 2H, J<sub>AB</sub> = 13,51 Hz, Pz-CH<sub>2</sub>), 4,12 (s, 5H, Fc), 4,33 (t, 2H, J = 1,00 Hz, мета-Fc), 4,87 (t, 1H, J = 1,00 Hz, орто-Fc), 4,88 (t, 1H, J = 1,00 Hz, орто-Fc), 7,29 (t, 1H, J = 7,50 Hz, p-фенил), 7,48 (t, 2H, J = 7,50 Hz, m-фенил), 7,74 (d, 2H, J = 7,50 Hz, o-фенил), 8,16 (s, 1H, Pz); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Na-co): 15,44 (CH<sub>3</sub>-S), 32,15 (S-CH<sub>2</sub>), 35,03 (CH-CH<sub>2</sub>), 43,93 (Pz-CH<sub>2</sub>), 64,79 (CH-COO), 68,70 (орто-Fc), 68,75 (орто-Fc), 69,87 (мета-Fc), 69,90 (мета-Fc), 70,54 (5C, Fc), 79,12 (Fc, ипсо), 120,09 (2C, o-фенил), 121,25 (C-4, Pz), 127,32 (p-фенил), 129,44 (C-5, Pz), 130,65 (2C, m-фенил), 141,55 (C-3, Pz), 151,83 (N-супст. фенил), 182,18 (COO). Израчунато: C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>SFe (507,43 g/mol): C, 59,17; H, 5,76; N, 8,28; S, 6,32; Нађено: C, 59,25; H, 5,77; N, 8,30; S, 6,32.

3.3.6.



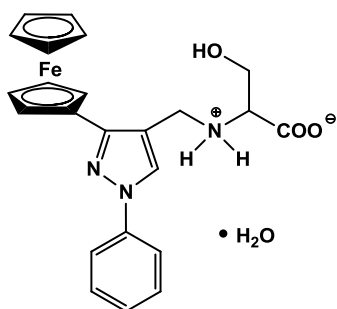
**17:** Наранцаста аморфна супстанца; принос: 0,46 g (75%); Т.Т. 156-157 °С (разлагање);  $[\alpha]_D^{20} = + 0,98$  ( $c = 1,023 \cdot 10^{-3}$  g/cm<sup>3</sup>, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1/1 v/v); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3436  $\nu$ (O-H), 3092  $\nu$ (C-H)<sub>Ar</sub>, 2921 и 2853  $\nu$ (C-H)<sub>Al</sub>, 2746-2385  $\nu$ (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 1628  $\nu_{as}$ (COO<sup>-</sup>), 1599  $\nu$ (C=C)<sub>Ar</sub>, 1557  $\nu$ (C=N)<sub>Ar</sub>, 1505  $\delta$ (C=C)<sub>Ar</sub>, 1465  $\delta$ (C=N)<sub>Ar</sub>, 1411  $\nu_s$ (COO<sup>-</sup>),

1057  $\delta$ (C-H)<sub>ip</sub>, 756  $\delta$ (C-H)<sub>oop</sub>, 507 и 486  $\nu_{as}$ (Cp-Fe-Cp); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Na-co): 2,12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-S), 2,79 (dd, 1H, J = 13,50 и 7,50 Hz, S-CH<sub>2</sub>), 2,94 (dd, 1H, J = 13,50 и 5,00 Hz, S-CH<sub>2</sub>), 3,41 (dd, 1H, J = 7,50 и 5,00 Hz, CH),  $\delta_A = 4,09$  и  $\delta_B = 3,91$  (AB систем, 2H, J<sub>AB</sub> = 14,01 Hz, Pz-CH<sub>2</sub>), 4,12 (s, 5H, Fc), 4,33 (t, 2H, J = 1,50 Hz, мета-Fc), 4,85 (m, 1H, орто-Fc), 4,88 (m, 1H, орто-Fc), 7,29 (td, 1H, J = 7,50 и 1,00 Hz, p-фенил), 7,48 (dd,



2H,  $J = 7,50$  Hz, м-фенил), 7,74 (dd, 2H,  $J = 7,50$  и 1,00 Hz, о-фенил), 8,21 (s, 1H, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Na-co): 16,10 ( $\text{CH}_3\text{-S}$ ), 39,55 ( $\text{S-CH}_2$ ), 43,76 ( $\text{Pz-CH}_2$ ), 64,05 ( $\text{CH-COO}$ ), 68,65 (орто-Fc), 68,74 (орто-Fc), 69,89 (мета-Fc), 69,94 (мета-Fc), 70,57 (5C, Fc), 79,07 (Fc, ипсо), 120,05 (2C, о-фенил), 121,08 (C-4, Pz), 127,34 (р-фенил), 129,46 (C-5, Pz), 130,67 (2C, м-фенил), 141,54 (C-3, Pz), 151,81 (N-супст. фенил), 180,59 (COO). Израчунато:  $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3\text{SFe}$  (493,40 g/mol): C, 58,42; H, 5,52; N, 8,52; S, 6,50; Нађено: C, 58,35; H, 5,50; N, 8,52; S, 6,49.

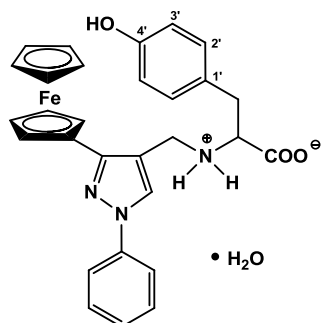
### 3.3.7.



**18:** Жута аморфна супстанца; принос: 0,40 g (69%); Т.Т. 167 °C (разлагање);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -6,18$  ( $c = 1,133 \cdot 10^{-3}$  g/cm<sup>3</sup>, MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1/1 v/v); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3431  $\nu(\text{O-H})$ , 3073  $\nu(\text{C-H})_{\text{Ar}}$ , 2961 и 2852  $\nu(\text{C-H})_{\text{Al}}$ , 2703-2462  $\nu(\text{NH}_2^+)$ , 1628  $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ , 1598  $\nu(\text{C=C})_{\text{Ar}}$ , 1554  $\nu(\text{C=N})_{\text{Ar}}$ , 1504  $\delta(\text{C=C})_{\text{Ar}}$ , 1463  $\delta(\text{C=N})_{\text{Ar}}$ , 1401  $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ , 1057  $\delta(\text{C-H})_{\text{ip}}$ ,

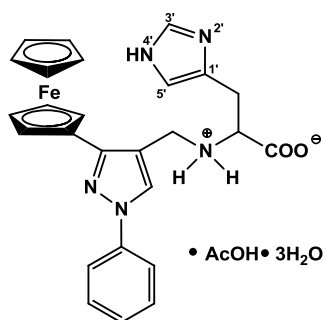
758  $\delta(\text{C-H})_{\text{oop}}$ , 508 и 487  $\nu_{\text{as}}(\text{Cp-Fe-Cp})$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Na-co): 3,35 (dd, 1H,  $J = 6,00$  и 4,50 Hz,  $\text{CH-COO}$ ), 3,76 (dd, 1H,  $J = 10,75$  и 6,00 Hz,  $\text{CH-CH}_2$ ), 3,85 (dd, 1H,  $J = 10,75$  и 4,50 Hz,  $\text{CH-CH}_2$ ),  $\delta_{\text{A}} = 4,09$  и  $\delta_{\text{B}} = 3,92$  (AB систем, 2H,  $J_{\text{AB}} = 14,01$  Hz,  $\text{Pz-CH}_2$ ), 4,12 (s, 5H, Fc), 4,34 (m, 2H, мета-Fc), 4,85 (m, 2H, орто-Fc), 7,29 (t, 1H,  $J = 7,50$  Hz, р-фенил), 7,48 (t, 2H,  $J = 7,50$  Hz, м-фенил) 7,75 (d, 2H,  $J = 7,50$  Hz, о-фенил), 8,20 (s, 1H, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Na-co): 43,92 ( $\text{Pz-CH}_2$ ), 65,12 ( $\text{CH}_2\text{-OH}$ ), 66,71 ( $\text{CH-COO}$ ), 68,57 (орто-Fc), 68,64 (орто-Fc), 69,92 (мета-Fc), 69,94 (мета-Fc), 70,57 (5C, Fc), 79,08 (Fc, ипсо), 120,07 (2C, о-фенил), 121,19 (C-4, Pz), 127,34 (р-фенил), 129,38 (C-5, Pz), 130,67 (2C, м-фенил), 141,56 (C-3, Pz), 151,69 (N-супст. фенил), 180,07 (COO). Израчунато:  $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4\text{Fe}$  (463,31 g/mol): C, 59,63; H, 5,44; N, 9,07; Нађено: C, 59,87; H, 5,42; N, 9,10.

3.3.8.



**19:** Наранцасто-браон аморфна супстанца; принос: 0,56 g (83%); Т.Т. 168 °С (разлагање);  $[\alpha]_D^{20} = + 7,97$  ( $c = 0,502 \cdot 10^{-3} \text{ g/cm}^3$ , MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1/1 v/v); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3430  $\nu$ (O-H), 3092  $\nu$ (C-H)<sub>Ar</sub>, 2923 и 2853  $\nu$ (C-H)<sub>Al</sub>, 2691–2369  $\nu$ (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 1612  $\nu_{as}$ (COO<sup>-</sup>), 1599  $\nu$ (C=C)<sub>Ar</sub>, 1563  $\nu$ (C=N)<sub>Ar</sub>, 1516 и 1505  $\delta$ (C=C)<sub>Ar</sub>, 1464  $\delta$ (C=N)<sub>Ar</sub>, 1409  $\nu_s$ (COO<sup>-</sup>), 1057  $\delta$ (C-H)<sub>ip</sub>, 755  $\delta$ (C-H)<sub>oop</sub>, 507 и 486  $\nu_{as}$ (Cr-Fe-Cr); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Na-co): 2,66 (dd, 1H, J = 13,50 и 9,00 Hz, CH-CH<sub>2</sub>), 3,04 (dd, 1H, J = 13,50 и 4,50 Hz, CH-CH<sub>2</sub>), 3,46 (dd, 1H, J = 9,00 и 4,50 Hz, CH-COO),  $\delta_A = 3,97$  и  $\delta_B = 3,80$  (AB систем, 2H, J<sub>AB</sub> = 14,01 Hz, Pz-CH<sub>2</sub>), 4,07 (s, 5H, Fc), 4,29 (m, 2H, мета-Fc), 4,65 (m, 1H, орто-Fc), 4,70 (m, 1H, орто-Fc), 6,63 (d, 2H, J = 8,00 Hz, 2H на 2'), 7,03 (d, 2H, J = 8,00 Hz, 2H на 3'), 7,27 (t, 1H, J = 7,50 Hz, пара-фенил), 7,49 (t, 2H, J = 7,50 Hz, мета-фенил), 7,67 (dd, 2H, J = 7,50 и 1,00 Hz, орто-фенил), 7,85 (s, 1H, Pz); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Na-co): 40,81 (Ph-CH<sub>2</sub>), 43,89 (Pz-CH<sub>2</sub>), 67,41 (CH-COO), 68,56 (2C, орто-Fc), 69,84 (мета-Fc), 69,94 (мета-Fc), 70,51 (5C, Fc), 78,96 (Fc, ипсо), 119,59 (2C, 3'), 120,01 (2C, орто-фенил), 121,27 (C-4, Pz), 125,92 (1'), 127,21 (пара-фенил), 129,01 (C-5, Pz), 130,67 (2C, мета-фенил), 131,14 (2C, 2'), 141,42 (C-3, Pz), 151,67 (N-супст. фенил), 165,58 (4'), 182,25 (COO). Израчунато: C<sub>29</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Fe (539.40 g/mol): C, 64,57; H, 5,42; N, 7,79; Нађено: C, 64,73; H, 5,40; N, 7,82.

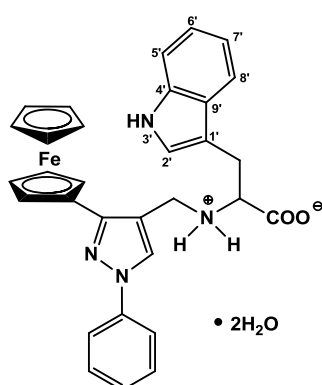
3.3.9.



**20:** Наранцасто-браон аморфна супстанца; принос: 0,31 g (41%); Т.Т. 178 °С (разлагање);  $[\alpha]_D^{20} = + 4,50$  ( $c = 1,111 \cdot 10^{-3} \text{ g/cm}^3$ , MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1/1 v/v); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3415  $\nu$ (O-H), 3144  $\nu$ (N-H)<sub>имидазол</sub>, 3087  $\nu$ (C-H)<sub>Ar</sub>, 3009  $\nu$ (C-H)<sub>имидазол</sub>, 2924 и 2853  $\nu$ (C-H)<sub>Al</sub>, 2791-2465  $\nu$ (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 1701  $\nu$ (COO<sup>-</sup>)<sub>ацетат</sub>, 1631  $\nu_{as}$ (COO<sup>-</sup>), 1599  $\nu$ (C=C)<sub>Ar</sub>, 1556  $\nu$ (C=N)<sub>Ar</sub>, 1505  $\delta$ (C=C)<sub>Ar</sub>, 1463  $\delta$ (C=N)<sub>Ar</sub>, 1410  $\nu_s$ (COO<sup>-</sup>), 1053  $\delta$ (C-H)<sub>ip</sub>, 757  $\delta$ (C-H)<sub>oop</sub>, 502 и 485  $\nu_{as}$ (Cr-Fe-Cr); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Na-co): 1,90 (s, 3H, CH<sub>3</sub>, acetate), 2,86 (dd, 1H, J = 14,50 и 8,00 Hz, CH-CH<sub>2</sub>), 3,09 (dd, 1H, J = 14,50 и 5,50 Hz, CH-CH<sub>2</sub>), 3,46 (dd, 1H, J = 8,00 и 5,50 Hz, CH-COO),  $\delta_A = 4,01$  и  $\delta_B = 3,82$  (AB систем, 2H, J<sub>AB</sub> =

13,51 Hz, Pz-CH<sub>2</sub>), 4,07 (s, 5H, Fc), 4,29 (m, 2H, мета-Fc), 4,73 (m, 1H, орто-Fc), 4,78 (m, 1H, орто-Fc), 6,89 (s, 1H на 5'), 7,28 (t, 1H, J = 7,50 Hz, пара-фенил), 7,47 (t, 2H, J = 7,50 Hz, мета-фенил), 7,53 (d, 1H, J = 2,00 Hz, 1H на 3'), 7,70 (dd, 2H, J = 7,50 и 1,00 Hz, орто-фенил), 8,02 (s, 1H, Pz); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Na-co): 24,40 (CH<sub>3</sub>, ацетат), 31,96 (CH-CH<sub>2</sub>), 43,84 (Pz-CH<sub>2</sub>), 65,63 (CH-COO), 68,61 (2C, орто-Fc), 69,87 (2C, мета-Fc), 70,53 (5C, Fc), 79,04 (Fc, ипсо), 120,03 (2C, о-фенил) 121,25 (5' на C-4, Pz, преклопљени), 127,30 (пара-фенил), 129,34 (C-5, Pz), 130,64 (2C, мета-фенил), 134,33 (1'), 136,00 (3'), 141,50 (C-3, Pz), 151,76 (N-супст. фенил), 180,62 (COO, ацетат), 181,67 (COO). Израчунато: C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe (609,45 g/mol): C, 55,18; H, 5,79; N, 11,49; Нађено: C, 55,16; H, 5,78; N, 11,53.

### 3.3.10.



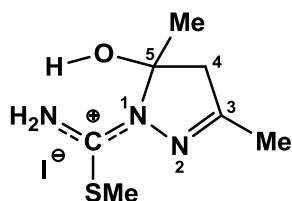
**21:** Наранцасто-браон аморфна супстанца; принос: 0,31 g (41%); Т.Т. 178 °C (разлагање); [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 4,50 (c = 1,111 · 10<sup>-3</sup> g/cm<sup>3</sup>, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1/1 v/v); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3415 ν(O-H), 3144 ν(N-H)<sub>имидазол</sub>, 3087 ν(C-H)<sub>Ar</sub>, 3009 ν(C-H)<sub>имидазол</sub>, 2924 и 2853 ν(C-H)<sub>Al</sub>, 2791–2465 ν(NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 1701 ν(COO<sup>-</sup>)<sub>ацетат</sub>, 1631 ν<sub>as</sub>(COO<sup>-</sup>), 1599 ν(C=C)<sub>Ar</sub>, 1556 ν(C=N)<sub>Ar</sub>, 1505 δ(C=C)<sub>Ar</sub>, 1463 δ(C=N)<sub>Ar</sub>, 1410 ν<sub>s</sub>(COO<sup>-</sup>),

1053 δ(C-H)<sub>ip</sub>, 757 δ(C-H)<sub>оор</sub>, 502 и 485 ν<sub>as</sub>(Cp-Fe-Cp); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Na-co): 1,90 (s, 3H, CH<sub>3</sub>, ацетат), 2,86 (dd, 1H, J = 14,50 и 8,00 Hz, CH-CH<sub>2</sub>), 3,09 (dd, 1H, J = 14,50 и 5,50 Hz, CH-CH<sub>2</sub>), 3,46 (dd, 1H, J = 8,00 и 5,50 Hz, CH-COO), δ<sub>A</sub> = 4,01 и δ<sub>B</sub> = 3,82 (AB систем, 2H, J<sub>AB</sub> = 13,51 Hz, Pz-CH<sub>2</sub>), 4,07 (s, 5H, Fc), 4,29 (m, 2H, мета-Fc), 4,73 (m, 1H, орто-Fc), 4,78 (m, 1H, орто-Fc), 6,89 (s, 1H на 5'), 7,28 (t, 1H, J = 7,50 Hz, пара-фенил), 7,47 (t, 2H, J = 7,50 Hz, мета-фенил), 7,53 (d, 1H, J = 2,00 Hz, 1H на 3'), 7,70 (dd, 2H, J = 7,50 и 1,00 Hz, орто-фенил), 8,02 (s, 1H, Pz); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Na-co): 24,40 (CH<sub>3</sub>, ацетат), 31,96 (CH-CH<sub>2</sub>), 43,84 (Pz-CH<sub>2</sub>), 65,63 (CH-COO), 68,61 (2C, орто-Fc), 69,87 (2C, мета-Fc), 70,53 (5C, Fc), 79,04 (Fc, ипсо), 120,03 (2C, о-фенил) 121,25 (5' на C-4, Pz, преклопљени), 127,30 (пара-фенил), 129,34 (C-5, Pz), 130,64 (2C, мета-фенил), 134,33 (1'), 136,00 (3'), 141,50 (C-3, Pz), 151,76 (N-супст. фенил), 180,62 (COO, ацетат), 181,67 (COO). Израчунато: C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe (609,45 g/mol): C, 55,18; H, 5,79; N, 11,49; Нађено: C, 55,16; H, 5,78; N, 11,53.

### 3.4. Поступак за синтезу једињења 22

Смеса тиосемикарбазида (9,10 g, 100 mmol) и метил-јодида (15,05 g, 106 mmol) у апсолутном етанолу (40 ml) рефлуктована је 45 минута. После 12 часова, настали бели кристали *S*-метилизотиосемикарбазид-хидројодида су процеђени, испрани етанолом и коришћени у следећем кораку без даљег пречишћавања. Принос: 15,1 g (65 %). Смеша *S*-метилизотиосемикарбазид-хидројодида (11,65 g, 50 mmol) и ацетилацетона (19,50 g, 195 mmol) у апсолутном етанолу (20 ml) рефлуктована је 5 минута. После хлађења на собној температури, кристализација је изазвана трљањем зидова суда помоћу стакленог штапића. Бледожути кристали су процеђени, испрани три пута са по 5 ml етра и осушени на ваздуху.

#### 3.4.1.



**22**: Бледожута кристална супстанца; принос: 10,0 g (63 %);

Т. Т. 157 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3331, 3266, 3191, 3161, 3132,

2980, 1635, 1629, 1557, 1427, 1372, 1328, 1254, 1113, 733;  $^1\text{H}$

NMR (200 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 1,68 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-C-OH}$ ), 2,04

(3H, s,  $\text{CH}_3\text{-C=N}$ ), 2,55 и 2,62 (3H, два s,  $\text{CH}_3\text{-S}$ ),  $\delta_{\text{A}}=3,24$  и  $\delta_{\text{B}}=3,14$  (2H, АВ систем,  $J_{\text{AB}}$  19,7 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 7,52 и 7,73 (1H, два bs, OH), 8,80, 8,96 и 9,42 (2H, три bs, протони на азоту);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ ): 14,4 ( $\text{CH}_3\text{-S}$ ), 16,7 ( $\text{CH}_3\text{-C=N}$ ), 24,7 ( $\text{CH}_3\text{-C-OH}$ ), 52,8 (C-4), 96,2 (C-5), 164,9 ( $\text{NH}_2\text{-C(N)-S}$ ), 165,3 (C-3).

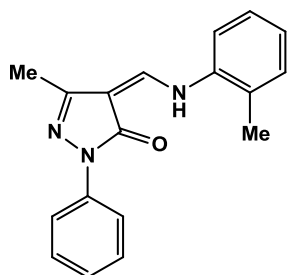
NMR подаци за **22** у  $\text{D}_2\text{O}$ :  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 1,83 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-C-OH}$ ), 2,13 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-C=N}$ ), 2,65 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-S}$ ), 3,32 (2H, s,  $\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 16,3 ( $\text{CH}_3\text{-S}$ ), 18,5 ( $\text{CH}_3\text{-C=N}$ ), 26,8 ( $\text{CH}_3\text{-C-OH}$ ), 55,2 (C-4), 98,9 (C-5), 168,5 ( $\text{NH}_2\text{-C(N)-S}$ ), 168,7 (C-3).

NMR подаци за **22** на  $\text{pD} = 9,5$  (Таутомерна форма А):  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{NaOD/D}_2\text{O}$ ): 1,95 и 2,07 (3H, два s,  $\text{CH}_3\text{-C=N}$ ), 2,17 и 2,30 (3H, два s,  $\text{CH}_3\text{-CO}$ ), 2,38 и 2,44 (3H, два s,  $\text{CH}_3\text{-S}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{NaOD/D}_2\text{O}$ ): 15,2 и 15,4 ( $\text{CH}_3\text{-S}$ ), 19,9 и 24,8 ( $\text{CH}_3\text{-C=N}$ ), 31,2 и 32,6 ( $\text{CH}_3\text{-CO}$ ), 50,1 (комплексан сигнал,  $\text{CH}_2$ ), 163,4 ( $\text{CH}_3\text{-C=N}$ ), 163,8 ( $\text{NH}_2\text{-C(N)-S}$ ), 214,3 (CO).

### 3.5. Поступак за синтезу једињења 23-49

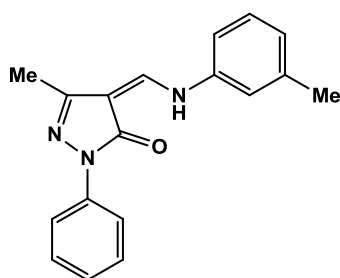
Смеса одговарајућег 4-формилпиразол-5-она (0,303g, 1,5 mmol), примарног амина (3 mmol) и монохидрата *p*-толуенсолфунске киселине (0,011g, 0,06 mmol) у етанолу (10 ml) рефлугована је 2 часа. После хлађења, талог је процеђен, испран са мало хладног етанола и осушен у вакууму преко анхидрованог CaCl<sub>2</sub>.

#### 3.5.1.



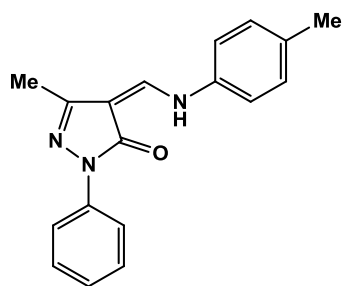
**23:** Жута аморфна супстанца; принос: 0,39 g (89 %); Т.Т. 182–183 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3435, 1667, 1628, 1596, 1551, 1492, 1285, 750; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 2,29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7,10-7,18 (m, 2H, Ar-H), 7,30-7,44 (m, 4H, Ar-H), 7,74 (d, 1H, J = 8,2 Hz, Ar-H), 8,00 (dd, 2H, J = 7,4 и 1,2 Hz, Ar-H), 8,75 (d, 1H, J = 12,4 Hz, =CH-N), 11,62 (d, 1H, J = 12,4 Hz, NH). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 12,68, 16,93, 102,36, 115,99, 117,98, 124,08, 125,51, 127,09, 127,56, 128,98, 131,35, 137,15, 139,19, 146,24, 148,99, 165,67. Израчунато: C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O (291,35 g/mol): C, 74,20; H, 5,88; N, 14,42; Нађено: C, 74,70; H, 5,93; N, 14,41.

#### 3.5.2.



**24:** Жута аморфна супстанца; принос: 0,35 g (80 %); Т.Т. 103–104 °C (разлагање); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3436, 1664, 1628, 1602, 1545, 1493, 1301, 755; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 2,29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7,03-7,05 (m, 1H, Ar-H), 7,13 (t, 1H, J = 7,4 Hz, Ar-H), 7,31-7,40 (m, 5H, Ar-H), 7,99 (dd, 2H, J = 7,4 и 1,2 Hz, Ar-H), 8,59 (d, 1H, J = 9,0 Hz, =CH-N), 11,25 (d, 1H, J = 9,0 Hz, NH); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 12,72, 21,08, 101,94, 115,20, 117,86, 118,22, 123,97, 126,32, 128,98, 129,73, 138,81, 139,29, 139,61, 145,89, 149,21, 165,20. Израчунато: C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O (291,35 g/mol): C, 74,20; H, 5,88; N, 14,42; Нађено: C, 74,59; H, 5,84; N, 14,39.

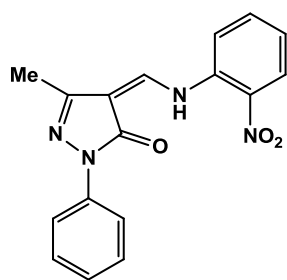
3.5.3.



**25:** Жута аморфна супстанца; принос: 0,35 g (80 %); Т.Т. 165–166 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3437, 1670, 1652, 1593, 1486, 1293, 1284, 754;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 2,28 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,30 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7,13 (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz, Ar-H), 7,25 (d, 2H,  $J = 8,2$  Hz, Ar-H), 7,35-7,49 (m, 4H, Ar-H), 8,00 (dd, 2H,  $J = 7,4$  и 1,2 Hz, Ar-H), 8,56 (d, 1H,  $J = 10,8$

Hz, =CH-N), 11,31 (d, 1H,  $J = 10,8$  Hz, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 12,70, 20,51, 101,66, 117,83, 117,95, 123,92, 128,96, 130,29, 135,02, 136,56, 139,34, 145,93, 149,16, 165,17. Израчунато:  $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$  (291,35 g/mol): C, 74,20; H, 5,88; N, 14,42; Нађено: C, 74,49; H, 5,87; N, 14,40.

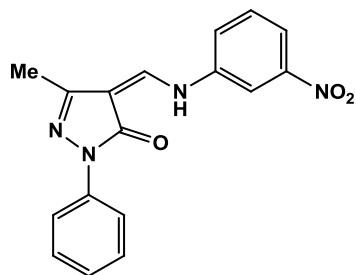
3.5.4.



**26:** Наранџаста аморфна супстанца; принос: 0,43 g (89 %); Т.Т. 238–239 °C (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3436, 1672, 1624, 1599, 1331, 1306, 1257, 1161, 747;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 2,31 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7,15 (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz, Ar-H), 7,35-7,46 (m, 3H, Ar-H), 7,87 (td, 1H,  $J = 7,4$  и 1,4 Hz, Ar-H), 7,97 (dd, 2H,  $J = 7,4$  и 1,2 Hz, Ar-H), 8,16 (d, 1H,  $J = 8,0$  Hz,

Ar-H), 8,27 (dd, 1H,  $J = 8,2$  и 1,2 Hz, Ar-H), 8,71 (d, 1H,  $J = 8,4$  Hz, =CH-N), 12,68 (d, 1H,  $J = 8,4$  Hz, NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 12,18, 105,58, 117,92, 118,67, 124,24, 124,87, 126,47, 129,04, 135,09, 136,29, 137,16, 138,91, 144,20, 149,51, 164,61. Израчунато:  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3$  (322,32 g/mol): C, 63,35; H, 4,38; N, 17,38; Нађено: C, 63,32; H, 4,38; N, 17,40.

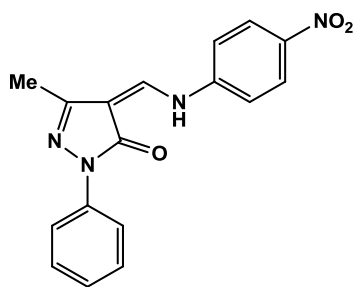
3.5.5.



**27:** Светло-норанџаста аморфна супстанца; принос: 0,46 g (95 %); Т.Т. 181–182 °C (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3435, 1671, 1643, 1597, 1530, 1502, 1355, 1313, 1292, 738;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 2,29 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7,13 (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz, Ar-H), 7,40 (t, 2H,  $J = 8,0$  Hz, Ar-H), 7,67 (t, 1H,  $J = 8,0$  Hz, Ar-H), 7,97 (m, 4H,

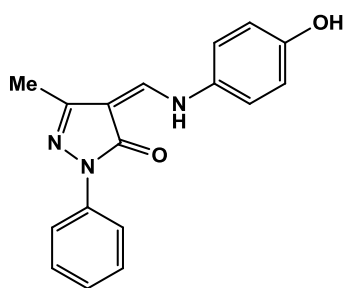
Ar-H), 8,52 (t, 1H, J = 2,2 Hz, Ar-H), 8,64 (bs, 1H, =CH-N), 11,36 (bs, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 12,81, 103,36, 112,61, 117,82, 119,55, 124,05, 124,69, 128,98, 131,02, 139,14, 140,58, 145,69, 148,97, 149,52, 164,83. Израчунато:  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3$  (322,32 g/mol): C, 63,35; H, 4,38; N, 17,38; Нађено: C, 63,41; H, 4,40; N, 17,43.

### 3.5.6.



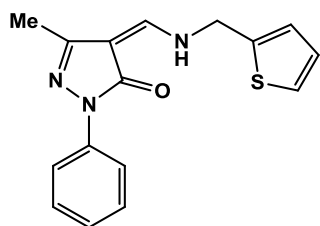
**28:** Браон аморфна супстанца; принос: 0,43 g (89 %); Т.Т. 204–205 °C (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3421, 1664, 1636, 1591, 1509, 1498, 1339, 1279, 749;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 2,30 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7,15 (t, 1H, J = 7,4 Hz, Ar-H), 7,42 (t, 2H, J = 7,4 Hz, Ar-H), 7,82 (d, 2H, J = 9,2 Hz, Ar-H), 7,97 (dd, 2H, J = 7,4 и 1,2 Hz, Ar-H), 8,29 (d, 2H, J = 9,2 Hz, Ar-H), 8,64 (bs, 1H, =CH-N), 11,41 (bs, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 12,78, 104,46, 117,89, 118,26, 124,24, 125,59, 129,05, 132,89, 138,98, 143,92, 144,90, 149,62, 164,74. Израчунато:  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3$  (322,32 g/mol): C, 63,35; H, 4,38; N, 17,38; Нађено: C, 63,66; H, 4,39; N, 17,43.

### 3.5.7.



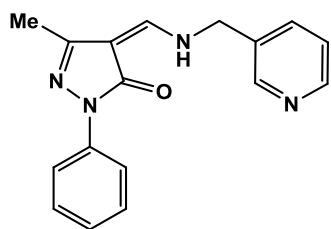
**29:** Жута аморфна супстанца; принос: 0,38 g (86 %); Т.Т. 277–278 °C (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3411, 1665, 1650, 1596, 1522, 1485, 1306, 1267, 752;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 2,26 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 6,83 (d, 2H, J = 9,0 Hz, Ar-H), 7,11 (t, 1H, J = 7,4 Hz, Ar-H), 7,35-7,43 (m, 4H, Ar-H), 8,00 (dd, 2H, J = 7,4 и 1,2 Hz, Ar-H), 8,45 (bs, 1H, =CH-N), 9,62 (s, 1H, OH), 11,36 (bs, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 12,69, 100,93, 116,29, 117,80, 119,77, 123,83, 128,96, 130,88, 139,47, 146,18, 149,01, 155,80, 165,20. Израчунато:  $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$  (293,33 g/mol): C, 69,61; H, 5,15; N, 14,33; Нађено: C, 69,94; H, 5,19; N, 14,38.

3.5.8.



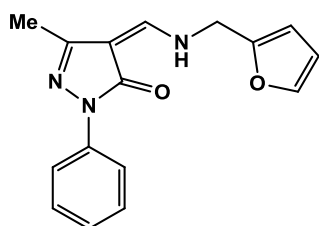
**30:** Светло-жута кристална супстанца; принос: 0.28 g (62%); Т.Т. 116–117 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3446, 3283, 1662, 1621, 1593, 1553, 1499, 1308, 1286, 1254, 758, 701, 693;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 2,17 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4,83 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,02-7,16 (m, 3H, 2H(Thi) и 1H(Ar)), 7,32 (t, 2H,  $J = 7,4$  Hz, Ar-H), 7,52 (dd, 1H,  $J = 5,2$  и 1,2 Hz, Thi-H), 7,96 (dd, 2H,  $J = 7,4$  и 1,2 Hz, Ar-H), 8,13 (d, 1H,  $J = 12,0$  Hz, =CH-N), 9,89 (bs, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 12,52, 47,00, 99,50, 117,66, 123,53, 126,60, 127,03, 127,47, 128,86, 139,67, 140,42, 148,55, 153,05, 165,16. Израчунато:  $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{OS}$  (297,38 g/mol): C, 64,62; H, 5,08; N, 14,13; S, 10,78; Нађено: C, 64,90; H, 5,09; N, 14,15; S, 10,83.

3.5.9.



**31:** Бела кристална супстанца; принос: 0,28 g (63%); Т.Т. 92–93 °C (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3422, 3205, 1668, 1628, 1593, 1547, 1500, 1488, 1440, 1345, 1238, 759;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 2,18 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4,68 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,07 (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz, Ar-H), 7,35 (t, 2H,  $J = 7,4$  Hz, Ar-H), 7,42 (два d, 1H,  $J = 4,8$  и 5,8 Hz, Py-H), 7,82 (dt, 1H,  $J = 5,8$  и 1,6 Hz, Py-H), 7,98 (dd, 2H,  $J = 7,4$  и 1,2 Hz, Ar-H), 8,17 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, =CH-N), 8,54 (dd, 1H,  $J = 4,8$  и 1,6 Hz, Py-H), 8,62 (d, 1H,  $J = 1,6$  Hz, Py-H), 9,90 (bs, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 12,57, 50,09, 99,57, 117,65, 123,50, 123,95, 128,86, 133,75, 135,78, 139,73, 148,66, 149,23, 149,40, 153,68, 165,16. Израчунато:  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}$  (292,34 g/mol): C, 69,85; H, 5,52; N, 19,16; Нађено: C, 70,01; H, 5,54; N, 19,21.

3.5.10.

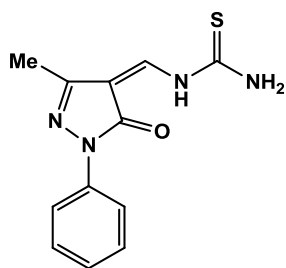


**32:** Жуто-наранџаста аморфна супстанца; принос: 0,16 g (38%); Т.Т. 110–111 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3436, 3290, 1666, 1625, 1593, 1502, 1487, 1310, 1299, 761;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 2,17 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4,67 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6,42-6,48 (m, 2H, Fur-H), 7,08 (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz, Ar-H), 7,36 (t, 2H,  $J = 7,4$  Hz, Ar-H), 7,68 (dd, 1H,  $J = 2,6$  и 1,0 Hz, Fur-H), 7,96 (dd, 2H,  $J = 7,4$  и 1,2 Hz,



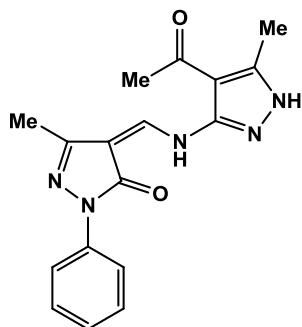
Ar-H), 8,10 (d, 1H, J = 8,8 Hz, =CH-N), 9,75 (bs, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 12,50, 45,24, 99,56, 108,65, 110,97, 117,67, 123,55, 128,86, 139,65, 143,53, 148,51, 150,72, 153,44, 165,20. Израчунато:  $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$  (281,31 g/mol): C, 68,31; H, 5,37; N, 14,94; Нађено: C, 68,67; H, 5,38; N, 14,97.

### 3.5.11.



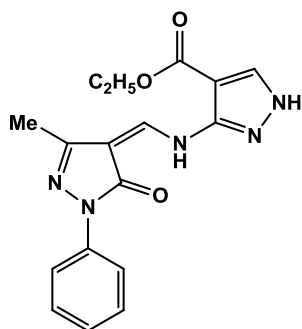
**33:** Жута аморфна супстанца; принос: 0,30 g (77%); Т.Т. 227–228 °C (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3438, 3358, 3319, 3178, 1671, 1633, 1608, 1597, 1498, 1233, 1163, 1004, 756;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 2,25 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7,16 (t, 1H, J = 7,4 Hz, Ar-H), 7,42 (t, 2H, J = 7,4 Hz, Ar-H), 7,92 (dd, 2H, J = 7,4 и 1,2 Hz, Ar-H), 8,63 (bs, 1H, =CH-N), 9,38 (s, 1H, C(=S)NH), 9,55 (s, 1H, C(=S)NH), 11,44 (bs, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 12,59, 106,37, 118,00, 124,55, 129,14, 138,69, 144,01, 150,06, 164,02, 181,66. Израчунато:  $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{OS}$  (260,32 g/mol): C, 55,37; H, 4,65; N, 21,52; S, 12,32; Нађено: C, 55,49; H, 4,65; N, 21,53; S, 12,37.

### 3.5.12.



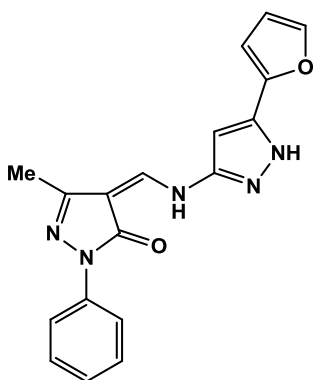
**34:** Жута аморфна супстанца; принос: 0,36 g (74 %); Т.Т. 274–275 °C (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3444, 3254, 1674, 1644, 1619, 1593, 1535, 1494, 1321, 1271, 951, 584;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 2,27 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,45 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,56 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7,14 (t, 1H, J = 7,4 Hz, Ar-H), 7,41 (t, 2H, J = 7,4 Hz, Ar-H), 7,98 (dd, 2H, J = 7,4 и 1,2 Hz, Ar-H), 8,43 (d, 1H, J = 12,6 Hz, =CH-N), 12,40 (d, 1H, J = 12,6 Hz, NH), 13,11 (s, 1H, NH, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 12,48, 12,66, 29,66, 103,43, 108,10, 117,83, 124,04, 129,01, 139,16, 142,35, 144,24, 149,06, 149,23, 164,78, 193,88. Израчунато:  $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_2$  (323,35 g/mol): C, 63,15; H, 5,30; N, 21,66; Нађено: C, 63,20; H, 5,31; N, 21,69.

3.5.13.



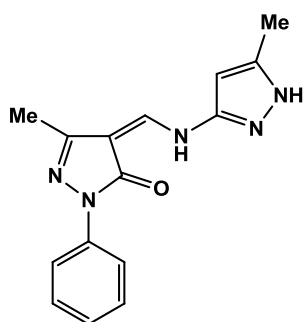
**35:** Жута кристална супстанца; принос: 0,33 g (65%); Т.Т. 244–245 °С (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3439, 3352, 1661, 1611, 1601, 1541, 1279, 1089, 751;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ): 1,36 (t, 3H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 2,54 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4,32 (q, 2H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 7,13 (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz, Ar-H), 7,41 (t, 2H,  $J = 7,4$  Hz, Ar-H), 7,98 (dd, 2H,  $J = 7,4$  и 1,2 Hz, Ar-H), 8,38 (d, 1H,  $J = 1,8$  Hz, Pz-H), 8,44 (d, 1H,  $J = 12,2$  Hz, =CH-N), 11,78 (d, 1H,  $J = 12,2$  Hz, NH), 13,45 (s, 1H, NH, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ): 12,58, 14,33, 60,42, 101,11, 103,42, 117,87, 124,08, 128,99, 134,10, 139,10, 142,78, 147,96, 149,16, 162,79, 165,10. Израчунато:  $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_3$  (339,35 g/mol): C, 60,17; H, 5,05; N, 20,64; Нађено: C, 60,28; H, 5,02; N, 20,64.

3.5.14.



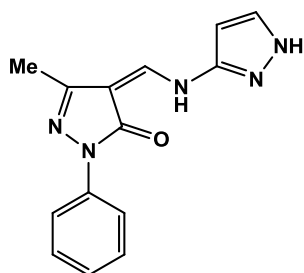
**36:** Жута кристална супстанца; принос: 0,35 g (70%); Т.Т. 230–231 °С (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3446, 3231, 1671, 1614, 1596, 1542, 1498, 1400, 1320, 753;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ): 2,27 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 6,65 (two d, 1H,  $J = 2,0$  и 1,6 Hz, Fur-H), 6,79 (d, 1H,  $J = 2,0$  Hz, Fur-H), 6,87 (d, 1H,  $J = 3,2$  Hz, Pz-H), 7,13 (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz, Ar-H), 7,41 (t, 2H,  $J = 7,4$  Hz, Ar-H), 7,82 (d, 1H,  $J = 1,6$  Hz, Fur-H), 7,99 (dd, 2H,  $J = 7,4$  и 1,2 Hz, Ar-H), 8,49 (s, 1H, =CH=N), 11,18 (bs, 1H, OH), 13,29 (d, 1H,  $J = 2,0$  Hz, NH, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ): 12,64, 90,91, 101,83, 107,69, 112,12, 117,90, 124,03, 129,00, 135,68, 139,26, 143,67, 144,34, 145,70, 149,13, 149,23, 165,13. Израчунато:  $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_2$  (333,35 g/mol): C, 64,86; H, 4,54; N, 21,01; Нађено: C, 65,00; H, 4,86; N, 21,07.

3.5.15.



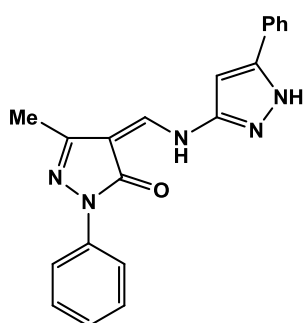
**37:** Жута аморфна супстанца; принос: 0,26 g (62 %); Т.Т. 213–214 °С (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3437, 3245, 1669, 1620, 1595, 1548, 1499, 1320, 1302, 755;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 2,24 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,25 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 6,25 (d, 1H,  $J = 1,4$  Hz, Pz-H), 7,12 (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz, Ar-H), 7,40 (t, 2H,  $J = 7,4$  Hz, Ar-H), 7,98 (dd, 2H,  $J = 7,4$  и 1,2 Hz, Ar-H), 8,39 (s, 1H,  $-\text{CH}=\text{N}$ ), 11,17 (bs, 1H, OH), 12,45 (s, 1H, NH, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 10,82, 12,62, 93,31, 101,35, 117,89, 123,97, 128,98, 139,32, 140,88, 145,64, 148,44, 149,02, 165,18. Израчунато:  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}$  (281,32 g/mol): C, 64,04; H, 5,37; N, 24,89; Нађено: C, 64,44; H, 5,40; N, 24,94.

3.5.16.



**38:** Жута кристална супстанца; принос: 0,36 g (90 %); Т.Т. 221–222 °С (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3446, 3215, 1658, 1605, 1551, 1499, 1484, 1285, 756;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 2,26 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 6,51 (t, 1H,  $J = 2,2$  Hz, Pz-H), 7,13 (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz, Ar-H), 7,40 (t, 2H,  $J = 7,4$  Hz, Ar-H), 7,78 (t, 1H,  $J = 2,2$  Hz, Pz-H), 7,98 (dd, 2H,  $J = 7,4$  и 1,2 Hz, Ar-H), 8,46 (s, 1H,  $-\text{CH}=\text{N}$ ), 11,40 (bs, 1H, OH), 12,77 (s, 1H, NH, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 12,65, 94,14, 101,48, 117,89, 123,99, 128,99, 131,05, 139,29, 145,86, 148,40, 149,06, 165,17. Израчунато:  $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}$  (267,29 g/mol): C, 62,91; H, 4,90; N, 26,20; Нађено: C, 62,98; H, 4,93; N, 26,21.

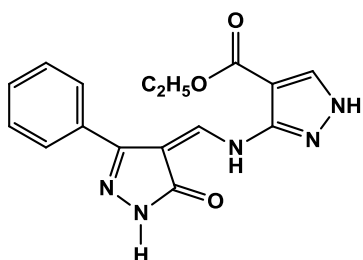
3.5.17.



**39:** Жута кристална супстанца; принос: 0,47 g (91 %); Т.Т. 263–264 °С (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3445, 3238, 1671, 1615, 1595, 1550, 1498, 1482, 1404, 1321, 743;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 2,28 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 6,95 (d, 1H,  $J = 1,8$  Hz, Pz-H), 7,13 (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz, Ar-H), 7,37-7,54 (m, 5H, Ar-H), 7,75 (dd, 2H,  $J = 7,0$  и 1,4 Hz, Ar-H), 8,00 (dd, 2H,  $J = 7,4$  и 1,2 Hz, Ar-H), 8,49 (s, 1H,  $-\text{CH}=\text{N}$ ), 11,19 (bs, 1H,

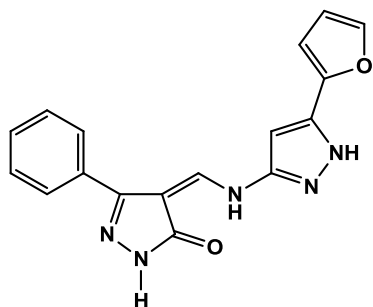
OH), 13,26 (s, 1H, NH, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 12,66, 91,65, 101,73, 117,92, 124,03, 124,06, 125,40, 129,00, 129,02, 129,36, 139,27, 144,18, 145,72, 149,06, 149,29, 165,21. Израчунато:  $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}$  (343,39 g/mol): C, 69,96; H, 4,99; N, 20,39; Нађено: C, 70,10; H, 5,03; N, 20,44.

3.5.18.



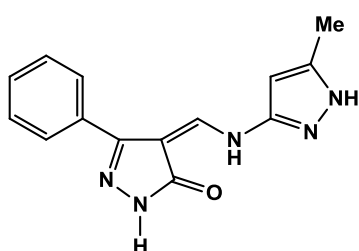
**40:** Светло-жута аморфна супстанца; принос: 0,37 g (75 %); Т.Т. 231–232 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3422, 3314, 3110, 1710, 1679, 1626, 1574, 1295, 771;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 1,36 (t, 3H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 4,32 (q, 2H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 7,49 (m, 3H, Ar-H), 7,67 (dd, 2H,  $J = 7,8$  и 1,6 Hz, Ar-H), 8,38 (s, 1H, Pz-H), 8,45 (s, 1H,  $\text{CH}=\text{N}$ ), 11,62 (s, 1H,  $\text{NH}-\text{C}-\text{O}$ ), 12,05 (s, 1H, OH), 13,36 (s, 1H, NH, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 14,38, 60,36, 100,84, 101,09, 127,21, 128,94, 129,06, 132,37, 134,26, 142,55, 147,81, 148,78, 162,44, 168,62. Израчунато:  $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_3$  (325,33 g/mol): C, 59,07; H, 4,65; N, 21,53; Нађено: C, 59,48; H, 4,75; N, 21,64.

3.5.19.



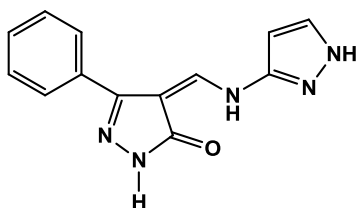
**41:** Светло-жута аморфна супстанца; принос: 0,27 g (56 %); Т.Т. 203–204 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3429, 3199, 3153, 1659, 1612, 1489, 1300, 1278, 955, 781;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 6,63 (dd, 1H,  $J = 3,2$  и 1,8 Hz, Fur-H), 6,83 (d, 1H,  $J = 3,2$  Hz, Fur-H), 6,86 (d, 1H,  $J = 3,2$  Hz, Pz-H), 7,49 (m, 3H, Ar-H), 7,71 (dd, 2H,  $J = 7,8$  и 1,6 Hz, Ar-H), 7,80 (d, 1H,  $J = 1,8$  Hz, Fur-H), 8,45 (s, 1H,  $-\text{CH}=\text{N}$ ), 11,59 (s, 1H,  $\text{NH}-\text{C}-\text{O}$ ), 11,90 (bs, 1H, OH), 13,23 (s, 1H, NH, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 90,95, 99,03, 107,55, 112,03, 127,34, 128,72, 128,95, 132,62, 135,64, 143,45, 144,37, 145,66, 148,73, 148,98, 168,77. Израчунато:  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2$  (319,32 g/mol): C, 63,94; H, 4,10; N, 21,93; Нађено: C, 64,19; H, 4,16; N, 22,07.

3.5.20.



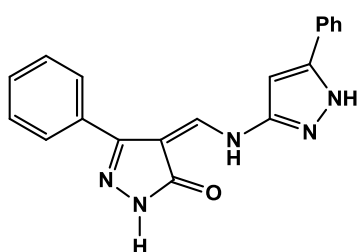
**42:** Светло-жута аморфна супстанца; принос: 0,21 g (52%); Т.Т. 191–192 °С (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3421, 3190, 3152, 1665, 1622, 1579, 1487, 1404, 1302, 753;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 2,22 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 6,25 (s, 1H, Pz-H), 7,48 (m, 3H, Ar-H), 7,68 (dd, 2H,  $J = 7,8$  и  $1,6$  Hz, Ar-H), 8,6 (s, 1H,  $-\text{CH}=\text{N}$ ), 10,95 (bs, 1H, OH), 11,55 (s, 1H, NH-C-O), 12,39 (s, 1H, NH, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 10,88, 93,35, 98,56, 127,28, 128,68, 128,96, 132,70, 140,76, 145,74, 148,31, 148,66, 168,76. Израчунато:  $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}$  (267,29 g/mol): C, 62,91; H, 4,90; N, 26,20; Нађено: C, 63,24; H, 4,99; N, 26,44.

3.5.21.



**43:** Жута аморфна супстанца; принос: 0,20 g (53 %); Т.Т. 207–208 °С (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3415, 3306, 3189, 1673, 1614, 1596, 1399, 1385, 742;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 6,50 (d, 1H,  $J = 2,4$  Hz, Pz-H), 7,45 (m, 3H, Ar-H), 7,69 (dd, 2H,  $J = 7,8$  и  $1,6$  Hz, Ar-H), 7,74 (d, 1H,  $J = 2,4$  Hz, Pz-H), 8,43 (s, 1H,  $-\text{CH}=\text{N}$ ), 11,40 (bs, 1H, OH), 11,57 (s, 1H, NH-C-O), 12,69 (bs, 1H, NH, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 94.26, 98.71, 127.31, 128.71, 128.96, 130.97, 132.69, 145.67, 148.26, 148.74, 168.77$ . Израчунато:  $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}$  (253,26 g/mol): C, 61,65; H, 4,38; N, 27,65; Нађено: C, 61,95; H, 4,43; N, 27,81.

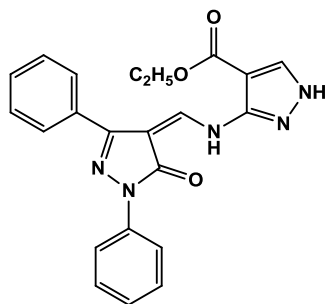
3.5.22.



**44:** Светло-жута аморфна супстанца; принос: 0,38 g (76%); Т.Т. 210–211 °С (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3427, 3169, 1658, 1609, 1586, 1487, 1405, 1299, 1280, 954, 783;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 6,99 (s, 1H, Pz-H), 7,46 (m, 6H, Ar-H), 7,73 (m, 4H, Ar-H), 8,47 (s, 1H,  $-\text{CH}=\text{N}$ ), 11,58 (bs, 1H, OH), 11,63 (s, 1H, NH-C-O), 13,21 (bs, 1H, NH, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 91,70, 98,97, 124,95, 125,35, 127,39, 128,80, 128,83, 129,04,

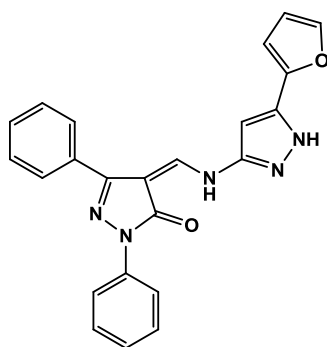
129,26, 132,68, 144,22, 145,72, 148,80, 149,16, 168,88. Израчунато: C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O (329,36 g/mol): C, 69,29; H, 4,59; N, 21,26; Нађено: C, 69,30; H, 4,59; N, 21,44.

3.5.23.



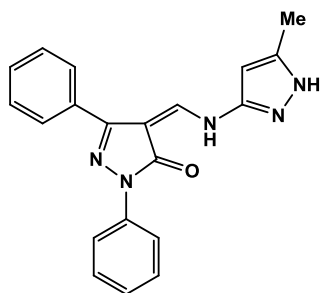
**45:** Жута аморфна супстанца; принос: 0,45 g (74%); Т.Т. 244–245 °С (разлагање); IR (KBr disc, cm<sup>-1</sup>): 3421, 3377, 3234, 3156, 1672, 1614, 1595, 1490, 1340, 1283, 776; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 1,37 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH<sub>3</sub>), 4,34 (q, 2H, J = 7,2 Hz, CH<sub>2</sub>), 7,21 (t, 1H, J = 7,4 Hz, Ar-H), 7,53 (m, 5H, Ar-H), 7,79 (m, 2H, Ar-H), 8,07 (d, 2H, J = 7,8 Hz, Ar-H), 8,41 (d, 1H, J = 1,8 Hz, Pz-H), 8,54 (d, 1H, J = 13,0 Hz, =CH-N), 12,14 (d, 1H, J = 13,0 Hz, NH), 13,44 (s, 1H, NH, Pz); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 14,37, 60,45, 101,17, 101,27, 118,38, 124,60, 127,67, 128,99, 129,16, 129,59, 131,43, 134,10, 138,84, 143,91, 147,62, 149,66, 162,58, 165,19. Израчунато: C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> (401,42 g/mol): C, 65,83; H, 4,77; N, 17,45; Нађено: C, 65,98; H, 4,82; N, 17,54.

3.5.24.



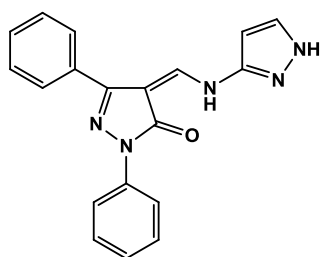
**46:** Светло-жута аморфна супстанца; принос: 0,42 g (71 %); Т.Т. 247–248 °С (разлагање); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3436, 3250, 3117, 1677, 1620, 1485, 1399, 1327, 752; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 6,65 (dd, 1H, J = 3,6 и 1,8 Hz, Fur-H), 6,85 (d, 1H, J = 3,6 Hz, Fur-H), 6,87 (d, 1H, J = 3,2 Hz, Pz-H), 7,21 (t, 1H, J = 7,4 Hz, Ar-H), 7,52 (m, 5H, Ar-H), 7,81 (d, 1H, J = 1,8 Hz, Fur-H), 7,83 (m, 2H, Ar-H), 8,10 (d, 2H, J = 7,8 Hz, Ar-H), 8,54 (s, 1H, -CH=N), 11,94 (bs, 1H, OH), 13,31 (s, 1H, NH, Pz); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 91,53, 99,54, 107,62, 112,02, 118,45, 124,55, 127,84, 128,99, 129,07, 129,39, 131,69, 135,57, 138,99, 143,49, 144,23, 146,58, 148,74, 149,71, 165,26. Израчунато: C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> (395,42 g/mol): C, 69,86; H, 4,33; N, 17,71; Нађено: C, 70,01; H, 4,40; N, 17,77.

3.5.25.



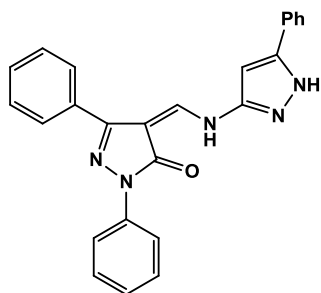
**47**: Светло-жута кристална супстанца; принос: 0,31 g (61%); Т.Т. 221–222 °С (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3420, 3269, 1680, 1617, 1602, 1522, 1482, 1402, 1331, 754;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 2,23 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 6,29 (s, 1H, Pz-H), 7,19 (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz, Ar-H), 7,50 (m, 5H, Ar-H), 7,79 (m, 2H, Ar-H), 8,09 (d, 2H,  $J = 7,8$  Hz, Ar-H), 8,45 (s, 1H,  $-\text{CH}=\text{N}$ ), 11,83 (bs, 1H, OH), 12,47 (s, 1H, NH, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 10,84, 93,95, 99,09, 118,42, 124,49, 127,77, 128,97, 129,07, 129,36, 131,77, 139,05, 140,78, 146,35, 148,05, 149,65, 165,28. Израчунато:  $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}$  (343,39 g/mol): C, 69,96; H, 4,99; N, 20,39; Нађено: C, 70,14; H, 5,03; N, 20,65.

3.5.26.



**48**: Светло-жута аморфна супстанца; принос: 0,30 g (61%); Т.Т. 214–215 °С (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3435, 3232, 1656, 1629, 1597, 1481, 1401, 1344, 756;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 6,55 (s, 1H, Pz-H), 7,19 (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz, Ar-H), 7,51 (m, 5H, Ar-H), 7,79 (s, 1H, Pz-H), 7,80 (m, 2H, Ar-H), 8,09 (d, 2H,  $J = 7,8$  Hz, Ar-H), 8,52 (s, 1H,  $-\text{CH}=\text{N}$ ), 11,94 (bs, 1H, OH), 12,79 (s, 1H, NH, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 94,88, 99,24, 118,43, 124,51, 127,80, 128,99, 129,08, 129,37, 130,96, 131,76, 139,05, 146,59, 148,03, 149,71, 165,28. Израчунато:  $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}$  (329,36 g/mol): C, 69,29; H, 4,59; N, 21,26; Нађено: C, 69,55; H, 4,63; N, 21,33.

3.5.27.



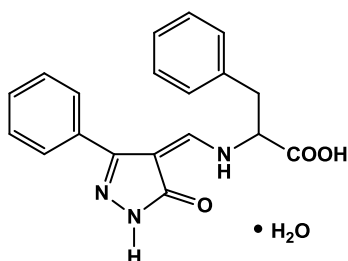
**49**: Светло-жута кристална супстанца; принос: 0,44 g (73%); Т.Т. 287–288 °С (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3434, 3212, 1672, 1623, 1598, 1488, 1481, 1403, 1333, 755;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 7,02 (s, 1H, Pz-H), 7,21 (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz, Ar-H), 7,47 (m, 8H, Ar-H), 7,40 (d, 2H,  $J = 7,0$  Hz, Ar-H), 7,83 (m, 2H, Ar-H), 8,09 (d, 2H,  $J = 7,8$  Hz, Ar-H), 8,55 (s, 1H,  $-\text{CH}=\text{N}$ ), 11,37 (bs, 1H, OH), 13,29 (s, 1H, NH, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,

DMSO-d<sub>6</sub>): 92,25, 99,44, 118,52, 124,62, 125,35, 127,85, 128,86, 129,04, 129,13, 129,19, 129,25, 129,45, 131,73 139,02, 144,16, 146,64, 148,93, 149,71, 165.35. Израчунато: C<sub>25</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O (405,46 g/mol): C, 74,06; H, 4,72; N, 17,27; Нађено: C, 74,19; H, 4,81; N, 17,44.

### 3.6. Поступак за синтезу једињења 50-64

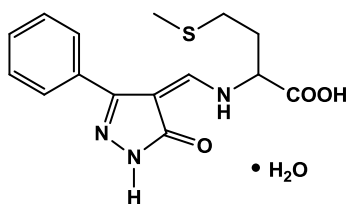
Смеса одговарајућег алдехида (1,5 mmol) и α-амино-киселине (1,8 mmol) у етанолу (10 ml) загревана је да кључа 4 часа. После испаравања растварача под сниженим притиском, додато је 40 ml воде и суспензија је мешана још 1 час на собној температури. Талог је процеђен, испран са мало хладног хлороформа и осушен у вакууму преко анхидрованог CaCl<sub>2</sub>.

#### 3.6.1.



**50:** Светло-жута аморфна супстанца; принос: 0,40 g (76 %); Т.Т. 137–138 °С (разлагање); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3413, 3352, 3152, 1710, 1659, 1590, 1507, 1400, 1306, 1283, 771; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 3,08 (dd, 1H, J = 14,0 и 8,5 Hz, CH-CH<sub>2</sub>), 3,29 (dd, 1H, J = 14,0 и 4,5 Hz, CH-CH<sub>2</sub>), 4,71 (dd 1H, J = 8,5 и 4,5 Hz, CH-COO), 7,24–7,38 (m, 10H, Ar-H), 7,65 (s, 1H, –CH=N), 10,09 (bs, 1H, OH), 11,25 (s, 1H, NH-C-O), 12,79 (bs, 1H, COOH); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 38,81, 61,43, 96,42, 126,91, 126,94, 128,24, 128,55, 128,63, 129,72, 132,75, 136,19, 148,25, 152,89, 168,61, 171,57. Израчунато: C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (353,38 g/mol): C, 64,58; H, 5,42; N, 11,89; Нађено: C, 64,28; H, 5,60; N, 11,82.

#### 3.6.2.

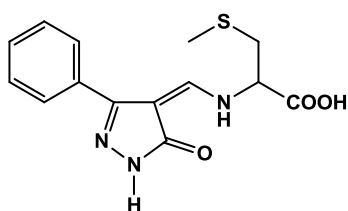


**51:** Жута аморфна супстанца; принос: 0,32 g (62%); Т.Т. 107–108 °С (разлагање); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3420, 3170, 1720, 1662, 1606, 1505, 1400, 1280, 769; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 2,05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,07 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>); 2,15 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>); 2,50 (m, 2H, S-CH<sub>2</sub>); 4,46 (dd, 1H, J = 8,0 и 5,0 Hz, CH-



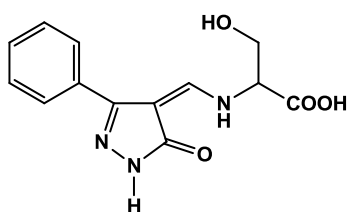
COO), 7,39 (t, 1H, J = 7,0 Hz, Ar-H), 7,44 (t, 2H, J = 7,0 Hz, Ar-H), 7,61 (dd, 2H, J = 7,0 и 1,5 Hz, Ar-H), 8,10 (s, 1H, -CH=N), 10,23 (bs, 1H, OH), 11,30 (s, 1H, NH-C-O), 12,85 (bs, 1H, COOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ): 14,54, 29,07, 32,20, 59,75, 96,68, 127,00, 128,25, 128,66, 132,91, 148,18, 153,33, 168,73, 172,02. Израчунато:  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$  (337,40 g/mol): C, 53,40; H, 5,68; N, 12,45; S, 9,50; Нађено: C, 53,27; H, 5,88; N, 12,41; S, 9,84.

### 3.6.3.



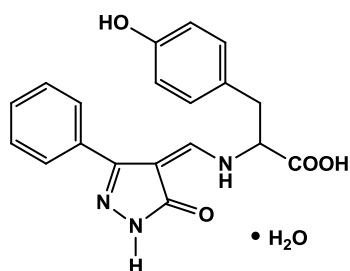
**52:** Светло-жута аморфна супстанца; принос: 0,20 g (44 %); Т.Т. 164–165 °C (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3413, 3256, 1731, 1662, 1605, 1506, 1400, 1304, 771;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ): 2,11 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,03 (dd, 1H, J = 14,0 и 7,0 Hz,  $\text{CH}-\text{CH}_2$ ), 3,08 (dd, 1H, J = 14,0 и 4,5 Hz,  $\text{CH}-\text{CH}_2$ ), 4,66 (dd 1H, J = 7,0 и 4,5 Hz,  $\text{CH}-\text{COO}$ ), 7,39 (t, 1H, J = 7,0 Hz, Ar-H), 7,45 (t, 2H, J = 7,0 Hz, Ar-H), 7,61 (d, 2H, J = 7,0 Hz, Ar-H), 8,14 (s, 1H, -CH=N), 10,22 (bs, 1H, OH), 11,32 (s, 1H, NH-C-O), 12,84 (bs, 1H, COOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ): 15,43, 37,06, 60,00, 96,73, 126,99, 128,32, 128,72, 132,89, 148,26, 153,43, 168,74, 171,02. Израчунато:  $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$  (305,36 g/mol): C, 55,07; H, 4,95; N, 13,76; S, 10,50; Нађено: C, 54,85; H, 5,14; N, 13,62; S, 10,27.

### 3.6.4.



**53:** Жута аморфна супстанца; принос: 0,18 g (44 %); Т.Т. 178–179 °C (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3421, 3226, 1715, 1661, 1616, 1603, 1400, 1255, 772;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ): 3,79 (dd, 1H, J = 11,0 и 3,5 Hz,  $\text{CH}-\text{CH}_2$ ), 3,84 (dd, 1H, J = 11,0 и 4,5 Hz,  $\text{CH}-\text{CH}_2$ ), 4,47 (m, 1H,  $\text{CH}-\text{COO}$ ), 5,45 (bs, 1H,  $\text{CH}_2-\text{OH}$ ), 7,39 (t, 1H, J = 7,0 Hz, Ar-H), 7,44 (t, 2H, J = 7,0 Hz, Ar-H), 7,60 (d, 2H, J = 7,0 Hz, Ar-H), 8,10 (s, 1H, -CH=N), 10,27 (bs, 1H, OH), 11,27 (s, 1H, NH-C-O), 12,89 (bs, 1H, COOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ): 62,24, 62,31, 96,58, 126,96, 128,22, 128,72, 132,98, 148,19, 153,61, 168,69, 170,85. Израчунато:  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4$  (275,26 g/mol): C, 56,72; H, 4,76; N, 15,27; Нађено: C, 57,01; H, 4,67; N, 15,10.

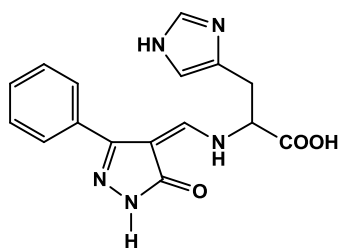
3.6.5.



**54:** Светло-жута аморфна супстанца; принос: 0,42 g (75%); Т.Т. 155–156 °С (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3401, 3296, 3204, 1735, 1656, 1609, 1591, 1514, 1331, 1284, 776;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ): 2,92 (dd, 1H,  $J = 13,5$  и  $9,0$  Hz,  $\text{CH}-\text{CH}_2$ ), 3,17 (dd, 1H,  $J = 13,5$  и  $4,5$  Hz,  $\text{CH}-\text{CH}_2$ ), 4,60 (dd 1H,  $J = 9,0$  и  $4,5$  Hz,  $\text{CH}-\text{COO}$ ), 6,72

(d, 2H,  $J = 8,5$  Hz, Ar-H), 7,02 (d, 2H,  $J = 8,5$  Hz, Ar-H), 7,41 (m, 3H, Ar-H), 7,53 (m, 2H, Ar-H), 7,55 (s, 1H,  $-\text{CH}=\text{N}$ ), 9,38 (bs, 1H, Ar-OH), 10,09 (bs, 1H, OH), 11,22 (s, 1H,  $\text{NH}-\text{C}-\text{O}$ ), 12,86 (bs, 1H,  $\text{COOH}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ): 38,45, 61,54, 96,27, 115,32, 126,91, 128,17, 128,63, 128,73, 130,75, 132,75, 148,25, 152,76, 156,44, 168,57, 171,64. Израчунато:  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5$  (369,38 g/mol): C, 61,78; H, 5,18; N, 11,38; Нађено: C, 61,48; H, 5,28; N, 11,16.

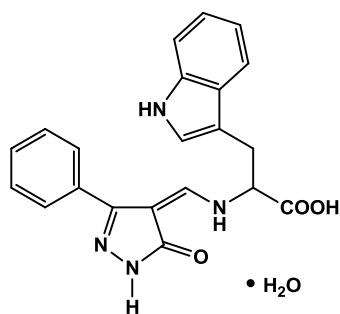
3.6.6.



**55:** Светло-жута аморфна супстанца; принос: 0,21 g (43 %); Т.Т. 232–233 °С (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3235, 3151, 1711, 1670, 1635, 1591, 1350, 1300, 1273, 775;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ): 3,04 (dd, 1H,  $J = 15,0$  и  $8,0$  Hz,  $\text{CH}-\text{CH}_2$ ), 3,18 (dd, 1H,  $J = 15,0$  и  $4,0$  Hz,  $\text{CH}-\text{CH}_2$ ),

4,63 (dd 1H,  $J = 8,0$  и  $4,0$  Hz,  $\text{CH}-\text{COO}$ ), 6,95 (s, 1H, His-H), 7,38 (m, 1H, NH, His), 7,43 (m, 5H, Ar-H), 7,70 (s, 1H,  $-\text{CH}=\text{N}$ ), 7,78 (s, 1H, His-H), 10,17 (bs, 1H, OH), 11,21 (s, 1H,  $\text{NH}-\text{C}-\text{O}$ ), 12,89 (bs, 1H,  $\text{COOH}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ): 31,14, 60,24, 96,22, 116,56, 126,85, 128,13, 128,62, 128,96, 132,86, 135,11, 148,15, 152,78, 168,51, 171,68. Израчунато:  $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_3$  (325,33 g/mol): C, 59,07; H, 4,65; N, 21,53; Нађено: C, 59,23; H, 4,55; N, 21,44.

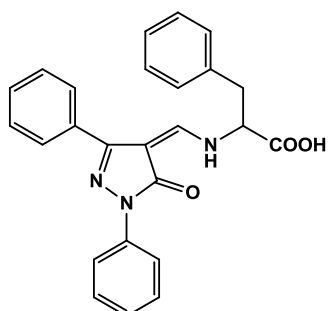
3.6.7.



**56:** Светло-жута аморфна супстанца; принос: 0,49 g (84 %); Т.Т. 163–164 °С (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3399, 3220, 1723, 1657, 1595, 1503, 1340, 1284, 744;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ): 3,19 (dd, 1H,  $J = 14,5$  и  $9,0$  Hz, CH- $\text{CH}_2$ ), 3,43 (dd, 1H,  $J = 14,5$  и  $4,0$  Hz, CH- $\text{CH}_2$ ), 4,66 (dd 1H,  $J = 9,0$  и  $4,0$  Hz, CH-COO), 7,00 (t, 1H,  $J = 7,0$  Hz,

Ar-H), 7,13 (m, 3H, Ar-H), 7,20 (d, 1H,  $J = 2,0$  Hz, Trp-H), 7,30 (m, 3H, Ar-H), 7,41 (s, 1H, -CH=N), 7,43 (m, 1H, Ar-H), 7,58 (d, 1H,  $J = 8,0$  Hz, Ar-H), 10,22 (bs, 1H, OH), 11,05 (d, 1H,  $J = 2,0$  Hz, N-H, Trp), 11,20 (s, 1H, NH-C-O), 12,77 (bs, 1H, COOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ): 29,77, 60,83, 96,04, 108,45, 111,56, 118,41, 118,73, 121,23, 124,79, 126,71, 126,90, 128,00, 128,56, 132,77, 136,33, 148,14, 152,48, 168,55, 172,04. Израчунато:  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_4$  (392,41 g/mol): C, 64,28; H, 5,14; N, 14,28; Нађено: C, 64,17; H, 5,08; N, 14,44.

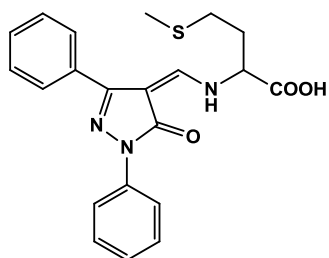
3.6.8.



**57** (L-Енантиомер) и **58** (D-енантиомер): Жуте аморфне супстанце; приноси: 0,55 g за **57** и 0,43 g за **58** (89 % за **57** и 69 % за **58**); Т.Т. 235–236 °С (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3445, 1731, 1656, 1597, 1574,1494, 1353, 1258, 1188, 758, 698;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ): 3,15 (dd, 1H,  $J = 14,0$  и  $8,5$  Hz, CH- $\text{CH}_2$ ), 3,34, (dd, 1H,  $J = 14,0$  и

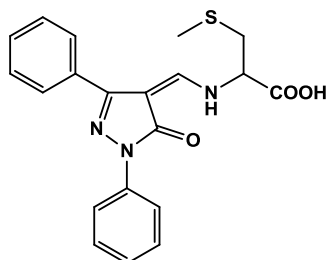
4,5 Hz, CH- $\text{CH}_2$ ), 4,83, (ddd, 1H,  $J = 9,0, 8,5$  и  $4,5$  Hz, CH-COO), 7,16 (t, 1H,  $J = 7,5$  Hz, Ar-H), 7,28 (m, 3H, Ar-H), 7,35 (t, 2H,  $J = 7,5$  Hz, Ar-H), 7,40–7,45 (m, 7H, Ar-H), 7,77 (d, 1H,  $J = 13,5$  Hz, =CH-N), 8,04, (d, 2H,  $J = 7,5$  Hz, Ar-H), 10,21 (dd, 1H,  $J = 13,5$  и  $9,0$  Hz, NH), 13,63 (bs, 1H, COOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ): 38,73, 61,50, 96,92, 118,08, 124,05, 126,98, 127,34, 128,56, 128,74, 128,82, 128,94, 129,71, 131,69, 135,96, 139,09, 149,08, 153,97, 165,29, 171,29. Израчунато:  $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3$  (411,46 g/mol): C, 72,98; H, 5,14; N, 10,21; Нађено: C, 72,96; H, 5,18; N, 10,29.

3.6.9.



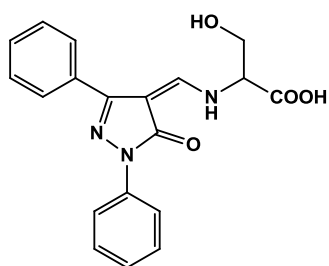
**59:** Жута аморфна супстанца; приноси: 0,43 g (73%); Т.Т. 167–168 °С (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3436, 3285, 1731, 1655, 1598, 1572, 1494, 1351, 1281, 758;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ): 2,06, (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 2,18, (m, 2H,  $\text{CH}-\text{CH}_2$ ); 2,54, (m, 2H,  $\text{S}-\text{CH}_2$ ); 4,62, (ddd, 1H,  $J = 9,0, 8,0$  и 3,5 Hz,  $\text{CH}-\text{COO}$ ), 7,17 (t, 1H,  $J = 7,5$  Hz, Ar-H), 7,43 (t, 2H,  $J = 7,5$  Hz, Ar-H), 7,48–7,53, (m, 3H, Ar-H), 7,75 (dd, 2H,  $J = 8,0$  и 1,5 Hz, Ar-H), 8,07 (d, 2H,  $J = 8,0$  Hz, Ar-H), 8,26 (d, 1H,  $J = 13,5$  Hz,  $=\text{CH}-\text{N}$ ), 10,31 (dd, 1H,  $J = 13,5$  и 9,0 Hz, NH), 13,48 (bs, 1H,  $\text{COOH}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ): 14,50, 29,01, 31,67, 59,75, 97,32, 118,14, 124,09, 127,50, 128,76, 128,80, 129,01, 131,87, 139,10, 149,10, 154,62, 165,44, 171,75. Израчунато:  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$  (395,48 g/mol): C, 63,78; H, 5,35; N, 10,63; S, 8,11; Нађено: C, 64,02; H, 5,25; N, 10,79; S, 8,26.

3.6.10.



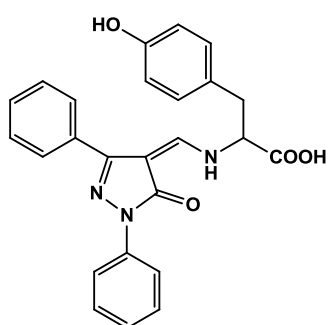
**60:** Жута аморфна супстанца; приноси: 0,37 g (64 %); Т.Т. 149–150 °С (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3421, 3116, 1736, 1650, 1598, 1574, 1496, 1349, 1183, 767;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ): 2,13 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 3,10 (dd, 1H,  $J = 14,0$  и 7,0 Hz,  $\text{CH}-\text{CH}_2$ ), 3,14 (dd, 1H,  $J = 14,0$  и 4,5 Hz,  $\text{CH}-\text{CH}_2$ ), 4,76 (m, 1H,  $\text{CH}-\text{COO}$ ), 7,17 (t, 1H,  $J = 7,0$  Hz, Ar-H), 7,43 (t, 2H,  $J = 8,0$  Hz, Ar-H), 7,47–7,54 (m, 3H, Ar-H), 7,74 (d, 2H,  $J = 7,0$  Hz, Ar-H), 8,07 (d, 2H,  $J = 8,0$  Hz, Ar-H), 8,27 (d, 1H,  $J = 13,5$  Hz,  $=\text{CH}-\text{N}$ ), 10,37 (dd, 1H,  $J = 13,5$  и 9,0 Hz, NH), 13,62 (bs, 1H,  $\text{COOH}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ): 15,36, 36,82, 60,07, 97,24, 118,13, 124,10, 127,46, 128,76, 128,85, 129,04, 131,86, 139,11, 149,11, 154,56, 165,44, 170,81. Израчунато:  $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$  (381,46 g/mol): C, 62,97; H, 5,02; N, 11,02; S, 8,41; Нађено: C, 63,05; H, 4,95; N, 10,98; S, 8,35.

3.6.11.



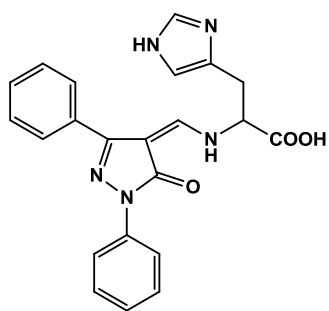
**61:** Жута аморфна супстанца; приноси: 0,32 g (61 %); Т.Т. 106–107 °С (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3410, 3232, 1734, 1657, 1598, 1495, 1348, 758;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ): 3,83 (m, 1H, CH- $\text{CH}_2$ ), 3,88 (dd, 1H,  $J = 10,5$  и 3,5 Hz, CH- $\text{CH}_2$ ), 4,56 (m, 1H, CH-COO), 5,45 (bs, 1H,  $\text{CH}_2$ -OH), 7,17 (t, 1H,  $J = 7,5$  Hz, Ar-H), 7,43 (t, 2H,  $J = 7,5$  Hz, Ar-H), 7,48 (m, 3H, Ar-H), 7,73 (d, 2H,  $J = 7,0$  Hz, Ar-H), 8,08 (d, 2H,  $J = 8,0$  Hz, Ar-H), 8,25 (d, 1H,  $J = 13,5$  Hz, =CH-N), 10,39 (dd, 1H,  $J = 13,5$  и 8,5 Hz, NH), 13,40 (bs, 1H, COOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ): 62,18, 62,42, 97,14, 118,10, 124,03, 127,43, 128,76, 128,83, 128,99, 131,96, 139,20, 149,09, 154,73, 165,45, 170,64. Израчунато:  $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4$  (351,23 g/mol): C, 64,95; H, 4,88; N, 11,96; Нађено: C, 65,25; H, 4,82; N, 11,69.

3.6.12.



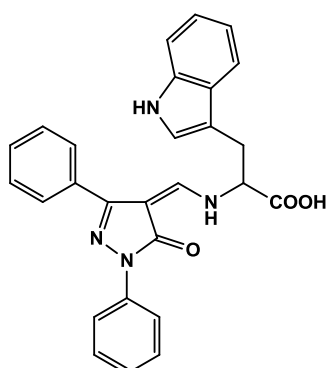
**62:** Жута аморфна супстанца; принос: 0,51 g (80 %); Т.Т. 209–210 °С (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3517, 3420, 3204, 1732, 1655, 1596, 1516, 1494, 1351, 1175, 760;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ): 2,99 (dd, 1H,  $J = 14,0$  и 9,0 Hz, CH- $\text{CH}_2$ ), 3,23 (dd, 1H,  $J = 14,0$  и 4,0 Hz, CH- $\text{CH}_2$ ), 4,83 (ddd, 1H,  $J = 9,0$ , 9,0 и 4,0 Hz, CH-COO), 6,75 (d, 2H,  $J = 8,5$  Hz, Ar-H), 7,06 (d, 2H,  $J = 8,5$  Hz, Ar-H), 7,16 (t, 1H,  $J = 7,5$  Hz, Ar-H), 7,40–7,47 (m, 7H, Ar-H), 7,66 (d, 1H,  $J = 13,0$  Hz, =CH-N), 8,05 (d, 2H,  $J = 8,0$  Hz, Ar-H), 9,41 (bs, 1H, OH, Tyr), 10,19 (dd, 1H,  $J = 13,0$  и 9,0 Hz, NH), 13,61 (bs, 1H, COOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ): 38,28, 61,75, 96,77, 115,37, 118,08, 124,03, 125,79, 127,36, 128,74, 128,78, 128,92, 130,82, 131,71, 139,13, 149,14, 153,80, 156,50, 165,30, 171,40. Израчунато:  $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4$  (427,46 g/mol): C, 70,25; H, 4,95; N, 9,83; Нађено: C, 69,95; H, 5,01; N, 9,79.

3.6.13.



**63:** Жута аморфна супстанца; принос: 0,42 g (70 %); Т.Т. 214–215 °С (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3420, 3155, 1715, 1653, 1598, 1570, 1499, 1347, 1333, 762;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ): 3,12 (dd, 1H,  $J = 15,0$  и  $8,5$  Hz, CH- $\text{CH}_2$ ), 3,23 (dd, 1H,  $J = 15,0$  и  $4,0$  Hz, CH- $\text{CH}_2$ ), 4,73 (m, 1H, CH-COO), 7,02 (s, 1H, His-H), 7,16 (t, 1H,  $J = 7,5$  Hz, Ar-H), 7,42 (t, 2H,  $J = 8,0$  Hz, Ar-H), 7,46–7,52 (m, 4H; 3H, Ar-H и 1H, NH, His), 7,57 (d, 2H,  $J = 7,0$  Hz, Ar-H), 7,86 (m, 2H, =CH-N и 1H, His), 8,05 (d, 2H,  $J = 8,0$  Hz, Ar-H), 10,31 (m, 1H, NH), 13,54 (bs, 1H, COOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ): 30,77, 60,47, 96,83, 116,43, 118,07, 123,97, 127,36, 128,72, 128,80, 128,91, 131,86, 132,70, 135,17, 139,18, 149,09, 153,93, 165,27, 171,44. Израчунато:  $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_3$  (401,42 g/mol): C, 65,83; H, 4,77; N, 17,45; Нађено: C, 65,52; H, 4,80; N, 17,33.

3.6.14.



**64:** Жута аморфна супстанца; принос: 0,50 g (74 %); Т.Т. 234–235 °С (разлагање); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3399, 3220, 1723, 1657, 1595, 1503, 1340, 1284, 744;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ): 3,28 (dd, 1H,  $J = 14,5$  и  $8,5$  Hz, CH- $\text{CH}_2$ ), 3,45 (dd, 1H,  $J = 14,5$  и  $4,5$  Hz, CH- $\text{CH}_2$ ), 4,79 (ddd 1H,  $J = 9,0$ ,  $8,5$  и  $4,0$  Hz, CH-COO), 7,00 (t, 1H,  $J = 7,5$  Hz, Ar-H), 7,12 (t, 1H,  $J = 7,5$  Hz, Ar-H), 7,16 (t, 1H,  $J = 7,5$  Hz, Ar-H), 7,25 (m, 3H; 2H, Ar-H и 1H, Trp-H), 7,35–7,43 (m, 6H; 5H, Ar-H и 1H, =CH-N), 7,58 (m, 2H, Ar-H), 8,04 (d, 2H,  $J = 7,5$  Hz, Ar-H), 10,28 (dd, 1H,  $J = 13,5$  и  $9,0$  Hz, NH), 11,07 (s, 1H, N-H, Trp), 13,58 (bs, 1H, COOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ): 29,37, 60,72, 96,70, 108,03, 111,56, 118,08, 118,38, 118,74, 121,27, 124,01, 124,91, 126,84, 127,17, 128,66, 128,72, 128,79, 131,69, 136,31, 139,13, 149,02, 153,70, 165,31, 171,74. Израчунато:  $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_3$  (450,50 g/mol): C, 71,99; H, 4,92; N, 12,44; Нађено: C, 71,77; H, 4,92; N, 12,30.

### 3.7. Рендгенска структурна анализа

Једињење **22**, 5-хидрокси-3,5-диметил-1-*S*-метилизотиокарбамоил-2-пиразолинијум-јодид (HDMCPI), добијено по претходно описаном поступку, кристалисало је из етанола. Одговарајући бледожути призматични монокристал погодан за рендгенску структурну анализу добијен је прекристализацијом из истог растварача.

Резултати су сакупљени на 293(2)К помоћу OXFORD DIFFRACTION KM4 SAPPHIRE CCD дифрактометра користећи  $\text{MoK}\alpha$  ( $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ ) зрачење монохроматизовано графитним монохроматором. Примењена је семиемпиријска апсорпциона корекција, заснована на интензитетима еквивалентних рефлексија (минимални и максимални трансмисиони фактори износили су 0,53295 и 1,000), а подаци су кориговани и за Лоренцове, поларизационе и позадинске ефекте. Структура једињења решена је директним методама (SIR-92) користећи програмски пакет WinGX<sup>135</sup> и побољшана анизотропним full-matrix least-squares процедурама (SHELX-97).<sup>136</sup>

**Табела 11.** Основни кристалографски подаци и подаци везани за прикупљање и решавање структуре једињења **22**.

Формула	$\text{C}_7\text{H}_{14}\text{IN}_3\text{OS}$	F(000)	616
M	315,17	Величина кристала (mm)	$0,23 \times 0,37 \times 0,69$
Кристални систем	Моноклиничан	T (K)	293
Просторна група	<i>P</i> 21/n (No. 14)	$\lambda$ (Å)	0,71073
a, b, c (Å)	12,204(5)	$\theta_{\text{Min}}, \theta_{\text{Max}}$ (°)	3,5; 29,1
	6,417(5)	Измерене рефлексије	5002
	15,995(5)	Независне рефлексије	2680
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90	Запажене рефлексије	2187
	110,402(5)	Критеријум	$I > 2\sigma(I)$
	90	Број параметара	122
$V$ (Å <sup>3</sup> )	1174,0(11)	$\Delta\rho_{\text{min}}, \Delta\rho_{\text{max}}$ (e Å <sup>-3</sup> )	-0,39; 0,34
Z	4	R	0,0210
$D_c$ (g cm <sup>-3</sup> )	1,783	$R_w$	0,0490
$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	2,876	S	1,05

**Табела 12.** Координате атома и еквивалентни изотропни параметри,  $U(eq)$  за једињење 22.

Атом	x	y	z	$U(eq)$ ( $\text{\AA}^2$ )
S1	0.16062(6)	0.52221(10)	0.59898(5)	0.0482(2)
O5	0.44122(12)	0.2748(2)	0.49165(10)	0.0388(5)
N1	0.24831(15)	0.3465(3)	0.48952(12)	0.0351(6)
N2	0.15227(15)	0.2130(3)	0.47497(13)	0.0393(6)
N7	0.35445(16)	0.6256(3)	0.56489(13)	0.0406(6)
C3	0.16074(19)	0.0674(4)	0.42415(15)	0.0389(7)
C4	0.2678(2)	0.0778(4)	0.3992(2)	0.0508(9)
C5	0.32413(17)	0.2861(3)	0.43624(14)	0.0351(7)
C6	0.26457(18)	0.4986(3)	0.54847(15)	0.0338(7)
C8	0.2142(3)	0.7415(5)	0.6700(2)	0.0750(12)
C31	0.0709(2)	-0.0988(4)	0.3928(2)	0.0592(10)
C51	0.3162(2)	0.4427(4)	0.36453(16)	0.0478(8)
H1	0.48504(1)	0.07606(2)	0.69777(1)	0.0441(1)



Табела 13. (Ан)изотропни параметри за једињење 22.

Атом	U(1,1) или U	U(2,2)	U(3,3)	U(2,3)	U(1,3)	U(1,2)
S1	0.0427(3)	0.0561(4)	0.0576(4)	-0.0115(3)	0.0325(3)	-0.0109(3)
O5	0.0279(8)	0.0533(10)	0.0371(8)	0.0061(8)	0.0136(6)	0.0018(7)
N1	0.0274(9)	0.0416(10)	0.0387(10)	-0.0057(9)	0.0146(8)	-0.0071(8)
N2	0.0296(9)	0.0440(11)	0.0461(11)	-0.0052(10)	0.0153(8)	-0.0102(8)
N7	0.0348(10)	0.0468(11)	0.0466(11)	-0.0131(9)	0.0224(9)	-0.0097(8)
C3	0.0344(12)	0.0412(13)	0.0397(12)	-0.0007(11)	0.0113(10)	-0.0052(10)
C4	0.0477(15)	0.0520(15)	0.0604(16)	-0.0176(13)	0.0286(13)	-0.0117(12)
C5	0.0274(10)	0.0464(13)	0.0340(11)	-0.0034(11)	0.0139(9)	-0.0012(9)
C6	0.0303(11)	0.0376(11)	0.0350(12)	0.0004(10)	0.0133(9)	0.0005(9)
C8	0.083(2)	0.081(2)	0.090(2)	-0.0415(19)	0.0667(19)	-0.0326(17)
C31	0.0486(16)	0.0562(17)	0.0696(19)	-0.0141(14)	0.0166(14)	-0.0189(12)
C51	0.0383(13)	0.0688(18)	0.0352(12)	0.0085(13)	0.0114(10)	0.0011(12)
I1	0.0401(1)	0.0551(1)	0.0374(1)	-0.0022(1)	0.0140(1)	-0.0028(1)

Табела 14. Координате атома водоника и изотропни параметри,  $U(\text{iso})$  за једињење 22.

Атом	x	y	z	$U(\text{iso}) (\text{Å}^2)$
H4A	0.32030	-0.03680	0.42560	0.0610
H4B	0.24740	0.07280	0.33490	0.0610
H5	0.44750	0.19610	0.53350	0.0470
H7A	0.36460	0.72420	0.60330	0.0490
H7B	0.40300	0.61000	0.53720	0.0490
H8A	0.16460	0.76730	0.70400	0.0980
H8B	0.21470	0.86170	0.63440	0.0980
H8C	0.29230	0.71350	0.70970	0.0980
H31A	0.01850	-0.09130	0.42560	0.0770
H31B	0.10840	-0.23260	0.40200	0.0770
H31C	0.02770	-0.07980	0.33040	0.0770
H51A	0.23580	0.46280	0.32810	0.0620
H51B	0.34900	0.57270	0.39140	0.0620
H51C	0.35890	0.39250	0.32830	0.0620

Табела 15. Дужине веза (Å) у једињењу 22.

	Експ.	Израч.		Експ.	Израч.
S1 - C6	1.732(3)	1.756	C4 - C5	1.525 (4)	1.544
S1 - C8	1.783(4)	1.826	C5 - C51	1.503 (3)	1.524
O5 - C5	1.396(3)	1.397	C4 - H4A	0.9700	1.095
O5 - H5	0.8200	0.985	C4 - H4B	0.9700	1.091
N1 - N2	1.404(3)	1.395	C8 - H8A	0.9600	1.089
N1 - C5	1.511 (3)	1.529	C8 - H8B	0.9600	1.090
N1 - C6	1.323 (3)	1.329	C8 - H8C	0.9600	1.089
N2 - C3	1.266 (3)	1.284	C31 - H31A	0.9600	1.094
N7 - C6	1.317 (3)	1.329	C31 - H31B	0.9600	1.089
N7 - H7B	0.8600	1.005	C31 - H31C	0.9600	1.094
N7 - H7A	0.8600	1.007	C51 - H51A	0.9600	1.090
C3 - C4	1.495 (4)	1.505	C51 - H51B	0.9600	1.091
C3 - C31	1.486 (4)	1.487	C51 - H51C	0.9600	1.091

Табела 16. Углови веза (°) у једињењу 22.

	Експ.	Израч.		Експ.	Израч.
C6 - S1 - C8	101.57 (14)	101.96	C3 - C4 - H4B	111.00	112.36
C5 - O5 - H5	109.00	111.24	C5 - C4 - H4A	111.00	111.16
N2 - N1 - C5	112.95 (17)	112.73	C5 - C4 - H4B	111.00	111.97
N2 - N1 - C6	118.51 (19)	119.70	H4A - C4 - H4B	109.00	107.90
C5 - N1 - C6	128.47 (19)	127.55	S1 - C8 - H8A	109.00	111.72
N1 - N2 - C3	107.84 (19)	108.15	S1 - C8 - H8B	109.00	103.93
H7A - N7 - H7B	120.00	118.59	S1 - C8 - H8C	109.00	111.37
C6 - N7 - H7B	120.00	119.05	H8A - C8 - H8B	109.00	108.60
C6 - N7 - H7A	120.00	121.41	H8A - C8 - H8C	110.00	112.09
C4 - C3 - C31	123.6 (2)	123.89	H8B - C8 - H8C	109.00	108.74
N2 - C3 - C4	114.4 (2)	114.30	C3 - C31 - H31A	109.00	109.97
N2 - C3 - C31	122.0 (2)	121.78	C3 - C31 - H31B	110.00	110.95
C3 - C4 - C5	104.7 (2)	103.89	C3 - C31 - H31C	109.00	110.06
O5 - C5 - N1	110.35 (16)	110.83	H31A - C31 - H31B	110.00	110.95
O5 - C5 - C4	115.09 (18)	115.80	H31A - C31 - H31C	109.00	109.38
O5 - C5 - C51	107.37 (18)	108.18	H31B - C31 - H31C	109.00	109.35
N1 - C5 - C4	99.33 (18)	99.13	C5 - C51 - H51A	109.00	111.40
N1 - C5 - C51	111.71 (18)	109.55	C5 - C51 - H51B	109.00	108.65
C4 - C5 - C51	112.9 (2)	113.01	C5 - C51 - H51C	109.00	110.24
S1 - C6 - N7	123.18 (17)	122.97	H51A - C51 - H51B	109.00	108.66
N1 - C6 - N7	120.4 (2)	119.94	H51A - C51 - H51C	110.00	108.99
S1 - C6 - N1	116.40 (17)	117.09	H51B - C51 - H51C	109.00	108.85

Табела 17. Торзиони углови (°) у једињењу 22.

	Експериментални	Израчунати
C8 - S1 - C6 - N1	-179.31 (19)	-176.61
C8 - S1 - C6 - N7	-0.8 (2)	-3.56
C5 - N1 - N2 - C3	4.3 (2)	7.81
C6 - N1 - C5 - C4	168.7 (2)	168.92
N2 - N1 - C5 - C4	-8.1 (2)	-12.76
C6 - N1 - N2 - C3	-173.0 (2)	-173.72
N2 - N1 - C5 - O5	-129.43 (17)	-134.96
C6 - N1 - C5 - O5	47.5 (3)	46.72
N2 - N1 - C6 - N7	179.14 (19)	174.76
C6 - N1 - C5 - C51	-71.9 (3)	-72.58
N2 - N1 - C6 - S1	-2.3 (3)	-5.40
C5 - N1 - C6 - N7	2.4 (3)	7.02
N2 - N1 - C5 - C51	111.2 (2)	105.74
C5 - N1 - C6 - S1	-179.06 (16)	-172.81
N1 - N2 - C3 - C31	-178.1 (2)	-179.73
N1 - N2 - C3 - C4	2.1 (3)	1.38
C31 - C3 - C4 - C5	172.9 (2)	172.17
N2 - C3 - C4 - C5	-7.3 (3)	-9.51
C3 - C4 - C5 - O5	126.2 (2)	130.68
C3 - C4 - C5 - C51	-110.1 (2)	-103.74
C3 - C4 - C5 - N1	8.4 (2)	12.14

Табела 18. Растојања (Å) у једињењу 22.

I1	.O5	3.399(3)	C6	.H5	3.0300
I1	.N7_e	3.613(3)	C6	.H51B	3.0700
I1	.C8_e	3.835(5)	C8	.H7A	2.4300
I1	.H5	2.6200	C51	.H7B	2.8000
I1	.H7A_e	2.8300	H4A	.H5	2.4000
I1	.H8C_e	3.3600	H4B	.H51A	2.5100
I1	.H8A_g	3.0500	H4B	.H51C	2.4800
I1	.H51A_h	3.0500	H5	.H4A	2.4000
S1	.N2	2.782(3)	H5	.I1	2.6200
O5	.N7	2.903(3)	H5	.C6	3.0300
O5	.I1	3.399(3)	H7A	.C8	2.4300
O5	.N7_a	3.003(3)	H7A	.H8B	2.2400
O5	.O5_a	3.196(3)	H7A	.H8C	2.1700
O5	.H7B	2.3700	H7A	.I1_b	2.8300
O5	.H7B_a	2.2300	H7B	.O5	2.3700
O5	.H51B_a	2.7700	H7B	.C51	2.8000
N2	.S1	2.782(3)	H7B	.H51B	2.2000
N7	.I1_b	3.613(3)	H7B	.C5	2.6000
N7	.O5	2.903(3)	H7B	.O5_a	2.2300
N7	.C51	3.290(4)	H8A	.I1_d	3.0500
N7	.O5_a	3.003(3)	H8B	.N7	2.7900
N7	.H8B	2.7900	H8B	.H7A	2.2400
N7	.H8C	2.7400	H8C	.I1_b	3.3600
N7	.H51B	2.7700	H8C	.N7	2.7400
C8	.I1_b	3.835(5)	H8C	.H7A	2.1700
C51	.N7	3.290(4)	H31B	.C6_e	3.0000
C5	.H7B	2.6000	H51A	.I1_f	3.0500
C6	.H31B_c	3.0000	H51A	.H4B	2.5100
H51B	.N7	2.7700	H51B	.H7B	2.2000

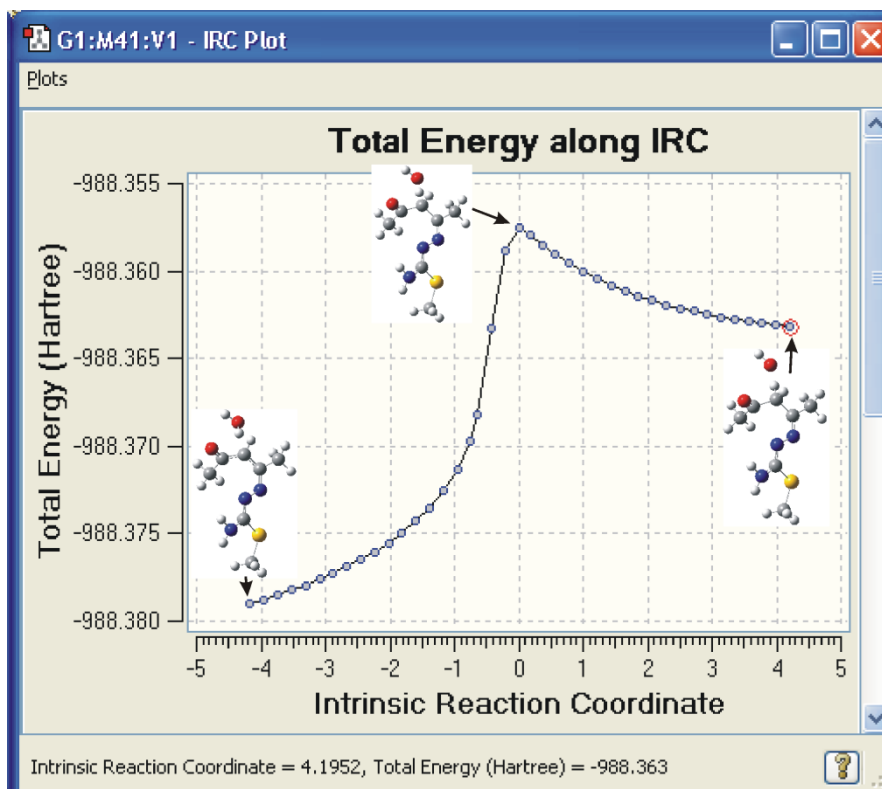
H51B .C6	3.0700	H51C .H4B	2.4800
H51B .O5_a	2.7700		

Табела 19. Водоничне везе ( $\text{\AA}$ ,  $^\circ$ ) у једињењу 22.

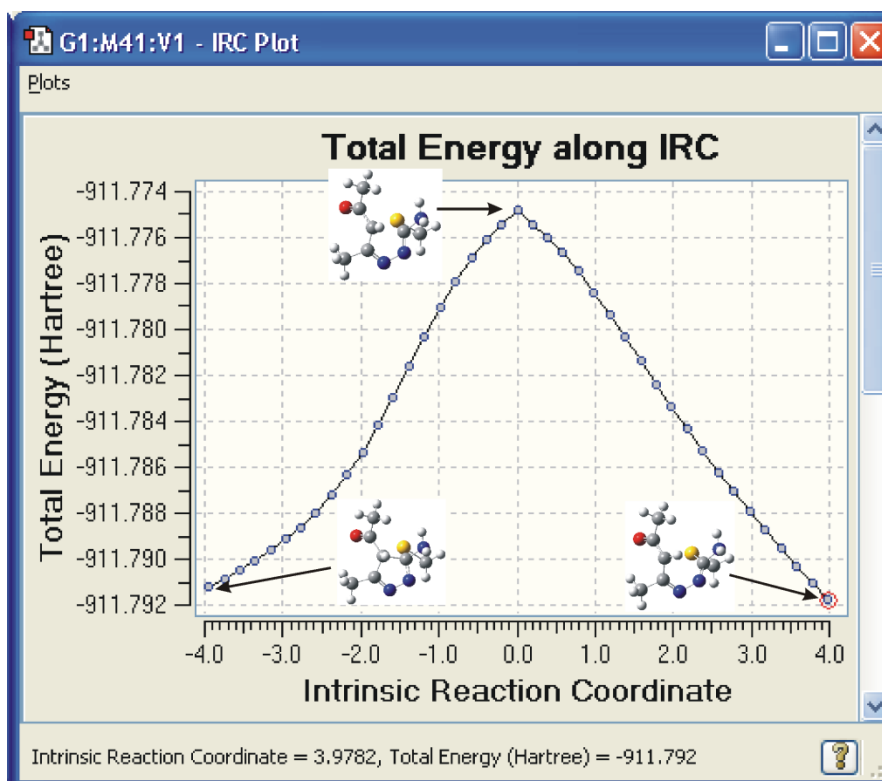
O5 -- H5 ..I1	0.8200	2.6200	3.399(3)	159.00
N7 -- H7A ..I1 1_565	0.8600	2.8300	3.613(3)	153.00
N7 -- H7B ..O5	0.8600	2.3700	2.903(3)	121.00
N7 -- H7B ..O5 3_666	0.8600	2.2300	3.003(3)	149.00
C8 -- H8A ..I1 2_556	0.9600	3.0500	3.886(5)	146.00
C51 -- H51A ..I1 4_454	0.9600	3.0500	3.993(4)	167.00

### 3.8. Рачунарске методе

Сва израчунавања изведена су помоћу програма Gaussian 03,<sup>137</sup> коришћењем В3LYP функционала.<sup>138-140</sup> Базисни скуп 6-311++G(d,p) коришћен је за C, O, N, S и H, док је 6-311G(d,p) употребљен за I. Геометријски параметри свих стационарних тачака оптимизовани су у води ( $\epsilon = 78.36$ ), користећи солватациони модел (CPCM).<sup>141,142</sup> Израчунавањем фреквенција потврђено је за све израчунате структуре да су или равнотежне геометрије (све реалне вибрационе фреквенције) или прелазна стања (једна имагинарна вибрациона фреквенција). Изведени су IRC (*енг.* Intrinsic Reaction Coordinates) рачуни за откривена прелазна стања. Ови рачуни су потврдили да свако прелазно стање повезује одговарајуће реактанте и производе. NBO (*енг.* Natural Bond Orbital) анализа је изведена за све структуре дуж реакционе координате.<sup>143</sup>



Слика 16. Резултати IRC прорачуна за TS4.



Слика 17. Резултати IRC прорачуна за TS6.



## **4. ЗАКЉУЧАК**



На основу резултата приказаних у Поглављу „**Наши радови**“, могу се извести следећи закључци.

Кондензацијом  $\alpha$ -амино-киселина са 1,3-дифенилпиразол-4-карбалдехидом синтетизоване су нове *N*-[(1,3-дифенилпиразол-4-ил)метил]  $\alpha$ -амино-киселине (**1-9**) у добрим приносима. Структура ових једињења потврђена је применом дводимензионалних NMR техника. Vilsmeier-Нааск-овим формиловањем хидразона 3-ацетил-фероцена извршена је синтеза алдехидног прекурсора 3-фероценил-1-фенилпиразол-4-карбалдехида, чија кондензација са  $\alpha$ -амино-киселинама даје једињења **10-21**. Структуре нових једињења потврђене су на основу спектралних података и елементарном анализом. Детаљно је анализиран утицај  $\pi$ -електронског система на хемијско померање, цепање и мултиплицитет орто и мета циклопентадиенских протона.

Извршено је изоловање интермедијера у синтези 3-аминопиразола (**22**) и његова потпуна спектрална карактеризација, као и карактеризација методом рендгенске структурне анализе. Механизам ове реакције разматран је и помоћу DFT (Density Functional Theory) метода које у потпуности објашњавају добијене NMR резултате.

Синтетизовани су 4-аминометилиденски деривати (**23-64**) три структурно различита пиразол-5-она, кондензацијом одговарајућих 4-формилпиразол-5-она са одабраним примарним аминима и  $\alpha$ -амино-киселинама. Помоћу IR и NMR-спектроскопије извршена је детаљна анализа таутомерног састава добијених једињења у чврстом стању и у раствору DMSO- $d_6$ .

Сва синтетизована једињења су тестирана на неколико туморских ћелијских линија уз анализу утицаја електронских и стерних фактора на њихов антипролиферативни потенцијал.



## **5. ЛИТЕРАТУРА**



1. Eicher, T.; Hauptmann S. *The Chemistry of Heterocycles: Structure, Reactions, Syntheses, and Applications*, 2<sup>nd</sup> edition, Wiley-VCH, **2003**.
2. Gosselin, F.; O'Shea, P. D.; Webster, R. A.; Reamer, R. A.; Tillyer, R. D.; Grabowski, E. J. J. *Synlett*, **2006**, 3267.
3. Ahmed, M. S. M.; Kobayashi, K.; Mori, A. *Org. Lett.*, **2005**, 7, 4487.
4. Rosa, F. A.; Machado, P.; Vargas, P. S.; Bonacorso, H. G.; Zanatta, N.; Martins, M. A. P. *Synlett*, **2008**, 1673.
5. Kira, M. A.; Abdel-Rahman, M. O.; Gadalla, K. Z. *Tetrahedron Lett.* **1969**, 10, 109.
6. Selvi, S.; Perumal, P. T. *J. Heterocyclic Chem.* **2002**, 39, 1129.
7. Selvi, S.; Perumal, P. T. *Indian J. Chem.* **2002**, 41B, 1887.
8. a) Sridhar, R.; Perumal, P. T. *Synth. Comm.* **2003**, 33, 1483; b) Sridhar, R. *et al*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 6035.
9. G. Jones, S.P. Stanforth, The Vilsmeier reaction of fully conjugated carbocycles and heterocycles. *Org. React.* 49 (2001) 1-315.
10. a) Meth-Cohn, O.; Tarnowski, B. *Adv. Heterocycl. Chem.* **1982**, 31, 2071; b) Perumal, P. T. *Indian J. Heterocycl. Chem.* **2001**, 11, 1; c) Majo, V. J.; Perumal, P. T. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 7136.
11. Bratenko, M. K.; Chornous, V. A.; Vovk, M. V. *Russ. J. Org. Chem.* **2001**, 37, 556.
12. Bratenko, M. K.; Chornous, V. A.; Vovk, M. V. *Russ. J. Org. Chem.* **2001**, 37, 552.
13. Bratenko, M. K.; Chornous, V. A.; Vovk, M. V. *Russ. J. Org. Chem.* **2001**, 37, 560.
14. Bratenko, M. K.; Chornous, V. A.; Vovk, M. V. *Russ. J. Org. Chem.* **2002**, 38, 411.
15. Nag, S.; Singh, V.; Batra, S. *ARKIVOC*, **2007**, 14, 185.
16. Farhanullah, Sharon, A.; Maulik, P. R.; Ram, V. J. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 5099.
17. Klumpp, D. A.; Kindelin, P. J.; Li, A. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 2931.
18. Prakash, O.; Pannu, K.; Kumar, A. *Molecules* **2006**, 11, 43.
19. Claramunt, R. M.; López, C.; Santa María, M. D.; Sanz, D.; Elguero, J. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2006**, 49, 169.
20. Kornis, G. I. *Pyrazoles, Pyrazolines, and Pyrazolones* in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, Inc., New York **2000**.
21. Holzer, W. *Tetrahedron* **1991**, 47, 1393.
22. Ashton, W. T.; Doss, G. A. *J. Heterocycl. Chem.* **1993**, 30, 307.

23. (a) Vinogradov, V. M.; Dalinger, I. L.; Shevelev, S. A. *Khim.-Farm. Zh.* **1994**, 28, 37.  
(b) Giuseppe, D.; Salvatore, P.; Demetrio, R. *Trends Heterocycl. Chem.* **1991**, 2, 97.
24. Sadek, K. U.; Ali Selim, M.; Elnagdi, M. H.; Otto, H. H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1993**, 66, 2927.
25. Furukawa, M.; Yuki, T.; Hayashi, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1973**, 21, 1845.
26. (a) Cai, J.; Jiang H.; Lin, X. *Huagong Shikan* **2006**, 20, 15. (b) Ege, G.; Franz, H. J. *Heterocycl. Chem.* **1982**, 19, 1267.
27. Pask, C. M.; Camm, K. D.; Kilner, C. A.; Halcrow, M. A. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 2531.
28. Elnagdi, M. H.; Fleita, D. H.; El-Moghayar, M. R. H. *Tetrahedron* **1975**, 31, 63.
29. Elnagdi, M. H.; El-Moghayar, M. R. H.; Fleita, D. H.; Hafez, E. A. A.; Fahmy, S. M. J. *Org. Chem.* **1976**, 41, 3781.
30. Riyadh, S. M.; Al-Matar, H. M.; Elnagdi, M. H. *Molecules* **2008**, 13, 3140.
31. Shawali, A. S.; Hassaneen, H. M. *Tetrahedron* **1973**, 29, 121.
32. Dorn, H.; Zubek, A. *Org. Synth.* **1968**, 48, 8.
33. Hillers, S.; Eremeev, A. V.; Kalvins, I.; Liepins, E.; Tikhomirov, D. A. *Khim. Geterotsikl. Soedin.* **1975**, 246.
34. (a) Das, J.; Moquin, R. V.; Pitt, S.; Zhang, R.; Shen, D. R.; McIntyre, K. W.; Gillooly, K.; Doweiko, A. M.; Sack, J. S.; Zhang, H.; Kiefer, S. E.; Kish, K.; McKinnon, M.; Barrish, J. C.; Dodd, J. H.; Schieven, G. L.; Leftheris, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 2652. (b) Gupta, S.; Rodrigues, L. M.; Esteves, A. P.; Oliveira-Campos, A. M. F.; Nascimento, M. S. J.; Nazareth, N.; Cidade, H.; Neves, M. P.; Fernandes, E.; Pinto, M.; Cerqueira, N. M. F. S. A.; Bras, N. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, 43, 771. (c) Daniels, R. N.; Kim, K.; Lebois, E. P.; Muchalski, H.; Hughes, M.; Lindsley, C. W. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 305.
35. (a) Hassaneen, H. M. E. *Synth. Commun.* **2007**, 37, 3579. (b) Tupper, D. E.; Bray, M. R. *Synthesis* **1997**, 337.
36. Abdel-Khalik, M. M.; Agamya, S. M.; Elnagdi, M. H. *Z. Naturforsch., B: Chem. Sci.* **2000**, 55, 1211.
37. Gopalsamy, A.; Yang, H.; Ellingboe, J. W.; Tsou, H.-R.; Zhang, N.; Honores, E.; Powell, D.; Miranda, M.; McGinnis, J. P.; Rabindran, S. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 1591.



38. El-Agamey, A. G. A.; El-Sakka, I.; El-Shahat, Z.; Elnagdi, M. H. *Arch. Pharm.* **1984**, *317*, 289.
39. Salman, H. M. A.; Mohamed, A. A.; Ibrahim, S. A.; Ahmed, A. A. *Bull. Fac. Sci., Assiut Univ. B* **2000**, *29*, 25.
40. Abunada, N. M.; Hassaneen, H. M.; Kandile, N. G.; Miqdad, O. A. *Molecules* **2008**, *13*, 1501.
41. Sanz, D.; Claramunt, R. M.; Elguero, J.; Salazar, L.; Espada, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1990**, 809.
42. Elguero, J.; Marzin, C.; Katritzky, A. R.; Linda, P. *The Tautomerism of Heterocycles*, Academic Press, New York, **1976**.
43. Elguero, J. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*; Pergamon Press: Oxford, **1984**.
44. Elguero, J. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*; Pergamon Press: Oxford, **1996**.
45. Puello, J. Q.; Obando, B. I. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 10783.
46. a) Jacobs, T. L., *Heterocyclic Compounds*, Wiley: New York, **1957**, *5*, 45; b) Stanovnik, E.; Svete, J. *Science of Synthesis*, **2002**, *12*, 15.
47. Li, J.J. *Name reaction in heterocyclic chemistry*, Wiley, New York, **2005**.
48. Burja, B.; Cimbora-Zovko, T.; Tomic, S.; Jelušić, T.; Kocevar, M.; Polanc, S.; Osmak, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 2375.
49. Tron, G. C.; Pirali, T.; Sorba, G.; Pagliai, F.; Busacca, S.; Genazzani, A. A. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3033.
50. a) Makhija, M. T.; Kasliwal, R. T.; Kulkarni, V. M.; Neamati, N. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2317; b) Ruiter, J. D.; Carter, D. A.; Avledge, W. S.; Sullivan, P. J.; *J. Heterocycl. Chem.* **1987**, *24*, 149; c) Phadtane, S. K.; Kamat, S. K.; Panse, G. T.; *Indian J. Chem.* **1980**, *19B*, 212; d) Khan, M. A.; Cosenza, A. G.; *J. Heterocycl. Chem.* **1982**, *19*, 1077; e) Katritzky, A. R.; Barczynski, P.; Ostercamp, D. L.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1987**, *2*, 969.
51. Verma, R. S. *Green Chem.* **1999**, *1*, 43.
52. Pal, S.; Mareddy, J.; Devi, N.S. *J. Braz. Chem. Soc.* **2008**, *19(6)*, 1207.
53. Deshmukh, M. B.; Jagtap, S. S.; Desmukh, S. A. *J. Indian Chem. Soc.* **2006**, *83*, 1055.
54. a) Bremner, D.H. *Ultrasonics Sonochemistry* **1994**, *1*, 119; b) Mason, T.J.; Lorimer, J.P. *Applied Sonochemistry, The Uses of Power Ultrasound Chemistry and Processing*, Wiley **2002**.

55. Abd EL-Rahman, N.M.; Saleh, T.S.; Mady, M.F. *Ultrason. Sonochem.* **2009**, *16*, 70.
56. Mojatahedi, M. M.; Javadpour, M.; Abaee, M. S. *Ultrason. Sonochem.* **2008**, *15*, 828.
57. Alderete, J.B.; Belmar, J.; Parra, M.; Zuniga, C. *Bol. Soc. Chil. Quím.* **2000**, *45*, 85.
58. Elguero, J.; Guiraud, G.; Jacquier, R.; Tarrago, G.; *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1966**, 775.
59. Elguero, J.; Jacquier, R.; Tarrago, G. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1966**, 2990; b) Elguero, J.; Jacquier, R.; Tarrago, G. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1967**, 3772; c) Elguero, J.; Jacquier, R.; Tarrago, G. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1967**, 3780.
60. Eller, G.A.; Holzer, W. *Molbank* **2006**, M464.
61. Cizmarik, J.; Lycka, A. *Pharmazie* **1988**, *43*, 794.
62. Holzer, W.; Kautsch, C.; Laggner, C.; Claramunt, R. M.; Perez-Torralba, M.; Alkorta, I.; Elguero, J. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 6791.
63. Belmar, J.; Alderete, J.; Zuniga, C.; Jimenez, C.; Jimenez, V.; Nunez, H.; Grandy, R.; Yori, A. *Bol. Soc. Chil. Quím.* **2001**, *46*, 4.
64. Witanowski, M.; Stefaniak, L.; Webb, G. A. In *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, Academic Press, London, **1993**, 25.
65. a) Knorr, L. *Ber.* **1884**, *17*, 2032; b) Krhos, W. *Chem. Ber.* **1955**, *88*, 866; c) Bouvelt, L.; Locquin, R. *Bull. Soc. Chim. France* **1902**, *27*, 1088; d) Bouvelt, L.; Locquin, R. *Bull. Soc. Chim. France* **1904**, *31*, 528.
66. Smith, P.A.S. *Open Chain Nitrogen Compounds*, Vol II, Benjamin Inc, New York **1966**, 139.
67. Guckian, K.; Carter, M. B.; Lin, E.; Choi, M.; Sun, L.; Boriack-Sjodin, P.A.; Chuaqui, C.; Lane, B.; Cheung, K.; Ling, L.; Lee, W.C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 326.
68. Ledrut, J., Winternitz, F., and Combes, G. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1961**, 704.
69. a) Bartulin, J.; Belmar, J.; and León, G. *Bol. Soc. Chil. Quím.* **1992**, *37*, 18; b) Belmar, J.; Alderete, J.; Leonardi, F.; León, G.; Parra, M.; Zúñiga, C. *Bol. Soc. Chil. Quím.* **1997**, *42*, 355.
70. a) Cornforth, J.W. *The Chemistry of Penicillin*, Princeton University Press, Princeton, **1949**, 730; b) Homami, S.S.; Mukerjee, A.K. *Indian J. Chem. Sect. B*, **1992**, *31*, 411.
71. Kepe, V.; Pozgan, F.; Golobic, A.; Polanc, S.; Kocevar, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1998**, 2813.
72. Stolz, F. *J. Prakt. Chem.* **1897**, *55*, 145.
73. Jensen, B.S. *Acta Chem. Scand.* **1959**, *13*, 1347.

74. Belmar, J.; Pérez, F.R.; Alderete, J.; Zúñiga, C. *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 179.
75. Jensen, B.S. *Acta Chem. Scand.* **1959**, *13*, 1668.
76. Chiba, P.; Holzer, W.; Landau, M.; Bechmann, G.; Lorenz, K.; Plagens, B.; Hitzler, M.; Richter, E.; Ecker, G. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4001.
77. Jadeja, R.N.; Shah, J.R.; Suresh, E.; Paul, P. *Polyhedron* **2004**, *23*, 2465.
78. Amarasekara, A.S.; Owereh, O.S.; Lyssenko, K.A.; Timofeeva, T.V. *J. Struct. Chem.* **2009**, *50(6)*, 1159.
79. Belmar, J.; Alderete, J.; Parra, M.; Zúñiga, C. *Bol. Soc. Chil. Quím.* **1999**, *44*, 367.
80. Palomer, A.; Cabre, F.; Pascual, J.; Campos, J.; Trujillo, M. A.; Entrena, A.; Callo, M. A.; Garcia, L.; Mauleon, D.; Espinosa, A. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1402.
81. Van Staveren, D. R.; Metzler-Nolte, N. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 5931.
82. Wlassoff, W. A.; King, G. C. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e58/1.
83. Navarro, A. E.; Spinelli, N.; Moustrou, C.; Chaix, C.; Mandrand, B.; Brisset, H. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 5310.
84. Chantson, J. T.; Falzacappa, M. V. V.; Crovella, S. B.; Metzler-Nolte, N. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1268.
85. Higgins, P. J.; Gellett, A. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1614.
86. Coutouli-Argyropoulou, E.; Sideris, C.; Kokkinidis, G. *J. Organomet. Chem.* **2006**, *691*, 3909.
87. Zsoldos-Mády, V.; Csámpai, A.; Szabó, R.; Mészáros-Alapi, E.; Pasztor, J.; Hudecz, F.; Sohár, P. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1119.
88. Hirao, T. *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694*, 806.
89. Corry, A. J.; Goel, A.; Alley, S. R.; Kelly, P. N.; O' Sullivan, D.; Savage, D.; Kenny, P. T. M. *J. Organomet. Chem.* **2007**, *692*, 1405.
90. Sehnert, J.; Hess, A.; Metzler-Nolte, N. *J. Organomet. Chem.* **2001**, *637-639*, 349.
91. Gellett, A. M.; Huber, P. W.; Higgins, P. J. *J. Organomet. Chem.* **2008**, *693*, 2959.
92. Duivenvoorden, W. C. M.; Liu, Y. N.; Schatte, G.; Kraatz, H. B. *Inorg. Chim. Acta* **2005**, *358*, 3183.
93. Osella, D.; Ferrali, M.; Zanello, P.; Laschi, F.; Fontani, M.; Nervi, C.; Cavigliolo, G. *Inorg. Chim. Acta* **2000**, *306*, 42.
94. Vessieres, A.; Top, S.; Pigeon, P.; Hillard, E.; Boubeker, L.; Spera, D.; Jaouen, G. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3937.

95. Hartinger, C. G.; Nazarov, A. A.; Arton, V. B.; Giester, G.; Jakupec, M.; Galanski, M.; Keppler, B. K. *New J. Chem.* **2002**, 26, 671.
96. Snegur, L. V.; Simenel, A. A.; Nekrasov, Y. S.; Morzova, E. A.; Starikova, Z. A.; Peregudova, S. M.; Kuzmenko, Y. V.; Babin, V. N.; Ostrovskaya, L. A. *J. Organomet. Chem.* **2004**, 689, 2473.
97. Top, S.; Tang, J.; Vessieres, A.; Carrez, D.; Provot, C.; Jaouen, G. *Chem. Commun.* **1996**, 955.
98. Hillard, E.; Vessieres, A.; Thoulin, L.; Jaouen, G.; Amatore, C. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **2006**, 45, 285.
99. Braña, M. F.; Gradillas, A.; Ovalles, A. G.; López, B.; Acero, N.; Llinares, F.; Muñoz Mingarro, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 9.
100. Sujatha, K.; Shanthi, G.; Panneer Selvam, N.; Manoharan, S.; Perumal, P. T.; Rajendran, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 4501.
101. Castagnolo, D.; Manetti, F.; Radi, M.; Bechi, B.; Pagano, M.; De Logu, A.; Meleddu, R.; Saddi, M.; Botta, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 5716.
102. Joksović, M. D.; Bogdanović, G.; Kojić, V.; Meszaros Szecsenyi, K.; Leovac, V. M.; Jakimov, D.; Trifunović, S.; Marković, V.; Joksović, Lj. *J. Het. Chem.* **2010**, 47, 850.
103. Joksović, M. D.; Marković, V.; Juranić, Z. D.; Stanojković, T.; Jovanović, Lj. S.; Damljanović, I. S.; Meszaros Szecsenyi, K.; Todorović, N.; Trifunović, S.; Vukicević, R. D. *J. Organom. Chem.* **2009**, 694, 3935.
104. Dorokhov, V. A.; Komkov, A. V.; Ugrak, B. I. *Russ. Chem. Bull.* **1993**, 42, 1364.
105. Marković, S.; Joksović, M. D.; Bombicz, P.; Leovac, V. M.; Marković, V.; Joksović, Lj. *Tetrahedron* **2010**, 66, 6205.
106. Marković, V.; Erić, S.; Juranić, Z. D.; Stanojković, T.; Joksović, Lj.; Ranković, B.; Kosanić, M.; Joksović, M. D. *Bioorg. Chem.* **2011**, 39, 18.
107. Marković, V.; Erić, S.; Stanojković, T.; Todorović, N.; Trifunović, S.; Manojlović, N.; Jelić, R.; Joksović, M. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 4416.
108. Cave, G. W. V.; Raston, C. L. *Perkin Trans 1* **2001**, 3258.
109. Casella, L.; Gullotti, M. *Inorg. Chem.* **1983**, 22, 2259.
110. Wagner, M. R.; Walker, F. A. *Inorg. Chem.* **1983**, 22, 3021.
111. Colthup, N. B.; Daly, L. H.; Wiberley, S. E.; *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press London: **1975**.

112. Pons, J.; Chadghan, A.; Casabó, J.; Alvarez-Larena, A.; Piniella, J. F.; Ros, J. *Polyhedron* **2001**, *20*, 2531.
113. Joksović, M.; Ratković, Z.; Vukićević, M.; Vukićević, R. *Synlett* **2006**, *16*, 2581.
114. Petrosyan, A. M. *Vib. Spectrosc.* **2007**, *43*, 284.
115. Köster, D. S.; Dittrich, J.; Gasser, G.; Hüsken, N.; Castañeda, I. C. H.; Jios, J. L.; della Vedova, C. O.; Metzler-Nolte, N. *Organometallics* **2008**, *27*, 6326.
116. Hergold-Brundić, A.; Kaitner, B.; Kamenar, B.; Leovac, V. M.; Ivegeš, E. Z.; Juranić, N. *Inorg. Chim. Acta* **1991**, *188*, 151.
117. Spek, A. L. *J. Appl. Cryst.* **2003**, *36*, 7.
118. Macrae, C. F.; Edgington, P. R.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Shields, G. P.; Taylor, R.; Towler, M.; v. d. Streek, J. *J. Appl. Crystallogr.* **2006**, *39*, 453.
119. Zelenin, K. N.; Alekseev, V. V.; Zelenin, A. K.; Sushkova, Yu. S. *Chem. Het. Comp.* **1999**, *35*, 87.
120. Casas, J. S.; Castano, M. V.; Castellano, E. E.; Ellena, J.; García-Tasende, M. S.; Gato, A.; Sánchez, A.; Sanjuán, L. M.; Sordo, J. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 1550.
121. Zelenin, K. N.; Alekseyev, V. V. *Top. Heterocycl. Syst.* **1996**, *1*, 141.
122. Katritzky, A. R.; Ghiviriga, I.; Oniciu, D. C.; O'Ferrall, R. A. M.; Walsh, S. M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1997**, 2605.
123. Yamazaki, C. *Can. J. Chem.* **1975**, *53*, 610.
124. Szabó, A.; Cesljevic, V. I.; Kovács, A. *Chem. Phys.* **2001**, *270*, 67.
125. Zelenin, K. N.; Potapov, A. A.; Alekseyev, V. V.; Lagoda, I. V. *Chem. Het. Comp.* **2004**, *40*, 903–910.
126. Wallace, D. J.; Straley, J. M. *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 3825.
127. Movchan, A. I.; Kurbangalieva, A. R.; Kataeva, O. N.; Litvinov, I. A.; Chmutova, G. A. *Russ. J. Gen. Chem.* **2003**, *73*, 1130.
128. Thaker, B. T.; Surati, K. R.; Oswal, S.; Jadeja, R. N.; Gupta, V. K. *Struct. Chem.* **2007**, *18*, 295.
129. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. *J. Natl. Cancer. Inst.* **1990**, *82*, 1107.
130. Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.
131. Ohno, M.; Abe, T. *J. Immunol. Methods* **1991**, *145*, 199.

132. Tabbi, G.; Cassino, C.; Colangelo, G.; Ghiglia, A.; Viano, I.; Osella, D.; *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5786.
133. Corry, A. J.; O' Donovan, N.; Mooney, A.; O' Sullivan, D.; Rai, D. K.; Kenny, P. T. M. *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694*, 880.
134. Liedtke, C.; Wang, J.; Tordai, A.; Symmans, W. F.; Hortobagyi, G. N.; Kiesel, L.; Hess, K.; Baggerly, K. A.; Coombes, K. R.; Pusztai, L. *Breast Cancer Res. Treat.* **2010**, *121*, 301.
135. Farrugia, L. J. *J. Appl. Cryst.* **1999**, *32*, 837-838.
136. Sheldrick, G. M. *SHELXL-97 Program for the Refinement of Crystal Structures*, **1997** (University of Göttingen, Göttingen).
137. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian 03*, E.01-SMP, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, **2003**.
138. Becke, A. D. *Phys. Rev. A.* **1988**, *38*, 3098-3100.
139. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785-789.
140. Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648-5652.
141. Barone, V.; Cossi, M. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 1995-2001.
142. Cossi, M.; Rega, N.; Scalmani, G.; Barone, V. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 669-681.
143. Foster, J. P.; Weinhold, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7211-7218.

## **6. ПРИЛОГ**

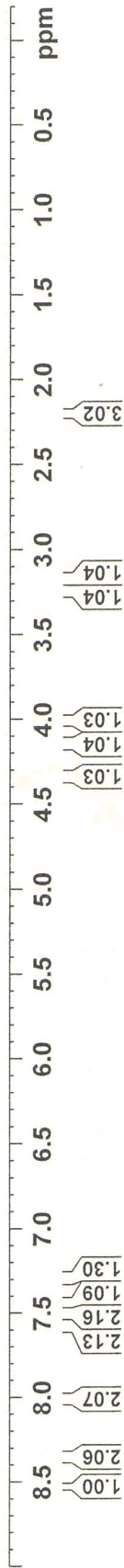
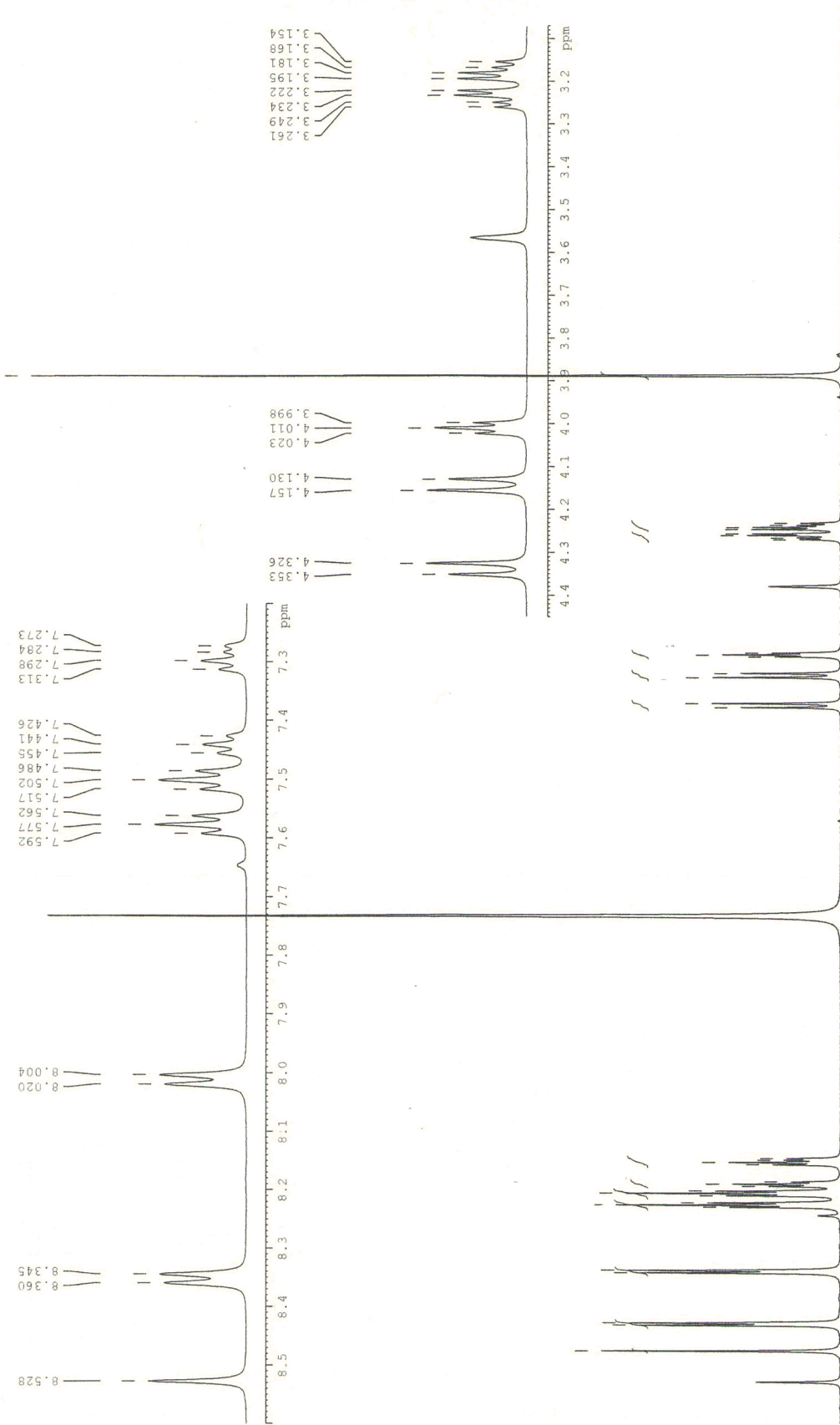




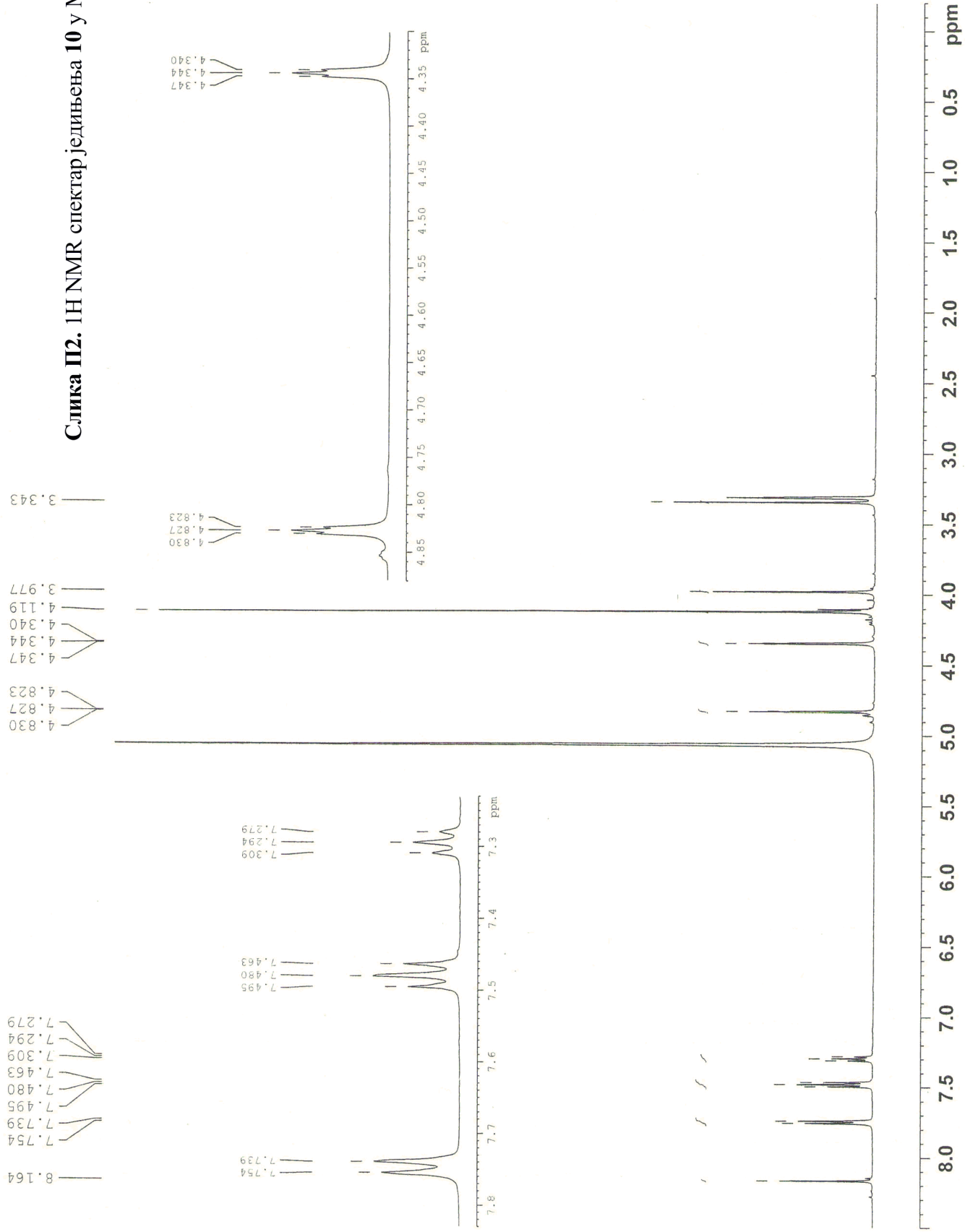
## **6.1. NMR спектри**



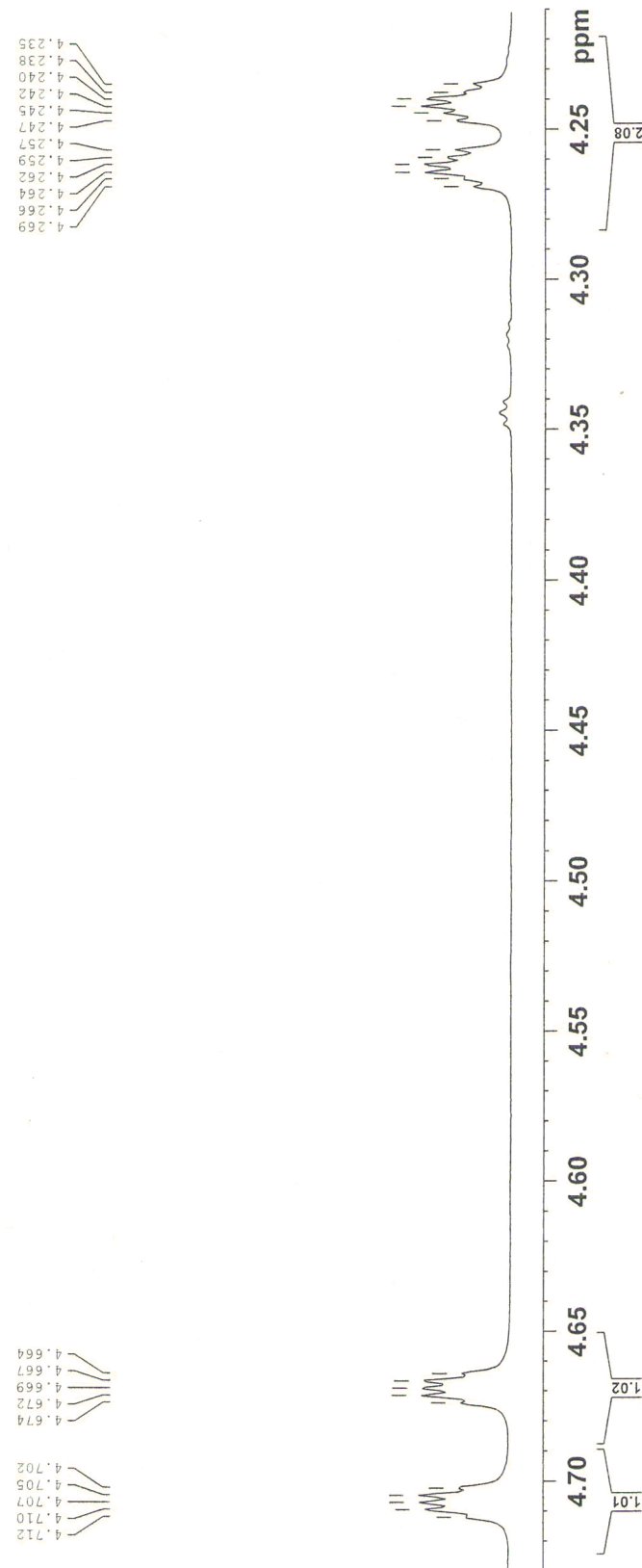
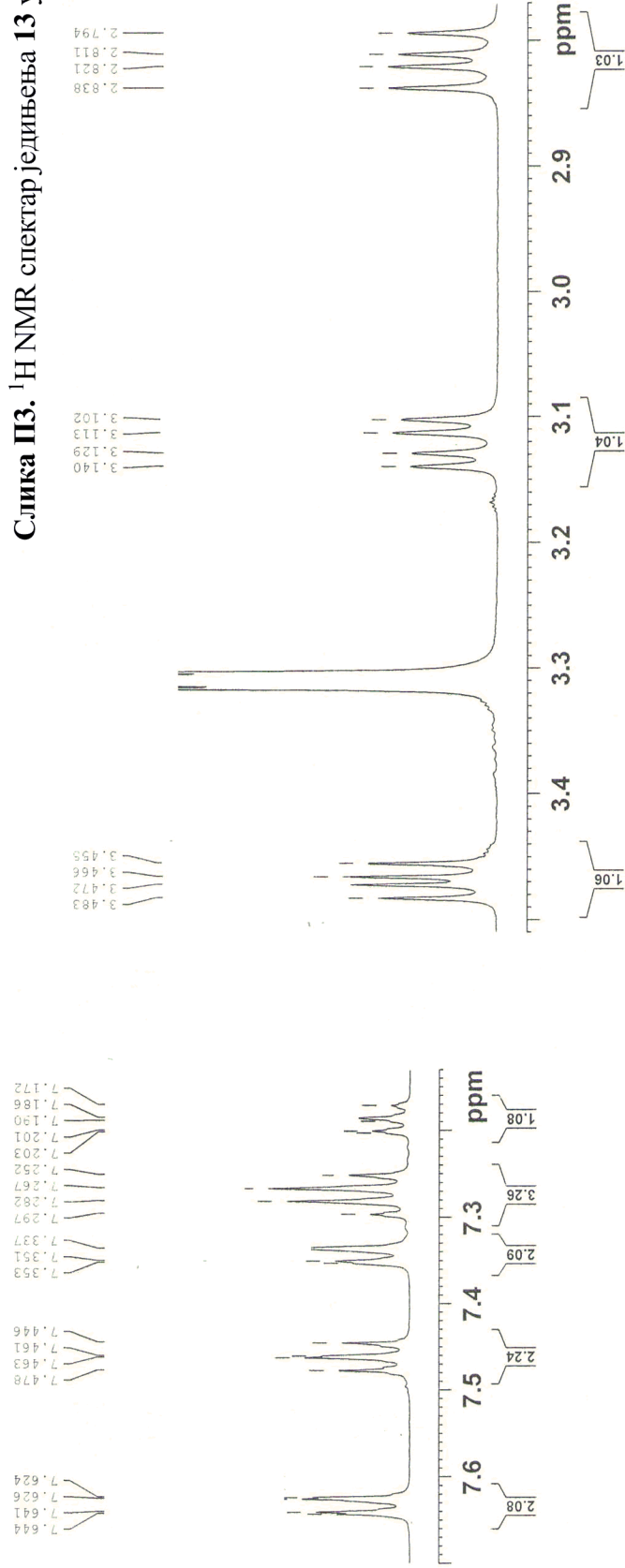
Слика П1.  $^1\text{H}$  NMR спектар једињења 7  
у деутериопиридину



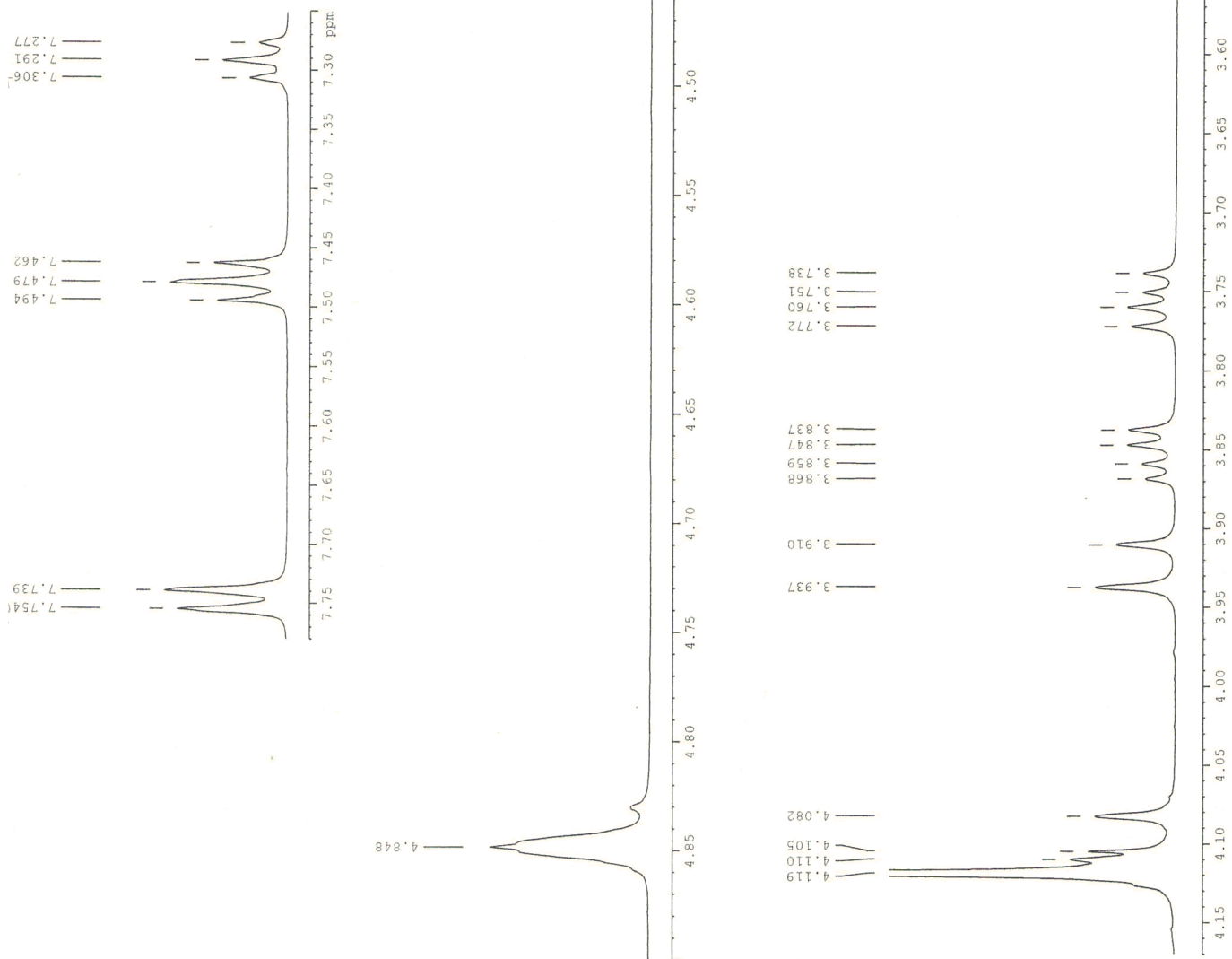
Слика П2. <sup>1</sup>H NMR спектар једињења 10 у MeOD.



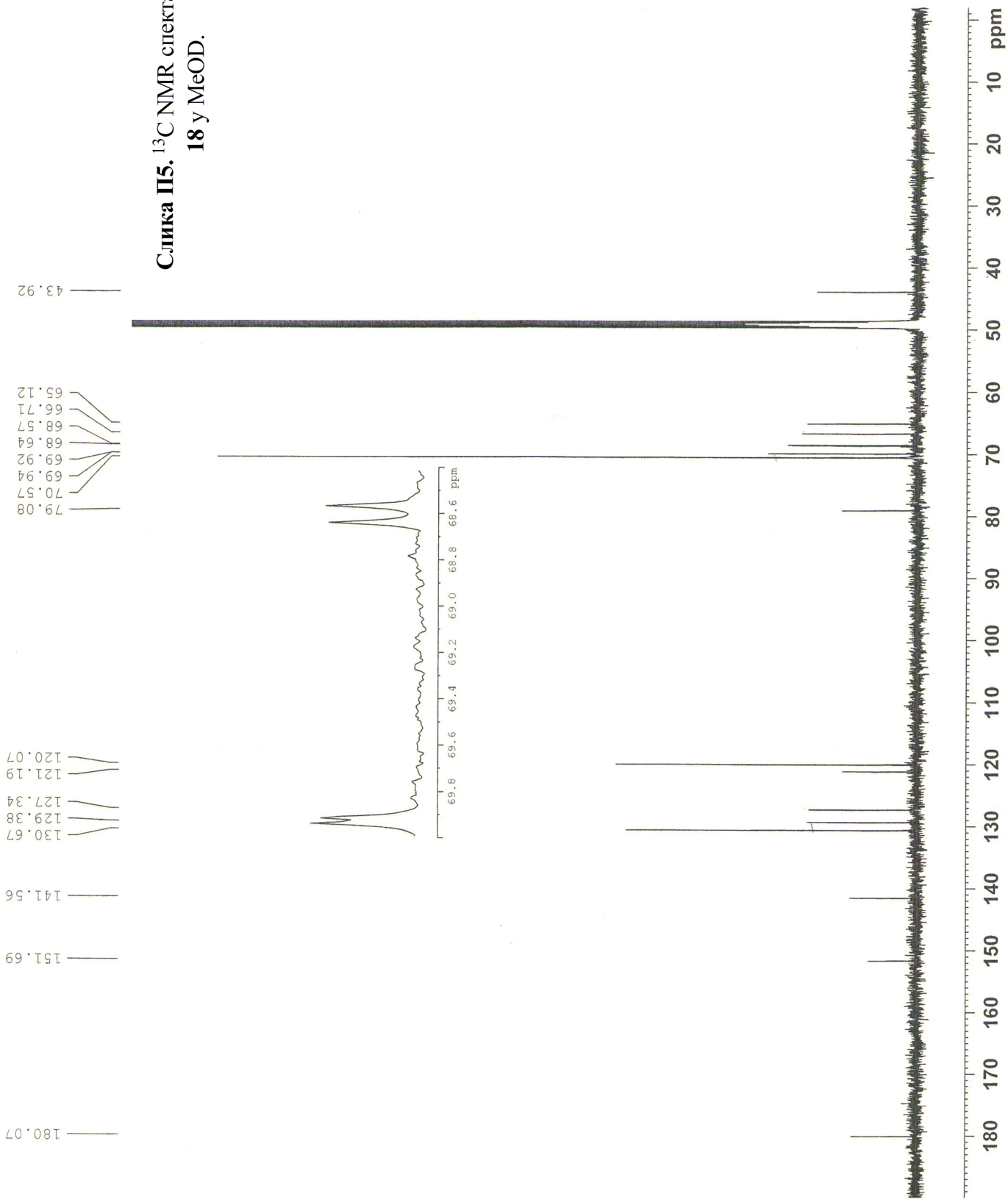
Слика ПЗ.  $^1\text{H}$  NMR спектар једињења 13 у MeOD.



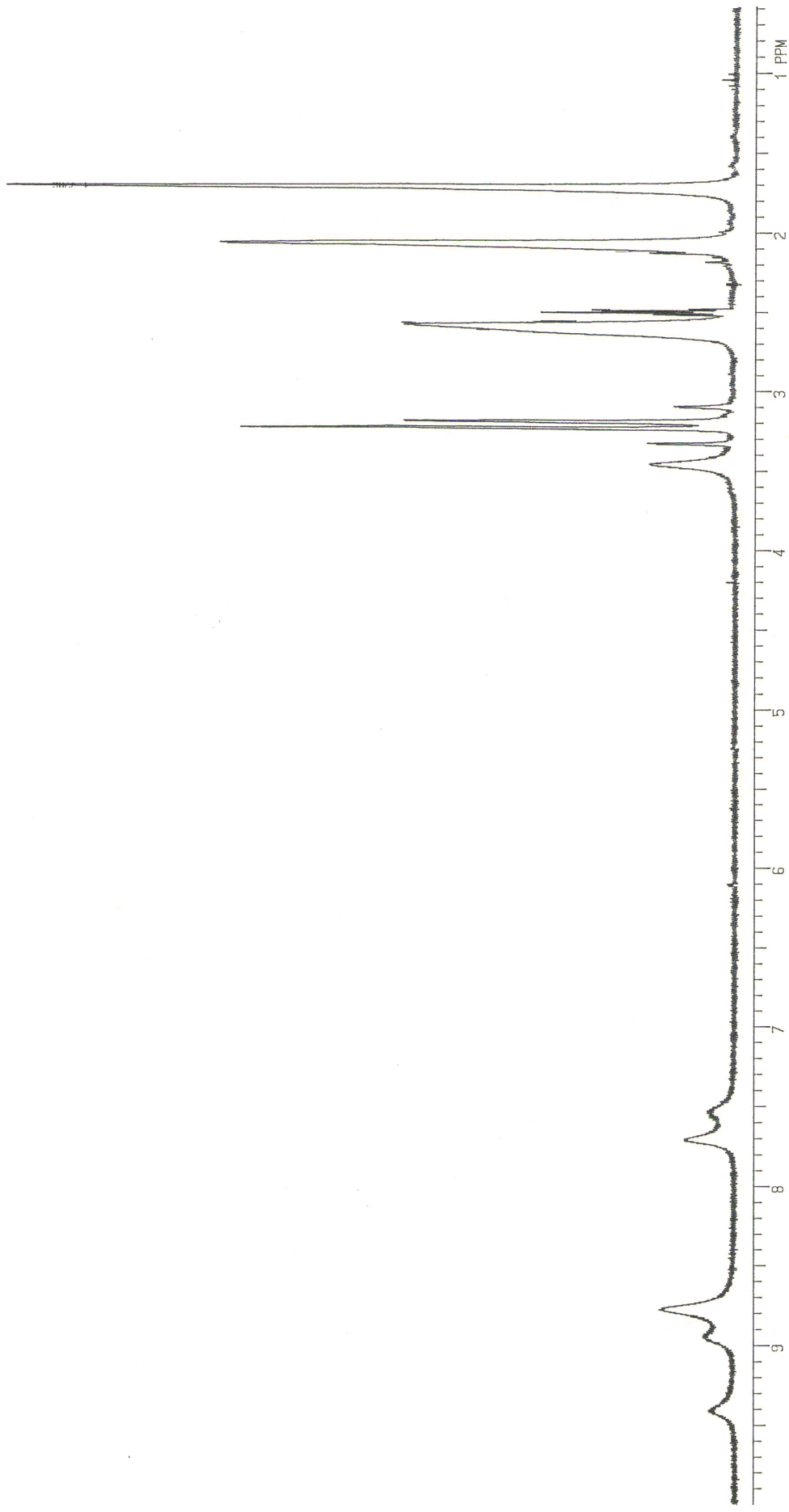
Слика П4.  $^1\text{H}$  NMR спектар једињења **18** у MeOD.



Слика П5.  $^{13}\text{C}$  NMR спектар једињења  
18 у MeOD.

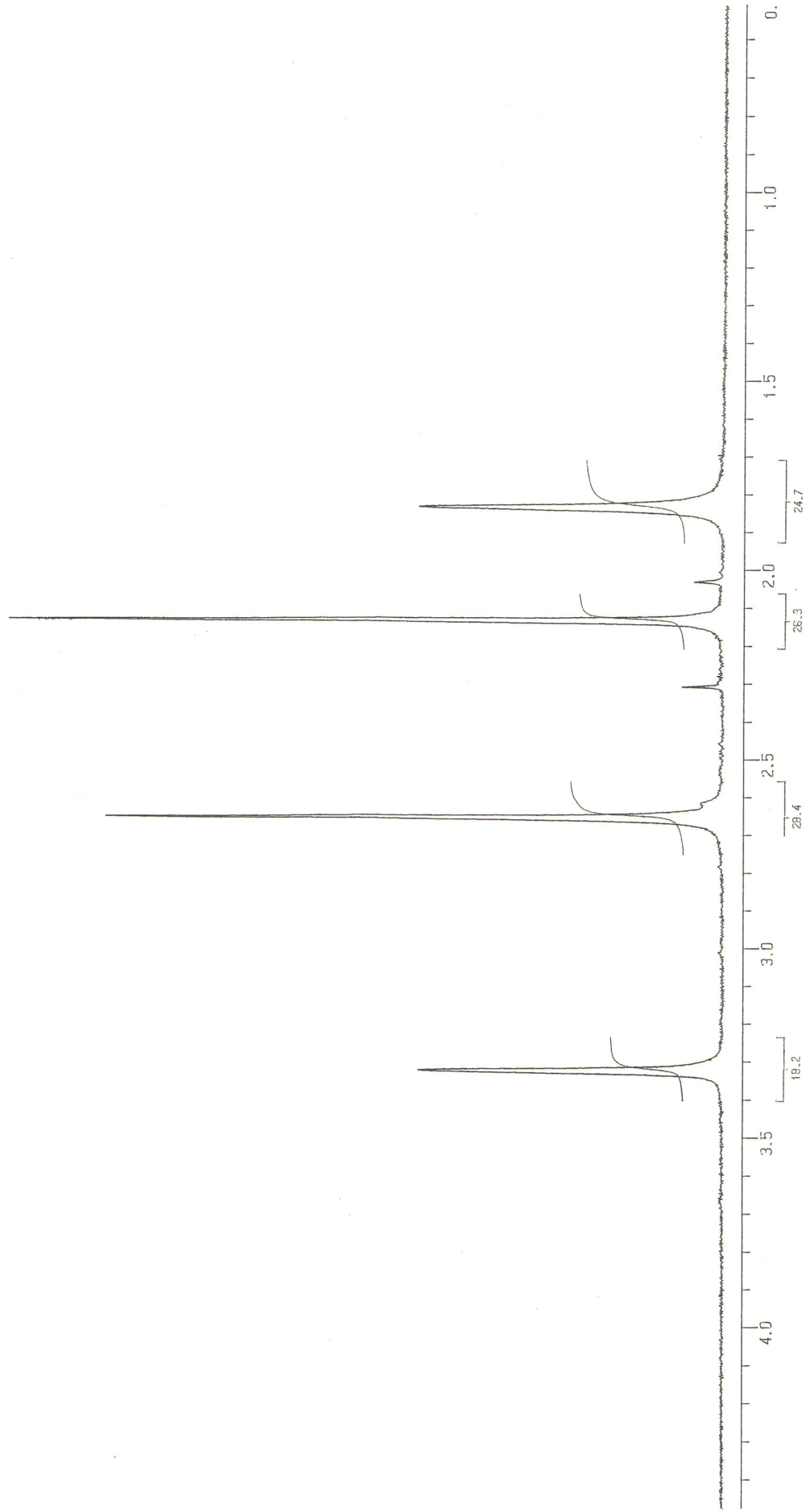


Слика Пб.  $^1\text{H}$  NMR спектар једињења HDMSPI у DMSO-d6.

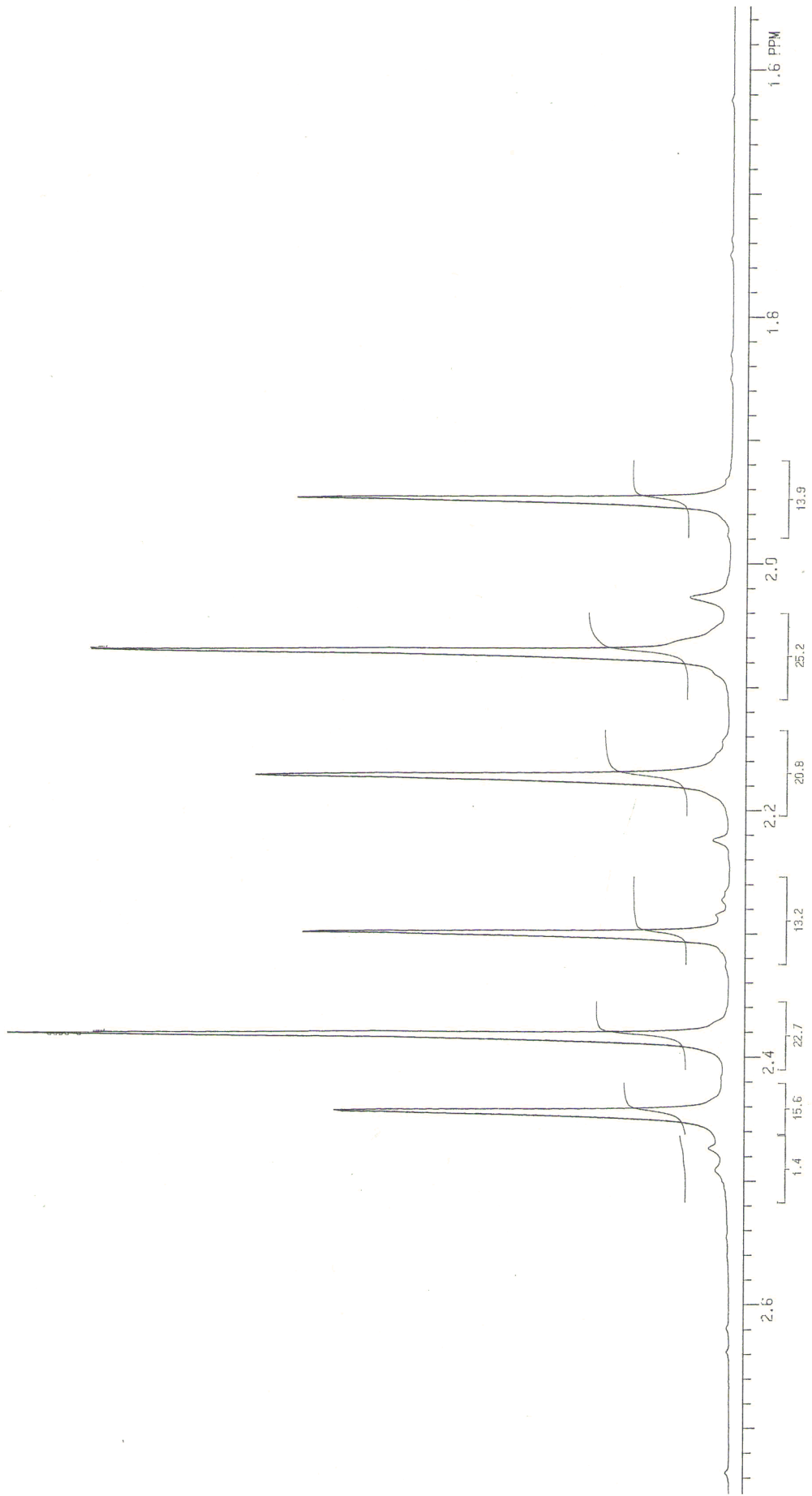




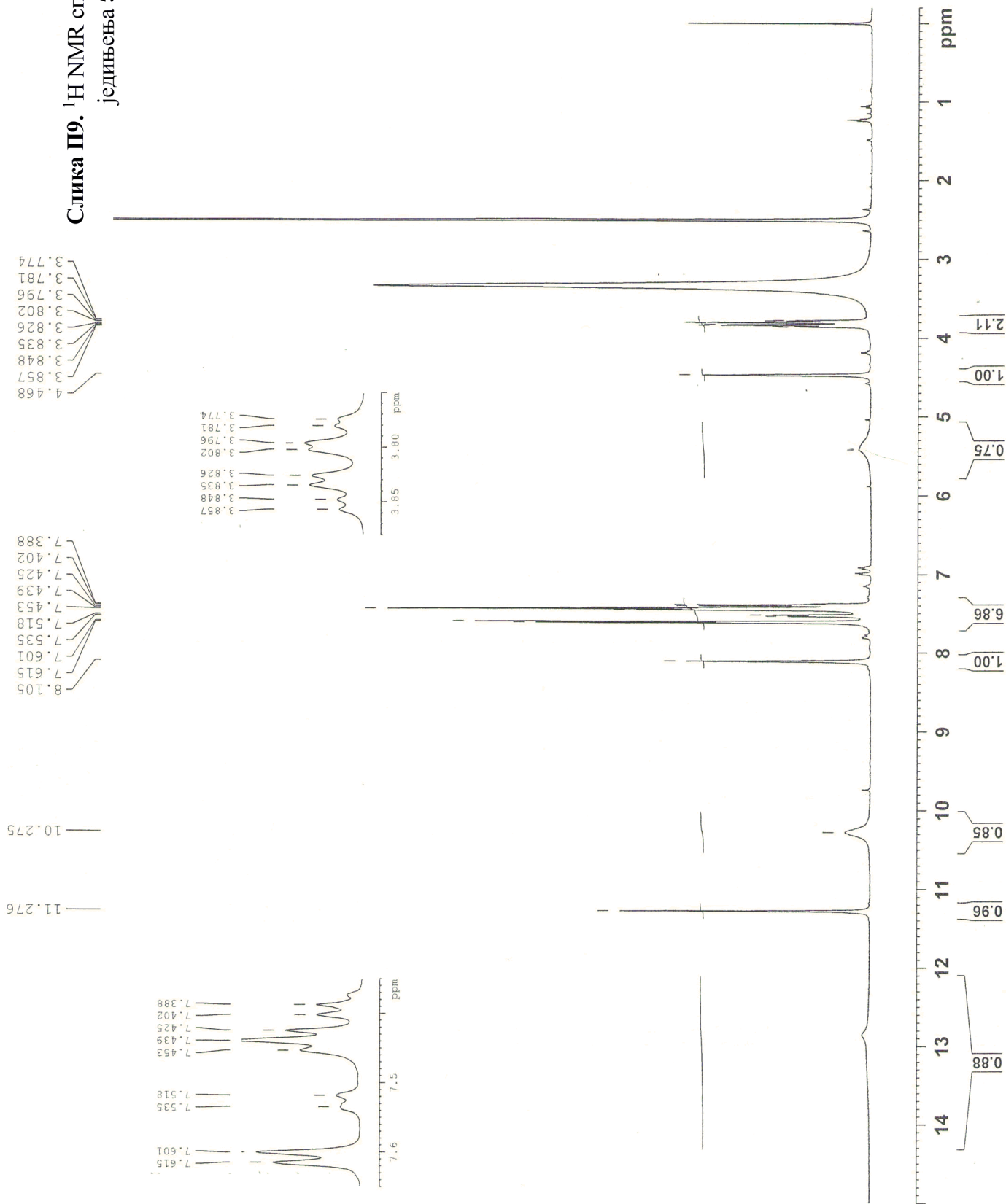
Слика П7.  $^1\text{H}$  NMR спектар једињења  $\text{HDMSP1}$  у  $\text{D}_2\text{O}$ .



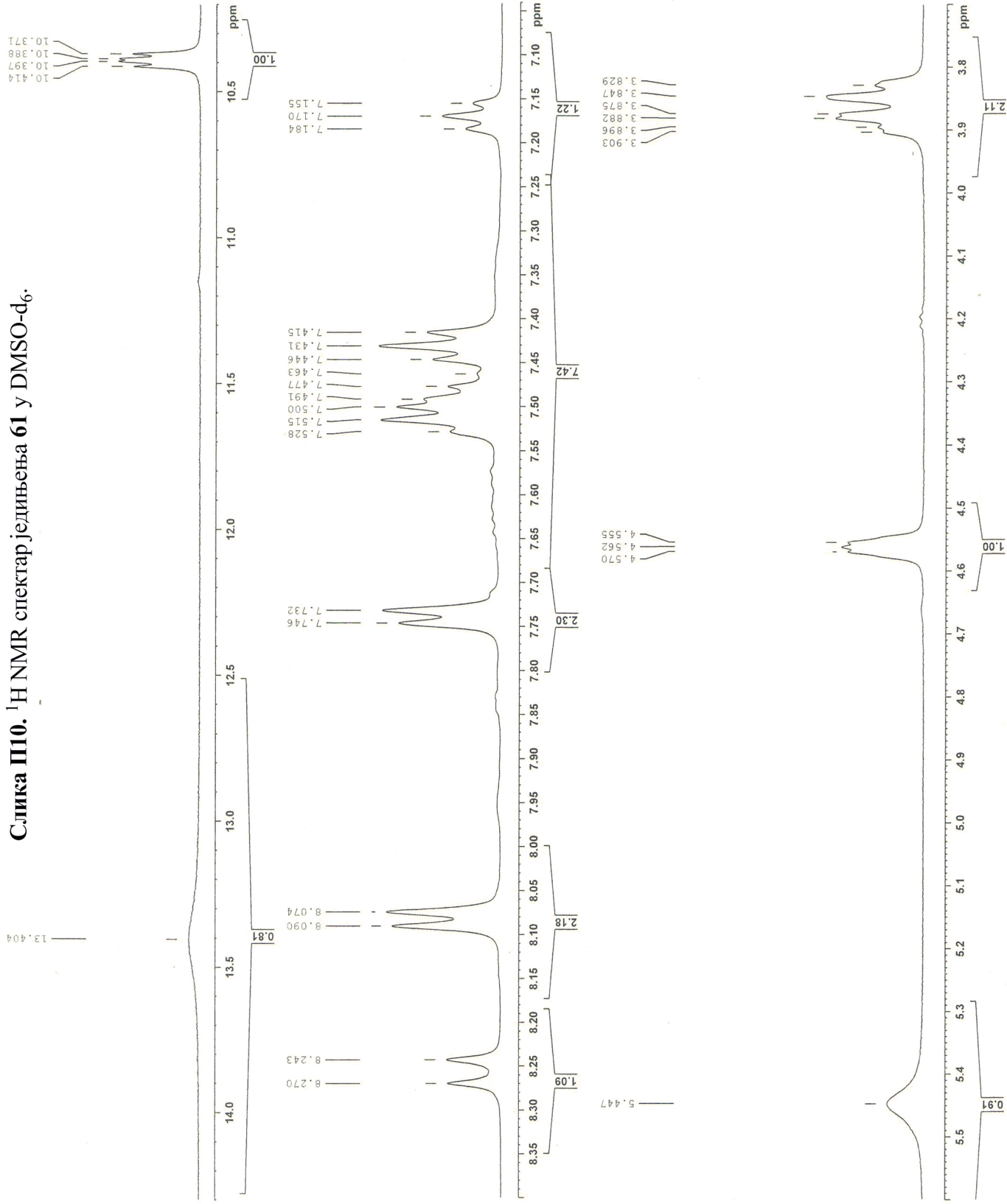
Слика П8.  $^1\text{H}$  NMR спектар једињења HDMSPI у  $\text{D}_2\text{O}$  при  $\text{pD} = 9,5$ .



Слика П9.  $^1\text{H}$  NMR спектар  
једињења 53 у DMSO-d6.



Слика П10.  $^1\text{H}$  NMR спектар једињења 61 у  $\text{DMSO-d}_6$ .



**6.2. Публиковани научни radovi u kojima su prezentovani rezultati  
doktorske disertacije**



Milan D. Joksović,<sup>a\*</sup> Gordana Bogdanović,<sup>b</sup> Vesna Kojić,<sup>b</sup>  
Katalin Mészáros Szécsényi,<sup>c</sup> Vukadin M. Leovac,<sup>c</sup> Dimitar Jakimov,<sup>b</sup>  
Snežana Trifunović,<sup>d</sup> Violeta Marković,<sup>a</sup> and Ljubinka Joksović<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>b</sup>Institute of Oncology Sremska Kamenica, Institutski put 4, 21204 Sremska Kamenica, Serbia

<sup>c</sup>Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, 21000 Novi Sad, Serbia

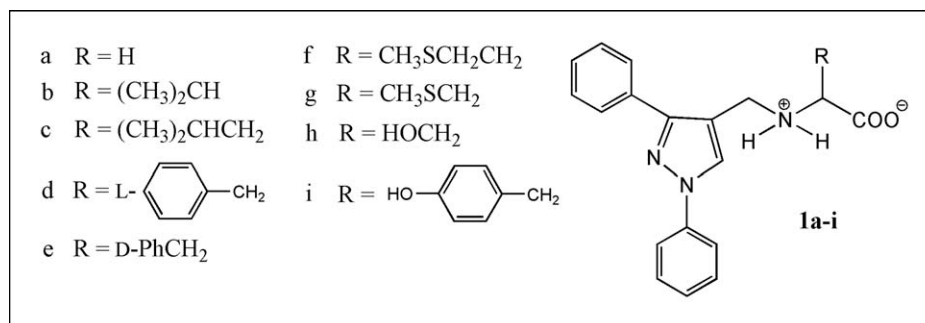
<sup>d</sup>Faculty of Chemistry, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia

\*E-mail: mjoksovic@kg.ac.rs

Received October 19, 2009

DOI 10.1002/jhet.400

Published online 8 June 2010 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).



New *N*-[(1,3-diphenylpyrazol-4-yl)methyl] $\alpha$ -amino acids (**1a-i**) have been synthesized and tested *in vitro* for their antiproliferative activity against human myelogenous leukemia K562, colon adenocarcinoma HT-29, cervix carcinoma HeLa, and normal fetal lung fibroblasts, MRC-5. Compounds derived from both phenylalanine enantiomer precursors appeared to be the most active against myelogenous leukemia K562 cell lines with a high cytotoxic potential.

*J. Heterocyclic Chem.*, **47**, 850 (2010).

## INTRODUCTION

Arylpyrazole derivatives play an important role in biologically active compounds and therefore represent an interesting template for medicinal chemistry. These compounds displayed diverse biological properties such as antiparasitic [1], antifungal [2], antibacterial [3], and antidiabetic [4]. Moreover, arylpyrazole derivatives have shown several biological activities as seen in cyclooxygenase-2 [5], p38 MAP kinase [6], and nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors [7]. In the research for antitumor agents, arylpyrazole derivatives exhibited promising antiproliferative properties against several kinds of human tumor cell lines [8–10].

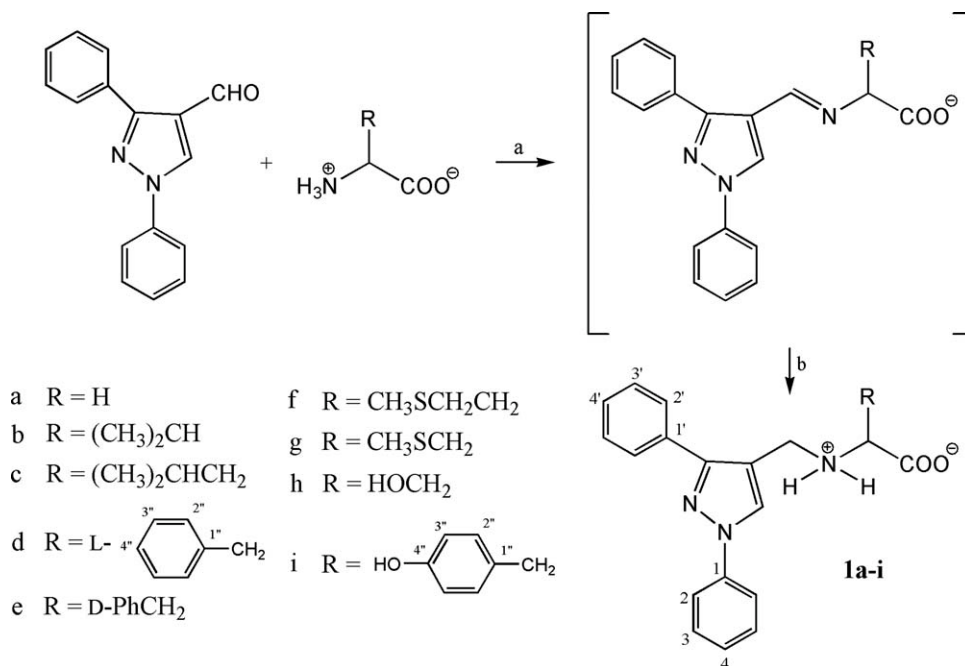
The cytotoxic drugs, such as doxorubicin, 5-fluorouracil, and camptothecins, can damage DNA or affect cellular metabolic pathways causing indirect block of the cell cycle. Unfortunately, these agents produce an irreversible damage to both normal and tumor cells, resulting in a significant toxicity and side effects [11–13]. In this respect, it is desirable to synthesize new highly specific antitumor agents with comparable efficacy and reduced toxicity than the currently available drugs. In

view of these observations and as a continuation of our interest toward synthesis and biological activity of arylpyrazole derivatives [14,15], some new *N*-[(1,3-diphenylpyrazol-4-yl)methyl]  $\alpha$ -amino acids were prepared with the aim to have promising antiproliferative properties against several kinds of human tumor cell lines.

## RESULTS AND DISCUSSION

In this work, condensation of the optically active L- and D-amino acids (except **1a**) with 1,3-diphenylpyrazole-4-carboxaldehyde in the presence of NaOH led to the formation of Schiff base intermediates. As  $\alpha$ -amino acids are sparingly soluble in alcoholic solvents, the Schiff base formation takes long time, and the reaction gives lower yields even under reflux conditions. Thus, the condensation reaction was accelerated using solventless method [16] combining aldehyde,  $\alpha$ -amino acids, and NaOH in a porcelain mortar with pestle and aggregating the dry solid mixture until a white powder was formed. The condensation was completed by an additional heating at reflux for 2 h in dry methanol (Scheme 1).

**Scheme 1.** Reagents and conditions: (a) NaOH, continuous aggregating at rt, then MeOH, reflux, 2 h; (b) NaBH<sub>4</sub>, 0–5°C, then rt, 12 h, AcOH.



The stability of the formed Schiff base products depends on several factors such as amino acid side chain polarity [17], the metal, pH, solvent, and temperature [18]. The problem with Schiff base instability can be overcome by their reduction to give a more flexible amine and not constrained compounds. In the light of these facts, we have performed out the reduction with an excess of NaBH<sub>4</sub> without isolation of Schiff base to afford the novel *N*-[(1,3-diphenylpyrazol-4-yl)methyl]  $\alpha$ -amino acids.

The structures of the new compounds were confirmed using different spectral data (IR, <sup>1</sup>H, and <sup>13</sup>C NMR) and elemental analysis. The IR spectra revealed the presence of NH<sub>2</sub><sup>+</sup> stretching frequencies between 2650 and 2300 cm<sup>-1</sup> in the form of broad band with multiple peaks on the low frequency wing, which continue until about 2200 cm<sup>-1</sup>, confirming their zwitterionic nature. The  $\nu_{as}$  (COO) was related to the strong absorption band appearing in the spectra between 1619 and 1601 cm<sup>-1</sup>, whereas the symmetric carboxylate stretches  $\nu_s$  (COO) correspond to the medium–strong peaks about 1410 cm<sup>-1</sup> [19]. The other characteristic very strong absorption bands in the IR spectra were those attributed to the pyrazole ring:  $\nu$  (C=C) and  $\nu$  (C=N) between 1601 and 1547 cm<sup>-1</sup> as well as  $\delta$  (C=C) about 1505 cm<sup>-1</sup> [20].

The <sup>1</sup>H NMR spectra of all compounds exhibited a characteristic AB system except **1a** and ABX system for **1d**, **1e**, **1g**, **1h**, and **1i**. The <sup>1</sup>H NMR spectra revealed

the presence of characteristic singlet peak attributed to pyrazole ring proton appeared between 7.97 and 8.67 depending on the applied solvent system. The complete assignment of all reported signals (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C) in the experimental part was carried out by means of 1D and 2D homo- and heteronuclear correlated NMR spectroscopy.

The newly synthesized compounds **1a-i** were evaluated *in vitro* for their antiproliferative activity against human myelogenous leukemia K562, colon adenocarcinoma HT-29, cervix carcinoma HeLa, and normal fetal lung fibroblasts, MRC-5 using sulforhodamine B (SRB) assay [21] and doxorubicin (Dox) as reference drug. The results are presented in Table 1.

The malignant cell line K562 was the most sensitive, where the pronounced cytotoxicity was achieved by seven of nine tested samples. The compounds with benzyl group **1d** and **1e** showed the most potent cytotoxic activity against human myelogenous leukemia K562 cell lines. The replacement of the benzyl group in **1d** by a hydrophobic isobutyl group leading to **1c** would retain potential hydrophobic bonding while creating spatial property differences between the benzyl and isobutyl group. The comparison of the cytotoxicity of **1d** or **1e** with **1c** indicates that **1d** and **1e** are more active in inhibition of these cells. When the side chain was replaced with an isopropyl group **1b**, a complete inactivity against K562 was observed. The moderate activity was achieved when an additional heteroatom was



**Table 1**  
*In vitro* cytotoxicity of compounds **1a–i**.

Compounds	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>			
	K562	HeLa	HT29	MRC-5
<b>1a</b>	8.89	>100	>100	>100
<b>1b</b>	>100	9.21	>100	>100
<b>1c</b>	4.17	>100	72.31	>100
<b>1d</b>	1.02	14.43	8.31	>100
<b>1e</b>	0.97	11.97	6.45	>100
<b>1f</b>	6.37	>100	>100	>100
<b>1g</b>	>100	7.64	>100	>100
<b>1h</b>	4.69	96.34	>100	>100
<b>1i</b>	3.25	>100	67.32	>100
Dox	0.36	1.17	0.51	0.32

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> is the concentration of compound required to inhibit the cell growth by 50% compared to an untreated control.

incorporated into the side chain **1f**. These differences in cytotoxicity could be related to their conformation and size of the substitutes. The bulky isopropyl group **1b** and voluminous sulfur atom **1g** closely to aminocarboxylate skeleton induce the decrease of cytotoxic activity, probably preventing the formation of intermolecular interaction with cell receptors. Comparison of the cytotoxicity of compounds derived from different enantiomers of phenylalanine indicates that D-phenylalanine demonstrated similar activity with respect to L-phenylalanine analog. We could also suggest that **1d** and **1e** are the most cytotoxic compounds because of their planarity and hydrophobic properties. These results indicate that spatial effects and side chain length should be an important factor in the design of future molecules. It is interesting to note that the compounds **1h** and **1i** having polar hydroxyl groups proved to be less active than **1d** and **1e**, suggesting that electronic character could be diminished in comparison with hydrophobic requirements of amino acid part of molecule. Compounds **1g** and **1e** were also active against HeLa and HT29 cell lines, respectively, but their activity was significantly lower compared with doxorubicin. On the other hand, all compounds were devoid of any cytotoxicity against the normal fetal lung fibroblasts MRC-5. Generally, the hydrophobic character and steric effects in amino acid moiety appear to be the main factors for the growth suppressing potential against K562 cell lines. Further modification of carboxylate group and identification of its molecular target, is under investigation.

**Thermal analysis.** Thermal analysis of pharmaceutical compounds is a very reliable method for purity control, and it is a necessary part of the characterization of new compounds with potential bioactivity [22,23]. As amino acid–water–protein interface interactions are very

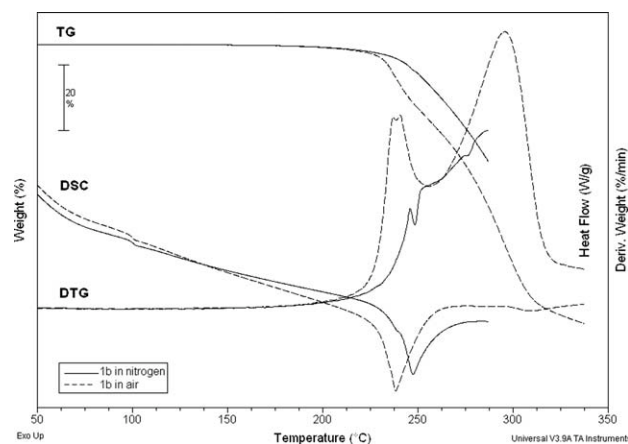
important in biological systems [24]; the thermal properties of these new amino acid derivatives may be of special interest.

In the series of nine new compounds, two of them are pure N-substituted amino acids, whereas the others crystallize with different number of water molecules.

Thermal measurements reveal that the stability of N-substituted amino acids **1a** and **1b** is rather high in both atmospheres (in N<sub>2</sub> 200 and 205°C, respectively). Most probably as a consequence of some sensitivity toward oxidation, in air the thermal stability of the compounds is somewhat less. The decomposition mechanism in inert and oxidative atmosphere also differs (see Fig. 1).

The dehydration pattern of the hydrates does not depend on the atmosphere. The dehydrated compounds **1c**, **1g**, **1h**, and **1i** are stable to above 200°C, with the previous remark: their stability in air is less with about 5°C. Compounds **1d**, **1e**, and **1f** decompose further after dehydration, without giving a stable anhydrous intermediate.

The decomposition of all samples was accompanied by melting, observed visually. The decomposition mechanism of the first decomposition step of dry compounds is proposed only on the basis of the mass loss. The fragmentation begins with that of the side chain, *e.g.*, the mass loss to the minimum in DTG curve of **1a** amounts 14.5% in N<sub>2</sub> that agrees well with the loss of CO<sub>2</sub> molecule (calcd. 14.32%). The valine **1b** derivative most probably decomposes by the loss of the methyl groups. However, it is pointless to give a decomposition mechanism in lack of coupled measurements. It is more important to have a closer look to the dehydration process of the hydrates from both the theoretical and practical point of view. The mass loss with the corresponding temperature of the dehydration is given in Table 2 together with the decomposition temperature of the anhydrous compound.



**Figure 1.** Thermal decomposition curves of **1b** in air and nitrogen.

Table 2

Mass loss of the dehydration, the dehydration temperature, and the onset temperature of the decomposition of the anhydrous compound in N<sub>2</sub>.

Compound	Dehydration, $\Delta m$ (%)		$t_{\text{DEHYD.}}$ (°C)	$t_{\text{DECOMP.}}$ (°C)	Comments
	Exp.	Calcd.			
<b>1c</b>	4.2	4.72	<105	215	Stable anhydrous compound
<b>1d, 1e</b>	7.3	8.31	<130	–	Stepwise dehydration, continuous decomposition
<b>1f</b>	10.4	10.17	<135	–	Stepwise dehydration, continuous decomposition
<b>1g</b>	1.3	4.67	<50	203	Crystal water
<b>1h</b>	2.2	5.34	<150	225	Structural water
<b>1i</b>	0.5	4.36	<30	235	Loosely bond crystal water

As the decomposition of the compounds **1d**, **1e**, and **1f** is continuous to obtain better separated decomposition steps, quasi-isothermal [25] (SWI) measurement was carried out. Figure 2 illustrates SWI curve of the compound **1f**. The five water molecules evaporate to 150°C (exp. 15.8%, calcd. 16.95%) in five clearly distinguished steps, not one by one, but through a complex process governed by macroscopic properties of the sample (*e.g.*, the rate of the diffusion) as well as by their different bonding energy. The dehydration of this compound is most probable followed by the evaporation of CH<sub>3</sub>COOH molecule. The difference in experimentally determined mass loss and the theoretical one is most probable because of the evaporation of the crystal water at room temperature. The dehydration of **1d** and **1e** derivatives shows similar complexity of the dehydration. Derivative **1h**, according to elemental analysis data, contains both crystal and structural water, belonging to more than one molecule. By TA only the structural water is detected, because in air the compound lost its crystal water completely. Compound **1i** has some crystal water left, while most of it has evaporated during the storage time.

Taking into account the importance of the interactions in the relation of amino acid–water–protein, the cytotoxicity of the compounds might be related to H-bond-forming capability in the molecules. This, indirectly, may be investigated using TA data of hydrates. However, the correlation is not straightforward. TA data may refer only to the preferences of an amino acid to bind water molecules and the strength of the bond between them [26].

## CONCLUSIONS

In summary, a new class of *N*-[(1,3-diphenylpyrazol-4-yl)methyl]  $\alpha$ -amino acids were synthesized, and their antiproliferative activity against human myelogenous leukemia K562, colon adenocarcinoma HT-29, cervix carcinoma HeLa, and normal fetal lung fibroblasts, MRC-5 was evaluated. The nature, spatial effects and

the distance of bulky substitutes from aminocarboxylate part of molecule appeared to play an important role in antiproliferative activity against different malignant cell lines. The dehydration temperature is related to the water bond energy and might be connected with the active sites of some bioactive molecules.

## EXPERIMENTAL

All chemicals were obtained from commercial sources (Aldrich) and used as supplied. 1,3-Diphenylpyrazole-4-carboxaldehyde was synthesized by Vilsmeier-Haack reaction [27].

Melting points were determined on a Mel-Temp capillary melting points apparatus, model 1001, and are uncorrected. Optical rotations were measured on a Rudolph Research Analytical automatic polarimeter Autopol IV. Elemental (C, H, N, and S) analysis of the samples was carried out by standard micromethods in the Center for Instrumental Analysis, Faculty of Chemistry, Belgrade. IR spectra were recorded on a Perkin Elmer Spectrum One FTIR spectrometer with a KBr disc. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on a Varian Gemini 200 (200 MHz) and a Bruker Avance III spectrometer operating at 500 MHz. As a consequence of the poor solubility in DMSO-*d*<sub>6</sub>, the NMR spectra were recorded in pyridine-*d*<sub>5</sub>/D<sub>2</sub>O and NaOD/D<sub>2</sub>O solvent system for **1h** and **1i**. Thermal measurements were conducted using SDT Q600 TA Instruments'

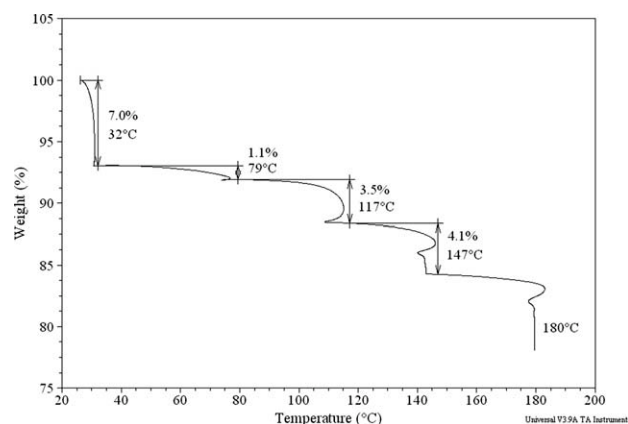


Figure 2. SWI decomposition curve of **1g**, illustrating the complexity of its dehydration.

thermal analyzer with about 2 mg sample masses and a heating rate of 20°C/min in air and nitrogen atmospheres. The sample holder and the reference cells were made of alumina.

**General procedure for the preparation of 1a–i.** 1,3-Diphenylpyrazole-4-carboxaldehyde (0.62 g, 2.5 mmol),  $\alpha$ -amino acid (2.75 mmol), and NaOH (0.11 g, 2.75 mmol, for **1i** 0.22g, 5.50 mmol) were milled using a porcelain mortar and pestle to obtain a homogenous white powder until the release of water was observed. This mixture was transferred into 50 cm<sup>3</sup> of dry methanol and heated to reflux for 2 h. After cooling in an ice bath, sodium borohydride (0.11 g, 3 mmol) was added in several portions with stirring. The solution was stirred for additional 2 h at room temperature, then diluted with 50 cm<sup>3</sup> of deionized water, and left for 12 h, after which time the white precipitate had formed by addition of glacial acetic acid. The crude product was purified by dissolving in 1M NaOH and precipitation with glacial acetic acid. Recrystallized compound was collected by filtration, washed with plenty of water, and dried over anhydrous CaCl<sub>2</sub>.

***N*-[(1,3-Diphenylpyrazol-4-yl)methyl]glycine (1a).** White powder; yield: 0.56 g (73%); mp 190–191°C (Dec.); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3063  $\nu$  (C–H)<sub>Ar</sub>, 2960 and 2820  $\nu$  (C–H)<sub>Al</sub>, 2650–2400  $\nu$  (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 1626  $\nu_{as}$  (COO<sup>-</sup>), 1601  $\nu$  (C=C)<sub>Ar</sub>, 1547  $\nu$  (C=N)<sub>Ar</sub>, 1502  $\delta$  (C=C)<sub>Ar</sub>, 1453  $\delta$  (C=N)<sub>Ar</sub>, 1412  $\nu_s$  (COO<sup>-</sup>), 1066  $\delta$  (C–H)<sub>ip</sub>, 758  $\delta$  (C–H)<sub>oop</sub>; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>/D<sub>2</sub>O, 9/1 v/v): 4.19 (s, 2H, CH<sub>2</sub>–COO), 4.74 (s, 2H, Pz–CH<sub>2</sub>), 7.40–7.71 (m, 6H, 1H at C-4, 1H at C-4', 2H at C-3/5, and 2H at C-3'/5'), 7.97 (d, 2H at C-2/6, *J* = 8.00 Hz), 8.00 (d, 2H at C-2'/6', *J* = 8.00 Hz), 8.94 (s, 1H, Pz); <sup>13</sup>C NMR (pyridine-*d*<sub>5</sub>/D<sub>2</sub>O, 9/1 v/v): 41.87 (Pz–CH<sub>2</sub>), 50.13 (CH<sub>2</sub>–COO), 113.09 (C-4, Pz), 119.15 (C-2/6), 127.31 (C-4), 128.66 (C-2'/6'), 129.08 (C-4'), 129.46 (C-3'/5'), 130.02 (C-3/5), 130.40 (C-5, Pz), 132.42 (C-1'), 139.72 (C-3, Pz), 152.50 (C-1), 170.83 (COO); Anal. Calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (307.35 g/mol): C, 70.34; H, 5.58; N, 13.67; Found: C, 70.12; H, 5.62; N, 13.55.

***N*-[(1,3-Diphenylpyrazol-4-yl)methyl]-L-valine (1b).** White powder; yield: 0.72 g (82%); mp 198°C (Dec.); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +12.77 (*c* = 1.096 × 10<sup>-3</sup> g/cm<sup>3</sup>, pyridine/H<sub>2</sub>O, 9/1 v/v); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3059  $\nu$  (C–H)<sub>Ar</sub>, 2965 and 2876  $\nu$  (C–H)<sub>Al</sub>, 2600–2400  $\nu$  (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 1614  $\nu_{as}$  (COO<sup>-</sup>), 1600  $\nu$  (C=C)<sub>Ar</sub>, 1550  $\nu$  (C=N)<sub>Ar</sub>, 1504  $\delta$  (C=C)<sub>Ar</sub>, 1451  $\delta$  (C=N)<sub>Ar</sub>, 1411  $\nu_s$  (COO<sup>-</sup>), 1069  $\delta$  (C–H)<sub>ip</sub>, 756  $\delta$  (C–H)<sub>oop</sub>; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>/D<sub>2</sub>O, 9/1 v/v): 1.16 (d, 3H, *J* = 6.62 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.19 (d, 3H, *J* = 6.56 Hz, CH<sub>3</sub>), 2.31 (m, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 3.55 (d, 1H, *J* = 5.46 Hz, CH–COO),  $\delta_A$  = 4.31 and  $\delta_B$  = 4.01 (AB system, 2H, *J*<sub>AB</sub> = 13.50 Hz, Pz–CH<sub>2</sub>), 7.33–7.62 (m, 6H, 1H at C-4, 1H at C-4', 2H at C-3/5, and 2H at C-3'/5'), 8.02 (d, 2H at C-2/6, *J* = 8.00 Hz), 8.36 (d, 2H at C-2'/6', *J* = 8.00 Hz), 8.55 (s, 1H, Pz); <sup>13</sup>C NMR (pyridine-*d*<sub>5</sub>/D<sub>2</sub>O, 9/1 v/v): 18.81 (CH<sub>3</sub>), 19.95 (CH<sub>3</sub>), 31.78 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 43.25 (Pz–CH<sub>2</sub>), 67.49 (CH–COO), 118.80 (C-2/6), 120.14 (C-4, Pz), 126.46 (C-4), 128.33 (C-4'), 128.56 (C-2'/6'), 128.98 (C-3'/5'), 129.14 (C-5, Pz), 129.85 (C-3/5), 134.13 (C-1'), 140.46 (C-3, Pz), 151.93 (C-1), 177.01 (COO); Anal. Calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (349.43 g/mol): C, 72.18; H, 6.63; N, 12.03; Found: C, 72.02; H, 6.68; N, 11.86.

***N*-[(1,3-Diphenylpyrazol-4-yl)methyl]-L-leucine monohydrate (1c).** White powder; yield: 0.82 g (86%); mp 184°C (Dec.); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -6.09 (*c* = 1.313 × 10<sup>-3</sup> g/cm<sup>3</sup>, pyridine/H<sub>2</sub>O, 9/1 v/v); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3065  $\nu$  (C–H)<sub>Ar</sub>, 2956 and 2869  $\nu$  (C–H)<sub>Al</sub>, 2550–2300  $\nu$  (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 1612  $\nu_{as}$  (COO<sup>-</sup>), 1600

$\nu$  (C=C)<sub>Ar</sub>, 1560  $\nu$  (C=N)<sub>Ar</sub>, 1503  $\delta$  (C=C)<sub>Ar</sub>, 1454  $\delta$  (C=N)<sub>Ar</sub>, 1412  $\nu_s$  (COO<sup>-</sup>), 1076  $\delta$  (C–H)<sub>ip</sub>, 755  $\delta$  (C–H)<sub>oop</sub>; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>/D<sub>2</sub>O, 9/1 v/v): 0.92 (d, 3H, *J* = 6.72 Hz, CH<sub>3</sub>), 0.96 (d, 3H, *J* = 6.74 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.89 (m, 2H, CH–CH<sub>2</sub>–CH), 2.16 (m, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 3.87 and 3.90 (2d, 1H, *J* = 6.36 Hz and *J* = 6.60 Hz, NH–CH–COO),  $\delta_A$  = 4.42 and  $\delta_B$  = 4.15 (AB system, 2H, *J*<sub>AB</sub> = 13.50 Hz, Pz–CH<sub>2</sub>), 7.32–7.61 (m, 6H, 1H at C-4, 1H at C-4', 2H at C-3/5, and 2H at C-3'/5'), 8.03 (d, 2H at C-2/6, *J* = 8.00 Hz), 8.36 (d, 2H at C-2'/6', *J* = 8.00 Hz), 8.67 (s, 1H, Pz); <sup>13</sup>C NMR (pyridine-*d*<sub>5</sub>/D<sub>2</sub>O, 9/1 v/v): 21.17 (CH<sub>3</sub>), 21.94 (CH<sub>3</sub>), 24.14 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 41.38 (CH–CH<sub>2</sub>–CH), 41.62 (Pz–CH<sub>2</sub>), 59.50 (CH–COO), 117.67 (C-2/6), 118.20 (C-4, Pz), 125.36 (C-4), 127.23 (C-4'), 127.43 (C-2'/6'), 127.67 (C-3'/5'), 128.22 (C-5, Pz), 128.71 (C-3/5), 132.66 (C-1'), 139.28 (C-3, Pz), 150.78 (C-1), 176.47 (COO); Anal. Calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (381.48 g/mol): C, 69.27; H, 7.13; N, 11.02; Found: C, 68.99; H, 7.21; N, 10.89.

***N*-[(1,3-Diphenylpyrazol-4-yl)methyl]-L-phenylalanine dihydrate (1d).** White powder; yield: 0.95 g (88%); mp 185–186°C (Dec.); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -1.82 (*c* = 1.100 × 10<sup>-3</sup> g/cm<sup>3</sup>, pyridine/H<sub>2</sub>O, 9/1 v/v); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3062  $\nu$  (C–H)<sub>Ar</sub>, 2972 and 2853  $\nu$  (C–H)<sub>Al</sub>, 2620–2380  $\nu$  (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 1619  $\nu_{as}$  (COO<sup>-</sup>), 1599  $\nu$  (C=C)<sub>Ar</sub>, 1553  $\nu$  (C=N)<sub>Ar</sub>, 1503  $\delta$  (C=C)<sub>Ar</sub>, 1453  $\delta$  (C=N)<sub>Ar</sub>, 1412  $\nu_s$  (COO<sup>-</sup>), 1072  $\delta$  (C–H)<sub>ip</sub>, 754  $\delta$  (C–H)<sub>oop</sub>; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>/D<sub>2</sub>O, 9/1 v/v):  $\delta_A$  = 3.42,  $\delta_B$  = 3.21, and  $\delta_X$  = 4.04 (ABX system, 3H, *J*<sub>AB</sub> = 13.59 Hz, *J*<sub>AX</sub> = 5.15 Hz, *J*<sub>BX</sub> = 8.26 Hz, CH–CH<sub>2</sub>),  $\delta_A$  = 4.29 and  $\delta_B$  = 3.99 (AB system, 2H, *J*<sub>AB</sub> = 13.50 Hz, Pz–CH<sub>2</sub>), 7.28–7.62 (m, 11H, Ar–H), 7.93 (d, 2H at C-2/6, *J* = 8.00 Hz), 8.20 (d, 2H at C-2'/6', *J* = 8.00 Hz), 8.29 (s, 1H, Pz); <sup>13</sup>C NMR (pyridine-*d*<sub>5</sub>/D<sub>2</sub>O, 9/1 v/v): 40.10 (Ph–CH<sub>2</sub>), 42.88 (Pz–CH<sub>2</sub>), 63.30 (CH–COO), 118.77 (C-2/6), 120.66 (C-4, Pz), 126.36 (C-4''), 126.78 (C-4), 128.19 (C-4'), 128.50 (C-2'/6'), 128.69 (C-3''/5''), 128.75 (C-5, Pz), 128.96 (C-3'/5'), 129.78 (C-3/5), 130.05 (C-2''/6''), 134.18 (C-1'), 139.35 (C-1''), 140.48 (C-3, Pz), 151.76 (C-1), 176.98 (COO); Anal. Calcd. for C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (433.51 g/mol): C, 69.27; H, 6.28; N, 9.69; Found: C, 69.51; H, 6.31; N, 9.74.

***N*-[(1,3-Diphenylpyrazol-4-yl)methyl]-D-phenylalanine dihydrate (1e).** Yield: 0.93 g (86%); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +1.82 (*c* = 1.100 × 10<sup>-3</sup> g/cm<sup>3</sup>, pyridine/H<sub>2</sub>O, 9/1 v/v).

***N*-[(1,3-Diphenylpyrazol-4-yl)methyl]-L-methionine acetate pentahydrate (1f).** White powder; yield: 1.18 g (89%); mp 185–186°C (Dec.); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -6.94 (*c* = 1.296 × 10<sup>-3</sup> g/cm<sup>3</sup>, pyridine/H<sub>2</sub>O, 9/1 v/v); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3291  $\nu$  (O–H, broad), 3060  $\nu$  (C–H)<sub>Ar</sub>, 2916 and 2853  $\nu$  (C–H)<sub>Al</sub>, 2600–2440  $\nu$  (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 1681  $\nu$  (C=O), 1607  $\nu_{as}$  (COO<sup>-</sup>), 1598  $\nu$  (C=C)<sub>Ar</sub>, 1558  $\nu$  (C=N)<sub>Ar</sub>, 1504  $\delta$  (C=C)<sub>Ar</sub>, 1452  $\delta$  (C=N)<sub>Ar</sub>, 1412  $\nu_s$  (COO<sup>-</sup>), 1067  $\delta$  (C–H)<sub>ip</sub>, 756  $\delta$  (C–H)<sub>oop</sub>; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>/D<sub>2</sub>O, 9/1 v/v): 2.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>–S), 2.43 (s, 3H, CH<sub>3</sub>–COO), 2.53 (m, 2H, CH–CH<sub>2</sub>), 3.00 (t, 2H, *J* = 6.09 Hz, CH<sub>2</sub>–S); 4.13 (t, 1H, *J* = 5.60 Hz, CH–CH<sub>2</sub>),  $\delta_A$  = 4.58 and  $\delta_B$  = 4.35 (AB system, 2H, *J*<sub>AB</sub> = 13.50 Hz, Pz–CH<sub>2</sub>), 7.36–7.70 (m, 6H, 1H at C-4, 1H at C-4', 2H at C-3/5, and 2H at C-3'/5'), 8.03 (d, 2H at C-2/6, *J* = 8.00 Hz), 8.21 (d, 2H at C-2'/6', *J* = 7.52 Hz); 8.66 (s, 1H, Pz); <sup>13</sup>C NMR (pyridine-*d*<sub>5</sub>/D<sub>2</sub>O, 9/1 v/v): 14.92 (CH<sub>3</sub>–S), 23.38 (CH<sub>3</sub>–COO), 30.91 (S–CH<sub>2</sub>), 32.70 (S–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>), 42.28 (Pz–CH<sub>2</sub>), 62.92 (CH–COO), 117.35 (C-4, Pz), 118.95 (C-2/6), 126.74 (C-4), 128.59 (C-2'/6'), 128.64 (C-4'), 129.18

(C-3'/5'), 129.90 (C-3/5), 130.05 (C-5, Pz), 133.35 (C-1'), 140.11 (C-3, Pz), 152.10 (C-1), 177.02 (COO), 177.39 (CH<sub>3</sub>-COO); Anal. Calcd. for C<sub>23</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S (531.63 g/mol): C, 51.96; H, 7.02; N, 7.90; S, 6.03; Found: C, 51.86; H, 6.94; N, 7.82; S, 5.93.

***N*-[(1,3-Diphenylpyrazol-4-yl)methyl]-*S*-methyl-*L*-cysteine monohydrate (Ig).** White powder; yield: 0.88 g (92%); mp 187°C (Dec.);  $[\alpha]_D^{20} = -11.04$  ( $c = 1.177 \times 10^{-3}$  g/cm<sup>3</sup>, pyridine/H<sub>2</sub>O, 9/1 v/v); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3051  $\nu$  (C-H)<sub>Ar</sub>, 2923 and 2853  $\nu$  (C-H)<sub>Al</sub>, 2601–2388  $\nu$  (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 1628  $\nu_{as}$  (COO<sup>-</sup>), 1599  $\nu$  (C=C)<sub>Ar</sub>, 1549  $\nu$  (C=N)<sub>Ar</sub>, 1504  $\delta$  (C=C)<sub>Ar</sub>, 1451  $\delta$  (C=N)<sub>Ar</sub>, 1413  $\nu_s$  (COO<sup>-</sup>), 1067  $\delta$  (C-H)<sub>ip</sub>, 757  $\delta$  (C-H)<sub>oop</sub>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>/D<sub>2</sub>O, 9/1 v/v): 2.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-S),  $\delta_A = 3.25$ ,  $\delta_B = 3.16$ , and  $\delta_X = 4.01$  (ABX system, 3H,  $J_{AB} = 13.50$  Hz,  $J_{AX} = 5.73$  Hz,  $J_{BX} = 7.27$  Hz, CH-CH<sub>2</sub>),  $\delta_A = 4.34$  and  $\delta_B = 4.14$  (AB system, 2H,  $J_{AB} = 13.50$  Hz, Pz-CH<sub>2</sub>), 7.29 (t, 1H,  $J = 7.50$  Hz, C-4), 7.44 (t, 1H,  $J = 7.50$  Hz, C-4'), 7.50 (t, 2H,  $J = 7.50$  Hz, C-3/5), 7.57 (t, 2H,  $J = 7.50$  Hz, C-3'/5'), 8.01 (d, 2H,  $J = 8.00$  Hz, C-2/6), 8.35 (d, 2H,  $J = 8.00$  Hz, C-2'/6'), 8.53 (s, 1H, Pz); <sup>13</sup>C NMR (pyridine-*d*<sub>5</sub>/D<sub>2</sub>O, 9/1 v/v): 16.35 (CH<sub>3</sub>-S), 38.08 (S-CH<sub>2</sub>), 43.02 (Pz-CH<sub>2</sub>), 61.60 (CH), 118.93 (C-2/6), 120.69 (C-4, Pz), 126.52 (C-4), 128.41 (C-4'), 128.74 (C-2'/6'), 128.98 (C-5, Pz), 129.12 (C-3'/5'), 129.95 (C-3/5), 134.43 (C-1'), 140.75 (C-3, Pz), 151.96 (C-1), 175.98 (COO); Anal. Calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S (385.48 g/mol): C, 62.32; H, 6.01; N, 10.90; S, 8.32; Found: C, 62.49; H, 5.99; N, 10.92; S, 8.35.

***N*-[(1,3-Diphenylpyrazol-4-yl)methyl]-*L*-serine monohydrate (Ih).** White powder; yield: 0.71 g (80%); mp 190–191°C (Dec.);  $[\alpha]_D^{20} = +3.96$  ( $c = 1.263 \times 10^{-3}$  g/cm<sup>3</sup>, pyridine/H<sub>2</sub>O, 9/1 v/v); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3445  $\nu$  (O-H, broad), 3055  $\nu$  (C-H)<sub>Ar</sub>, 2961 and 2853  $\nu$  (C-H)<sub>Al</sub>, 2600–2390  $\nu$  (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 1628  $\nu_{as}$  (COO<sup>-</sup>), 1600  $\nu$  (C=C)<sub>Ar</sub>, 1547  $\nu$  (C=N)<sub>Ar</sub>, 1504  $\delta$  (C=C)<sub>Ar</sub>, 1452  $\delta$  (C=N)<sub>Ar</sub>, 1417  $\nu_s$  (COO<sup>-</sup>), 1074  $\delta$  (C-H)<sub>ip</sub>, 752  $\delta$  (C-H)<sub>oop</sub>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, NaOD/D<sub>2</sub>O):  $\delta_A = 3.71$ ,  $\delta_B = 3.65$ , and  $\delta_X = 3.17$  (ABX system, 3H,  $J_{AB} = 11.50$  Hz,  $J_{AX} = 4.66$  Hz,  $J_{BX} = 6.09$  Hz, CH-CH<sub>2</sub>),  $\delta_A = 3.37$  and  $\delta_B = 3.62$  (AB system, 2H,  $J_{AB} = 13.50$  Hz, Pz-CH<sub>2</sub>), 7.35 (t, 1H,  $J = 7.50$  Hz, C-4), 7.44–7.52 (m, 5H, 2H at C-3/5, 1H at C-4', and 2H at C-3'/5'), 7.58 (d, 2H at C-2/6,  $J = 8.00$  Hz), 7.60 (d, 2H at C-2'/6',  $J = 8.00$  Hz), 8.05 (s, 1H, Pz); <sup>13</sup>C NMR (NaOD/D<sub>2</sub>O): 43.88 (Pz-CH<sub>2</sub>); 65.67 (CH<sub>2</sub>-OH), 67.22 (CH), 121.65 (C-4, Pz), 122.09 (C-2/6), 129.75 (C-4), 130.69 (C-2'/6'), 131.32 (C-4'), 131.58 (C-3'/5'), 132.13 (C-5, Pz), 132.33 (C-3/5), 134.68 (C-1'), 141.78 (C-3, Pz), 154.57 (C-1), 181.84 (COO); Anal. Calcd. for C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (355.39 g/mol): C, 64.21; H, 5.96; N, 11.82; S, 8.32; Found: C, 64.40; H, 5.94; N, 11.81.

***N*-[(1,3-Diphenylpyrazol-4-yl)methyl]-*L*-tyrosine monohydrate (Ii).** White powder; yield: 0.85 g (79%); mp 190–191°C (Dec.);  $[\alpha]_D^{20} = -6.00$  ( $c = 1.166 \times 10^{-3}$  g/cm<sup>3</sup>, pyridine/H<sub>2</sub>O, 9/1 v/v); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3418  $\nu$  (O-H, broad), 3061  $\nu$  (C-H)<sub>Ar</sub>, 2957 and 2812  $\nu$  (C-H)<sub>Al</sub>, 2622–2400  $\nu$  (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 1611  $\nu_{as}$  (COO<sup>-</sup>), 1597  $\nu$  (C=C)<sub>Ar</sub>, 1559  $\nu$  (C=N)<sub>Ar</sub>, 1504  $\delta$  (C=C)<sub>Ar</sub>, 1451  $\delta$  (C=N)<sub>Ar</sub>, 1410  $\nu_s$  (COO<sup>-</sup>), 1072  $\delta$  (C-H)<sub>ip</sub>, 757  $\delta$  (C-H)<sub>oop</sub>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, NaOD/D<sub>2</sub>O):  $\delta_A = 2.80$ ,  $\delta_B = 2.63$ , and  $\delta_X = 3.28$  (ABX system, 3H,  $J_{AB} = 13.75$  Hz,  $J_{AX} = 5.67$  Hz,  $J_{BX} = 7.83$  Hz, CH-CH<sub>2</sub>),  $\delta_A = 3.75$  and  $\delta_B = 3.54$  (AB system, 2H,  $J_{AB} = 13.50$  Hz, Pz-CH<sub>2</sub>), 6.54 (d, 2H at 3'',  $J = 8.00$  Hz), 6.91 (d, 2H at 2'',  $J = 8.50$  Hz), 7.37 (t, 1H at C-4,  $J = 7.50$  Hz), 7.49 (m, 7H, 2H at C-3/5, 1H at C-4', 2H at C-3'/5', and 2H at C-2/6), 7.61

(d, 2H at C-2'/6',  $J = 8.00$  Hz), 7.97 (s, 1H, Pz); <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, NaOD/D<sub>2</sub>O): 40.84 (Ph-CH<sub>2</sub>), 43.62 (Pz-CH<sub>2</sub>), 67.60 (CH), 121.38 (3''), 121.64 (C-4, Pz), 122.24 (C-2/6), 126.28 (1''), 129.81 (C-4), 130.72 (C-2'/6'), 131.35 (C-4'), 131.63 (C-3'/5'), 132.15 (C-5, Pz), 132.39 (C-3/5), 133.03 (2''), 134.60 (C-1'), 141.83 (C-3, Pz), 154.77 (C-1), 167.28 (4''), 184.13 (COO); Anal. Calcd. for C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (431.48 g/mol): C, 69.59; H, 5.84; N, 9.74; Found: C, 69.69; H, 5.82; N, 9.74.

**Biological evaluation.** Three human tumor cell lines and one human nontumor cell line were used in this study: K562 (chronic myelogenous leukemia), HeLa (epitheloid carcinoma of cervix), HT-29 (colon adenocarcinoma), and MRC5 (lung fetal fibroblasts). The cells were grown in RPMI 1640 (K562 cells) or Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 4.5% of glucose (HeLa, HT-29, and MRC5 cells). Media were supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS, NIVNS) and antibiotics: 100 IU/mL of penicillin and 100  $\mu$ g/mL of streptomycin (ICN Galenika). All cell lines were cultured in flasks (Costar, 25 cm<sup>2</sup>) at 37°C in the 100% humidity atmosphere and 5% of CO<sub>2</sub>. Only viable cells were used in the assay. Viability was determined by dye exclusion assay with Trypan blue.

Cytotoxicity was evaluated by colorimetric SRB assay as described by Skehan et al. [21]. Briefly, single cell suspension was plated into 96-well microtiter plates (Costar, flat bottom):  $1 \times 10^4$  of K562 and  $5 \times 10^3$  of HeLa, HT29, and MRC5 cells, per 180 mL of medium. Plates were preincubated for 24 h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Tested substances at concentration ranging from 10<sup>-8</sup> to 10<sup>-4</sup>M were added to all wells except to the control ones. After incubation period (48 h/37°C/5% CO<sub>2</sub>), SRB assay was carried out as follows: 50  $\mu$ L of 80% trichloroacetic acid (TCA) was added to all wells; an hour later, plates were washed with distillate water, and 75  $\mu$ L of 0.4% SRB was added to all wells; half an hour later, plates were washed with citric acid (1%) and dried at room temperature. Finally, 200  $\mu$ L of 10 mmol TRIS (pH = 10.5) basis was added to all wells. Absorbance was measured on the microplate reader (Multiscan MCC340, Labsystems) at 540/690 nm. The wells without cells, containing compete medium only, acted as blank.

Cytotoxicity was calculated according to the formula:

$$(1 - A_{\text{TEST}}/A_{\text{CONTROL}}) \times 100$$

and expressed as a percent of cytotoxicity (CI %).

**Acknowledgment.** The work was financed by the Ministry for Science of the Republic of Serbia (Grant N° 142028) and the Provincial Secretariat for Science and Technological Development of Vojvodina.

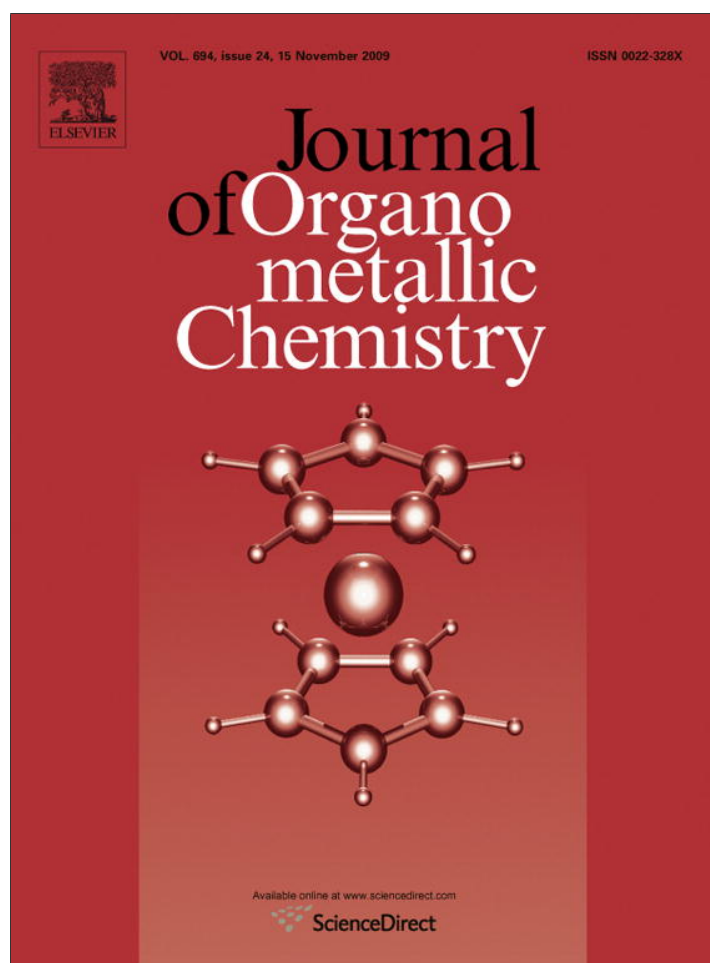
## REFERENCES AND NOTES

- [1] Rathelot, P.; Azas, N.; El-Kashef, H.; Delmas, F.; Di Giorgio, C.; Timon-David, P.; Maldonado, J.; Vanelle, P. *Eur J Med Chem* 2002, 37, 671.
- [2] Prakash, O.; Kumar, R.; Parkash, V. *Eur Med Chem* 2008, 43, 435.
- [3] Finn, J.; Mattia, K.; Morytko, M.; Ram, S.; Yang, Y.; Wu, X.; Mak, E.; Gallant, P.; Keith, D. *Bioorg Med Chem Lett* 2003, 13, 2231.

- [4] Bebernitz, G. R.; Argentieri, G.; Battle, B.; Brennan, C.; Balkan, B.; Burkey, B. F.; Eckhardt, M.; Gao, J.; Kapa, P.; Strohschein, R. J.; Schuster, H. F.; Wilson, M.; Xu, D. D. *J Med Chem* 2001, 44, 2601.
- [5] Habeeb, A. G.; Rao, P. N. P.; Knaus, E. E. *J Med Chem* 2001, 44, 3039.
- [6] Regan, J.; Breitfelder, S.; Cirillo, P.; Gilmore, T.; Graham, A. G.; Hickey, E.; Klaus, B.; Madwed, J.; Moriak, M.; Moss, N.; Pargellis, C.; Pav, S.; Proto, A.; Swinamer, A.; Tong, L.; Torcellini, C. *J Med Chem* 2002, 45, 2994.
- [7] Genin, M. J.; Biles, C.; Keiser, B. J.; Poppe, S. M.; Swaney, S. M.; Tarpley, W. G.; Yagi, Y.; Romero, D. L. *J Med Chem* 2000, 43, 1034.
- [8] Wei, F.; Zhao, B. X.; Huang, B.; Zhang, L.; Sun, C. H.; Dong, W. L.; Shin, D. S.; Miao, J. Y. *Bioorg Med Chem Lett* 2006, 16, 6342.
- [9] Rostom, S. A. F.; Shalaby, M. A.; El-Demellawy, M. A. *Eur J Med Chem* 2003, 38, 959.
- [10] Park, H. J.; Lee, K.; Park, S. J.; Ahn, B.; Lee, J. C.; Cho, H. Y.; Lee, K. I. *Bioorg Med Chem Lett* 2005, 15, 3307.
- [11] Van de Vrie, W.; Jonker, A. M.; Marquet, R. L.; Eggermont, A. M. M. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994, 120, 533.
- [12] Longhi, A.; Ferrari, S.; Bacci, G.; Specchia, S. *Anticancer Drugs* 2007, 18, 737.
- [13] Kimura, Y.; Okuda, H. *Jpn J Cancer Res* 1999, 90, 765.
- [14] Joksović, M. D.; Marković, V.; Juranić, Z. D.; Stanojković, T.; Jovanović, L. S.; Damljanović, I. S.; Mészáros Szécsényi, K.; Todorović, N.; Trifunović, S.; Vukićević, R. D. *J Organomet Chem* 2009, 694, 3935.
- [15] Leovac, V. M.; Bombicz, P.; Mészáros Szécsényi, K.; Joksović, M. *Aust J Chem* 2007, 60, 615.
- [16] Cave, G. W. V.; Raston, C. L. *J Chem Soc Perkin Trans 1* 2001, 3258.
- [17] Casella, L.; Gullotti, M. *Inorg Chem* 1983, 22, 2259.
- [18] Wagner, M. R.; Walker, F. A. *Inorg Chem* 1983, 22, 3021.
- [19] Colthup, N. B.; Daly, L. H.; Wiberley, S. E. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, 2nd ed.; Academic Press: London, 1975; Chapter 9, p 304.
- [20] Pons, J.; Chadghan, A.; Casabó, J.; Alvarez-Larena, A.; Piniella, J. F.; Ros, J. *Polyhedron* 2001, 20, 2531.
- [21] Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. *J Natl Cancer Inst* 1990, 82, 1107.
- [22] Kiss, D.; Zelkó, R.; Novák, C.; Éhen, Z. *J Therm Anal Calorim* 2006, 84, 447.
- [23] Presswala, L.; Matthews, M. E.; Atkinson, I.; Najjar, O.; Gerhardstein, N.; Moran, J.; Wei, R.; Riga, A. T. *J Therm Anal Calorim* 2008, 93, 295.
- [24] Thanki, N.; Thornton, J. M.; Goodfellow, J. M. *J Mol Biol* 1988, 202, 637.
- [25] Paulik, J.; Paulik, F. *Simultaneous Thermoanalytical Examinations by Means of the Derivatograph*, *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol. 12: Thermal Analysis; Wendlandt, W. W., Ed.; Elsevier Scientific Publishing Company: Amsterdam, 1981; p 47.
- [26] Hritz, J.; Žoldák, G.; Sedlák, E. *Proteins* 2006, 64, 465.
- [27] Kira, M. A.; Abdel-Rahman, M. O.; Gadalla, K. Z. *Tetrahedron Lett* 1969, 10, 109.



Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



## Synthesis, characterization and antitumor activity of novel N-substituted $\alpha$ -amino acids containing ferrocenyl pyrazole-moiety

Milan D. Joksović<sup>a,\*</sup>, Violeta Marković<sup>a</sup>, Zorica D. Juranić<sup>b</sup>, Tatjana Stanojković<sup>b</sup>, Ljiljana S. Jovanović<sup>c</sup>, Ivan S. Damljanović<sup>a</sup>, Katalin Mészáros Szécsényi<sup>c</sup>, Nina Todorović<sup>d</sup>, Snežana Trifunović<sup>e</sup>, Rastko D. Vukićević<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Sciences, University of Kragujevac, R. Domanovica 12, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>b</sup> Institute of Oncology and Radiology of Serbia, Pasterova 14, 11000 Belgrade, Serbia

<sup>c</sup> Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg D. Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Serbia

<sup>d</sup> Institute for Chemistry, Technology and Metallurgy, Njegoševa 12, 11000 Belgrade, Serbia

<sup>e</sup> Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 16, P.O. Box 158, 11000 Belgrade, Serbia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 May 2009

Received in revised form 4 August 2009

Accepted 7 August 2009

Available online 14 August 2009

#### Keywords:

Ferrocenyl pyrazole

Amino acids

Cytotoxicity

### ABSTRACT

A series of new *N*-[(3-ferrocenyl-1-phenylpyrazol-4-yl)methyl]  $\alpha$ -amino acids were prepared and characterized by a range of spectroscopic techniques and cyclic voltammetry. The *in vitro* antitumor activity of all synthesized compounds was investigated against cervix adenocarcinoma HeLa, melanoma Fem-x and myelogenous leukemia K562 cell lines using the MTT method. Tryptophan derivative **11** exhibited the highest cytotoxic activity in the cell growth inhibition of all three types of cell lines.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The organometallic ferrocenyl compounds are promising candidates for conjugation with biomolecules due to their stability in aqueous media, the possibility of a large variety of derivatives and favorable electrochemical properties [1]. In the light of these facts, investigation in the field of ferrocene chemistry has seen a drastic increase in attention over the past years, particularly in area peptide mimetic models. Conjugations of ferrocene scaffolds with biomolecules such as DNA, carbohydrates, amino acids and peptides are recognized to provide novel compounds by combining the beneficial properties of each component [2–11]. These bioconjugates of ferrocene with amino acids or peptides are of great interest as structural mimetics of natural peptides for protein folding and construction of highly-ordered assemblies.

Ferrocene has been used as a cytotoxic agent in form of its ferrocenium salts [12]. Some of its derivatives have exhibited antitumor potential [13–17] with greatly enhanced activity when ferrocene compounds were bound to polymers as prodrugs [18,19]. In another medicinal application of ferrocene com-

pounds, ferrocifen, a ferrocenyl derivative of hydroxytamoxifen was widely prescribed for the treatment of hormone-dependant breast cancer, as well as ferrociphenol which has been recently reported to show a strong antiproliferative effect [20,21]. Moreover, both compounds were found to possess a specific antiproliferative effect on several malignant melanoma cell lines [22]. The low reduction potential of these compounds is responsible for generating reactive oxygenated species under physiological conditions resulting in anticancer activity [21].

The synthesis and structural characterization of ferrocenyl amino acids and peptide bioconjugates bearing a heterocyclic triazole moiety have been recently reported [23]. Herein, we have focused our attention to synthesize ferrocenyl pyrazole  $\alpha$ -amino acids having in mind remarkable pharmacological importance of heterocyclic pyrazole unit as a constitutive part of a number of biologically active compounds. Our intentions were based on the synthetic combination of biomolecules with the known pharmacophores in order to avoid toxic or other unwanted side effects and prepare compounds with favorable properties for pharmacological applications. In continuation with our recent studies on ferrocene derivatives [24,25] we also report in this paper spectral characterization, electrochemical studies and test of their inhibitory effect on tumor growth in order to investigate the structure–reactivity relationship of this new antitumor class of compounds.

\* Corresponding author.

E-mail address: [mjoksovic@kg.ac.rs](mailto:mjoksovic@kg.ac.rs) (M.D. Joksović).



## 2. Results and discussion

### 2.1. General synthesis of *N*-[(3-ferrocenyl-1-phenylpyrazol-4-yl)-methyl] $\alpha$ -amino acids

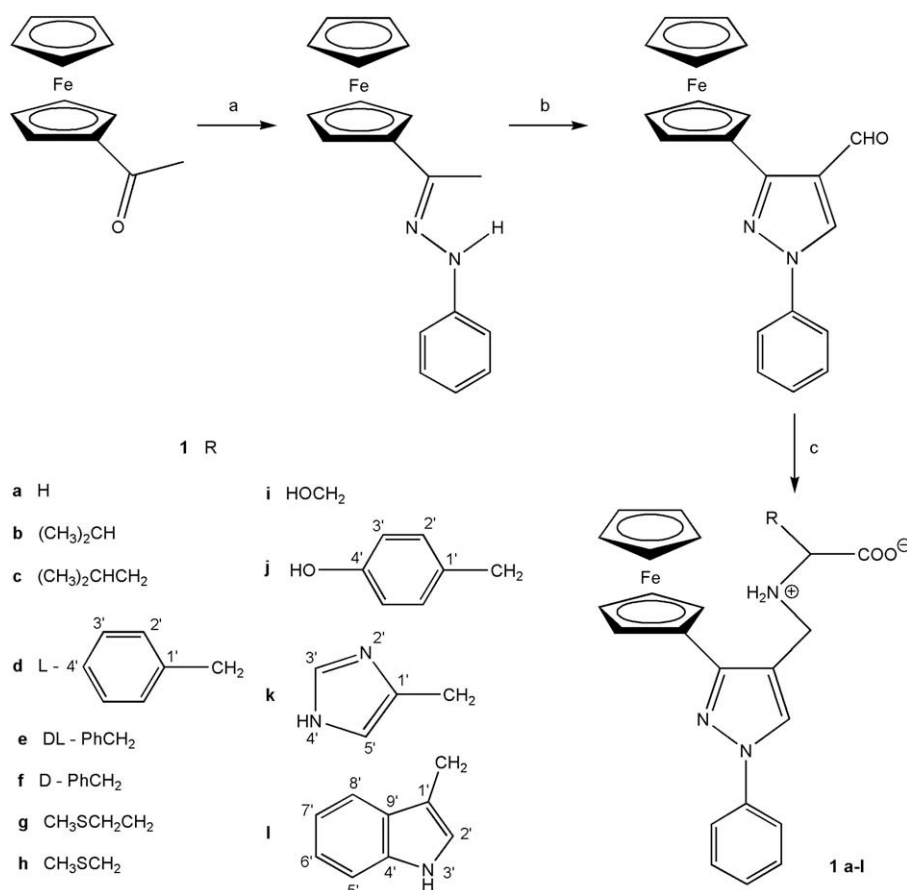
The synthesis of the targeted compounds was performed out according to Scheme 1. Aldehyde precursor 3-ferrocenyl-1-phenylpyrazole-4-carboxaldehyde (FPCA) used for condensation with  $\alpha$ -amino acids was prepared from acetylferrocene in a Vilsmeier-Haack formylation by the previously described procedure [28]. In the last step we applied a solventless method [29] combining aldehyde,  $\alpha$ -amino acid and NaOH in a porcelain mortar with pestle and aggregating the solid mixture until an orange powder was formed. The condensation was completed by an additional heating to reflux for 2 h in dry methanol. The potential problem with instability of Schiff bases was solved by subsequent reduction with sodium borohydride obtaining desired compounds in satisfactory yields 41–84%. Structures of all new compounds were confirmed by spectral data and elemental analysis.

### 2.2. IR and NMR spectral studies

The IR spectral region between 2300 and 3600  $\text{cm}^{-1}$  is typical for superimposed hydrogen bonded O–H and  $\text{NH}_2^+$  stretching bands of multiple fine structure. Weak bands positioned at 2300–2600  $\text{cm}^{-1}$  concern to overtones and combinational tones while the group of absorption bands in the region of 2600–2800  $\text{cm}^{-1}$  is probably caused by combinational vibrations [30].

The strong bands located between 1612 and 1630  $\text{cm}^{-1}$  may be ascribed to largely asymmetric stretchings of the anionic carboxyl group. This band is very characteristic for zwitterionic form of *N*-substituted  $\alpha$ -amino acids since it clearly shows that the carboxyl group is present as the ionized  $\text{COO}^-$  form. In the IR spectra of all compounds we also find very strong characteristic absorption bands attributed to the pyrazole ring:  $\nu(\text{C}=\text{C})$  and  $\nu(\text{C}=\text{N})$  between 1553 and 1600  $\text{cm}^{-1}$  as well as  $\delta(\text{C}=\text{C})$  at around 1505  $\text{cm}^{-1}$  [31].

In the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of glycine derivative **1a** two protons of methylene group attached to pyrazole nucleus were present as a singlet at 3.98 ppm. In all other derivatives, as a consequence of the chiral carbon atom of the bonded  $\alpha$ -amino acid, these two protons become diastereotopic and give rise to an AB system with a large geminal coupling constant (13.51–14.01 Hz). For the same reason, the presence of chiral carbon center in the  $\alpha$ -amino acid generates two chemical nonequivalent diastereotopic sides of the molecule and protons and carbons of the substituted cyclopentadiene ring give more peaks compared to glycine derivative [23]. Even at 500 MHz, not all signals for Cp protons in the  $^1\text{H}$  NMR spectra are equally well resolved and in the most derivatives (**1c**, **1g**, **1h**, **1j** and **1k**) three complex signals with unresolved couplings and intensities 1:1:2 are observed while phenylalanine and tryptophan derivatives (**1d–f** and **1l**) exhibit four separated signals with 1:1:1:1 intensities. This additional splitting of the ortho and meta ferrocene signals as well as their multiplicities also depend on nature of  $\alpha$ -amino acid side chain and cannot be attributed to the chirality of pyrazole-linked  $\alpha$ -amino acid alone. The effect of magnetic



**Scheme 1.** Reagents and conditions: (a)  $\text{PhNHNH}_2$ , EtOH, reflux; (b) DMF,  $\text{POCl}_3$  (3 equiv.), r.t.; (c)  $\alpha$ -amino acid, NaOH, continuous aggregating at rt, then MeOH, reflux, 2 h;  $\text{NaBH}_4$ , 0–5  $^\circ\text{C}$ , then rt, 12 h, AcOH.

**Table 1**  
<sup>1</sup>H NMR chemical shifts of ortho and meta Cp protons.

Compound	ortho-H <sub>1</sub>	ortho-H <sub>2</sub>	Δδ <sub>ortho</sub>	meta-H <sub>1</sub>	meta-H <sub>2</sub>	Δδ <sub>meta</sub>
<b>1a</b>	4.827	–	4.344	–	–	–
<b>1b</b>	4.910	–	4.321	–	–	–
<b>1c</b>	4.876	4.887	0.011	4.329	–	–
<b>1d</b>	4.669	4.707	0.038	4.241	4.263	0.022
<b>1g</b>	4.875	4.885	0.010	4.331	–	–
<b>1h</b>	4.849	4.877	0.028	4.334	–	–
<b>1i</b>	4.848	–	4.336	–	–	–
<b>1j</b>	4.648	4.701	0.053	4.286	–	–
<b>1k</b>	4.731	4.779	0.048	4.295	–	–
<b>1l</b>	4.388	4.553	0.165	4.100	4.165	0.065

nonequivalence of both ortho protons of substituted Cp unit is particularly pronounced in compounds containing aromatic or heteroaromatic rings (Table 1). The influence of π-electron system on chemical shift, splitting and multiplicity of ortho and meta Cp protons depends on several factor such as inductive effect, resonance possibility and magnetic anisotropy contributions. Interestingly, there is no appearance of splitting of ortho Cp signals in serine derivative **1i** probably as a consequence of hydrogen bond formation between hydroxyl and carboxylate group causing an alternate conformation with reduced influence of CH<sub>2</sub>OH moiety on ferrocene scaffold.

The H atoms of unsubstituted Cp ring are observed as singlets for all compounds. <sup>13</sup>C NMR measurements show that the chemical shift of the ortho and meta carbon atoms of substituted and unsubstituted Cp rings exhibit signals which do not vary significantly from one α-amino acid to another. However, five distinct signals in most derivatives indicate magnetically nonequivalent carbon atoms of substituted Cp unit due to presence of chiral center in the α-amino acid moiety. All other signals in <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of all compounds are positioned in the expected region of δ-values.

### 2.3. UV–Vis spectral studies

Electronic spectra of our ferrocene-based compounds were recorded in acetonitrile and methanol in the spectral range 190–1000 nm. Appearance and data recorded in two solvents are, generally, similar. A slight bathochromic shift of λ<sub>max</sub> in MeOH is observed. Due to poor solubility in acetonitrile of most compounds, methanol appeared to be favorable solvent for the spectral recordings.

Since first papers on ferrocene and its spectral characteristics [32,33], numerous other report that ferrocenyl-based compounds absorb (in the absence of a stronger chromophore), generally, as ferrocene alone – in 3–4 main bands. To test the system, especially in view of the observation that the UV–Vis spectra of ferrocene were influenced by the present impurities, external agents etc. [34], we run the spectra of this commercially available compound in both solvents. The bands in AN/MeOH at 199/205 nm, 320/323 nm and 438/441 nm are fairly consistent with the literature data [32,34]. The first band is assigned to π → π\*, the other two lie in the region where d → π\* and d–d interactions are expected [34,35].

Spectra of our compounds (**1a–l**) follow, in general, the pattern of the ferrocene spectrum. The band at ~200 nm is π → π\* ferrocene-based, the second at ~320–360 nm which is about 10 times stronger than for pure ferrocene is MLCT, and the weakest one, which is alike to the corresponding ferrocene band, is probably also d–d origin. But, in these spectra two new close and strong bands appear in the range of ~260–295 nm. Obviously, these bands may belong to other chromophores, such as pyrazole-based moieties. In fact, π → π\* transitions of moderate intensity for pyrazole are reported to be in MeOH at 208 nm [36] and for a number of substi-

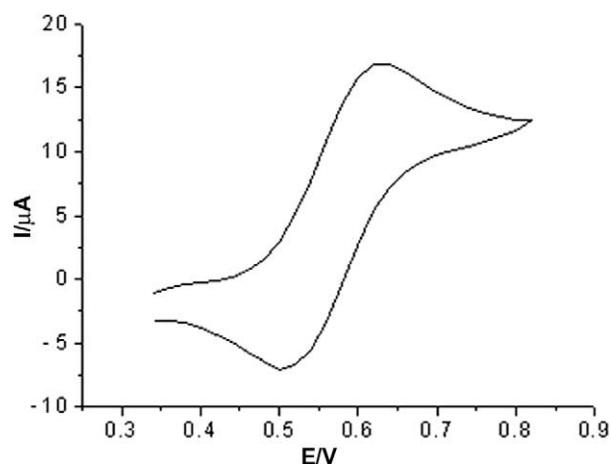
tuted pyrazole ligands there are even two more transitions, at about 250 and 290 nm [37]. The former high-energy transition in our case might be well overlapped by the stronger ferrocene-based absorption. Besides, the latter two absorptions (~260–295 nm) appear to be the only ones affected by addition of an equivalent amount of NaOH per molecule (**1a–l**) causing deprotonation of the –NH<sub>2</sub><sup>+</sup>– group. As a result, the band at ~290 nm is red-shifted for 2–3 nm and increased at the expense of the high-energy one. Thus, it is believed to belong to lower energy π → π\* and n → π\* pyrazole-moiety transitions which could be affected by the electronic changes in the neighboring atoms.

Finally, it can be concluded that no significant correlation is established between particular spectral data and the structure of **1a–l**. It is not surprising because the changes in substituents exert little effect on absorbing chromophores to which they are not linked by a conjugation system.

### 2.4. Electrochemistry

Because of low solubility of the investigated compounds in acetonitrile, a common solvent for this type of compounds, our voltammetric experiments were carried out in DMSO and DMF. In the available potential range with 0.1 M TEAP as supporting electrolyte, i.e. –1.9 V to +1.5 V, our compounds display three oxidation processes at potentials >+0.5 V. The first one (~+0.6 V) is well defined oxidation process, the other two at ~+1.2 V and +1.3 V are overlapped multielectron irreversible oxidations followed by chemical reactions of product decomposition. The latter two processes were out of scope of our work.

The main oxidation process (Fig. 1), common for ferrocenyl-based compounds, is one of the most widely studied electrode reactions. It is basically 1 – e<sup>–</sup> reversible process, with possible kinetic complications depending on the solvent, supporting electrolyte or structural effects of substituents on the ferrocene moiety [38,39]. In this potential range, our compounds, like most others in similar solvents, undergo 1 – e<sup>–</sup> process accompanied with chemical complications. At Pt electrode, peak separation ΔE<sub>p</sub> (i.e. E<sub>p</sub><sup>a</sup> – E<sub>p</sub><sup>c</sup>) varies from 80 mV (20 mV/s) to 140 mV (1 V/s), which is greater than expected for a fully reversible 1 – e<sup>–</sup> process [40]. Furthermore, the current ratio i<sub>p</sub><sup>a</sup>/i<sub>p</sub><sup>c</sup> of 1.2–1.4 at low scan rates (<50 mV/s), becoming ~1.1 at higher (≥0.5 V/s), might be a proof of a slow irreversible chemical reaction coupled to the oxidation process. Leucine (**1c**) and tryptophan (**1l**) derivatives seem to be the most stable in this respect. Namely, as reported for a strong donor system as DMSO, ferrocenyl compounds may be involved in a



**Fig. 1.** Cyclic voltammogram for tryptophan derivative (**1l**) in DMSO, 2 mM, Pt, 200 mV/s, air atmosphere.

chemical reaction of a ferricenium cation with solvent molecule to form  $\text{Fe}^{3+}$  and other decomposition products [39,41]. On the other hand, as reported recently, after this oxidation process carried out in the presence of oxygen a new chemical complication, due to formation of peroxy radical cation is observed, which in turn decomposes rapidly in some polar solvents to form ferrocene in about 50% yield [42].

In order to get a more precise insight into the extent of each chemical complication, the role of oxygen, solvent and the electrode surface, we performed experiments in DMSO and DMF, at Pt and glassy carbon (GC) electrode, and in the presence of air oxygen and in nitrogen atmosphere. The most pronounced chemical effects were observed in air atmosphere for compounds **1d**, **1g**, **1i** and **1j**, at low scan rates (Fig. 2). Even in these cases, the newly formed peaks at  $\sim 0.2$  V did not exceed 15% of the initial  $i_p^a$ . As can be seen from Fig. 2, oxygen affects the voltammogram only slightly. In fact, both chemical complications cannot be observed at scan rates higher than  $\sim 500$  mV/s. In addition, DMF seems to be less “aggressive solvent”, since the newly formed peak current resulting from both kinds of chemical complications did not exceed  $\sim 5\%$  of the initial  $i_p^a$  at most. In DMF only the formed  $\text{Fe}^{3+}$  ions can be stabilized into  $[\text{FeCl}_4]^-$  (reduced at  $\sim 0.1$  V) by adding of excess LiCl [41], the peak of this complex reaches about 30% of initial  $i_p^a$ .

Other characteristics of this oxidation process, such as current function variations:  $i_p^a/v^{1/2}$  and  $i_p^a/c \cdot v^{1/2}$  in the applied range of  $v$  (20 mV/s–2 V/s) and  $c$  (0.5–4.0 mM) are consistent with the electrode process coupled to chemical complications [40]. Finally, the obtained values of  $E_{1/2}$  (taken as  $(E_p^a + E_p^c)/2$ ) (reported for Pt in DMSO) varied in a narrow potential range from  $E_{1/2} = 0.537$  V (**1d**) to  $E_{1/2} = 0.570$  V (**1i**). These potentials could be correlated to electronic transitions at  $\lambda_{\text{max}} = \sim 440$ –450 nm in the UV–Vis spectra of our compounds. In both cases only slight variation of the main process characteristics due to the changes in substituents of ferrocenyl–pyrazolyl–moiety are observed. This is in agreement with a number of reports concerning ferrocenylaminoacids and oligopeptides, where even greater changes than in our compounds did not interfere much with the main process based on ferrocenyl moiety reaction [43–46].

In DMF, the appearance of a new small oxidation peak at potentials  $\sim 0.4$  V (close to  $E_p$  of unsubstituted ferrocene) at scan rates 100 and 200 mV/s may be a proof that reaction pathway of chemical decomposition leads through ferrocenyl moiety to  $\text{Fe}^{3+}$  as the final product. Peak potentials and peak current characteristics in DMF are generally similar to those in DMSO, only potentials are about 15 mV more positive. Finally, from a comparison of Pt and GC electrode kinetic data in DMF, a  $\Delta E_p$  criterion, it appears that

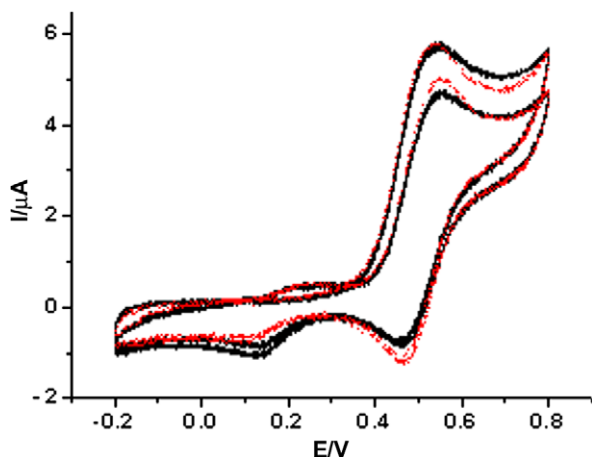


Fig. 2. Cyclic voltammograms for tyrosine derivative (**1j**) in DMSO, 1 mM, GC, 50 mV/s. in nitrogen (---) and air (—) atmosphere.

the processes at GC are much faster than at Pt (at  $v = 500$  mV/s, where the effects of a follow-up chemical reaction were apparently eliminated, we registered  $\sim 95$  mV at GC vs.  $\sim 135$  mV at Pt electrode). Besides, Pt surface was more prone to adsorption, therefore, GC electrode appeared to be favorable for these measurements.

## 2.5. Biological studies

The in vitro antitumor activities of all synthesized compounds were evaluated by MTT tetrazolium assay dye against cervix adenocarcinoma HeLa, melanoma Fem-x and myelogenous leukemia K562 cell lines. Table 2 represents the results of cytotoxic activity, while Figs. 3 and 4 depict the cytotoxic curves from MTT assay showing the survival of HeLa and K562 cell grown for 72 h in the presence of increasing concentrations of D-phenylalanine (**1f**), methionine (**1g**), histidine (**1k**) and tryptophan (**1l**) derivatives.

Ferrocene alone shows no antitumor activity, but introduction of *N*-phenyl pyrazole unit resulted in a product with powerful cytotoxic properties. A modification of aldehyde precursor (Scheme 1) with different amino acids produced compounds with altered cytotoxic activity compared to the starting material. As shown in Table 2 the malignant cell line K562 was very sensitive while the most active compounds were methionine, histidine and tryptophan derivatives **1g**, **1k** and **1l**, respectively, having a better cytotoxic potential in comparison to the starting precursor 3-ferricenyl-1-phenylpyrazole-4-carboxaldehyde (FPCA).

It has been previously published that the increase in the lipophilic character on ferrocene results in better cytotoxic activity

Table 2

IC<sub>50</sub> (μg/ml) for the 72 h of action of investigated compounds and cisplatin on the HeLa, Fem-x and K562 cells determined by MTT test.

Compound	HeLa	FemX	K562
	IC <sub>50</sub> (μg/ml)		
<b>1a</b>	46.71 ± 5.94	41.42 ± 2.91	41.01 ± 1.56
<b>1b</b>	48.52 ± 1.18	67.04 ± 4.92	61.24 ± 11.37
<b>1c</b>	25.13 ± 7.33	17.36 ± 4.62	11.78 ± 4.63
<b>1d</b>	10.69 ± 5.00	19.14 ± 1.16	7.29 ± 2.86
<b>1e</b>	11.51 ± 2.93	16.82 ± 2.31	6.92 ± 2.04
<b>1f</b>	10.92 ± 2.38	16.67 ± 1.43	7.78 ± 2.84
<b>1g</b>	21.71 ± 2.88	12.66 ± 3.59	6.29 ± 1.15
<b>1h</b>	31.80 ± 4.56	22.16 ± 2.11	11.64 ± 5.92
<b>1i</b>	24.91 ± 1.04	16.37 ± 5.69	12.67 ± 2.07
<b>1j</b>	20.95 ± 2.16	19.88 ± 2.08	8.13 ± 2.65
<b>1k</b>	10.08 ± 1.30	16.76 ± 4.43	6.16 ± 0.43
<b>1l</b>	7.95 ± 1.42	9.78 ± 0.27	6.34 ± 1.24
Ferrocene	>100	>100	>100
FPCA	15.68 ± 0.03	10.11 ± 0.27	7.91 ± 0.43
Cisplatin	2.10 ± 0.20	4.70 ± 0.20	5.90 ± 0.20

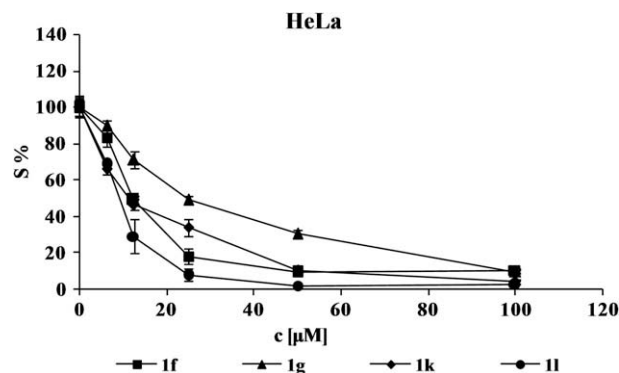


Fig. 3. Representative graphs showing survival of HeLa cell grown for 72 h in the presence of increasing concentrations of **1f**, **1g**, **1k** and **1l**.

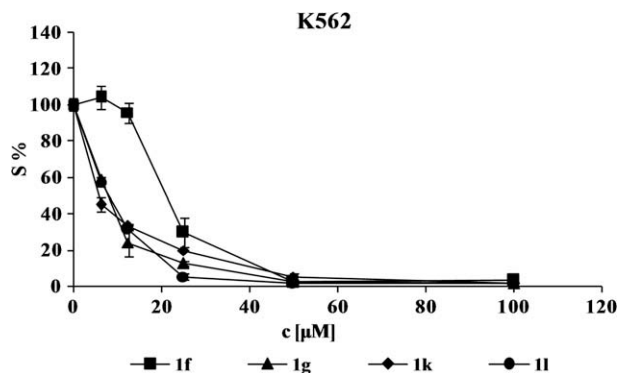


Fig. 4. Representative graphs showing survival of K562 cell grown for 72 h in the presence of increasing concentrations of **1f**, **1g**, **1k** and **1l**.

[47]. In our experiments, opposite to these conclusions, we found that serine and tyrosine derivatives **1i** and **1j** having polar hydroxyl groups proved to be less active than compounds bearing aromatic and especially heteroaromatic rings suggesting that lipophilic character could be diminished in comparison with planar aromatic requirements of amino acid part of molecule. Some interesting findings were reported for a series of *N*-(ferrocenyl) benzoyl dipeptide esters demonstrating the lowering of cytotoxic activity in dependence on increasing of amino acid alkyl chain length [48]. However, all these data come from different cancer cell lines making the difficulty in accordance of their  $IC_{50}$  values with our results. The decrease in cytotoxic activity in **1b** and **1h** in comparison with **1c** and **1g**, respectively, could be related to the size and steric effects of the bulky isopropyl group (**1b**) and voluminous sulfur atom (**1h**) closely to aminocarboxylate moiety.

Cytotoxic data for compounds derived from both enantiomers of phenylalanine including the racemic one indicated that there was no significant difference in their activity against all three tested types of cancer cell lines. These results confirmed the important role of the nature of amino acid side chain and steric hindrance for the growth suppressing potential against K562 cell lines. Histidine and tryptophan derivatives **1k** and **1l** appeared to be the most potent in inhibition of all three kinds of cancer cell lines but the activity of **1l** on Fem-x malignant cells was almost identical to FPCA. All other compounds were moderately sensitive towards HeLa and Fem-x cell.

### 3. Conclusion

Twelve novel *N*-[(3-ferrocenyl-1-phenylpyrazol-4-yl)methyl]  $\alpha$ -amino acids, including both phenylalanine enantiomer derivatives were prepared using standard synthetic protocols. The structures of all compounds were determined by use of spectroscopic, electrochemical and analytical methods. Compounds containing heteroaromatic rings appeared to be the most active against myelogenous leukemia K562 cell lines with a better cytotoxic potential than starting FPCA precursor indicating a pronounced influence of the nature of amino acid moiety and steric effects on cytotoxic activity.

### 4. Experimental

#### 4.1. Physical measurements

Melting points were determined on a Mel-Temp capillary melting points apparatus, model 1001 and are uncorrected. Optical rotations were measured on a Rudolph Research Analytical auto-

matic polarimeter Autopol IV. Elemental (C, H, N, S) analysis of the samples was carried out by standard micromethods in the Center for Instrumental Analysis, Faculty of Chemistry, Belgrade. Cyclic voltammetric experiments were carried out on an AUTOLAB PST 050 instrument with a Pt-disc and GC-disc (diameter 3 mm) working electrodes, Pt wire counter electrode and a Ag/AgCl reference electrode. All potentials are reported against this electrode. The working electrodes were polished with finest alumina suspension before each set of measurements and when necessary. The measurements were performed in distilled (previously dried on molecular sieves) DMSO and DMF solutions, with  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  TEAP as supporting electrolyte. Experiments were carried out either in air or in an inert atmosphere provided by purging nitrogen. Electronic spectra of  $1 \times 10^{-4}$ – $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  acetonitrile or methanol solutions of the compounds (**1a–l**) were recorded on T 80+ UV/Vis Spectrometer PG Instruments, Ltd., in the spectral range of 190–1000 nm. IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR spectrometer with a KBr disc. All  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on a Bruker Avance III 500 MHz spectrometer. As a consequence of very poor solubility, all compounds were characterized by NMR in the form of their much better soluble Na-salts by adding finely powdered solid NaOH in NMR tube containing  $\text{CD}_3\text{OD}$ . The full assignments of all reported NMR signals were made by use of 1D and 2D NMR experiments such as HSQC and HMBC heteronuclear correlation techniques.

#### 4.2. General procedure for the preparation of **1a–l**

3-Ferrocenyl-1-phenylpyrazole-4-carboxaldehyde (0.445 g, 1.25 mmol),  $\alpha$ -amino acid (1.375 mmol) and NaOH (0.055 g, 1.375 mmol, for **1j** 0.11 g, 2.75 mmol) were milled using a porcelain mortar and pestle to obtain a homogenous orange powder until the release of water was observed. This mixture was transferred into  $25 \text{ cm}^3$  of dry methanol and heated to reflux for 2 h. After cooling in an ice bath sodium borohydride (0.057 g, 1.5 mmol) was added in several portions with stirring. The solution was stirred for additional 2 h at room temperature, then diluted with  $25 \text{ cm}^3$  of deionized water and left for 12 h, after which time the precipitate had formed by addition of glacial acetic acid. The crude product was collected by filtration, washed with plenty of water and dried over anhydrous  $\text{CaCl}_2$ . The obtained compound was satisfactory pure but very high purity was achieved by its dissolving in methanol solution of 1 equiv, of NaOH followed by precipitation with glacial acetic acid.

##### 4.2.1. *N*-[(3-ferrocenyl-1-phenylpyrazol-4-yl)methyl]glycine monohydrate (**1a**)

Yellow-brown powder; yield: 0.40 g (74%); m.p.: 140–141 °C (Dec.);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Na salt): 3.34, (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{-COO}$ ); 3.98, (s, 2H, Pz- $\text{CH}_2$ ); 4.12, (s, 5H, Fc); 4.34, (t, 2H,  $J = 2.00 \text{ Hz}$ , *meta*-Fc); 4.83, (t, 2H,  $J = 2.00 \text{ Hz}$ , *ortho*-Fc); 7.29, (t, 1H,  $J = 7.50 \text{ Hz}$ , *p*-phenyl); 7.48, (t, 2H,  $J = 7.50 \text{ Hz}$ , *m*-phenyl); 7.75, (d, 2H,  $J = 7.50 \text{ Hz}$ , *o*-phenyl); 8.16, (s, 1H, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Na salt): 44.83 (Pz- $\text{CH}_2$ ); 54.10 ( $\text{CH}_2\text{-COO}$ ); 68.58 (2C, *ortho*-Fc); 69.96 (2C, *meta*-Fc); 70.57 (5C, Fc); 79.02 (Fc, ipso); 120.08 (2C, *o*-phenyl); 120.72 (C-4, Pz); 127.40 (*p*-phenyl); 129.23 (C-5, Pz); 130.68 (2C, *m*-phenyl); 141.51 (C-3, Pz); 151.63 (N-subst. phenyl); 179.06 (COO); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3430  $\nu(\text{O-H})$ ; 3084  $\nu(\text{C-H})_{\text{Ar}}$ ; 2926 and 2852  $\nu(\text{C-H})_{\text{Al}}$ ; 2791–2379  $\nu(\text{NH}_2^+)$ ; 1628  $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ ; 1599  $\nu(\text{C=C})_{\text{Ar}}$ ; 1556  $\nu(\text{C=N})_{\text{Ar}}$ ; 1504  $\delta(\text{C=C})_{\text{Ar}}$ ; 1464  $\delta(\text{C=N})_{\text{Ar}}$ ; 1407  $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ ; 1059  $\delta(\text{C-H})_{\text{ip}}$ ; 757  $\delta(\text{C-H})_{\text{oop}}$ ; 507 and 489  $\nu_{\text{as}}(\text{Cp-Fe--Cp})$ .  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH)/nm (log  $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ): 206(4.48), 266(4.18), 286(4.11),  $\sim$ 326sh(4.48), 442(2.69). Anal. Calc. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3\text{Fe}$  (433.28 g/mol): C, 60.99; H, 5.35; N, 9.70. Found: C, 60.78; H, 5.37; N, 9.67%.

#### 4.2.2. *N*-[(3-ferrocenyl-1-phenylpyrazol-4-yl)methyl]*L*-valine monohydrate (**1b**)

Orange-brown powder; yield: 0.50 g (84%); m.p.: 163 °C (Dec.);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +17.02$  ( $c = 1.116 \times 10^{-3}$  g/cm<sup>3</sup>, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1/1 v/v); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Na salt): 1.03, (d, 3H,  $J = 6.50$  Hz, CH<sub>3</sub>); 1.05, (d, 3H,  $J = 6.50$  Hz, CH<sub>3</sub>); 1.93, (octet, 1H,  $J = 6.50$  Hz, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH); 2.97, (d, 1H,  $J = 6.50$  Hz, CH-COO);  $\delta_{\text{A}} = 4.02$  and  $\delta_{\text{B}} = 3.80$ , (AB system, 2H,  $J_{\text{AB}} = 13.51$  Hz, Pz-CH<sub>2</sub>); 4.11, (s, 5H, Fc); 4.32, (m, 2H, *meta*-Fc); 4.91, (m, 2H, *ortho*-Fc); 7.29, (t, 1H,  $J = 7.50$  Hz, *p*-phenyl); 7.48, (t, 2H,  $J = 7.50$  Hz, *m*-phenyl); 7.74, (dd, 2H,  $J = 7.50$  and 1.00 Hz, *o*-phenyl); 8.13, (s, 1H, Pz); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Na salt): 20.02 (CH<sub>3</sub>); 20.60 (CH<sub>3</sub>); 33.02 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH); 44.32 (Pz-CH<sub>2</sub>); 68.79 (*ortho*-Fc); 68.81 (*ortho*-Fc); 69.81 (*meta*-Fc); 69.83 (*meta*-Fc); 70.52 (5C, Fc); 71.87 (CH-COO); 79.19 (Fc, ipso); 120.08 (2C, *o*-phenyl); 121.65 (C-4, Pz); 127.28 (*p*-phenyl); 129.51 (C-5, Pz); 130.65 (2C, *m*-phenyl); 141.57 (C-3, Pz); 152.00 (N-subst. phenyl); 182.41 (COO); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3435  $\nu$ (O-H); 3093  $\nu$ (C-H)<sub>Ar</sub>; 2965 and 2876  $\nu$ (C-H)<sub>Al</sub>; 2642–2386  $\nu$ (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>); 1630  $\nu_{\text{as}}$ (COO<sup>-</sup>); 1599  $\nu$ (C=C)<sub>Ar</sub>; 1570  $\nu$ (C=N)<sub>Ar</sub>; 1505  $\delta$ (C=C)<sub>Ar</sub>; 1466  $\delta$ (C=N)<sub>Ar</sub>; 1403  $\nu_{\text{s}}$ (COO<sup>-</sup>); 1061  $\delta$ (C-H)<sub>ip</sub>; 757  $\delta$ (C-H)<sub>oop</sub>; 507 and 486  $\nu_{\text{as}}$ (Cp-Fe-Cp).  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH)/nm ( $\log \epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 204(4.57), 267(4.23), 287(4.15), 325(3.45), 443(2.50). Anal. Calc. for C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>Fe (475.36 g/mol): C, 63.17; H, 6.15; N, 8.84. Found: C, 63.27; H, 6.13; N, 8.83%.

#### 4.2.3. *N*-[(3-ferrocenyl-1-phenylpyrazol-4-yl)methyl]*L*-leucine monohydrate (**1c**)

Orange-brown powder; yield: 0.48 g (78%); m.p.: 149 °C (Dec.);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +45.45$  ( $c = 1.078 \times 10^{-3}$  g/cm<sup>3</sup>, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1/1 v/v); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Na salt): 0.95, (d, 3H,  $J = 6.50$  Hz, CH<sub>3</sub>); 1.00, (d, 3H,  $J = 6.50$  Hz, CH<sub>3</sub>); 1.48, (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH); 1.58, (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-CH); 1.87, (nonet, 1H,  $J = 6.50$  Hz, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH); 3.28, (t, 1H,  $J = 6.50$  Hz, CH-COO);  $\delta_{\text{A}} = 4.04$  and  $\delta_{\text{B}} = 3.82$ , (AB system, 2H,  $J_{\text{AB}} = 13.51$  Hz, Pz-CH<sub>2</sub>); 4.12, (s, 5H, Fc); 4.33, (m, 2H, *meta*-Fc); 4.88, (m, 1H, *ortho*-Fc); 4.89, (m, 1H, *ortho*-Fc); 7.29, (t, 1H,  $J = 7.50$  Hz, *p*-phenyl); 7.48, (dd, 2H,  $J = 7.50$  and 1.00 Hz, *m*-phenyl); 7.74, (dd, 2H,  $J = 7.50$  and 1.00 Hz, *o*-phenyl); 8.15, (s, 1H, Pz); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Na salt): 23.45 (CH<sub>3</sub>); 23.57 (CH<sub>3</sub>); 26.50 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH); 43.81 (Pz-CH<sub>2</sub>); 44.92 (CH-CH<sub>2</sub>-CH); 64.53 (CH-COO); 68.66 (*ortho*-Fc); 68.77 (*ortho*-Fc); 69.85 (*meta*-Fc); 69.91 (*meta*-Fc); 70.55 (5C, Fc); 79.10 (Fc, ipso); 120.08 (2C, *o*-phenyl); 121.28 (C-4, Pz); 127.32 (*p*-phenyl); 129.40 (C-5, Pz); 130.66 (2C, *m*-phenyl); 141.55 (C-3, Pz); 151.82 (N-subst. phenyl); 183.20 (COO); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3435  $\nu$ (O-H); 3084  $\nu$ (C-H)<sub>Ar</sub>; 2958 and 2869  $\nu$ (C-H)<sub>Al</sub>; 2673–2391  $\nu$ (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>); 1622  $\nu_{\text{as}}$ (COO<sup>-</sup>); 1600  $\nu$ (C=C)<sub>Ar</sub>; 1555  $\nu$ (C=N)<sub>Ar</sub>; 1505  $\delta$ (C=C)<sub>Ar</sub>; 1466  $\delta$ (C=N)<sub>Ar</sub>; 1409  $\nu_{\text{s}}$ (COO<sup>-</sup>); 1059  $\delta$ (C-H)<sub>ip</sub>; 755  $\delta$ (C-H)<sub>oop</sub>; 507 and 486  $\nu_{\text{as}}$ (Cp-Fe-Cp).  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH)/nm ( $\log \epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 206(4.52), 267(4.20), 285(4.15), 325(3.45), 443(2.48). Anal. Calc. for C<sub>26</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>Fe (489.39 g/mol): C, 63.81; H, 6.38; N, 8.59. Found: C, 63.80; H, 6.37; N, 8.59%.

#### 4.2.4. *N*-[(3-ferrocenyl-1-phenylpyrazol-4-yl)methyl]*L*-phenylalanine monohydrate (**1d**)

Yellow-orange powder; yield: 0.50 g (76%); m.p.: 156–157 °C (Dec.);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +13.99$  ( $c = 1.072 \times 10^{-3}$  g/cm<sup>3</sup>, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1/1 v/v); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Na salt): 2.82, (dd, 1H,  $J = 8.50$  and 13.50 Hz, Ph-CH<sub>2</sub>); 3.12, (dd, 1H,  $J = 5.50$  and 13.50 Hz, Ph-CH<sub>2</sub>); 3.47, (dd, 1H,  $J = 5.50$  and 8.50 Hz, CH);  $\delta_{\text{A}} = 3.96$  and  $\delta_{\text{B}} = 3.77$ , (AB system, 2H,  $J_{\text{AB}} = 14.01$  Hz, Pz-CH<sub>2</sub>); 4.05, (s, 5H, Fc); 4.24, (m, 1H, *meta*-Fc); 4.26, (m, 1H, *meta*-Fc); 4.67, (m, 1H, *ortho*-Fc); 4.71, (m, 1H, *ortho*-Fc); 7.19, (t, 1H,  $J = 7.50$  Hz, 1H at 4'); 7.27, (m, 3H, 2H at 3' and *p*-phenyl); 7.34, (dd, 2H,  $J = 7.50$  and 1.00 Hz, 2H at 2'); 7.46, (t, 2H,  $J = 7.50$  Hz, *m*-phenyl); 7.63, (dd, 2H,  $J = 7.50$  and 1.00 Hz, *o*-phenyl); 7.82, (s, 1H, Pz); <sup>13</sup>C

NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Na salt): 41.71 (Ph-CH<sub>2</sub>); 43.92 (Pz-CH<sub>2</sub>); 67.31 (CH-COO); 68.59 (*ortho*-Fc); 68.62 (*ortho*-Fc); 69.80 (*meta*-Fc); 69.85 (*meta*-Fc); 70.50 (5C, Fc); 79.01 (Fc, ipso); 120.09 (2C, *o*-phenyl); 121.34 (C-4, Pz); 127.29 (*p*-phenyl); 127.40 (4'); 129.19 (C-5, Pz); 129.47 (2C, 3'); 130.59 (2C, *m*-phenyl); 130.71 (2C, 2'); 141.08 (1'); 141.45 (C-3, Pz); 151.76 (N-subst. phenyl); 181.92 (COO); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3447  $\nu$ (O-H); 3085  $\nu$ (C-H)<sub>Ar</sub>; 2926 and 2854  $\nu$ (C-H)<sub>Al</sub>; 2731–2389  $\nu$ (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>); 1621  $\nu_{\text{as}}$ (COO<sup>-</sup>); 1600  $\nu$ (C=C)<sub>Ar</sub>; 1568  $\nu$ (C=N)<sub>Ar</sub>; 1504  $\delta$ (C=C)<sub>Ar</sub>; 1456  $\delta$ (C=N)<sub>Ar</sub>; 1410  $\nu_{\text{s}}$ (COO<sup>-</sup>); 1060  $\delta$ (C-H)<sub>ip</sub>; 755  $\delta$ (C-H)<sub>oop</sub>; 507 and 486  $\nu_{\text{as}}$ (Cp-Fe-Cp).  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH)/nm ( $\log \epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 206(4.52), 267(4.11), 287(3.94), ~326(3.40), 445(2.44). Anal. Calc. for C<sub>29</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>Fe (523.40 g/mol): C, 66.55; H, 5.58; N, 8.03. Found: C, 66.43; H, 5.60; N, 8.05%.

#### 4.2.5. *N*-[(3-ferrocenyl-1-phenylpyrazol-4-yl)methyl]*D,L*-phenylalanine monohydrate (**1e**)

Yield: 0.49 g (75%).

#### 4.2.6. *N*-[(3-ferrocenyl-1-phenylpyrazol-4-yl)methyl]*D*-phenylalanine monohydrate (**1f**)

Yield: 0.49 g (75%);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -14.13$  ( $c = 1.054 \times 10^{-3}$  g/cm<sup>3</sup>, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1/1 v/v).

#### 4.2.7. *N*-[(3-ferrocenyl-1-phenylpyrazol-4-yl)methyl]*L*-methionine monohydrate (**1g**)

Orange-brown powder; yield: 0.49 g (77%); m.p.: 155–156 °C (Dec.);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +41.21$  ( $c = 1.092 \times 10^{-3}$  g/cm<sup>3</sup>, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1/1 v/v); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Na salt): 1.92, (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>); 2.00, (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>); 2.10, (s, 3H, CH<sub>3</sub>-S); 2.67, (t, 2H,  $J = 7.50$  Hz, CH<sub>2</sub>-S); 3.34, (t, 1H,  $J = 6.50$  Hz, CH-CH<sub>2</sub>);  $\delta_{\text{A}} = 4.04$  and  $\delta_{\text{B}} = 3.84$ , (AB system, 2H,  $J_{\text{AB}} = 13.51$  Hz, Pz-CH<sub>2</sub>); 4.12, (s, 5H, Fc); 4.33, (t, 2H,  $J = 1.00$  Hz, *meta*-Fc); 4.87, (t, 1H,  $J = 1.00$  Hz, *ortho*-Fc); 4.88, (t, 1H,  $J = 1.00$  Hz, *ortho*-Fc); 7.29, (t, 1H,  $J = 7.50$  Hz, *p*-phenyl); 7.48, (t, 2H,  $J = 7.50$  Hz, *m*-phenyl); 7.74, (d, 2H,  $J = 7.50$  Hz, *o*-phenyl); 8.16, (s, 1H, Pz); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Na salt): 15.44 (CH<sub>3</sub>-S); 32.15 (S-CH<sub>2</sub>); 35.03 (CH-CH<sub>2</sub>); 43.93 (Pz-CH<sub>2</sub>); 64.79 (CH-COO); 68.70 (*ortho*-Fc); 68.75 (*ortho*-Fc); 69.87 (*meta*-Fc); 69.90 (*meta*-Fc); 70.54 (5C, Fc); 79.12 (Fc, ipso); 120.09 (2C, *o*-phenyl); 121.25 (C-4, Pz); 127.32 (*p*-phenyl); 129.44 (C-5, Pz); 130.65 (2C, *m*-phenyl); 141.55 (C-3, Pz); 151.83 (N-subst. phenyl); 182.18 (COO); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3436  $\nu$ (O-H); 3082  $\nu$ (C-H)<sub>Ar</sub>; 2918 and 2853  $\nu$ (C-H)<sub>Al</sub>; 2658–2406  $\nu$ (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>); 1619  $\nu_{\text{as}}$ (COO<sup>-</sup>); 1600  $\nu$ (C=C)<sub>Ar</sub>; 1558  $\nu$ (C=N)<sub>Ar</sub>; 1505  $\delta$ (C=C)<sub>Ar</sub>; 1464  $\delta$ (C=N)<sub>Ar</sub>; 1409  $\nu_{\text{s}}$ (COO<sup>-</sup>); 1059  $\delta$ (C-H)<sub>ip</sub>; 756  $\delta$ (C-H)<sub>oop</sub>; 507 and 486  $\nu_{\text{as}}$ (Cp-Fe-Cp).  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH)/nm ( $\log \epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 207(4.00), 217(4.04), 267(4.03), 288(4.00), 327(3.76), 444(2.53). Anal. Calc. for C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>SFe (507.43 g/mol): C, 59.17; H, 5.76; N, 8.28; S, 6.32. Found: C, 59.25; H, 5.77; N, 8.30; S, 6.32%.

#### 4.2.8. *N*-[(3-ferrocenyl-1-phenylpyrazol-4-yl)methyl]*S*-methyl-*L*-cysteine monohydrate (**1h**)

Orange powder; yield: 0.46 g (75%); m.p.: 156–157 °C (Dec.);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +0.98$  ( $c = 1.023 \times 10^{-3}$  g/cm<sup>3</sup>, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1/1 v/v); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Na salt): 2.12, (s, 3H, CH<sub>3</sub>-S); 2.79, (dd, 1H,  $J = 13.50$  and 7.50 Hz, S-CH<sub>2</sub>); 2.94, (dd, 1H,  $J = 13.50$  and 5.00 Hz, S-CH<sub>2</sub>); 3.41, (dd, 1H,  $J = 7.50$  and 5.00 Hz, CH);  $\delta_{\text{A}} = 4.09$  and  $\delta_{\text{B}} = 3.91$ , (AB system, 2H,  $J_{\text{AB}} = 14.01$  Hz, Pz-CH<sub>2</sub>); 4.12, (s, 5H, Fc); 4.33, (t, 2H,  $J = 1.50$  Hz, *meta*-Fc); 4.85, (m, 1H, *ortho*-Fc); 4.88, (m, 1H, *ortho*-Fc); 7.29, (td, 1H,  $J = 7.50$  and 1.00 Hz, *p*-phenyl); 7.48, (dd, 2H,  $J = 7.50$  Hz, *m*-phenyl); 7.74, (dd, 2H,  $J = 7.50$  and 1.00 Hz, *o*-phenyl); 8.21, (s, 1H, Pz); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Na salt): 16.10 (CH<sub>3</sub>-S); 39.55 (S-CH<sub>2</sub>); 43.76 (Pz-CH<sub>2</sub>); 64.05 (CH-COO); 68.65 (*ortho*-Fc); 68.74 (*ortho*-Fc); 69.89

(*meta*-Fc); 69.94 (*meta*-Fc); 70.57 (5C, Fc); 79.07 (Fc, ipso); 120.05 (2C, *o*-phenyl) 121.08 (C-4, Pz); 127.34 (*p*-phenyl); 129.46 (C-5, Pz); 130.67 (2C, *m*-phenyl); 141.54 (C-3, Pz); 151.81 (N-subst. phenyl); 180.59 (COO); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3436  $\nu(\text{O-H})$ ; 3092  $\nu(\text{C-H})_{\text{Ar}}$ ; 2921 and 2853  $\nu(\text{C-H})_{\text{Al}}$ ; 2746–2385  $\nu(\text{NH}_2^+)$ ; 1628  $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ ; 1599  $\nu(\text{C=C})_{\text{Ar}}$ ; 1557  $\nu(\text{C=N})_{\text{Ar}}$ ; 1505  $\delta(\text{C=C})_{\text{Ar}}$ ; 1465  $\delta(\text{C=N})_{\text{Ar}}$ ; 1411  $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ ; 1057  $\delta(\text{C-H})_{\text{ip}}$ ; 756  $\delta(\text{C-H})_{\text{oop}}$ ; 507 and 486  $\nu_{\text{as}}(\text{Cp-Fe-Cp})$ .  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH)/nm ( $\log \epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 204(4.57), 267(4.20), ~287(4.11), ~327sh(3.43), 444(2.50). Anal. Calc. for  $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3\text{SFe}$  (493.40 g/mol): C, 58.42; H, 5.52; N, 8.52; S, 6.50. Found: C, 58.35; H, 5.50; N, 8.52; S, 6.49%.

#### 4.2.9. *N*-[(3-ferrocenyl-1-phenylpyrazol-4-yl)methyl]L-serine monohydrate (**1i**)

Yellow powder; yield: 0.40 g (69%); m.p.: 167 °C (Dec.);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -6.18$  ( $c = 1.133 \times 10^{-3} \text{ g/cm}^3$ , MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1/1 v/v);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Na salt): 3.35, (dd, 1H,  $J = 6.00$  and 4.50 Hz, CH-COO); 3.76, (dd, 1H,  $J = 10.75$  and 6.00 Hz, CH- $\text{CH}_2$ ); 3.85, (dd, 1H,  $J = 10.75$  and 4.50 Hz, CH- $\text{CH}_2$ );  $\delta_{\text{A}} = 4.09$  and  $\delta_{\text{B}} = 3.92$ , (AB system, 2H,  $J_{\text{AB}} = 14.01$  Hz, Pz- $\text{CH}_2$ ); 4.12, (s, 5H, Fc); 4.34, (m, 2H, *meta*-Fc); 4.85, (m, 2H, *ortho*-Fc); 7.29, (t, 1H,  $J = 7.50$  Hz, *p*-phenyl); 7.48, (t, 2H,  $J = 7.50$  Hz, *m*-phenyl); 7.75, (d, 2H,  $J = 7.50$  Hz, *o*-phenyl); 8.20, (s, 1H, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Na salt): 43.92 (Pz- $\text{CH}_2$ ); 65.12 (CH $_2$ -OH); 66.71 (CH-COO); 68.57 (*ortho*-Fc); 68.64 (*ortho*-Fc); 69.92 (*meta*-Fc); 69.94 (*meta*-Fc); 70.57 (5C, Fc); 79.08 (Fc, ipso); 120.07 (2C, *o*-phenyl) 121.19 (C-4, Pz); 127.34 (*p*-phenyl); 129.38 (C-5, Pz); 130.67 (2C, *m*-phenyl); 141.56 (C-3, Pz); 151.69 (N-subst. phenyl); 180.07 (COO); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3431  $\nu(\text{O-H})$ ; 3073  $\nu(\text{C-H})_{\text{Ar}}$ ; 2961 and 2852  $\nu(\text{C-H})_{\text{Al}}$ ; 2703–2462  $\nu(\text{NH}_2^+)$ ; 1628  $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ ; 1598  $\nu(\text{C=C})_{\text{Ar}}$ ; 1554  $\nu(\text{C=N})_{\text{Ar}}$ ; 1504  $\delta(\text{C=C})_{\text{Ar}}$ ; 1463  $\delta(\text{C=N})_{\text{Ar}}$ ; 1401  $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ ; 1057  $\delta(\text{C-H})_{\text{ip}}$ ; 758  $\delta(\text{C-H})_{\text{oop}}$ ; 508 and 487  $\nu_{\text{as}}(\text{Cp-Fe-Cp})$ .  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH)/nm ( $\log \epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 198(4.08), 267(3.60), 286(3.34), 325(2.90), 446(1.96). Anal. Calc. for  $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4\text{Fe}$  (463.31 g/mol): C, 59.63; H, 5.44; N, 9.07. Found: C, 59.87; H, 5.42; N, 9.10%.

#### 4.2.10. *N*-[(3-ferrocenyl-1-phenylpyrazol-4-yl)methyl]L-tyrosine monohydrate (**1j**)

Orange-brown powder; yield: 0.56 g (83%); m.p.: 168 °C (Dec.);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +7.97$  ( $c = 0.502 \times 10^{-3} \text{ g/cm}^3$ , MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1/1 v/v);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Na salt): 2.66, (dd, 1H,  $J = 13.50$  and 9.00 Hz, CH- $\text{CH}_2$ ); 3.04, (dd, 1H,  $J = 13.50$  and 4.50 Hz, CH- $\text{CH}_2$ ); 3.46, (dd, 1H,  $J = 9.00$  and 4.50 Hz, CH-COO);  $\delta_{\text{A}} = 3.97$  and  $\delta_{\text{B}} = 3.80$ , (AB system, 2H,  $J_{\text{AB}} = 14.01$  Hz, Pz- $\text{CH}_2$ ); 4.07, (s, 5H, Fc); 4.29, (m, 2H, *meta*-Fc); 4.65, (m, 1H, *ortho*-Fc); 4.70, (m, 1H, *ortho*-Fc); 6.63, (d, 2H,  $J = 8.00$  Hz, 2H at 2'); 7.03, (d, 2H,  $J = 8.00$  Hz, 2H at 3'); 7.27, (t, 1H,  $J = 7.50$  Hz, *p*-phenyl); 7.49, (t, 2H,  $J = 7.50$  Hz, *m*-phenyl); 7.67, (dd, 2H,  $J = 7.50$  and 1.00 Hz, *o*-phenyl); 7.85, (s, 1H, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Na salt): 40.81 (Ph- $\text{CH}_2$ ); 43.89 (Pz- $\text{CH}_2$ ); 67.41 (CH-COO); 68.56 (2C, *ortho*-Fc); 69.84 (*meta*-Fc); 69.94 (*meta*-Fc); 70.51 (5C, Fc); 78.96 (Fc, ipso); 119.59 (2C, 3'); 120.01 (2C, *o*-phenyl); 121.27 (C-4, Pz); 125.92 (1'); 127.21 (*p*-phenyl); 129.01 (C-5, Pz); 130.67 (2C, *m*-phenyl); 131.14 (2C, 2'); 141.42 (C-3, Pz); 151.67 (N-subst. phenyl); 165.58 (4'); 182.25 (COO); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3430  $\nu(\text{O-H})$ ; 3092  $\nu(\text{C-H})_{\text{Ar}}$ ; 2923 and 2853  $\nu(\text{C-H})_{\text{Al}}$ ; 2691–2369  $\nu(\text{NH}_2^+)$ ; 1612  $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ ; 1599  $\nu(\text{C=C})_{\text{Ar}}$ ; 1563  $\nu(\text{C=N})_{\text{Ar}}$ ; 1516 and 1505  $\delta(\text{C=C})_{\text{Ar}}$ ; 1464  $\delta(\text{C=N})_{\text{Ar}}$ ; 1409  $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ ; 1057  $\delta(\text{C-H})_{\text{ip}}$ ; 755  $\delta(\text{C-H})_{\text{oop}}$ ; 507 and 486  $\nu_{\text{as}}(\text{Cp-Fe-Cp})$ .  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH)/nm ( $\log \epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 201(4.80), 224sh(4.46), 268(4.32), 284(4.28), 3.26sh(3.54), 445(2.58). Anal. Calc. for  $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4\text{Fe}$  (539.40 g/mol): C, 64.57; H, 5.42; N, 7.79. Found: C, 64.73; H, 5.40; N, 7.82%.

#### 4.2.11. *N*-[(3-ferrocenyl-1-phenylpyrazol-4-yl)methyl]L-histidine acetate trihydrate (**1k**)

Orange-brown powder; yield: 0.31 g (41%); m.p.: 178 °C (Dec.);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +4.50$  ( $c = 1.111 \times 10^{-3} \text{ g/cm}^3$ , MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1/1 v/v);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Na salt): 1.90, (s, 3H,  $\text{CH}_3$ , acetate); 2.86, (dd, 1H,  $J = 14.50$  and 8.00 Hz, CH- $\text{CH}_2$ ); 3.09, (dd, 1H,  $J = 14.50$  and 5.50 Hz, CH- $\text{CH}_2$ ); 3.46, (dd, 1H,  $J = 8.00$  and 5.50 Hz, CH-COO);  $\delta_{\text{A}} = 4.01$  and  $\delta_{\text{B}} = 3.82$ , (AB system, 2H,  $J_{\text{AB}} = 13.51$  Hz, Pz- $\text{CH}_2$ ); 4.07, (s, 5H, Fc); 4.29, (m, 2H, *meta*-Fc); 4.73, (m, 1H, *ortho*-Fc); 4.78, (m, 1H, *ortho*-Fc); 6.89, (s, 1H at 5'); 7.28, (t, 1H,  $J = 7.50$  Hz, *p*-phenyl); 7.47, (t, 2H,  $J = 7.50$  Hz, *m*-phenyl); 7.53, (d, 1H,  $J = 2.00$  Hz, 1H at 3'); 7.70, (dd, 2H,  $J = 7.50$  and 1.00 Hz, *o*-phenyl); 8.02, (s, 1H, Pz);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Na salt): 24.40 ( $\text{CH}_3$ , acetate); 31.96 (CH- $\text{CH}_2$ ); 43.84 (Pz- $\text{CH}_2$ ); 65.63 (CH-COO); 68.61 (2C, *ortho*-Fc); 69.87 (2C, *meta*-Fc); 70.53 (5C, Fc); 79.04 (Fc, ipso); 120.03 (2C, *o*-phenyl) 121.25 (5' and C-4, overlapped); 127.30 (*p*-phenyl); 129.34 (C-5, Pz); 130.64 (2C, *m*-phenyl); 134.33 (1'); 136.00 (3'); 141.50 (C-3, Pz); 151.76 (N-subst. phenyl); 180.62 (COO, acetate); 181.67 (COO); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3415  $\nu(\text{O-H})$ ; 3144  $\nu(\text{N-H})_{\text{imidazole}}$ ; 3087  $\nu(\text{C-H})_{\text{Ar}}$ ; 3009  $\nu(\text{C-H})_{\text{imidazole}}$ ; 2924 and 2853  $\nu(\text{C-H})_{\text{Al}}$ ; 2791–2465  $\nu(\text{NH}_2^+)$ ; 1701  $\nu(\text{COO})_{\text{acetate}}$ ; 1631  $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ ; 1599  $\nu(\text{C=C})_{\text{Ar}}$ ; 1556  $\nu(\text{C=N})_{\text{Ar}}$ ; 1505  $\delta(\text{C=C})_{\text{Ar}}$ ; 1463  $\delta(\text{C=N})_{\text{Ar}}$ ; 1410  $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ ;  $^{1053} \delta(\text{C-H})_{\text{ip}}$ ; 757  $\delta(\text{C-H})_{\text{oop}}$ ; 502 and 485  $\nu_{\text{as}}(\text{Cp-Fe-Cp})$ .  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH)/nm ( $\log \epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 208(4.59), 267(4.23), 286(4.23), ~328sh(4.48), 444(2.57). Anal. Calc. for  $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_7\text{Fe}$  (609.45 g/mol): C, 55.18; H, 5.79; N, 11.49. Found: C, 55.16; H, 5.78; N, 11.53%.

#### 4.2.12. *N*-[(3-ferrocenyl-1-phenylpyrazol-4-yl)methyl]L-tryptophan dihydrate (**1l**)

Orange-brown powder; yield: 0.58 g (80%); m.p.: 148–149 °C (Dec.);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -46.00$  ( $c = 1.000 \times 10^{-3} \text{ g/cm}^3$ , MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1/1 v/v);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Na salt): 2.97, (dd, 1H,  $J = 14.50$  and 9.50 Hz, CH- $\text{CH}_2$ ); 3.37, (dd, 1H,  $J = 14.50$  and 4.00 Hz, CH- $\text{CH}_2$ ); 3.68, (dd, 1H,  $J = 9.50$  and 4.00 Hz, CH-COO);  $\delta_{\text{A}} = 3.93$  and  $\delta_{\text{B}} = 3.72$ , (AB system, 2H,  $J_{\text{AB}} = 14.01$  Hz, Pz- $\text{CH}_2$ ); 3.97, (s, 5H, Fc); 4.10, (m, 1H, *meta*-Fc); 4.16, (m, 1H, *meta*-Fc); 4.39, (m, 1H, *ortho*-Fc); 4.55, (m, 1H, *ortho*-Fc); 7.02, (t, 1H,  $J = 7.50$  Hz, 1H at 7'); 7.12, (t, 1H,  $J = 7.50$  Hz, 1H at 6'); 7.17, (s, 1H at 2'); 7.25, (t, 1H,  $J = 7.50$  Hz, *p*-phenyl); 7.38, (d, 1H,  $J = 8.00$  Hz, 1H at 8'); 7.42, (t, 2H,  $J = 7.50$  Hz, *m*-phenyl); 7.46, (d, 2H,  $J = 7.50$  Hz, *o*-phenyl); 7.66, (s, 1H, Pz); 7.81, (d, 1H,  $J = 8.00$  Hz, 1H at 5');  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Na salt): 31.44 (CH- $\text{CH}_2$ ); 43.87 (Pz- $\text{CH}_2$ ); 65.71 (CH-COO); 68.31 (*ortho*-Fc); 68.49 (*ortho*-Fc); 69.70 (*meta*-Fc); 69.84 (*meta*-Fc); 70.44 (5C, Fc); 78.84 (Fc, ipso); 112.60 (8'); 113.23 (1'); 119.93 (7'); 119.97 (2C, *o*-phenyl); 120.04 (5'); 121.10 (C-4, Pz); 122.57 (6'); 124.79 (2'); 127.20 (*p*-phenyl); 128.94 (C-5, Pz); 129.09 (9'); 130.59 (2C, *m*-phenyl); 138.54 (4'); 141.36 (C-3, Pz); 151.68 (N-subst. phenyl); 182.40 (COO); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3420  $\nu(\text{O-H})$ ; 3371  $\nu(\text{N-H})_{\text{indole}}$ ; 3081  $\nu(\text{C-H})_{\text{Ar}}$ ; 2925 and 2853  $\nu(\text{C-H})_{\text{Al}}$ ; 2747–2383  $\nu(\text{NH}_2^+)$ ; 1621  $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ ; 1599  $\nu(\text{C=C})_{\text{Ar}}$ ; 1570  $\nu(\text{C=N})_{\text{Ar}}$ ; 1504  $\delta(\text{C=C})_{\text{Ar}}$ ; 1459  $\delta(\text{C=N})_{\text{Ar}}$ ; 1411  $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ ; 1060  $\delta(\text{C-H})_{\text{ip}}$ ; 749  $\delta(\text{C-H})_{\text{oop}}$ ; 507 and 492  $\nu_{\text{as}}(\text{Cp-Fe-Cp})$ .  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH)/nm ( $\log \epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 209(4.63), 217(4.62), 270(4.25), 288(4.20), ~327sh(3.43), 444(2.50). Anal. Calc. for  $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_4\text{Fe}$  (580.46 g/mol): C, 64.15; H, 5.58; N, 9.67. Found: C, 64.16; H, 5.58; N, 9.67%.

### 4.3. In vitro studies

#### 4.3.1. Drugs and solutions

The MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) was dissolved (5 mg/ml) in phosphate buffer saline pH 7.2 and filtered (0.22  $\mu\text{m}$ ) before use. The RPMI 1640 cell culture medium, fetal bovine serum (FBS), and MTT, were purchased from Sigma Chemical Company, USA.

#### 4.3.2. Cell lines

Cervix adenocarcinoma HeLa and melanoma Fem-x cell lines were maintained in monolayer culture, and myelogenous leukemia K562 cells in suspension culture, in nutrient medium RPMI 1640, with 10% (inactivated at 56 °C) FBS, 3 mM of L-glutamine, and antibiotics.

#### 4.3.3. Treatment of cell lines

Stock solutions (10 mM) of compounds were made in dimethylsulfoxide (DMSO), and were dissolved in corresponding medium to the required working concentrations. Target cells HeLa, (2000 cells per well), Fem-x (2000 cells per well), or K562 cells (3000 cells per well) were seeded into wells of a 96-well flat-bottomed microtitre plate. Twenty hours later, after the cell adherence, 50 µl of the investigated compounds was added to cells in final concentrations (6.25, 12.5, 25, 50, and 100 µM), except in the control wells, where only nutrient medium was added to the cells. Exceptionally compounds were applied to the suspension of leukemia K562 cells 2 hours after the cell seeding. The intensity of agents action on cancer cell survival was determined 72 h later by MTT test [26], modified by Ohno and Abe [27]. Briefly, 20 µl of MTT (5 mg/ml) dye was added to each well. After incubation for further 4 h, 100 µl of 10% SDS were added to extract the insoluble product formazan, resulting from conversion of the MTT dye by viable cells. The number of viable cells in each well is proportional to the intensity of the absorbance of light, which was then read in an ELISA plate reader at 570 nm. To achieve cell survival (%), absorbance at 570 nm of a sample with cells grown in the presence of various concentrations of agent was divided with absorbance of control sample (the absorbance of cells grown only in nutrient medium), having subtracted from absorbance of a corresponding sample with target cells the absorbance of the blank. IC50 is used as the measure of the toxic agents action and is determined from the graph  $S(\%) = f(c)$ , as the concentration of the agent which induces decrease in cell survival to 50%.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia for financial support (Grant Nos. 142042, 145006 and 142028).

#### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jorgchem.2009.08.013.

#### References


- [1] D.R. van Staveren, N. Metzler-Nolte, *Chem. Rev.* 104 (2004) 5931–5985.
- [2] W.A. Wlasoff, G.C. King, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002). e58/1–e58/7.
- [3] A.E. Navarro, N. Spinelli, C. Moustrou, C. Chaix, B. Mandrand, H. Brisset, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 5310–5319.
- [4] J.T. Chantson, M.V.V. Falzacappa, S.B. Crovella, N. Metzler-Nolte, *ChemMedChem* 1 (2006) 1268–1274.
- [5] P.J. Higgins, A.M. Gellett, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 1614–1617.
- [6] E. Coutouli-Argyropoulou, C. Sideris, G. Kokkinidis, *J. Organomet. Chem.* 691 (2006) 3909–3918.
- [7] V. Zsoldos-Mády, A. Csámpai, R. Szabó, E. Mészáros-Alapi, J. Pasztor, F. Hudecz, P. Sohár, *ChemMedChem* 1 (2006) 1119–1125.
- [8] T. Hirao, *J. Organomet. Chem.* 694 (2009) 806–811.
- [9] A.J. Corry, A. Goel, S.R. Alley, P.N. Kelly, D. O' Sullivan, D. Savage, P.T.M. Kenny, *J. Organomet. Chem.* 692 (2007) 1405–1410.
- [10] J. Sehnert, A. Hess, N. Metzler-Nolte, *J. Organomet. Chem.* 637–639 (2001) 349–355.
- [11] A.M. Gellett, P.W. Huber, P.J. Higgins, *J. Organomet. Chem.* 693 (2008) 2959–2962.
- [12] P. Kopf-Maier, H. Kopf, *Chem. Rev.* 87 (1987) 1137–1152.
- [13] W.C.M. Duivenvoorden, Y.N. Liu, G. Schatte, H.B. Kraatz, *Inorg. Chim. Acta* 358 (2005) 3183–3189.
- [14] D. Osella, M. Ferrali, P. Zanello, F. Laschi, M. Fontani, C. Nervi, G. Caviglioglio, *Inorg. Chim. Acta* 306 (2000) 42–48.
- [15] A. Vessieres, S. Top, P. Pigeon, E. Hillard, L. Boubeker, D. Spera, G. Jaouen, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 3937–3940.
- [16] C.G. Hartinger, A.A. Nazarov, V.B. Arton, G. Giester, M. Jakupec, M. Galanski, B.K. Keppler, *New J. Chem.* 26 (2002) 671–673.
- [17] L.V. Snegur, A.A. Simenel, Y.S. Nekrasov, E.A. Morzova, Z.A. Starikova, S.M. Peregudova, Y.V. Kuzmenko, V.N. Babin, L.A. Ostrovskaya, *J. Organomet. Chem.* 689 (2004) 2473–2479.
- [18] W.C. Shen, K. Beloussow, M.G. Meirim, E.W. Neuse, G. Caldwell, *J. Inorg. Organomet. Polym.* 10 (2000) 51–60.
- [19] E.W. Neuse, *Macromol. Symp.* 172 (2001) 127–138.
- [20] S. Top, J. Tang, A. Vessieres, D. Carrez, C. Provot, G. Jaouen, *Chem. Commun.* (1996) 955–956.
- [21] E. Hillard, A. Vessieres, L. Thoulin, G. Jaouen, C. Amatore, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 45 (2006) 285–290.
- [22] Q. Michard, G. Jaouen, A. Vessieres, B.A. Bernard, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 1980–1985.
- [23] D.S. Köster, J. Dittrich, G. Gasser, N. Hüskén, I.C.H. Castañeda, J.L. Jios, C.O. della Vedova, N. Metzler-Nolte, *Organometallics* 27 (2008) 6326–6332.
- [24] I. Damjanović, M. Vukičević, N. Radulović, E. Ellmerer, Z. Ratković, M.D. Joksović, R.D. Vukičević, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 1093–1096.
- [25] I. Damjanović, M. Čolović, M. Vukičević, D. Manojlović, N. Radulović, K. Wurst, G. Laus, Z. Ratković, M. Joksović, R.D. Vukičević, *J. Organomet. Chem.* 694 (2009) 1575–1580.
- [26] T. Mosmann, *J. Immunol. Meth.* 65 (1983) 55–63.
- [27] M. Ohno, T. Abe, *J. Immunol. Meth.* 145 (1991) 199–203.
- [28] M. Joksović, Z. Ratković, M. Vukičević, R. Vukičević, *Synlett* 16 (2006) 2581–2584.
- [29] G.W.V. Cave, C.L. Raston, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (2001) 3258–3264.
- [30] A.M. Petrosyan, *Vib. Spectrosc.* 43 (2007) 284–289.
- [31] J. Pons, A. Chadghan, J. Casabo, A. Alvarez-Larena, J.F. Piniella, J. Ros, *Polyhedron* 20 (2001) 2531–2536.
- [32] G. Wilkinson, M. Rosenblum, M.C. Whiting, R.B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 2125–2126.
- [33] L. Kaplan, W.L. Kester, J.J. Katz, *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 5531–5532.
- [34] G. Zhang, H. Zhang, M. Sun, Y. Liu, X. Pang, X. Yu, B. Liu, Z. Li, *J. Comput. Chem.* 28 (2007) 2260–2274.
- [35] K. Ishimura, M. Hada, H. Nakatsuji, *J. Chem. Phys.* 117 (2002) 6533–6537.
- [36] E. Bernarucci, W.F. Schwindinger, J.L. Hughey IV, K. Krogh-Jespersen, H.J. Schugar, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 1686–1691.
- [37] T.N. Sorrel, A.S. Borovik, *Inorg. Chem.* 26 (1987) 1957–1964.
- [38] A.P. Tomilov, I.N. Chernykh, Yu.M. Kargin, "Elektrokimiya elementoorganicheskikh soedinenii (Elementy I, II, III grupp periodicheskoi sistemy i perekhodnye metally)", "Nauka", Moscow, 1985, pp. 102–130.
- [39] M.V. Baker, H.-B. Kraatz, J.W. Quail, *New J. Chem.* 25 (2001) 427–433.
- [40] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, 2nd ed., Wiley & Sons, New York, 2001.
- [41] R. Prins, A.R. Korswagen, A.G.T.G. Kortbeek, *J. Organomet. Chem.* 39 (1972) 335–344.
- [42] J.P. Hurvois, C. Moinet, *J. Organomet. Chem.* 690 (2005) 1829–1839.
- [43] H.-B. Kraatz, J. Lusztyk, G.D. Enright, *Inorg. Chem.* 36 (1997) 2400–2405.
- [44] P. Saweczko, H.-B. Kraatz, *Coord. Chem. Rev.* 190–192 (1999) 185–198.
- [45] Y. Xu, P. Saweczko, H.-B. Kraatz, *J. Organomet. Chem.* 637–639 (2001) 335–342.
- [46] I. Bediako-Amoa, T.C. Sutherland, Ch.-Zh. Li, R. Silerova, H.-B. Kraatz, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 704–714.
- [47] G. Tabbi, C. Cassino, G. Colangelo, A. Ghiglia, I. Viano, D. Osella, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 5786–5796.
- [48] A.J. Corry, N. O' Donovan, A. Mooney, D. O' Sullivan, D.K. Rai, P.T.M. Kenny, *J. Organomet. Chem.* 694 (2009) 880–885.





Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.

Vol. 66 • Issue 32 • 7 August 2010 • ISSN 0040-4020

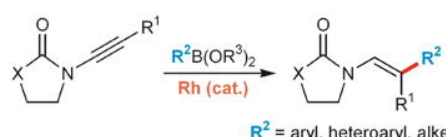


# Tetrahedron

THE INTERNATIONAL JOURNAL FOR THE RAPID PUBLICATION OF FULL ORIGINAL RESEARCH PAPERS AND CRITICAL REVIEWS IN ORGANIC CHEMISTRY

IN THIS ISSUE

Rhodium-Catalyzed Carbometalation of Ynamides with Organoboron Reagents



$R^2 = \text{aryl, heteroaryl, alkenyl}$

Benoit Gourdet, Donna L. Smith, and Hon Wai Lam

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



## Theoretical study on structural and mechanistic aspects of synthesis of a 3-aminopyrazole derivative

Svetlana Marković<sup>a</sup>, Milan D. Joksović<sup>a,\*</sup>, Petra Bombicz<sup>b</sup>, Vukadin M. Leovac<sup>c</sup>, Violeta Marković<sup>a</sup>, Ljubinka Joksović<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Sciences, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>b</sup> Institute of Structural Chemistry, Chemical Research Center, Hungarian Academy of Sciences, PO Box 17, H-1525 Budapest, Hungary

<sup>c</sup> Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg D. Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Serbia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 March 2010

Received in revised form 6 May 2010

Accepted 24 May 2010

Available online 4 June 2010

#### Keywords:

Crystal structure

Reaction mechanism

Keto-imine tautomer

DFT

3-Aminopyrazole

### ABSTRACT

The structure of 5-hydroxy-3,5-dimethyl-1-*S*-methylisothiocarbamoyl-2-pyrazolinium iodide (HDMCPI), a cyclic intermediate for a 3-aminopyrazole derivative, was determined by means of X-ray analysis and spectroscopic techniques. In a treatment of HDMCPI in alkaline aqueous solution, 4-acetyl-3(5)-amino-5(3)-methylpyrazole (AAMP) was unexpectedly yielded. The reaction of HDMCPI was monitored by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. It was shown that keto-imine tautomer appears as the only tautomeric form. Density functional theory explained the spontaneous formation of keto-imine tautomer, whose existence is the main condition for generating a carbanion in alkaline medium. The carbanion further undergoes cyclization and elimination of MeSH, thus yielding AAMP. In the reaction of acetylacetone with thiosemicarbazide instead of *S*-methylisothiosemicarbazide, there were no traces of AAMP. This result can be attributed to the absence of keto-imine form in the tautomeric equilibrium, which would provide the formation of a carbanion for a nucleophilic attack and further cyclization.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The chemistry of 3-aminopyrazole has remained largely underdeveloped until the discovery of its derivatives as antitumor agents with their great therapeutic potential against various proliferative disorders in the role of chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases (CDKs), a family of enzymes involved in controlling normal cell proliferation.<sup>1–4</sup> The frequent deregulation of cell cycle progression in cancer has intensified search for kinase inhibitors with high affinity and specificity over the past several years.<sup>5–7</sup> PHA-739358, a small molecule of 3-aminopyrazole derivative with strong activity against Aurora kinases and cross-reactivities with some receptor tyrosine kinases, exhibits significant antitumor activity in a wide range of cancers and shows a favorable pharmacokinetic and safety profile.<sup>8</sup> Recently, a series of 3-aminopyrazole based Aurora kinase inhibitors with a pyrimidine scaffold led to a class of very potent inhibitors of cellular proliferation in treatment of chronic myelogenous leukemia or Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia.<sup>9</sup> Very recently, a selective 3-aminopyrazole MK2 kinase inhibitors were discovered and profiled to show potent inhibition MK2 activity and reasonable cellular activity.<sup>10</sup>

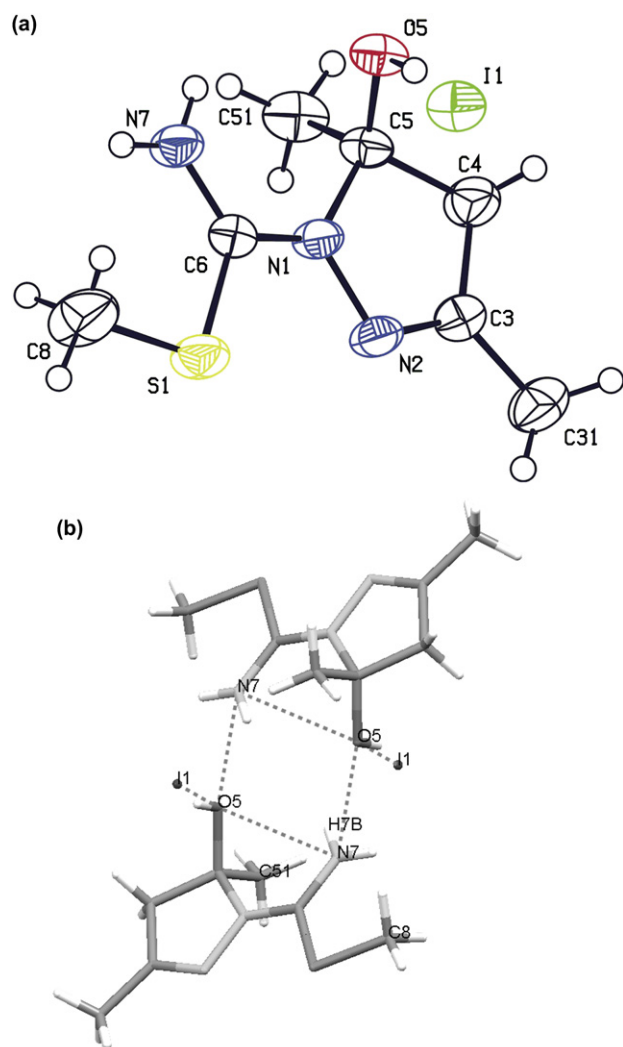
Although the synthesis of 4-acetyl-3(5)-amino-5(3)-methylpyrazole (AAMP) has been reported about two decades ago,<sup>11</sup> the recent discoveries in the field of 3-aminopyrazole derivatives and their pharmacological and medicinal importance prompted us to shed much more light on the mechanism of formation of AAMP, starting from relatively simple precursors. In the present study we have focused our attention on theoretical and mechanistical aspects of the synthesis of this 3-aminopyrazole derivative, as a high versatile precursor for preparation of a number of potential kinase inhibitors bearing in mind the great possibilities of transformation of acetyl group linked to 3-aminopyrazole scaffold.

## 2. Results and discussion

### 2.1. The crystal structure of 5-hydroxy-3,5-dimethyl-1-*S*-methylisothiocarbamoyl-2-pyrazolinium iodide (HDMCPI)

The crystal data, details of structure determination and refinement of HDMCPI are given in the [Supplementary data](#). The iodide anion is hydrogen bonded to the organic moiety by the O5–H5...I1 and N7–H7A...I1 interactions (Fig. 1a, Table 1). The packing coefficient is 65.7%, there is no residual solvent accessible void. The basic building unit of the crystal is a dimer organized by the symmetry centre (Fig. 1b, Table 1). H7B is a bifurcated hydrogen

\* Corresponding author. E-mail address: [mjoksovic@kg.ac.rs](mailto:mjoksovic@kg.ac.rs) (M.D. Joksović).



**Figure 1.** ORTEP representation<sup>13</sup> of HDMCPI at 50% probability level, heteroatoms are shaded. (b) The dimer formed in the structure of HDMCPI and the connected iodide organized by the symmetry centre.<sup>14</sup>

**Table 1**  
Intermolecular interactions in the crystal structure of HDMCPI

D–H...A	Type	D–H [Å]	H...A [Å]	D...A [Å]	D–H...A [°]	Symmetry operation
N7–H7B...O5	Intra	0.86	2.37	2.903 (3)	121	
O5–H5...I1	In asym unit	0.82	2.62	3.399 (3)	159	
N7–H7A...I1	Inter	0.86	2.83	3.612 (3)	153	$x, 1+y, z$
N7–H7B...O5	Inter	0.86	2.23	3.003 (3)	149	$1-x, 1-y, 1-z$
C51–H51A...I1	Inter	0.96	3.05	3.993 (4)	167	$-1/2+x, 1/2-y, -1/2+z$
C8–H8A...I1	Inter	0.96	3.05	3.886 (5)	146	$1/2-x, 1/2+y, 3/2-z$

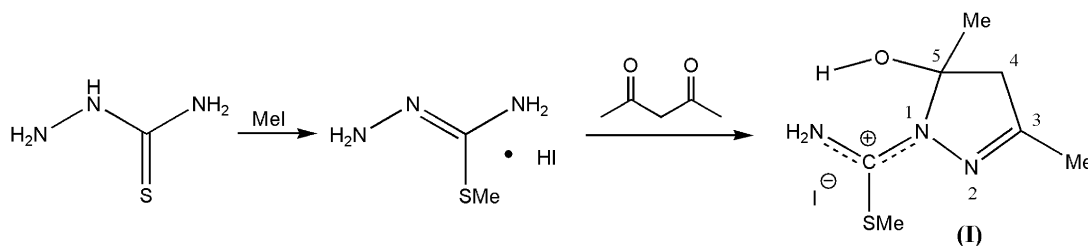
atom, taking part in both intramolecular and intermolecular hydrogen bonds to O5 oxygen atoms. The graph set description<sup>12</sup> of the ring formed by the hydrogen bonds is  $R^2_2(6)$ . The neighboring dimers are kept together by weak C–H...O interactions. A herringbone arrangement can be observed from the crystallographic  $a$  direction in the packing diagram (Supplementary data).

The structure of HDMCPI was reproduced using density functional theory (DFT), in order to test the suitability of the applied computational method. The obtained bond lengths, bond angles, and dihedral angles are provided in Tables S5–S7 of Supplementary data. The average relative errors for bond angles and dihedral angles amount 0.89 and 0.45%, respectively. The lengths of the bonds including hydrogen are overestimated, whereas the average relative error for bond lengths among heavy atoms equals 0.99%. Such agreement between the experimental and computed structure of HDMCPI confirms the applicability of the used DFT method.

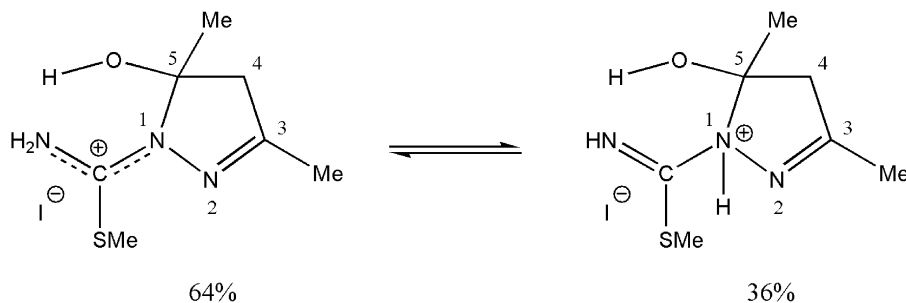
## 2.2. Mechanistic studies

The synthesis of 4-acetyl-3(5)-amino-5(3)-methylpyrazole (AAMP) starting from acetylacetone and *S*-methylisothiosemicarbazide hydrogen iodide has been already described,<sup>11</sup> but the intermediate was incorrectly presented, only on the basis of elemental analysis, as acetylacetone mono-*S*-methylisothiosemicarbazone. Now, we have obtained single crystals suitable for X-ray analysis, and using spectroscopic methods completely characterized this compound as the cyclic compound 5-hydroxy-3,5-dimethyl-1-*S*-methylisothiocarbamoyl-2-pyrazolinium iodide (HDMCPI) (Scheme 1).

The values of bond lengths between the carbon and two nitrogens of *S*-methylisothiocarbamoyl group indicate delocalization of positive charge through all three atoms in the solid state. In addition, the natural bond orbital (NBO) analysis of HDMCPI shows strong donation of density from the  $p$  orbitals on N7 and S to the  $\pi^*$  antibonding N1–C6 orbital, and from the  $sp^{0.45}$  orbital on S to the  $\sigma^*$  antibonding C6–N7 orbital, thus confirming the delocalization in the *S*-methylisothiocarbamoyl group. However, in DMSO- $d_6$  solution, the <sup>1</sup>H NMR spectra, except for two singlets (C3–Me and C5–Me) and one AB system for the pyrazoline ring protons, shows two singlets for S–Me protons, as well as two groups of signals at lower field. The first, two broad singlets, one bigger at 7.73 ppm and a smaller one at 7.52 ppm of the total relative intensity 1, can be attributed to two kinds of hydroxyl protons. The second set of three broad peaks, one bigger at 8.80 ppm and two smaller at 8.96 and 9.42 ppm of the total relative intensity 2 can be assigned to the nitrogen protons. Three smaller peaks were in an intensity ratio of 1:1:1 while bigger signals at 8.80 ppm and 7.73 ppm were in an intensity ratio 2:1, respectively. These facts suggest that not only one form of HDMCPI was present in the DMSO- $d_6$  solution. In order to consider an explanation of this <sup>1</sup>H NMR complexity, we must take into an account the existence of other distinct tautomers with possibly different NMR spectra whose concentration will vary with selected deuterated solvent. For example, a proton could be moved from the exocyclic nitrogen onto ring nitrogen atom giving a structure with three chemically nonequivalent protons with the same intensities (Scheme 2).



**Scheme 1.** Synthesis of HDMCPI (I).



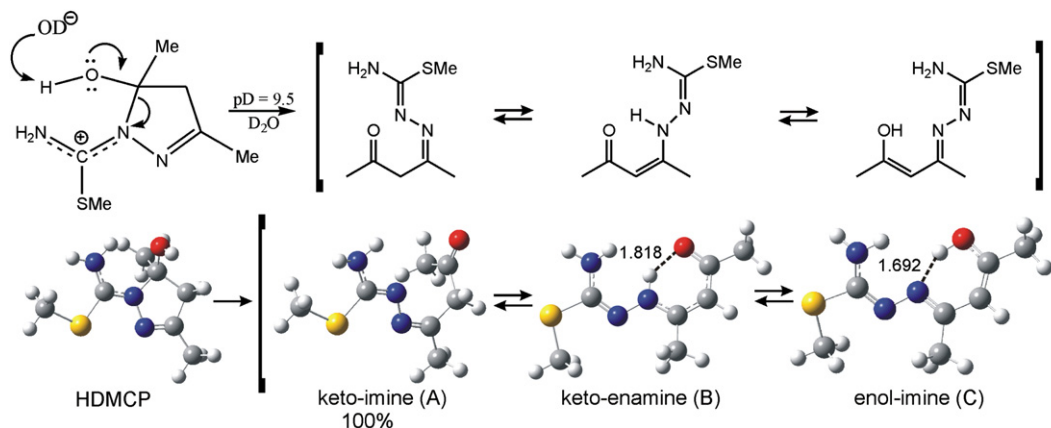
**Scheme 2.** Two possible tautomeric forms of HDMCPI in DMSO- $d_6$  solution (the ratio of tautomers is determined by integration of  $^1\text{H}$  NMR signals).

Addition of  $\text{D}_2\text{O}$  to the DMSO- $d_6$  solution caused the collapse of the AB system to a singlet and disappearance of the N–H and the O–H protons because of fast exchange of these protons with  $\text{D}_2\text{O}$ . Simultaneously, one singlet attributable to the S–Me protons was observed instead of two singlets in DMSO- $d_6$  solution. Finally, in pure  $\text{D}_2\text{O}$  solution all signals appeared only as singlets.

Dissolving HDMCPI in an alkaline aqueous solution ( $\text{pH} > 13$ ) unexpectedly affords AAMP after about 15 h of standing at room temperature, in the forms of white needle-like crystals. In order to slow this reaction for  $^1\text{H}$  NMR monitoring, we dissolved HDMCPI in  $\text{D}_2\text{O}$  and adjusted pD to 9.5 by careful addition of NaOD. Bearing in mind that thiosemicarbazones of 1,3-dicarbonylic compounds are complex multitautomeric systems, we could expect an equilibrium mixture of several open-chain tautomeric forms in the solution, including the cyclic one with predominance of keto-enamine form.<sup>15,16</sup> It has been known that the tautomeric equilibria are very sensitive to pH and the polarity of the solvent.<sup>17</sup> However, after analyzing the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra at pD=9.5 we have observed surprisingly that this compound is present in  $\text{D}_2\text{O}$  only in the form of keto-imine tautomer A (Scheme 3). The presence of the keto-imine tautomer A in

respectively. The  $G^{298}$  values are in agreement with a simple chemical reasoning, based on the fact that B and C are stabilized with strong hydrogen bonds. On the basis of these facts, the presence of tautomer A is not expected as the only form in the tautomeric equilibrium.

To explain this unexpected experimental finding, we examined possible interactions between the HDMCP cation and hydroxide anion. All examined pathways are here presented. Our investigation did not reveal any transition state for a reaction pathway between the HDMCP cation and hydroxide anion. On the other hand, our attempts to optimize a structure consisting of the HDMCP cation and hydroxide anion resulted in a spontaneous transfer of a proton (i.e., without activation barrier) from the hydroxyl group of the HDMCP cation to the  $\text{OH}^-$  anion. This rearrangement includes a ring opening, and formation of the structure D (Fig. 2), with the stabilization of the system of 143.2 kJ/mol. It is worth pointing out that structure D is actually a hydrated tautomeric form A. The tautomer A can be transformed into B via transition state TS1, requiring an activation barrier of 185.0 kJ/mol, whereas B can rearrange into C via transition state TS2, requiring an activation energy



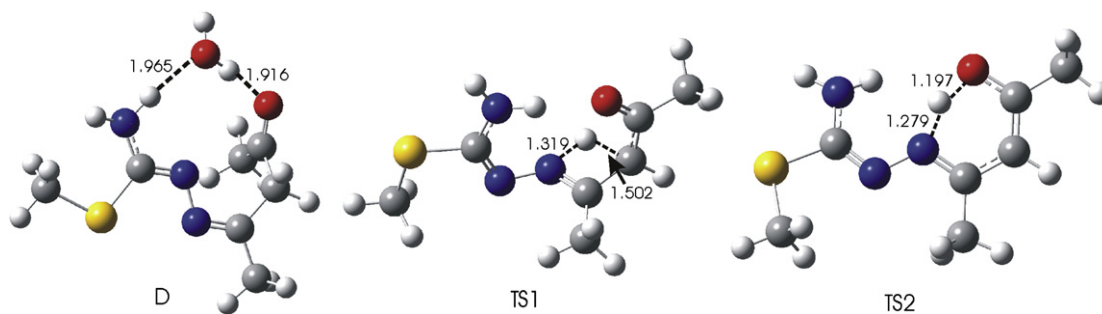
**Scheme 3.** Tautomeric forms of 5-hydroxy-3,5-dimethyl-1-S-methylisothiocarbamoyl-2-pyrazolinium cation (HDMCP).

solution is unambiguously indicated by the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum, in which a resonance signal at the high  $\delta$  value of 214.3 ppm is in the range characteristic of aliphatic ketones, not that of keto-enamines or enol-imine forms.<sup>18</sup> Further evidences, confirming the structure of A result from a systematic pattern of isomer peaks of the methyl group typical for S-alkylated thiosemicarbazones due to cis/trans isomerism from the C=N double bond.<sup>19</sup> The  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum also has complex broad signal at 50.1 ppm corresponding to the carbon between carbonyl and imino group. Other details of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra agree with keto-imine tautomeric form.

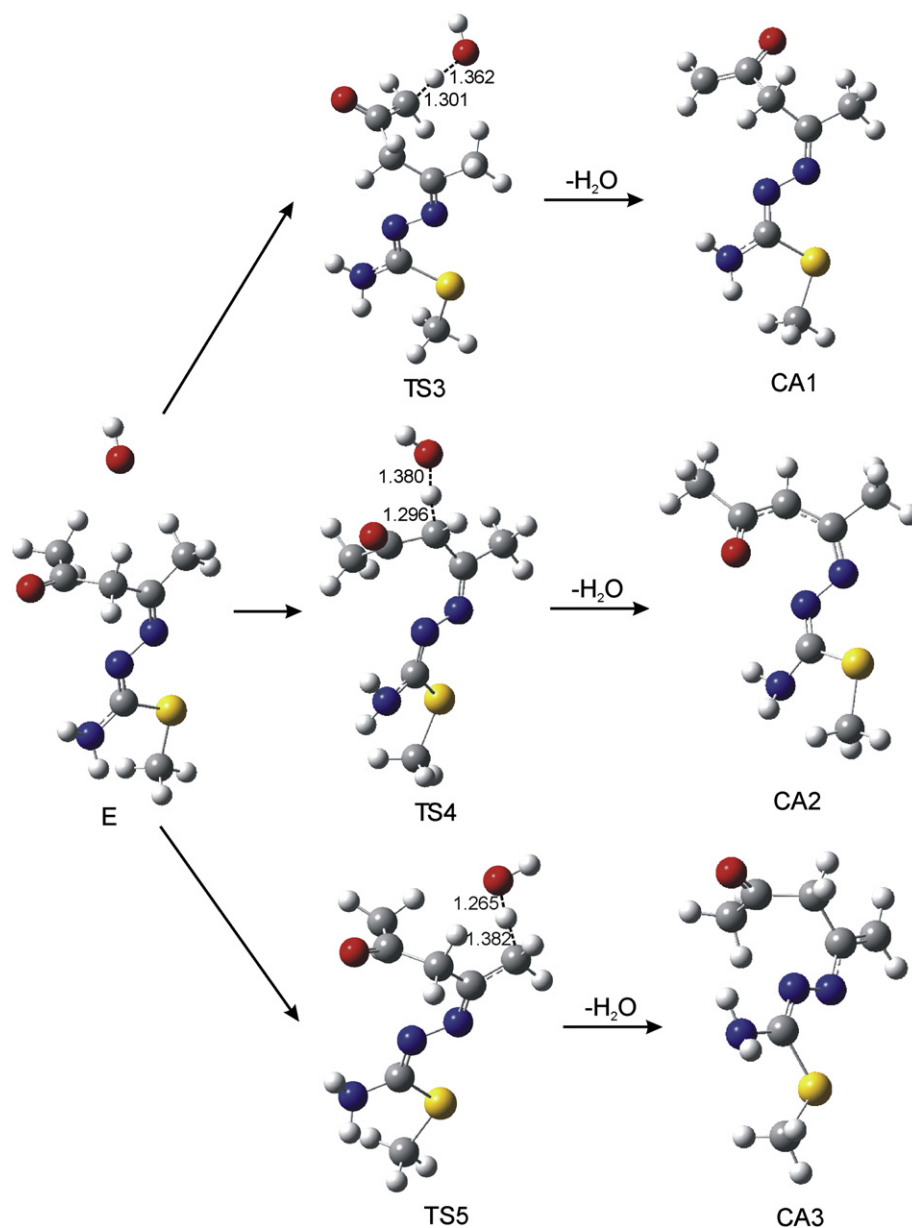
This finding motivated us to investigate the mechanism of the formation of A from the HDMCP cation using DFT calculations. If Gibbs free energy ( $G^{298}$ ) is taken as a measure of tautomer stability, it turns out that A is less stable than B and C by 18.1 and 2.8 kJ/mol,

of 14.8 kJ/mol (Fig. 2). A reaction path for a transformation of A into C was not revealed. One can conclude, on the basis of the presented activation energies, that the only pathway for transformation of the HDMCP cation in alkaline medium is the formation of the tautomer A. In this way the presence of A as the only form in tautomeric equilibrium is explained.

Our investigation shows that in alkaline medium tautomer A can undergo pathways that lead to the formation of carbanions. Namely, the acidic hydrogens of A can delocalize the charge of the hydroxide anion, forming structure E in Scheme 4. Three reaction pathways were revealed for the transformation of E, where the carbanions CA1, CA2, and CA3 were formed. The activation energies for the formation of CA1, CA2, and CA3 amount 4.9, 8.8, and 31.3 kJ/mol, respectively. As expected,  $G^{298}$  of CA2 is lower than those of CA1 and CA3 by 27.1



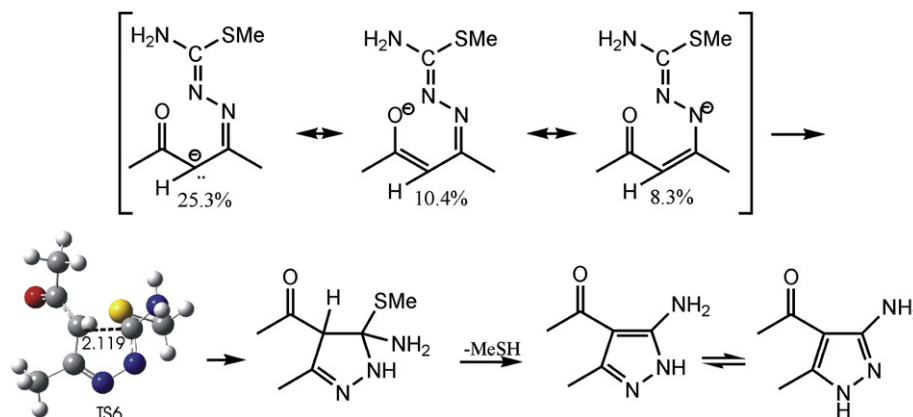
**Figure 2.** Optimized structures of hydrated tautomer A (D), and transition states TS1 and TS2.



**Scheme 4.** Mechanism of formation of carbanions CA1, CA2, and CA3, via transition states TS3, TS4, and TS5, respectively.

and 61.3 kJ/mol, respectively. Taking into account low activation energy and pronounced stability of CA2, we assume that the main reaction path for the transformation of A is the formation of CA2. Thus, the existence of tautomeric form A is the main condition for generating the carbanion CA2 in alkaline medium.

The natural resonance analysis of CA2 revealed the possibility of its resonance stabilization. The major resonance structures of CA2 are presented in Scheme 5. The numbers below the resonance structures denote the resonance weights in the equilibrium geometry of CA2. It is obvious that the resonance structure with the 25.3%



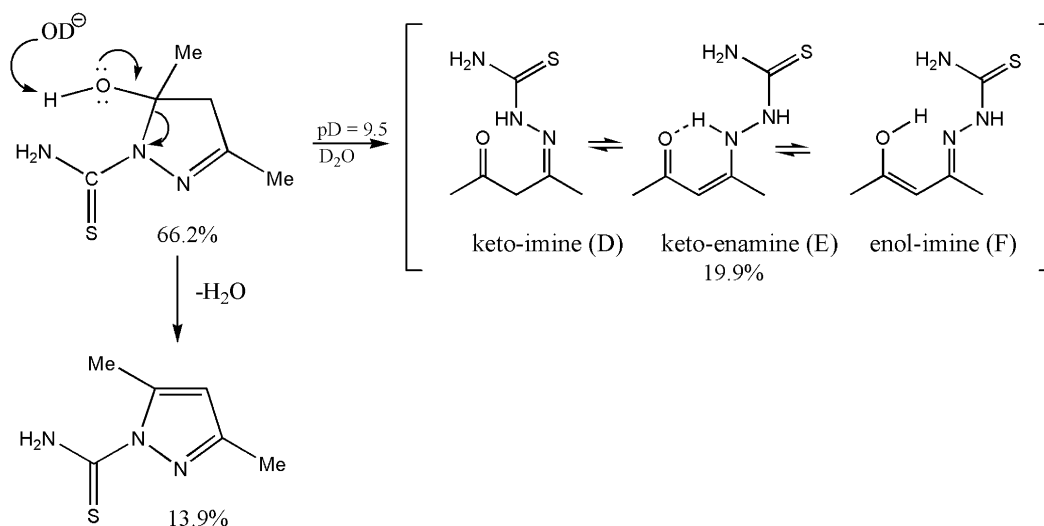
**Scheme 5.** Possible mechanism of formation of AAMP.

resonance weight dominates in the resonance hybrid, thus providing the conditions for nucleophilic attack and further cyclization.

The carbanion structure (that with the highest resonance weight) gives the possibility for intramolecular nucleophilic attack on the very electrophilic carbon of the C=N group, leading to the formation of the corresponding cyclic pyrazoline compound. This step of the reaction proceeds via transition state TS6 (Scheme 5), and requires activation barrier of 115.7 kJ/mol. The elimination of MeSH takes place easily in an alkaline medium, followed by an unpleasant mercaptane odor, yielding the tautomeric equilibrium of corresponding pyrazoles.<sup>20</sup>

In order to confirm our hypothesis about the crucial role of keto-imine tautomer, we repeated the same experiment with

carbon atom of the conjugated carbonyl group at 183.04 ppm. These data agree with the spectra of many enamines.<sup>18,21</sup> It is evident that the absence of the keto-imine form (F) in the tautomeric equilibrium does not allow any possibility of the formation of a carbanion for a nucleophilic attack and further cyclization. Also, we detected 3,5-dimethylpyrazole-1-thiocarbonylamine as a consequence of the dehydration of pyrazolinol compound. The structure of this compound was confirmed by comparison with authentic sample. It is notable that cyclic pyrazolinol (Scheme 6) is a very unstable compound even in the solid state. Its decomposition begins after several hours and all material was transformed into 3,5-dimethylpyrazole-1-thiocarbonylamine after two weeks of standing.



**Scheme 6.** Tautomeric forms of 5-hydroxy-3,5-dimethyl-1-thiocarbonyl-2-pyrazoline. The ratio of tautomer (E), 3,5-dimethylpyrazole-1-thiocarbonylamine and starting pyrazolinol compound was determined by integration of <sup>1</sup>H NMR signals of the methyl groups.

thiosemicarbazide instead of *S*-methylisothiosemicarbazide in the reaction with acetylacetone preparing its cyclic analogue 5-hydroxy-3,5-dimethyl-1-thiocarbonyl-2-pyrazoline (Scheme 6) according to the known procedure.<sup>15</sup>

After 15 h of standing in highly alkaline solution (pH > 13) there were no traces of AAMP. Then we adjusted pD at 9.5, and the almost quantitatively formed white solid was analyzed by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR in the same conditions for comparison with *S*-methylated derivative. We established that the main form in the state of the equilibrium in DMSO-*d*<sub>6</sub> solution is the starting cyclic compound (Scheme 6) The keto-enamine form (G) in the NMR spectrum of the mixture was presented as vinyl proton signal at 6.48 ppm as well as the  $\alpha$ -carbon of the vinyl group at 84.98 and a signal for the

### 3. Conclusion

The agreement between experimentally obtained and calculated bond distances, bond angles, and torsion angles of 5-hydroxy-3,5-dimethyl-1-*S*-methylisothiocarbonyl-2-pyrazolinium iodide (HDMCPI) is very good, confirming that the selected computational method is suitable for investigating the reactions of HDMCPI. In this work, the transformation of 5-hydroxy-3,5-dimethyl-1-*S*-methylisothiocarbonyl-2-pyrazolinium cation (HDMCP) in alkaline aqueous solution was investigated using experimental and computational methods.

It was shown that the reaction between the HDMCP cation and hydroxide anion proceeds smoothly, without activation barrier,

and with significant stabilization of the system. In this way the hydrated keto-imine tautomer A is formed, at 100% yield. The activation energy for the isomerization of A into keto-enamine tautomer B is significantly higher in comparison to the formation of carbanion CA2 in alkaline medium. CA2 undergoes further cyclization and elimination of MeSH, thus yielding 4-acetyl-3(5)-amino-5(3)-methylpyrazole (AAMP).

The absence of AAMP as a product of the reaction between acetylacetone with thiosemicarbazide instead of *S*-methylisothiosemicarbazide can be explained with the absence of keto-imine form in the tautomeric equilibrium, which would allow the formation of a carbanion for further cyclization. This fact confirms the crucial role of the keto-imine tautomer A in the formation of AAMP.

## 4. Experimental section

### 4.1. General methods

IR spectrum was recorded on a Perkin–Elmer Spectrum One FT-IR spectrometer with a KBr disc.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were obtained using a Varian Gemini 200 spectrometer. Melting point was determined on a Mel-Temp capillary melting points apparatus, model 1001.

### 4.2. Procedure for the preparation of HDMCPI

**4.2.1. 5-Hydroxy-3,5-dimethyl-1-*S*-methylisothiocarbamoyl-2-pyrazolium iodide (HDMCPI).** A mixture of thiosemicarbazide (9.10 g, 100 mmol) and methyl iodide (15.05 g, 106 mmol) in absolute ethanol (40 mL) was refluxed for 45 min. After 12 h, the separated white crystals of *S*-methylisothiosemicarbazide hydrogen iodide were filtered, washed with ethanol and used in the next step without further purification. Yield: 15.1 g (65%). A mixture of *S*-methylisothiosemicarbazide hydrogen iodide (11.65 g, 50 mmol) and acetylacetone (19.50 g, 195 mmol) in absolute ethanol (20 mL) was refluxed for 5 min. After cooling to room temperature, the crystallization was induced by rubbing the walls of the vessel with a glass stick. The light yellow crystals were filtered, washed three times with 5 mL of ether, and dried in air. Yield: 10.0 g (63%). Mp 157 °C. The suitable single crystals of HDMCPI for X-ray analysis were obtained by recrystallization from ethanol.

**4.2.1.1. Spectral data for HDMCPI.** IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3331, 3266, 3191, 3161, 3132, 2980, 1635, 1629, 1557, 1427, 1372, 1328, 1254, 1113, 733;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  1.68 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-C-OH}$ ), 2.04 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-C=N}$ ), 2.55 and 2.62 (3H, two s,  $\text{CH}_3\text{-S}$ ),  $\delta_A=3.24$  and  $\delta_B=3.14$  (2H, AB system,  $J_{AB}$  19.7 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 7.52 and 7.73 (1H, two br s, OH), 8.80, 8.96, and 9.42 (2H, three br s, nitrogen protons);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  14.4 ( $\text{CH}_3\text{-S}$ ), 16.7 ( $\text{CH}_3\text{-C=N}$ ), 24.7 ( $\text{CH}_3\text{-C-OH}$ ), 52.8 (C-4), 96.2 (C-5), 164.9 ( $\text{NH}_2\text{-C(N)-S}$ ), 165.3 (C-3).

**4.2.1.2. NMR data for HDMCPI in  $\text{D}_2\text{O}$ .**  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  1.83 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-C-OH}$ ), 2.13 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-C=N}$ ), 2.65 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-S}$ ), 3.32 (2H, s,  $\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  16.3 ( $\text{CH}_3\text{-S}$ ), 18.5 ( $\text{CH}_3\text{-C=N}$ ), 26.8 ( $\text{CH}_3\text{-C-OH}$ ), 55.2 (C-4), 98.9 (C-5), 168.5 ( $\text{NH}_2\text{-C(N)-S}$ ), 168.7 (C-3).

**4.2.1.3. NMR data for HDMCPI at  $\text{pD}=9.5$  (tautomeric form A).**  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{NaOD}/\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  1.95 and 2.07 (3H, two s,  $\text{CH}_3\text{-C=N}$ ), 2.17 and 2.30 (3H, two s,  $\text{CH}_3\text{-CO}$ ), 2.38 and 2.44 (3H, two s,  $\text{CH}_3\text{-S}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{NaOD}/\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  15.2 and 15.4 ( $\text{CH}_3\text{-S}$ ), 19.9 and 24.8 ( $\text{CH}_3\text{-C=N}$ ), 31.2 and 32.6 ( $\text{CH}_3\text{-CO}$ ), 50.1 (complex signal,  $\text{CH}_2$ ), 163.4 ( $\text{CH}_3\text{-C=N}$ ), 163.8 ( $\text{NH}_2\text{-C(N)-S}$ ), 214.3 (CO).

### 4.3. X-ray data collection and structure refinement

A light yellow prism shape single crystal of the compound 5-hydroxy-3,5-dimethyl-1-*S*-methylisothiocarbamoyl-2-pyrazolium iodide (HDMCPI) was selected and mounted on glass fiber. Diffraction data were collected on an OXFORD DIFFRACTION KM4 four-circle goniometer equipped with SAPPHIRE CCD detector using graphite monochromated Mo  $K\alpha$  X-radiation ( $\lambda=0.71073$  Å) at 293 (2) K in the range  $3.45 \leq \theta \leq 26.37^\circ$ . The crystals to detector distances were 45.0 mm. Crystal data:  $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{IN}_3\text{OS}$ , Fwt.: 315.17, size:  $0.69 \times 0.37 \times 0.23$  mm, monoclinic, space group  $P2_1/n$ ,  $a=12.204$  (5) Å  $b=6.417$ (5) Å,  $c=15.995$ (5) Å,  $\beta=110.402$ (5)°,  $V=1174$ (1) Å<sup>3</sup>,  $T=293$ (2) K,  $Z=4$ ,  $F(000)=616$ ,  $D_x=1.783$  Mg m<sup>-3</sup>,  $\mu=2.876$  mm<sup>-1</sup>. Cell parameters were determined by least-squares of the setting angles of 5004 ( $3.05 \leq \theta \leq 29.1^\circ$ ) reflections. A total of 4625 reflections were collected of which 2366 were unique [ $R(\text{int})=0.0118$ ,  $R(\sigma)=0.0183$ ]; 1998 reflections were  $>2\sigma$  ( $I$ ). Completeness to  $2\theta=0.989$ . The data were reduced using the Oxford Diffraction program CrysAlis<sup>pro</sup>.<sup>22</sup> A semiempirical absorption-correction based upon the intensities of equivalent reflections was applied (the minimum and maximum transmission factors were 0.53295 and 1.000), and the data were corrected for Lorentz, polarization, and background effects. Neutral atomic scattering factors, together with anomalous-dispersion corrections, were taken from the International Tables for X-ray Crystallography.<sup>23</sup> The structures were solved by direct methods (SIR-92) using program package WinGX,<sup>24</sup> and the figures were drawn using ORTEP<sup>25</sup> and MERCURY.<sup>14</sup> Anisotropic full-matrix least-squares refinement (SHELX-97)<sup>26</sup> on  $F^2$  for all non-hydrogen atoms yielded  $R1=0.0199$  and  $wR2=0.0447$  for 1998 [ $I>2\sigma(I)$ ] and  $R1=0.0275$  and  $wR2=0.0464$  for all (2366) intensity data (goodness-of-fit=1.064; the maximum and mean shift/esd 0.002 and 0.000). Number of parameters=122. The maximum and minimum residual electron density in the final difference map was 0.302 and  $-0.385$  e Å<sup>-3</sup>. All hydrogen atomic positions could be located in the difference maps. The final refinement included atomic positional and displacement parameters for all non-H atoms. The isotropic displacement parameters of the hydrogen atoms were approximated from the  $U(\text{eq})$  value of the atom they were bonded. The weighting schemes applied was  $w=1/[\sigma^2(F_o^2)+(0.0247P)^2+0.00648P]$  in **3**, where  $P=(F_o^2+2F_c^2)/3$ .

Crystallographic data (excluding structure factors) have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre as supplementary publication number CCDC 755236. Copies of this information may be obtained free of charge from The Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, UK (fax: +44 1223 336033; e-mail: [deposit@ccdc.cam.ac.uk](mailto:deposit@ccdc.cam.ac.uk) or [www.ccdc.cam.ac.uk](http://www.ccdc.cam.ac.uk)).

### 4.4. Computational methods

All calculations were carried out using the Gaussian 03 program<sup>27</sup> using the B3LYP functional.<sup>28–30</sup> The 6-311++G(d,p) basis set was used for C, O, N, S, and H, whereas 6-311G(d,p) was employed for I. The geometrical parameters of all stationary points and transition states were optimized in water ( $\epsilon=78.36$ ), using the conductor-like solvation model (CPCM).<sup>31,32</sup> All calculated structures were confirmed to be local minima (all positive eigenvalues) for ground state structures, or first-order saddle points (one negative eigenvalue) for transition state structures, by frequency calculations. The intrinsic reaction coordinates (IRCs), from the transition states down to the two lower energy structures, were traced using the IRC routine in Gaussian in order to verify that each saddle point is linked with two putative minima. The results of the IRC calculations for two crucial transition states, TS4 and TS6, are presented in Figs S2 and S3 of Supplementary data. Evolution of

relevant bonds along the reaction pathway was estimated using the natural bond orbital analysis.<sup>33</sup>

## Acknowledgements

The work was financed by the Ministry for Science of the Republic of Serbia (Grants N° 142028 and 142025) and the Provincial Secretariat for Science and Technological Development of Vojvodina.

## Supplementary data

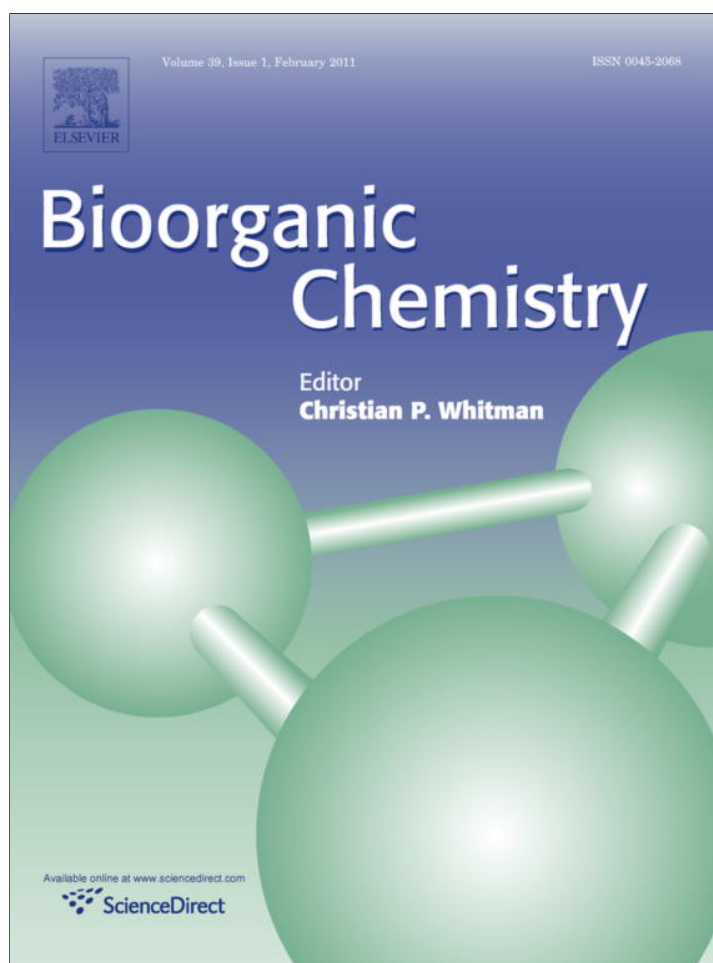
Electronic supplementary data available: X-ray crystallographic and computational data. Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.tet.2010.05.093. These data include MOL files and InChIKeys of the most important compounds described in this article.

## References and notes

1. Pevarello, P.; Brasca, M. G.; Amici, R.; Orsini, P.; Traquandi, G.; Corti, L.; Piutti, C.; Sansonna, P.; Villa, M.; Pierce, B. S.; Pulici, M.; Giordano, P.; Martina, K.; Fritzen, E. L.; Nugent, R. A.; Casale, E.; Cameron, A.; Ciomei, M.; Roletto, F.; Isacchi, A.; Fogliatto, G.; Pesenti, E.; Pastori, W.; Marsiglio, A.; Leach, K. L.; Clare, P. M.; Fiorentini, F.; Varasi, M.; Vulpetti, A.; Warpehoski, M. A. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3367–3380.
2. Pevarello, P.; Brasca, M. G.; Orsini, P.; Traquandi, G.; Longo, A.; Nesi, M.; Orzi, F.; Piutti, C.; Sansonna, P.; Varasi, M.; Cameron, A.; Vulpetti, A.; Roletto, F.; Alzani, R.; Ciomei, M.; Albanese, C.; Pastori, W.; Marsiglio, A.; Pesenti, E.; Fiorentini, F.; Bischoff, J. R.; Mercurio, C. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2944–2956.
3. Samanta, S.; Debnath, B.; Basu, A.; Gayen, S.; Srikanth, K.; Jha, T. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 1190–1195.
4. Pevarello, P.; Fancelli, D.; Vulpetti, A.; Amici, R.; Brasca, M. G.; Amici, R.; Villa, M.; Pittala, V.; Vianello, P.; Cameron, A.; Ciomei, M.; Mercurio, C.; Bischoff, J. R.; Roletto, F.; Varasi, M.; Brasca, M. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1084–1090.
5. Shapiro, G. I. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 1770–1783.
6. Misra, R. N. *Drugs Future* **2006**, *31*, 43–52.
7. Castoldi, R. E.; Pennella, G.; Saturno, G. S.; Grossi, P.; Brughera, M.; Venturi, M. *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2007**, *10*, 53–57.
8. Carpinelli, P.; Ceruti, R.; Giorgini, M. L.; Cappella, P.; Gianellini, L.; Croci, V.; Degrassi, A.; Texido, G.; Rocchetti, M.; Vianello, P.; Rusconi, L.; Storici, P.; Zugnani, P.; Arrigoni, C.; Soncini, C.; Alli, C.; Patton, V.; Marsiglio, A.; Ballinari, D.; Pesenti, E.; Fancelli, D.; Moll, J. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 3158–3168.
9. Bebbington, D.; Binch, H.; Charrier, J. D.; Everitt, S.; Frayse, D.; Golec, J.; Kay, D.; Knegtel, R.; Mak, C.; Mazzei, F.; Miller, A.; Mortimore, M.; O'Donnell, M.; Patel, S.; Pierard, F.; Pinder, J.; Pollard, J.; Ramaya, S.; Robinson, D.; Rutherford, A.; Studley, J.; Westcott, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3586–3592.
10. Velcicky, J.; Feifel, R.; Hawtin, S.; Heng, R.; Huppertz, C.; Koch, G.; Kroemer, M.; Moebitz, H.; Revesz, L.; Scheufler, C.; Schlapbach, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, , doi:10.1016/j.bmcl.2009.10.138
11. Hergold-Brundić, A.; Kaitner, B.; Kamenar, B.; Leovac, V. M.; Ivegeš, E. Z.; Juranić, N. *Inorg. Chim. Acta* **1991**, *188*, 151–158.
12. Grell, J.; Bernstein, J.; Tinhofer, G. *Acta Cryst., Sect. B* **2000**, *56*, 166.
13. Spek, A. L. *J. Appl. Crystallogr.* **2003**, *36*, 7–13.
14. Macrae, C. F.; Edgington, P. R.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Shields, G. P.; Taylor, R.; Towler, M. v. d.; Streek, J. *J. Appl. Crystallogr.* **2006**, *39*, 453–457.
15. Zelenin, K. N.; Alekseev, V. V.; Zelenin, A. K.; SushkovaYu, S. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1999**, *35*, 87–92.
16. Casas, J. S.; Castano, M. V.; Castellano, E. E.; Ellena, J.; García-Tasende, M. S.; Gato, A.; Sánchez, A.; Sanjuán, L. M.; Sordo, J. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 1550–1557.
17. Zelenin, K. N.; Alekseyev, V. V. *Top. Heterocycl. Syst.* **1996**, *1*, 141–156.
18. Katritzky, A. R.; Ghiviriga, I.; Oniciu, D. C.; O'Ferrall, R. A. M.; Walsh, S. M. J. *Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1997**, 2605–2608.
19. Yamazaki, C. *Can. J. Chem.* **1975**, *53*, 610–615.
20. Szabó, A.; Cesljević, V. I.; Kovács, A. *Chem. Phys.* **2001**, *270*, 67–78.
21. Zelenin, K. N.; Potapov, A. A.; Alekseyev, V. V.; Lagoda, I. V. *Chem. Het. Comp.* **2004**, *40*, 903–910.
22. Data collection and processing software, Vers.1 2006, (Oxford Diffraction Ltd, 68 Milton Park, OX144RX, UK).
23. *International Tables for X-ray Crystallography*; Wilson, A. J. C., Ed.; Kluwer Academic: Dordrecht, 1992; Vol C, pp 500–502; 219–222, 193–199.
24. Farrugia, L. J. *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, *32*, 837–838.
25. Farrugia, L. J. *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30*, 565.
26. Sheldrick, G. M. *SHELXL-97 Program for the Refinement of Crystal Structures*; University of Göttingen: Göttingen, 1997.
27. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian 03, E.01-SMP*; Gaussian: Pittsburgh, PA, 2003.
28. Becke, A. D. *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098–3100.
29. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785–789.
30. Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
31. Barone, V.; Cossi, M. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 1995–2001.
32. Cossi, M.; Rega, N.; Scalmani, G.; Barone, V. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 669–681.
33. Foster, J. P.; Weinhold, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7211–7218.



Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

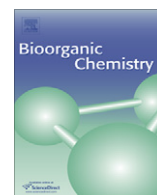
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

## Bioorganic Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bioorg](http://www.elsevier.com/locate/bioorg)

## Synthesis, antitumor activity and QSAR studies of some 4-aminomethylidene derivatives of edaravone

Violeta Marković<sup>a</sup>, Slavica Erić<sup>b</sup>, Zorica D. Juranić<sup>c</sup>, Tatjana Stanojković<sup>c</sup>, Ljubinka Joksović<sup>a</sup>, Branislav Ranković<sup>d</sup>, Marijana Kosanić<sup>d</sup>, Milan D. Joksović<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Sciences, Department of Chemistry, University of Kragujevac, R. Domanovica 12, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>b</sup> Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Vojvode Stepe 450, 11000 Belgrade, Serbia

<sup>c</sup> Institute of Oncology and Radiology of Serbia, Pasterova 14, 11000 Belgrade, Serbia

<sup>d</sup> Faculty of Sciences, Department of Biology, University of Kragujevac, R. Domanovica 12, 34000 Kragujevac, Serbia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 September 2010

Available online 28 October 2010

#### Keywords:

Edaravone derivatives

Antitumor activity

QSAR studies

### ABSTRACT

A series of aminomethylidene derivatives obtained from 4-formylederavone were synthesized and characterized by IR, NMR and elemental analysis. All the compounds were screened for their antitumor activity. The compound containing 5-phenylpyrazole moiety (**3q**) exhibited remarkable antitumor activity in *in vitro* assays, especially against human breast cancer MDA-MB-361 and MDA-MB-453 cell lines. The most important whole-molecule descriptors for antitumor activity on MDA-MB-453 cells belong to the group of quantum-chemical descriptors.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

The increasing interest in biological studies of pyrazol-5-ones in the last decade is a consequence of their wide use as the pharmaceutically important class of compounds. Among them, edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one, Radicut<sup>®</sup>, Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation) represents an example of one of the prominent drugs which acts as a potent cerebral neuroprotectant that readily scavenges reactive oxygen species and inhibits proinflammatory responses after brain ischemia in the treatment of patients in the acute stage of cerebral infarction [1,2].

Unlike edaravone, its derivatives synthesized by functionalization of the C4 position of pyrazol-5-one ring have been reported to provide a diversity of synthetic and pharmacological possibilities as pyrazol-5-one is the core structure of numerous biologically active heterocycles. Knoevenagel–Michael reaction of two equivalents of edaravone with various aromatic aldehydes afforded 4,4'-(arylmethylene)bis(1H-pyrazol-5-ols) (**I**, Fig. 1) with excellent activity against peste des petits ruminant virus (PPRV) [3]. Condensation of edaravone with pyrimidine nucleoside resulted in generation of the novel 5-substituted pyrimidine nucleosides (**II**, Fig. 1) with potent *in vitro* antiviral activity against representative orthopoxviruses [4]. Several rigid edaravone derivatives (**III**, Fig. 1) were recently synthesized by condensation of 4-formylederavone with

secondary amines and evaluated as inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis [5].

The derivatives of pyrazol-5-one have already been discovered as antitumor agents. For example, thiadiazole substituted pyrazol-5-ones (**IV**, Fig. 1) were identified as potent KDR kinase inhibitors in regulating angiogenesis which is crucial for the proliferation of tumor cells [6]. It has also been discovered that edaravone itself enhances the antitumor effects of CPT-11 in murine colon cancer by increasing apoptosis [7] and also reacts with a pterin derivative to produce a cytotoxic substance that induces intracellular reactive oxygen species generation and cell death [8]. A new derivative of edaravone, 4,4-dichloro-1-(2,4-dichlorophenyl)-3-methylpyrazol-5-one (**V**, Fig. 1), was identified as a potent blocker of human telomerase and is considered to be a valuable substance for medical treatment of cancer and related diseases [9]. In spite of widely surveyed pharmacological action of series of edaravone derivatives, antitumor screening of compounds obtained by condensation of 4-formylederavone with primary amines has not been so far reported. The particular attention in this work is focused on introduction of the known antitumor 3-aminopyrazole pharmacophores [10,11] at C4 position of the edaravone moiety and their *in vitro* antitumor evaluation.

However, the mechanism of antitumor action of edaravone derivatives synthesized in this work, containing pyrazol-5-one as a core, has not been rationalized yet. Thus, we have performed quantitative structure–cellular activity relationships study in order to investigate the structural features of edaravone analogs that may be important for antitumor activity and therefore to get some

\* Corresponding author.

E-mail address: [mjoksovic@kg.ac.rs](mailto:mjoksovic@kg.ac.rs) (M.D. Joksović).

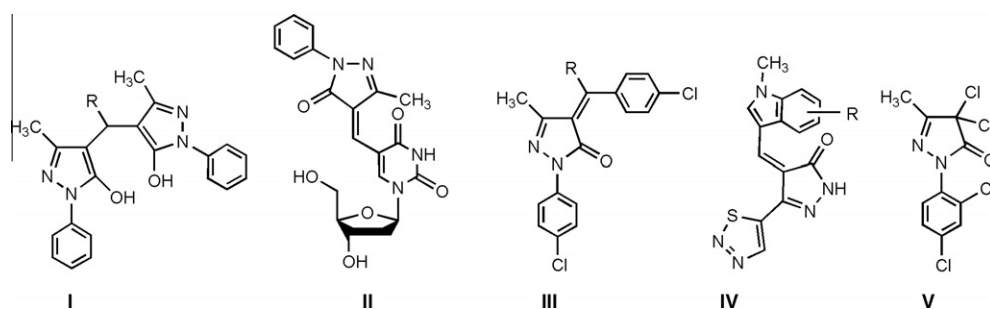


Fig. 1. Some pyrazol-5-one derivatives with pronounced biological activity.

basic direction for further investigation of the mechanism of action and optimization of these compounds.

## 2. Experimental

### 2.1. Physical measurements

Melting points were determined on a Mel-Temp capillary melting points apparatus, model 1001 and are uncorrected. Elemental (C, H, N, S) analysis of the samples was carried out by standard micromethods in the Center for Instrumental Analysis, Faculty of Chemistry, Belgrade. IR spectra were recorded on a Perkin Elmer Spectrum One FT-IR spectrometer with a KBr disc. All  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on a Varian Gemini 200 spectrometer.

### 2.2. General procedure for the preparation of 3a–q

A mixture of 4-formyl-3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (**2**, 0.303 g, 1.5 mmol), primary amine (3 mmol) and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.011 g, 0.06 mmol) in ethanol (10 mL) was heated to reflux for 2 h. After cooling, the precipitate was filtered off, washed with a little cold ethanol and dried in vacuo over anhydrous  $\text{CaCl}_2$ .

#### 2.2.1. 3-Methyl-4-((2-methylphenyl)amino)methylidene-1-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-one (3a)

0.39 g (89%); yellow powder; Mp = 182–183 °C.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 2.29 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.37 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.10–7.18 (m, 2H, Ar–H), 7.30–7.44 (m, 4H, Ar–H), 7.74 (d, 1H,  $J$  = 8.2 Hz, Ar–H), 8.00 (dd, 2H,  $J$  = 7.4 and 1.2 Hz, Ar–H), 8.75 (d, 1H,  $J$  = 12.4 Hz, =CH–N), 11.62 (d, 1H,  $J$  = 12.4 Hz, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 12.68, 16.93, 102.36, 115.99, 117.98, 124.08, 125.51, 127.09, 127.56, 128.98, 131.35, 137.15, 139.19, 146.24, 148.99, 165.67. IR (KBr disc,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3435, 1667, 1628, 1596, 1551, 1492, 1285, 750. Anal. Calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$  (291.35 g/mol): C, 74.20; H, 5.88; N, 14.42. Found: C, 74.70; H, 5.93; N, 14.41.

#### 2.2.2. 3-Methyl-4-((3-methylphenyl)amino)methylidene-1-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-one (3b)

0.35 g (80%); yellow powder; Mp = 103–104 °C (dec).  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 2.29 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.34 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.03–7.05 (m, 1H, Ar–H), 7.13 (t, 1H,  $J$  = 7.4 Hz, Ar–H), 7.31–7.40 (m, 5H, Ar–H), 7.99 (dd, 2H,  $J$  = 7.4 and 1.2 Hz, Ar–H), 8.59 (d, 1H,  $J$  = 9.0 Hz, =CH–N), 11.25 (d, 1H,  $J$  = 9.0 Hz, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 12.72, 21.08, 101.94, 115.20, 117.86, 118.22, 123.97, 126.32, 128.98, 129.73, 138.81, 139.29, 139.61, 145.89, 149.21, 165.20. IR (KBr disc,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3436, 1664, 1628, 1602, 1545, 1493, 1301, 755. Anal. Calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$  (291.35 g/mol): C, 74.20; H, 5.88; N, 14.42. Found: C, 74.59; H, 5.84; N, 14.39.

#### 2.2.3. 3-Methyl-4-((4-methylphenyl)amino)methylidene-1-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-one (3c)

0.35 g (80%); yellow powder; Mp = 165–166 °C.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 2.28 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.30 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.13 (t, 1H,  $J$  = 7.4 Hz, Ar–H), 7.25 (d, 2H,  $J$  = 8.2 Hz, Ar–H), 7.35–7.49 (m, 4H, Ar–H), 8.00 (dd, 2H,  $J$  = 7.4 and 1.2 Hz, Ar–H), 8.56 (d, 1H,  $J$  = 10.8 Hz, =CH–N), 11.31 (d, 1H,  $J$  = 10.8 Hz, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 12.70, 20.51, 101.66, 117.83, 117.95, 123.92, 128.96, 130.29, 135.02, 136.56, 139.34, 145.93, 149.16, 165.17. IR (KBr disc,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3437, 1670, 1652, 1593, 1486, 1293, 1284, 754. Anal. Calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$  (291.35 g/mol): C, 74.20; H, 5.88; N, 14.42. Found: C, 74.49; H, 5.87; N, 14.40.

#### 2.2.4. 3-Methyl-4-((2-nitrophenyl)amino)methylidene-1-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-one (3d)

0.43 g (89%); orange powder; Mp = 238–239 °C (dec).  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 2.31 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.15 (t, 1H,  $J$  = 7.4 Hz, Ar–H), 7.35–7.46 (m, 3H, Ar–H), 7.87 (td, 1H,  $J$  = 7.4 and 1.4 Hz, Ar–H), 7.97 (dd, 2H,  $J$  = 7.4 and 1.2 Hz, Ar–H), 8.16 (d, 1H,  $J$  = 8.0 Hz, Ar–H), 8.27 (dd, 1H,  $J$  = 8.2 and 1.2 Hz, Ar–H), 8.71 (d, 1H,  $J$  = 8.4 Hz, =CH–N), 12.68 (d, 1H,  $J$  = 8.4 Hz, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 12.18, 105.58, 117.92, 118.67, 124.24, 124.87, 126.47, 129.04, 135.09, 136.29, 137.16, 138.91, 144.20, 149.51, 164.61. IR (KBr disc,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3436, 1672, 1624, 1599, 1331, 1306, 1257, 1161, 747. Anal. Calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3$  (322.32 g/mol): C, 63.35; H, 4.38; N, 17.38. Found: C, 63.32; H, 4.38; N, 17.40.

#### 2.2.5. 3-Methyl-4-((3-nitrophenyl)amino)methylidene-1-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-one (3e)

0.46 g (95%); light orange powder; Mp = 181–182 °C (dec).  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 2.29 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.13 (t, 1H,  $J$  = 7.4 Hz, Ar–H), 7.40 (t, 2H,  $J$  = 8.0 Hz, Ar–H), 7.67 (t, 1H,  $J$  = 8.0 Hz, Ar–H), 7.97 (m, 4H, Ar–H), 8.52 (t, 1H,  $J$  = 2.2 Hz, Ar–H), 8.64 (bs, 1H, =CH–N), 11.36 (bs, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 12.81, 103.36, 112.61, 117.82, 119.55, 124.05, 124.69, 128.98, 131.02, 139.14, 140.58, 145.69, 148.97, 149.52, 164.83. IR (KBr disc,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3435, 1671, 1643, 1597, 1530, 1502, 1355, 1313, 1292, 738. Anal. Calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3$  (322.32 g/mol): C, 63.35; H, 4.38; N, 17.38. Found: C, 63.41; H, 4.40; N, 17.43.

#### 2.2.6. 3-Methyl-4-((4-nitrophenyl)amino)methylidene-1-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-one (3f)

0.43 g (89%); brown powder; Mp = 204–205 °C (dec).  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 2.30 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.15 (t, 1H,  $J$  = 7.4 Hz, Ar–H), 7.42 (t, 2H,  $J$  = 7.4 Hz, Ar–H), 7.82 (d, 2H,  $J$  = 9.2 Hz, Ar–H), 7.97 (dd, 2H,  $J$  = 7.4 and 1.2 Hz, Ar–H), 8.29 (d, 2H,  $J$  = 9.2 Hz, Ar–H), 8.64 (bs, 1H, =CH–N), 11.41 (bs, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 12.78, 104.46, 117.89, 118.26, 124.24, 125.59, 129.05, 132.89, 138.98, 143.92, 144.90, 149.62, 164.74. IR (KBr disc,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3421, 1664, 1636, 1591, 1509, 1498, 1339,

1279, 749. Anal. Calcd for  $C_{17}H_{14}N_4O_3$  (322.32 g/mol): C, 63.35; H, 4.38; N, 17.38. Found: C, 63.66; H, 4.39; N, 17.43.

2.2.7. 4-*[(4-Hydroxyphenyl)amino]methylidene*-3-methyl-1-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-one (**3g**)

0.38 g (86%); yellow powder; Mp = 277–278 °C.  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 2.26 (s, 3H,  $CH_3$ ), 6.83 (d, 2H,  $J = 9.0$  Hz, Ar–H), 7.11 (t, 1H,  $J = 7.4$  Hz, Ar–H), 7.35–7.43 (m, 4H, Ar–H), 8.00 (dd, 2H,  $J = 7.4$  and 1.2 Hz, Ar–H), 8.45 (bs, 1H, =CH–N), 9.62 (s, 1H, OH), 11.36 (bs, 1H, NH).  $^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 12.69, 100.93, 116.29, 117.80, 119.77, 123.83, 128.96, 130.88, 139.47, 146.18, 149.01, 155.80, 165.20$ . IR (KBr disc,  $cm^{-1}$ ): 3411, 1665, 1650, 1596, 1522, 1485, 1306, 1267, 752. Anal. Calcd for  $C_{17}H_{15}N_3O_2$  (293.33 g/mol): C, 69.61; H, 5.15; N, 14.33. Found: C, 69.94; H, 5.19; N, 14.38.

2.2.8. 3-Methyl-1-phenyl-4-*[(thiophen-2-ylmethyl)amino]methylidene*-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-one (**3h**)

0.28 g (62%); light yellow crystals; Mp = 116–117 °C.  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 2.17$  (s, 3H,  $CH_3$ ), 4.83 (s, 2H,  $CH_2$ ), 7.02–7.16 (m, 3H, 2H(Thi) and 1H(Ar)), 7.32 (t, 2H,  $J = 7.4$  Hz, Ar–H), 7.52 (dd, 1H,  $J = 5.2$  and 1.2 Hz, Thi–H), 7.96 (dd, 2H,  $J = 7.4$  and 1.2 Hz, Ar–H), 8.13 (d, 1H,  $J = 12.0$  Hz, =CH–N), 9.89 (bs, 1H, NH).  $^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 12.52, 47.00, 99.50, 117.66, 123.53, 126.60, 127.03, 127.47, 128.86, 139.67, 140.42, 148.55, 153.05, 165.16$ . IR (KBr disc,  $cm^{-1}$ ): 3446, 3283, 1662, 1621, 1593, 1553, 1499, 1308, 1286, 1254, 758, 701, 693. Anal. Calcd for  $C_{16}H_{15}N_3OS$  (297.38 g/mol): C, 64.62; H, 5.08; N, 14.13; S, 10.78. Found: C, 64.90; H, 5.09; N, 14.15; S, 10.83.

2.2.9. 3-Methyl-1-phenyl-4-*[(pyridin-2-ylmethyl)amino]methylidene*-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-one (**3i**)

0.28 g (63%); white crystals; Mp = 92–93 °C (dec).  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 2.18$  (s, 3H,  $CH_3$ ), 4.68 (s, 2H,  $CH_2$ ), 7.07 (t, 1H,  $J = 7.4$  Hz, Ar–H), 7.35 (t, 2H,  $J = 7.4$  Hz, Ar–H), 7.42 (two d, 1H,  $J = 4.8$  and 5.8 Hz, Py–H), 7.82 (dt, 1H,  $J = 5.8$  and 1.6 Hz, Py–H), 7.98 (dd, 2H,  $J = 7.4$  and 1.2 Hz, Ar–H), 8.17 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz, =CH–N), 8.54 (dd, 1H,  $J = 4.8$  and 1.6 Hz, Py–H), 8.62 (d, 1H,  $J = 1.6$  Hz, Py–H), 9.90 (bs, 1H, NH).  $^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 12.57, 50.09, 99.57, 117.65, 123.50, 123.95, 128.86, 133.75, 135.78, 139.73, 148.66, 149.23, 149.40, 153.68, 165.16$ . IR (KBr disc,  $cm^{-1}$ ): 3422, 3205, 1668, 1628, 1593, 1547, 1500, 1488, 1440, 1345, 1238, 759. Anal. Calcd for  $C_{17}H_{16}N_4O$  (292.34 g/mol): C, 69.85; H, 5.52; N, 19.16. Found: C, 70.01; H, 5.54; N, 19.21.

2.2.10. 4-*[(Furan-2-ylmethyl)amino]methylidene*-3-methyl-1-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-one (**3j**)

0.16 g (38%); yellow-orange powder; Mp = 110–111 °C.  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 2.17$  (s, 3H,  $CH_3$ ), 4.67 (s, 2H,  $CH_2$ ), 6.42–6.48 (m, 2H, Fur–H), 7.08 (t, 1H,  $J = 7.4$  Hz, Ar–H), 7.36 (t, 2H,  $J = 7.4$  Hz, Ar–H), 7.68 (dd, 1H,  $J = 2.6$  and 1.0 Hz, Fur–H), 7.96 (dd, 2H,  $J = 7.4$  and 1.2 Hz, Ar–H), 8.10 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz, =CH–N), 9.75 (bs, 1H, NH).  $^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 12.50, 45.24, 99.56, 108.65, 110.97, 117.67, 123.55, 128.86, 139.65, 143.53, 148.51, 150.72, 153.44, 165.20$ . IR (KBr disc,  $cm^{-1}$ ): 3436, 3290, 1666, 1625, 1593, 1502, 1487, 1310, 1299, 761. Anal. Calcd for  $C_{16}H_{15}N_3O_2$  (281.31 g/mol): C, 68.31; H, 5.37; N, 14.94. Found: C, 68.67; H, 5.38; N, 14.97.

2.2.11. 3-Methyl-1-phenyl-4-thioureidomethylidene-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-one (**3k**)

0.30 g (77%); yellow powder; Mp = 227–228 °C (dec).  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 2.25$  (s, 3H,  $CH_3$ ), 7.16 (t, 1H,  $J = 7.4$  Hz, Ar–H), 7.42 (t, 2H,  $J = 7.4$  Hz, Ar–H), 7.92 (dd, 2H,  $J = 7.4$  and 1.2 Hz, Ar–H), 8.63 (bs, 1H, =CH–N), 9.38 (s, 1H, C(=S)NH), 9.55

(s, 1H, C(=S)NH), 11.44 (bs, 1H, NH).  $^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 12.59, 106.37, 118.00, 124.55, 129.14, 138.69, 144.01, 150.06, 164.02, 181.66$ . IR (KBr disc,  $cm^{-1}$ ): 3438, 3358, 3319, 3178, 1671, 1633, 1608, 1597, 1498, 1233, 1163, 1004, 756. Anal. Calcd for  $C_{12}H_{12}N_4OS$  (260.32 g/mol): C, 55.37; H, 4.65; N, 21.52; S, 12.32. Found: C, 55.49; H, 4.65; N, 21.53; S, 12.37.

2.2.12. 4-*[(4-Methoxy-5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]methylidene*-3-methyl-1-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-one (**3l**)

0.36 g (74%); yellow powder; Mp = 274–275 °C (dec).  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 2.27$  (s, 3H,  $CH_3$ ), 2.45 (s, 3H,  $CH_3$ ), 2.56 (s, 3H,  $CH_3$ ), 7.14 (t, 1H,  $J = 7.4$  Hz, Ar–H), 7.41 (t, 2H,  $J = 7.4$  Hz, Ar–H), 7.98 (dd, 2H,  $J = 7.4$  and 1.2 Hz, Ar–H), 8.43 (d, 1H,  $J = 12.6$  Hz, =CH–N), 12.40 (d, 1H,  $J = 12.6$  Hz, NH), 13.11 (s, 1H, NH, Pz).  $^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 12.48, 12.66, 29.66, 103.43, 108.10, 117.83, 124.04, 129.01, 139.16, 142.35, 144.24, 149.06, 149.23, 164.78, 193.88$ . IR (KBr disc,  $cm^{-1}$ ): 3444, 3254, 1674, 1644, 1619, 1593, 1535, 1494, 1321, 1271, 951, 584. Anal. Calcd for  $C_{17}H_{17}N_5O_2$  (323.35 g/mol): C, 63.15; H, 5.30; N, 21.66. Found: C, 63.20; H, 5.31; N, 21.69.

2.2.13. 4-*[(4-Ethoxycarbonyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]methylidene*-3-methyl-1-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-one (**3m**)

0.33 g (65%); yellow crystals; Mp = 244–245 °C (dec).  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 1.36$  (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz,  $CH_3$ ), 2.54 (s, 3H,  $CH_3$ ), 4.32 (q, 2H,  $J = 7.2$  Hz,  $CH_2$ ), 7.13 (t, 1H,  $J = 7.4$  Hz, Ar–H), 7.41 (t, 2H,  $J = 7.4$  Hz, Ar–H), 7.98 (dd, 2H,  $J = 7.4$  and 1.2 Hz, Ar–H), 8.38 (d, 1H,  $J = 1.8$  Hz, Pz–H), 8.44 (d, 1H,  $J = 12.2$  Hz, =CH–N), 11.78 (d, 1H,  $J = 12.2$  Hz, NH), 13.45 (s, 1H, NH, Pz).  $^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 12.58, 14.33, 60.42, 101.11, 103.42, 117.87, 124.08, 128.99, 134.10, 139.10, 142.78, 147.96, 149.16, 162.79, 165.10$ . IR (KBr disc,  $cm^{-1}$ ): 3439, 3352, 1661, 1611, 1601, 1541, 1279, 1089, 751. Anal. Calcd for  $C_{17}H_{17}N_5O_3$  (339.35 g/mol): C, 60.17; H, 5.05; N, 20.64. Found: C, 60.28; H, 5.02; N, 20.64.

2.2.14. 4-*[(5-(Furan-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl)amino]methylidene*-3-methyl-1-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-one (**3n**)

0.35 g (70%); yellow crystals; Mp = 230–231 °C (dec).  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 2.27$  (s, 3H,  $CH_3$ ), 6.65 (two d, 1H,  $J = 2.0$  and 1.6 Hz, Fur–H), 6.79 (d, 1H,  $J = 2.0$  Hz, Fur–H), 6.87 (d, 1H,  $J = 3.2$  Hz, Pz–H), 7.13 (t, 1H,  $J = 7.4$  Hz, Ar–H), 7.41 (t, 2H,  $J = 7.4$  Hz, Ar–H), 7.82 (d, 1H,  $J = 1.6$  Hz, Fur–H), 7.99 (dd, 2H,  $J = 7.4$  and 1.2 Hz, Ar–H), 8.49 (s, 1H, =CH=N), 11.18 (bs, 1H, OH), 13.29 (d, 1H,  $J = 2.0$  Hz, NH, Pz).  $^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 12.64, 90.91, 101.83, 107.69, 112.12, 117.90, 124.03, 129.00, 135.68, 139.26, 143.67, 144.34, 145.70, 149.13, 149.23, 165.13$ . IR (KBr disc,  $cm^{-1}$ ): 3446, 3231, 1671, 1614, 1596, 1542, 1498, 1400, 1320, 753. Anal. Calcd for  $C_{18}H_{15}N_5O_2$  (333.35 g/mol): C, 64.86; H, 4.54; N, 21.01. Found: C, 65.00; H, 4.86; N, 21.07.

2.2.15. 3-Methyl-4-*[(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)amino]methylidene*-1-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-one (**3o**)

0.26 g (62%); yellow powder; Mp = 213–214 °C (dec).  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 2.24$  (s, 3H,  $CH_3$ ), 2.25 (s, 3H,  $CH_3$ ), 6.25 (d, 1H,  $J = 1.4$  Hz, Pz–H), 7.12 (t, 1H,  $J = 7.4$  Hz, Ar–H), 7.40 (t, 2H,  $J = 7.4$  Hz, Ar–H), 7.98 (dd, 2H,  $J = 7.4$  and 1.2 Hz, Ar–H), 8.39 (s, 1H, =CH=N), 11.17 (bs, 1H, OH), 12.45 (s, 1H, NH, Pz).  $^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 10.82, 12.62, 93.31, 101.35, 117.89, 123.97, 128.98, 139.32, 140.88, 145.64, 148.44, 149.02, 165.18$ . IR (KBr disc,  $cm^{-1}$ ): 3437, 3245, 1669, 1620, 1595, 1548, 1499, 1320, 1302, 755. Anal. Calcd for  $C_{15}H_{15}N_5O$  (281.32 g/mol): C, 64.04; H, 5.37; N, 24.89. Found: C, 64.44; H, 5.40; N, 24.94.

#### 2.2.16. 3-Methyl-1-phenyl-4-[[*(1H-pyrazol-3-yl)amino*]methylidene]-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol-5-one (**3p**)

0.36 g (90%); yellow crystals; Mp = 221–222 °C (dec). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 2.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.51 (t, 1H, *J* = 2.2 Hz, Pz–H), 7.13 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, Ar–H), 7.40 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, Ar–H), 7.78 (t, 1H, *J* = 2.2 Hz, Pz–H), 7.98 (dd, 2H, *J* = 7.4 and 1.2 Hz, Ar–H), 8.46 (s, 1H, –CH=N), 11.40 (bs, 1H, OH), 12.77 (s, 1H, NH, Pz). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 12.65, 94.14, 101.48, 117.89, 123.99, 128.99, 131.05, 139.29, 145.86, 148.40, 149.06, 165.17. IR (KBr disc, cm<sup>-1</sup>): 3446, 3215, 1658, 1605, 1551, 1499, 1484, 1285, 756. Anal. Calcd for C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O (267.29 g/mol): C, 62.91; H, 4.90; N, 26.20. Found: C, 62.98; H, 4.93; N, 26.21.

#### 2.2.17. 3-Methyl-1-phenyl-4-[[*(5-phenyl-1H-pyrazol-3-yl)amino*]methylidene]-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol-5-one (**3q**)

0.47 g (91%); yellow crystals; Mp = 263–264 °C (dec). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 2.28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.95 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, Pz–H), 7.13 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, Ar–H), 7.37–7.54 (m, 5H, Ar–H), 7.75 (dd, 2H, *J* = 7.0 and 1.4 Hz, Ar–H), 8.00 (dd, 2H, *J* = 7.4 and 1.2 Hz, Ar–H), 8.49 (s, 1H, –CH=N), 11.19 (bs, 1H, OH), 13.26 (s, 1H, NH, Pz). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 12.66, 91.65, 101.73, 117.92, 124.03, 124.06, 125.40, 129.00, 129.02, 129.36, 139.27, 144.18, 145.72, 149.06, 149.29, 165.21. IR (KBr disc, cm<sup>-1</sup>): 3445, 3238, 1671, 1615, 1595, 1550, 1498, 1482, 1404, 1321, 743. Anal. Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O (343.39 g/mol): C, 69.96; H, 4.99; N, 20.39. Found: C, 70.10; H, 5.03; N, 20.44.

### 2.3. Treatment of tumor cell lines

Stock solutions (10 mM) of compounds were made in dimethylsulfoxide (DMSO), and dissolved in corresponding medium to the required working concentrations. Human cervix adenocarcinoma HeLa cells, human chronic myelogenous leukemia K562, human breast cancer MDA-MB-361 and MDA-MB-453 cells and human colon carcinoma LS174 cells were cultured as a monolayer, while were grown in a suspension in the complete nutrient medium, at 37 °C in humidified air atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. For the growth of MDA-MB-361 and MDA-MB-453 cells complete medium was enriched with 1.11 g/L glucose. Neoplastic HeLa cells (2000 cells per well), MDA-MB-361 cells (7000 cells per well), MDA-MB-453 cells (3000 cells per well), human colon carcinoma LS174 cells (7000 cells per well), were seeded into 96-well microtiter plates. Twenty-four hours later, after the cell adherence, five different, double diluted, concentrations of investigated compounds were added to the wells, except for the control cells to which a nutrient medium only was added. K562 cells (3000 cells per well) were seeded, 2 h before addition of investigated compounds to give the desired final concentrations. Nutrient medium was RPMI-1640, supplemented with L-glutamine (3 mM), streptomycin (100 lg/mL), and penicillin (100 IU/mL), 10% heat inactivated (56 °C) FBS and 25 mM Hepes, and the pH of the medium was adjusted to 7.2 by bicarbonate solution. The cultures were incubated for 72 h. At the end of this incubation period, antiproliferative activity *in vitro* was determined by the MTT test [12] modified by Ohno and Abe [13]. Results are presented as the mean ± SD of three independent experiments. IC<sub>50</sub> is used as the measure of the toxic agents action and is determined from the graph S(%) = f(c), as the concentration of the agent which induces decrease in cell survival to 50%.

### 2.4. QSAR analysis

The set of 18 compounds synthesized in this study, including edaravone, (Scheme 1) was used for QSAR (quantitative structure–activity relationships) analysis. All structures were constructed using Spartan software [14]. Geometry optimization

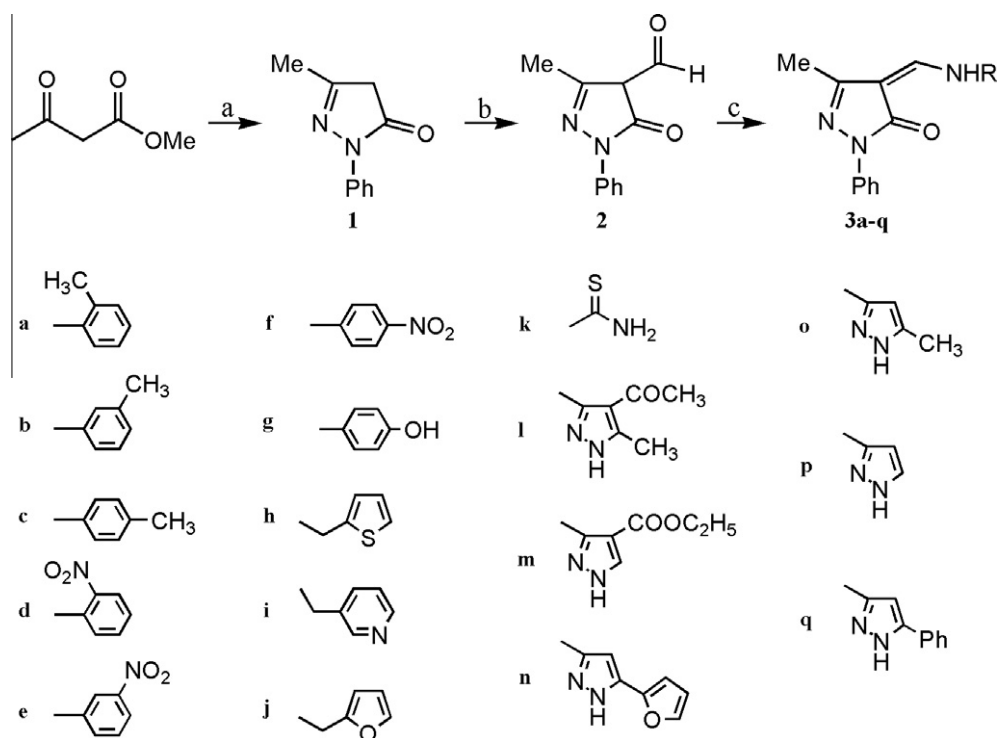
was performed by the AM1 semi-empirical method implemented in the Spartan software. Calculation of descriptors was performed using Codessa software (Comprehensive Descriptors for Structural and Statistical Analysis) [15]. A total of 450 descriptors were calculated and divided into five groups: constitutional, topological, geometrical, electrostatic and quantum-chemical. The heuristic method (HM) implemented in Codessa software was used for the selection of the most significant descriptors for antiproliferative activity of investigated edaravone derivatives on HeLa, MDA-MB-453 and K562 cancer cells. HM, as an advanced algorithm based on MLR, is suitable for preliminary studies of structural features important for activity of ligands, when mechanism of action of new compounds is not discovered yet. The advantage of HM is based on its unique strategy of selecting descriptors on the basis of their statistical significance: (a) first of all, all descriptors are checked to ensure that values of each descriptor are available for each structure, otherwise descriptors for which values are not available in data set are discarded; (b) descriptors having constant value for all structures in the data set are also discarded; (c) thereafter all possible one-parameter regression models are tested and insignificant descriptors are removed; (d) the program calculates the pair correlation matrix of descriptors and further reduces the descriptor pool by eliminating highly correlated descriptors. Therefore, HM represents an excellent tool for descriptor selection in preliminary analysis of structural features affecting the activity of drugs [16]. In this work, we first performed one-parameter heuristic analysis in order to investigate the structural features that are most significant for antitumor activity of compounds synthesized. Then we used heuristic 3-parameter analysis to establish preliminary QSAR equations for antiproliferative activity on HeLa, MDA-MB-453 and K562 cells tested in this study (Table 1).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Synthesis and spectral characterization

Compounds **3a–q** were prepared according to Scheme 1. Edaravone **1** was synthesized by the known condensation reaction of β-keto esters with phenylhydrazine. Under Vilsmeier conditions with POCl<sub>3</sub> and *N,N*-dimethylformamide, edaravone **1** was transformed into formylated derivative **2** [17]. Aldehyde precursor **2** was then reacted with selected primary amines affording the desired aminomethylidene derivatives of 4-formylederavone **3a–q** in good to excellent yields.

The preparation of the sufficiently pure aminomethylidene derivatives of 4-formylederavone was not possible by simple classical condensation reaction between aldehyde and amine in an equimolar ratio or in a slight excess of one of the reactants. Namely, the existence of four tautomeric forms of 4-formylederavone **2** [18] can make some difficulties in preparation of 4-aminomethylidene derivatives **3a–q** in high yields and without further purification. Initially, we tried the reaction of aldehyde **2** with primary amine in the presence of a slight excess of amine reagent (10%) but the major product was contaminated with hydroxymethylene tautomer of starting aldehyde. When we carried out this reaction with amines in form of their hydrochloride salts, we found a large content of hydroxymethylene tautomer and very low yield of the final product. Then, we investigated the reaction in the alkaline conditions using 1 equivalent of LiOH and a solid was subjected to column chromatography in order to obtain the pure compound **3**. However, when we performed this reaction with two equivalents of primary amines in the presence of catalytic amount of *p*-toluenesulphonic acid (*p*-TSA), pure compounds were isolated in good to high yields without presence of any



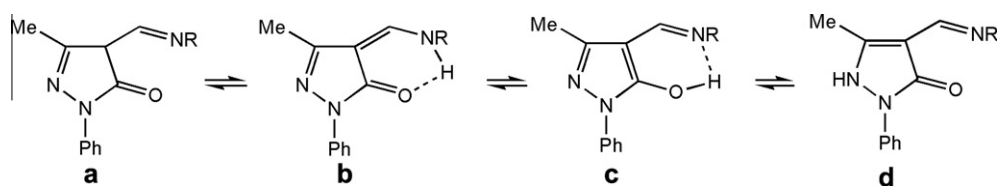
**Scheme 1.** Reagents and conditions: (a) PhNHNH<sub>2</sub>, EtOH, reflux, 3 h; (b) DMF, POCl<sub>3</sub>, heat, 80 °C, 1.5 h; (c) RNH<sub>2</sub>, p-TSA, EtOH, reflux, 2 h.

**Table 1**  
IC<sub>50</sub> (μg/ml) for the 72 h of action of investigated compounds and cisplatin on the HeLa, MDA-MB-361, MDA-MB-453, K562 and LS174 cells determined by MTT test.

Compounds	HeLa	MDA-MB-361	MDA-MB-453	K562	LS174
IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>					
<b>3a</b>	185.67 ± 0.02	n.d.	>200	154.50 ± 0.96	n.d.
<b>3b</b>	72.91 ± 0.78	n.d.	91.53 ± 0.06	72.79 ± 2.21	n.d.
<b>3c</b>	86.32 ± 0.96	n.d.	>200	137.08 ± 1.65	n.d.
<b>3d</b>	>200	n.d.	169.20 ± 1.76	168.02 ± 1.80	n.d.
<b>3e</b>	183.75 ± 0.21	n.d.	176.74 ± 4.02	115.62 ± 0.93	n.d.
<b>3f</b>	184.15 ± 1.43	n.d.	>200	167.26 ± 1.08	n.d.
<b>3g</b>	180.06 ± 1.11	n.d.	>200	185.15 ± 2.35	n.d.
<b>3h</b>	62.76 ± 0.25	n.d.	110.90 ± 0.53	87.18 ± 1.08	n.d.
<b>3i</b>	148.58 ± 1.84	n.d.	98.18 ± 0.23	80.51 ± 6.24	n.d.
<b>3j</b>	69.18 ± 1.69	n.d.	117.42 ± 1.59	86.82 ± 1.18	n.d.
<b>3k</b>	>200	n.d.	>200	158.92 ± 1.39	n.d.
<b>3l</b>	188.97 ± 0.11	n.d.	178.47 ± 0.43	187.18 ± 0.95	>200
<b>3m</b>	124.10 ± 0.34	n.d.	74.24 ± 0.24	75.65 ± 2.89	88.165 ± 3.55
<b>3n</b>	83.71 ± 1.22	n.d.	44.75 ± 0.12	79.91 ± 0.69	64.825 ± 3.70
<b>3o</b>	130.56 ± 2.23	n.d.	91.06 ± 5.11	79.77 ± 0.65	89.61 ± 1.27
<b>3p</b>	174.19 ± 0.98	n.d.	88.84 ± 1.72	166.39 ± 0.24	126.81 ± 1.44
<b>3q</b>	35.79 ± 2.35	13.63 ± 3.56	10.51 ± 0.09	22.13 ± 3.85	169.48 ± 1.01
<b>Edaravone</b>	195.28 ± 0.33	n.d.	99.36 ± 0.22	108.59 ± 1.35	92.87 ± 5.34
<b>Cis-DDP</b>	2.41 ± 0.14	14.74 ± 0.36	3.75 ± 0.12	7.9 ± 0.20	7.95 ± 0.32

n.d.: Not determined.

<sup>a</sup> Concentrations of examined compounds that induced a 50% decrease in HeLa, MDA-MB-453, K562, and LS174 cell survival (expressed IC<sub>50</sub> (μM)).



**Scheme 2.** Possible tautomers of aminomethylidene derivatives of 4-formyledaravone.

tautomeric form of starting aldehyde or amine reagent. Also, it has been observed that ethanol is the best solvent for carrying out this reaction using p-TSA as an acidic catalyst.

Like aldehyde precursor **2**, aminomethylidene derivatives of 4-formyledaravone **3a–q** can exist in four tautomeric forms (Scheme 2.) in dependence on experimental conditions.

IR spectra of all compounds **3a–q** in KBr disc contain the strong band of the conjugated carbonyl group between 1658 and 1674  $\text{cm}^{-1}$  together with broad absorption band of intramolecularly hydrogen-bonded N–H stretching frequencies at about 3440  $\text{cm}^{-1}$  indicating the tautomer **B** as a main form in the solid state. These observations for N–H stretching frequencies are in accordance with IR spectra of some aminomethylidene derivatives of pyrazol-5-one with exocyclic double bond at C4 position [19]. An X-ray analysis of a similar compound obtained as a condensation product of 4-formyldaravone and 2-aminoethanol confirmed the existence of keto–amine tautomeric form in the solid state [20].

The information obtained from  $^1\text{H}$  NMR spectra in  $\text{DMSO-d}_6$  solution has shown that compounds **3a–m** exist predominantly as **B** structure stabilized by intramolecular hydrogen bonds. A doublet observed as a result of couplings between protons attached to exocyclic carbon atom and amino protons confirms this hypothesis and rules out the presence of other tautomeric structures. Although the splitting of exocyclic CH protons is not well resolved in all homologs, the same structure should exist because it has the same or very similar chemical shift for this proton. Even more, a fast equilibrium change between **B** and **C** tautomers might be present, resulting in appearance of an average NMR signal.

However, 5-substituted-3-aminopyrazole derivatives **3n–q** displayed an intense, sharp singlet for exocyclic CH proton and a strongly deshielded, exchangeable with  $\text{D}_2\text{O}$  signal at the lower field, suggesting the tautomer structure **C** as a dominant form in  $\text{DMSO-d}_6$  solution. This chemical shift value exclude tautomer **D** since in this case, a location of the ring nitrogen proton at significantly higher field should be expected.

### 3.2. Antitumor activity

All synthesized compounds **3a–q** were evaluated for their antiproliferative activity against human cervix adenocarcinoma HeLa cells, human chronic myelogenous leukemia K562, human breast cancer MDA-MB-361 and MDA-MB-453 cells and human colon car-

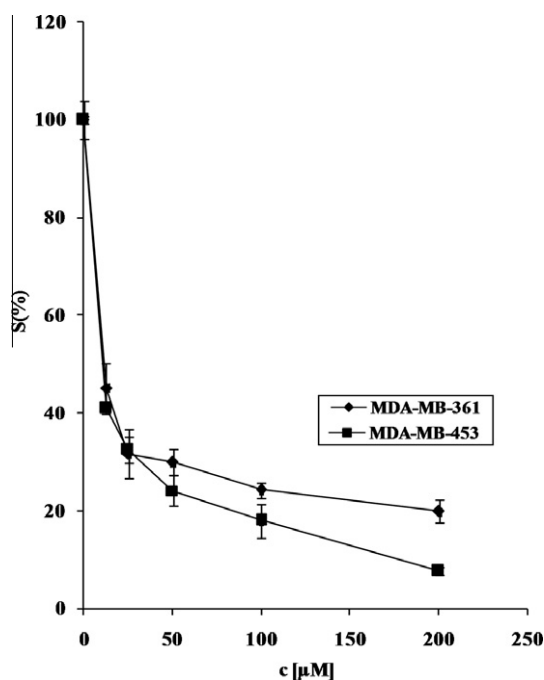


Fig. 2. Representative graph shows survival of MDA-MB-361 and MDA-MB-453 cell grown for 72 h in the presence of increasing concentrations of **3q**.

cinoma LS174 with cisplatin (cis-DDP) as referent cytostatic. Table 1 represents the results of cytotoxic activity, while Fig. 2 depicts the cytotoxic curves from MTT assay showing the survival of MDA-MB-361 and MDA-MB-453 cell grown for 72 h in the presence of increasing concentrations of **3q**.

Tautomerism might play an important role in antitumor activity of all tested compounds against several cell lines. In general, the compounds **3n** and **3q** containing 3-aminopyrazole moiety and existing in tautomeric form **C** showed the most potent antiproliferative activity, especially towards human breast carcinoma cells. Compound **3q** exhibited stronger cytotoxicity in inhibition of MDA-MB-361 type cell lines in comparison with cisplatin. The second important condition for the suppress of cell growth is kind of substituent at C5 position of pyrazole ring from 3-aminopyrazole pharmacophore. It is evident that the heteroaromatic and planar aromatic rings at C5 of pyrazole unit (**3n** and **3q**) more efficiently inhibited the growth of MDA-MB-453 with respective  $\text{IC}_{50}$  value being 2- and 9-fold lower than those observed for the compound **3o** with methyl group at C5 position. Comparing the compounds **3l** and **3m** in the same tautomeric form **B** it has been observed that methyl group at C5 shows a dramatic trend of lowering of cytotoxic activity against all type cell lines. It is interesting to note that edaravone alone was found to be significantly less active than compound **3q**.

### 3.3. QSAR studies

The antiproliferative activity of edaravone against HeLa, MDA-MB-453 and K562 cells occurs even without additional impact of substituent at position C4. The mechanism of direct antiproliferative activity of edaravone on different cancer cells still remains unclear, but it could be supposed that, besides the antioxidant activity for protecting normal cells, edaravone could inhibit hypothetical target that is included in proliferation process of cancer cells. It is noteworthy to emphasize that all our synthesized compounds showed very low antioxidant activity in comparison with edaravone. Regarding the structure of edaravone, possible mode of action with hypothetical target could include H-bond interactions with carbonyl group at position C5 in all possible tautomeric forms, hydrophobic interactions with phenyl ring, as well as interactions with nitrogen in position 2, depending on tautomeric form of edaravone that is predominant in physiological conditions. Introduction of different substituents at position C4 of edaravone increased, more or less significantly, antitumor activity of all derivatives against HeLa cells, and also antitumor activity of some C4-substituted edaravone derivatives against MDA-MB-453 and K562 cells. We tried to investigate the influence of substituents on whole-molecule features of edaravone derivatives, as well as features of substituents as fragments with respect to their antitumor activity, since pyrazolin-5-one core, as well as substituents introduced in position 4, could represent possible pharmacophores for antitumor activity. So we applied heuristic method using whole-molecule descriptors of edaravone derivatives, as well as fragmental descriptors calculated for the substituents, where every substituent at position 4 of edaravone represented one fragment. Variations in antitumor activity of edaravone derivatives have been quantitatively correlated with molecular structure features.

The results of the heuristic method applied on whole-molecule descriptors for activity on HeLa cells are shown in Table 2. The most significant descriptors for antitumor activity on HeLa cells mostly belong to the group of quantum-chemical descriptors, showing that quantum-chemical features of derivatives are the most important for binding to potential target. The most significant descriptor is the average electrophilic reactivity index for C atom, which indicates that electrophilic character of a C atom plays the important role in antitumor activity of investigated compounds on

**Table 2**  
The most significant descriptors of edaravone derivatives for antitumor activity on HeLa cells.

	Descriptor	R <sup>2</sup>	F	Type of feature
1	Average electrophilic reactivity index for a C atom	0.4353	12.33	Quantum-chemical
2	Balaban index	0.4261	11.88	Topological
3	Min. total interaction for a N–N bond	0.3687	9.34	Quantum-chemical
4	Min. e–e repulsion for a N–N bond	0.3626	9.10	Quantum-chemical
5	Number of rings	0.3510	8.65	Constitutional
6	PPSA-1 Partial positive surface area [semi-MO PC]	0.3471	8.51	Quantum-chemical
7	Min. total interaction for a C–H bond	0.3286	7.83	Quantum-chemical
8	Max. n–n repulsion for a C–H bond	0.3262	7.75	Quantum-chemical
9	Min. n–n repulsion for a N–N bond	0.3225	7.62	Quantum-chemical
10	Max. total interaction for a C–H bond	0.3178	7.46	Quantum-chemical

HeLa cells. Less electrophilic C at position 5 of edaravone derivatives determines tautomeric form that is stabilized by intramolecular H-bond and therefore sterically more suitable for binding, whilst possibility of intermolecular H-bond interactions is retained. The electrophilic reactivity index for C atom at position 5 of pyrazolyn-5-one (Eei(C5)) for all compounds was then calculated. The value of Eei(C5) for edaravone is  $10.1 \times 10^{-3}$ , whilst Eei(C5) for compound **3q**, showing highest activity on HeLa cells, is  $0.5 \times 10^{-3}$ . No direct linear correlation was observed for antitumor activity and Eei(C5) for all compounds, but from the values of Eei(C5) for particular compounds it could be concluded that less electrophilic C on position 5 favors tautomeric form **C** that is stabilized by intramolecular H-bonds, providing bioactive geometry of compound required for interaction with binding site, where formation of intermolecular H-bonds with hypothetical active site is still possible. The Number of rings, as constitutional descriptor, also appears to have an influence on binding. It is likely that active site of possible target possesses more than one binding site, therefore number of rings could be important for fitting in hydrophobic pocket. Partial positive surface area might be important for polar interactions with possible polar binding site of the target. The example of such type of active site is exactly Cdc25B phosphatase as target for 3-methyl-4-(O-methyl-oximino)-1-phenylpyrazolin-5-one [21]. Topological descriptors describing the atoms connectivity are also significant for antitumor activity. Balaban index was well correlated with antitumor activity on HeLa cells ( $R^2 = 0.4261$ ).

Applying 3-parameter correlation (the maximal number of descriptors in equation should not exceed 3, regarding the number of compounds), following QSAR equation for antitumor activity on HeLa cells has been obtained:

$$\log(1/IC50(\text{HeLa})) = 1.4772 \cdot E_{\text{tot}}(\text{CH}) + 48.0430 \cdot V_{\text{C}}^{\text{max}} - 36.0390 \cdot \text{Eni}^{\text{min}}(\text{O}) - 210.05 \quad (n = 16, R^2 = 0.8542) \quad (1)$$

The descriptors included in Eq. (1) are presented in Table 3, and they all belong to the group of quantum-chemical descriptors, which confirms that quantum-chemical interactions with binding site are most important for antitumor activity on HeLa cells. Increasing the maximum total interaction for a C–H bond, and decreasing the maximum valency of a C atom and the minimum nucleophilic reactivity index for an O atom can lead to an increase

in cytotoxicity against HeLa. Nucleophilic character of O atom appears to be the most important factor determining cytotoxicity of edaravone derivatives on HeLa cells.

The most significant fragmental descriptors (calculated for every substituent at position 4 of edaravone as fragment) for antitumor activity on HeLa cells are presented in Table 4. The results are in accordance with supposition that there is another binding site at target for interaction of edaravone substituents at position 4. The most significant descriptor is the relative negative charged surface area, indicating polar interactions of substituents with binding site. Other important descriptors belong to the topological and constitutional group. The number of rings also indicates that there is hydrophobic pocket of precise geometry which explains why compound **3q** shows considerably higher cytotoxicity on HeLa cells. Introduction of nitro group in aromatic phenyl ring decreased antitumor activity of compounds **3d**, **3e** and **3f**, probably due to conjugation of nitro group with phenyl ring, resulting in decrease of hydrophobic interactions of phenyl ring and enlargement of the plane area that perhaps could not fit with size of hydrophobic binding site.

The most significant whole-molecule descriptors for antitumor activity on MDA-MB-453 cells obtained by heuristic method are presented in Table 5. Most of the descriptors belong to the group of quantum-chemical descriptors, confirming that cytotoxicities of these compounds appear to be mainly governed by quantum-chemical factors. The Number of rings, as constitutional descriptor, also plays significant role in antitumor activity on MDA-MB-453 cells.

Applying 3-parameter correlation for antitumor activity on MDA-MB-453 cells, following equation has been obtained:

$$\log(1/IC50(\text{MDA-MB-453})) = -158.41 \cdot \text{Eei}^{\text{max}}(\text{O}) + 0.0260 \cdot {}^{\circ}\text{HDCA} - 0.8817 \cdot P_{\text{O}}^{\text{avg}} - 0.4107 \quad (n = 13, R^2 = 0.9257) \quad (2)$$

The descriptors included in Eq. (2) are presented in Table 6, and they belong to the group of quantum-chemical descriptors.

Decreasing the electrophilic reactivity index for an O atom and the average bond order of an O atom, and increasing the H-donors charged surface area will increase the cytotoxicity of edaravone derivatives on MDA-MB-453 cells. It appears that H-bonds interac-

**Table 3**  
Descriptors included in Eq. (1).

	Descriptor	Type of feature
1	Max. total interaction for a C–H bond ( $E_{\text{tot}}(\text{CH})$ )	Quantum-chemical
2	Max. valency of a C atom ( $V_{\text{C}}^{\text{max}}$ )	Quantum-chemical
3	Min. nucleophilic reactivity index for a O atom ( $\text{Eni}^{\text{min}}(\text{O})$ )	Quantum-chemical



**Table 4**

The most significant fragmental descriptors for antitumor activity on HeLa cells.

	Fragmental descriptor	R <sup>2</sup>	F	Type of feature
1	f-RNCS relative negative charged SA [semi-MO PC]	0.5080	15.49	Quantum-chemical
2	f-Balaban index	0.4290	11.27	Topological
3	f-FNSA-3 fractional PNSA (PNSA-3/TFSA) [semi-MO PC]	0.3794	9.17	Quantum-chemical
4	f-Max. n–n repulsion for a C–H bond	0.3775	9.09	Quantum-chemical
5	f-Max. total interaction for a C–H bond	0.3333	7.5	Quantum-chemical
6	f-FHBCA fractional HBCA (HBCA/TFSA) [semi-MO PC]	0.3280	7.32	Quantum-chemical
7	f-Max. resonance energy for a C–H bond	0.3177	6.98	Quantum-chemical
8	f-FNSA-3 fractional PNSA (PNSA-3/TMSA) [semi-MO PC]	0.3173	6.97	Quantum-chemical
9	f-PPSA-1 partial positive surface area [semi-MO PC]	0.3155	6.91	Quantum-chemical
10	f-Number of rings	0.3128	6.83	Constitutional

**Table 5**

The most significant descriptors for antitumor activity on MDA-MB-453 cells.

	Descriptor	R <sup>2</sup>	F	Type of feature
1	Max. resonance energy for a C–H bond	0.5522	19.73	Quantum-chemical
2	Max. n–n repulsion for a C–H bond	0.5411	18.87	Quantum-chemical
3	Min. exchange energy for a C–H bond	0.4340	12.27	Quantum-chemical
4	Relative number of rings	0.4207	11.62	Constitutional
5	Average electrophilic reactivity index for a C atom	0.4032	10.81	Quantum-chemical
6	Min. (>0.1) bond order of a C atom	0.3930	10.36	Quantum-chemical
7	Max. exchange energy for a N–N bond	0.3762	9.65	Quantum-chemical
8	Max. total interaction for a C–H bond	0.3732	9.53	Quantum-chemical
9	Max. e–e repulsion for a N–N bond	0.3556	8.83	Quantum-chemical
10	Min. exchange energy for a N–N bond	0.3456	8.45	Quantum-chemical

**Table 6**

Descriptors included in Eq. (2).

	Descriptor	Type of feature
1	Max. electrophilic reactivity index for a O atom (Eei <sup>max</sup> (O))	Quantum-chemical
2	HDCA H-donors charged surface area [semi-MO PC] ( <sup>q</sup> HDCA)	Quantum-chemical
3	Average bond order of a O atom (P <sub>O</sub> <sup>avg</sup> )	Quantum-chemical

**Table 7**

The most significant fragmental descriptors for antitumor activity on MDA-MB-453 cells.

	Fragmental descriptor	R <sup>2</sup>	F	Type of feature
1	f-Max. resonance energy for a C–H bond	0.6591	29.00	Quantum-chemical
2	f-Max. n–n repulsion for a C–H bond	0.6025	22.74	Quantum-chemical
3	f-Max. atomic state energy for a N atom	0.4792	13.80	Quantum-chemical
4	f-Max. exchange energy for a C–N bond	0.4691	13.25	Quantum-chemical
5	f-Average electrophilic reactivity index for a N atom	0.4647	13.02	Quantum-chemical
6	f-Average Information content (order 2)	0.4480	12.18	Topological
7	f-Number of rings	0.4259	11.13	Constitutional
8	f-Min. exchange energy for a C–H bond	0.4248	11.08	Quantum-chemical
9	f-Balaban index	0.4177	10.76	Topological
10	Max. coulombic interaction for a H–N bond	0.4176	10.77	Quantum-chemical

tions are most important for cytotoxicity of edaravone derivatives on MDA-MB-453 cells.

The most significant fragmental descriptors for antitumor activity on MDA-MB-453 are presented in Table 7. They belong to the group of quantum-chemical, topological and constitutional descriptors. The results suggest existence of hydrophobic pocket at binding site that is supposed to interact with certain substituents of edaravone derivatives increasing their antitumor activity on MDA-MB-453 cells.

The most significant whole-molecule descriptors for antitumor activity on K562 cells are presented in Table 8. They belong to quantum-chemical and electrostatic descriptors. It indicates that polar interactions of edaravone derivatives with target in K562 cells are important for the antitumor activity.

Applying 3-parameter correlation for antitumor activity on K562 cells, following equation has been obtained:

$$\log(1/IC50(K562)) = -119.51 \cdot Eei^{avg}(O) + 28.24 \cdot Eni^{min}(O) - 0.1486 \cdot {}^eRPCS - 1.4633$$

$$(n = 18, R^2 = 0.7458) \quad (3)$$

The descriptors included in Eq. (3) are presented in Table 9, and they belong to the group of quantum-chemical and electrostatic descriptors.

Decreasing the average electrophilic index for an O atom and the relative positive charged surface area, and increasing the minimal nucleophilic reactivity index for an O atom the cytotoxicity of the edaravone derivatives on K562 cells should increase.

**Table 8**  
The most significant descriptors for antitumor activity on K562 cells.

	Descriptor	$R^2$	$F$	Type of feature
1	Average electrophilic reactivity index for a C atom	0.3352	8.07	Quantum-chemical
2	Max. resonance energy for a C–H bond	0.2890	6.50	Quantum-chemical
3	Max. n–n repulsion for a C–H bond	0.2859	6.41	Quantum-chemical
4	FNSA-3 Fractional PNSA (PNSA-3/TMSA) [semi-MO PC]	0.2296	4.77	Quantum-chemical
5	Min. exchange energy for a N–N bond	0.2243	4.63	Quantum-chemical
6	Min. total interaction for a C–H bond	0.2213	4.55	Quantum-chemical
7	Average electrophilic reactivity index for a O atom	0.2161	4.41	Quantum-chemical
8	Max. total interaction for a C–H bond	0.2080	4.20	Quantum-chemical
9	Min. total interaction for a N–N bond	0.1966	3.92	Quantum-chemical
10	RPCS relative positive charged SA (SAMPOS * RPCG) [Zefirov's PC]	0.1964	3.91	Electrostatic

**Table 9**  
Descriptors included in Eq. (3).

	Descriptor	Type of feature
1	Average electrophilic reactivity index for a O atom ( $E_{ej}^{av}(O)$ )	Quantum-chemical
2	Min. nucleophilic reactivity index for a O atom ( $Eni^{min}(O)$ )	Quantum-chemical
3	RPCS relative positive charged SA (SAMPOS * RPCG) [Zefirov's PC] ( ${}^e$ RPCS)	Electrostatic

**Table 10**  
The most significant fragmental descriptors for antitumor activity on K562 cells.

	Fragmental descriptor	$R^2$	$F$	Type of feature
1	f-Max. n–n repulsion for a C–H bond	0.3972	9.88	Quantum-chemical
2	f-Max. resonance energy for a C–H bond	0.3806	9.22	Quantum-chemical
3	f-WPSA-1 weighted PPSA (PPSA1 * TFSA/1000) [semi-MO PC]	0.3545	8.24	Quantum-chemical
4	f-Balaban index	0.3519	8.14	Topological
5	f-RNCS relative negative charged SA (SAMNEG * RNCG) [semi-MO PC]	0.3358	7.58	Quantum-chemical
6	f-Structural information content (order 2)	0.3115	6.79	Topological
7	f-WPSA-1 weighted PPSA (PPSA1 * TMSA/1000) [semi-MO PC]	0.3017	6.48	Quantum-chemical
8	f-Average information content (order 2)	0.2922	6.19	Topological
9	f-Average electrophilic reactivity index for a N atom	0.2858	6.00	Quantum-chemical
10	f-PPSA-1 partial positive surface area [semi-MO PC]	0.2834	5.93	Quantum-chemical

These preliminary QSAR equations for antitumor activity of edaravone derivatives on HeLa, MDA-MB-453 and K562 cells give us insight about the importance of quantum-chemical and electrostatic factors for the prediction of cytotoxicity. It is clear that electrophilic/nucleophilic ratio of O atom as well as polar surface areas play very important role in antitumor activity of derivatives investigated. Further investigation, including more derivatives and detailed study of the particular fragments and atoms and their effects, could possibly provide reliable model for the prediction of cytotoxicity of these derivatives.

The most significant fragmental descriptors for antitumor activity on K562 cells are presented in Table 10. They belong to the group of quantum-chemical and topological descriptors. The differences in selected descriptors comparing to those presented for antitumor activity on HeLa and MDA-MB-453 suggest that interaction of compounds with binding site on K562 cells partially differ in nature and strength. From the descriptors presented in Table 10, it could be supposed that another interaction occurs with nitrogen at position 2 of edaravone. The target for these agents could be the same or similar for all three types of cancer cells, but some differences in cells intracellular environment may influence formation of predominant tautomeric form of compounds. Stronger interactions of basic pyrazolin-5-one core with target in K562 cells, possibly due to additional interactions with nitrogen at position 2, could be possible explanation why all structures investigated show some activity on K562 cells, no matter of substituent introduced. Also, it appears that polar interactions are the most important for antitumor activity on K562 cells.

Correlation of lipophilicity parameter  $\log P$  with antitumor activity of edaravone derivatives on HeLa, MDA-MB-453 and K562 did not give significant results ( $r^2 = 0.1858$ ,  $r^2 = 0.0006$  and

$r^2 = 0.0466$  for antitumor activity on HeLa, MDA-MB-453 and K562, respectively), perhaps because the range of  $\log P$  in this congeneric set was not statistically representative. It remains to be additionally investigated whether lipophilicity plays an important role in antitumor activity, as well as transport to cells of edaravone derivatives, by variation of lipophilic and hydrophilic substituents.

The action mechanism of investigated cytotoxic compounds still remains complicated since there are many factors that may influence activity of these agents. Here, we just offer some theoretical considerations based on the QSAR heuristic approach expecting that this results might give some guidance for further design and improvement of antitumor activity of related derivatives. It is interesting that cytotoxicities of these compounds against all three type of cells investigated appear to be mainly governed by quantum-chemical factors. Besides, it could be concluded that active site for these compounds could be consistent of more than one binding site, and that additional binding sites interact with ligands by hydrophobic and polar interactions, which might give some guidance in searching for target of these potential antitumor compounds.

#### 4. Conclusion

Seventeen structurally different aminomethylidene derivatives of 4-formyledaravone were prepared and characterized using spectroscopic techniques and elemental analysis. Compound **3q** was found to be the most active against human breast cancer MDA-MB-361 and MDA-MB-453 cell lines. In the cell growth inhibition of MDA-MB-361 cells this compound showed a cytotoxic potential practically comparable to cisplatin as referent cytostatic. The most significant fragmental descriptors for antitumor activity on MDA-

MB-453 cells belong to the group of quantum-chemical, topological and constitutional descriptors.

### Acknowledgment

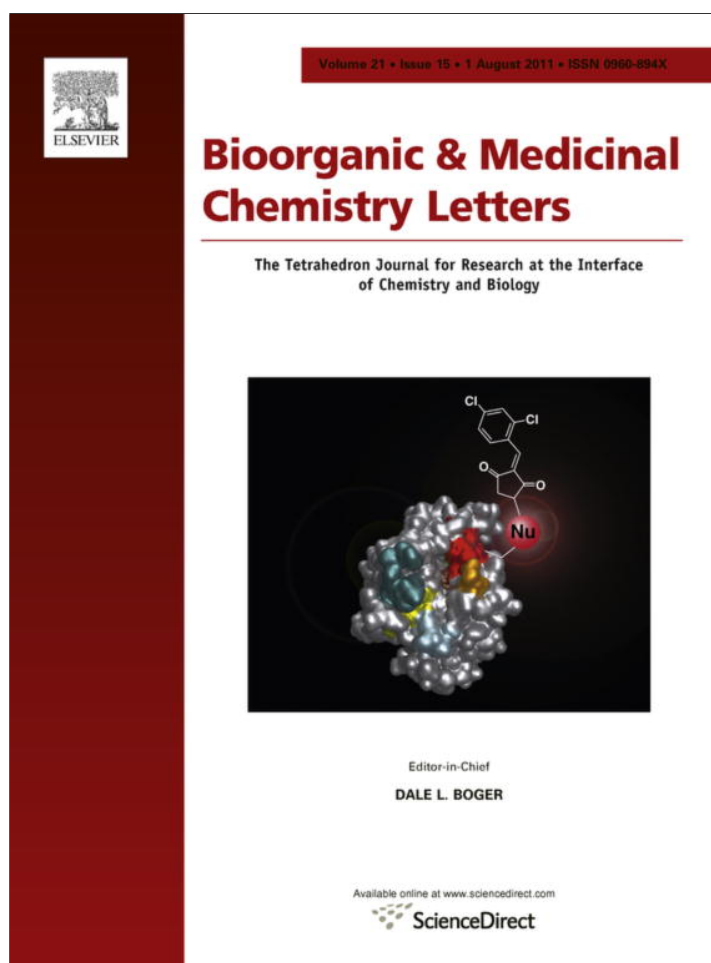
The authors are grateful to the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia for financial support (Grant Nos. 172016 and 145006).

### References

- [1] N. Zhang, M. Komine-Kobayashi, R. Tanaka, M. Liu, Y. Mizuno, T. Urabe, *Stroke* 36 (2005) 2220–2225.
- [2] T. Watanabe, M. Tahara, S. Todo, *Cardiovasc. Ther.* 26 (2008) 101–114.
- [3] K. Sujatha, G. Shanthi, N. Panneer Selvam, S. Manoharan, P.T. Perumal, M. Rajendran, *Bioorg Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 4501–4503.
- [4] X. Fan, X. Zhang, L. Zhou, K.A. Keith, E.R. Kern, P.F. Torrence, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 3224–3228.
- [5] D. Castagnolo, F. Manetti, M. Radi, B. Bechi, M. Pagano, A. De Logu, R. Meleddu, M. Saggi, M. Botta, *Bioorg Med. Chem.* 17 (2009) 5716–5721.
- [6] R. Tripathy, A. Ghose, J. Singh, E.R. Bacon, T.S. Angeles, S.X. Yang, M.S. Albom, L.D. Aimone, J.L. Herman, J.P. Mallamo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17 (2007) 1793–1798.
- [7] S. Kokura, N. Yoshida, N. Sakamoto, T. Ishikawa, T. Takagi, H. Higashihara, N. Nakabe, O. Handa, Y. Naito, T. Yoshikawa, *Cancer Lett.* 229 (2005) 223–233.
- [8] T. Arai, M. Nonogawa, K. Makino, N. Endo, H. Mori, T. Miyoshi, K. Yamashita, M. Sasada, M. Kakuyama, K. Fukuda, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 324 (2008) 529–538.
- [9] Y. Kakiuchi, N. Sasaki, M. Satoh-Masuoka, H. Murofushi, K. Murakami-Murofushi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320 (2004) 1351–1358.
- [10] P. Pevarello, M.G. Brasca, P. Orsini, G. Traquandi, A. Longo, M. Nesi, F. Orzi, C. Piutti, P. Sansonna, M. Varasi, A. Cameron, A. Vulpetti, F. Roletto, R. Alzani, M. Ciomei, C. Albanese, W. Pastori, A. Marsiglio, E. Pesenti, F. Fiorentini, J.R. Bischoff, C. Mercurio, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 2944–2956.
- [11] D. Bebbington, H. Binch, J.D. Charrier, S. Everitt, D. Frayse, J. Golec, D. Kay, R. Knechtel, C. Mak, F. Mazzei, A. Miller, M. Mortimore, M. O' Donnell, S. Patel, F. Pierard, J. Pinder, J. Pollard, S. Ramaya, D. Robinson, A. Rutherford, J. Studley, J. Westcott, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 3586–3592.
- [12] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [13] M. Ohno, T. Abe, *J. Immunol. Methods* 145 (1991) 199–203.
- [14] Spartan '02 for Linux, Wavefunction, Inc. Irvine, CA, 2002.
- [15] A.R. Katritzky, W.S. Lobanov, M. Karelson Codessa, Reference Manual (version 2.0), Gainesville, FL, 1994, p. 2.
- [16] P. Liu, W.H. Long, *Int. J. Mol. Sci.* 10 (2009) 1978–1998.
- [17] D.J. Wallace, J.M. Straley, *J. Org. Chem.* 26 (1961) 3825–3826.
- [18] A.I. Movchan, A.R. Kurbangaliev, O.N. Kataeva, I.A. Litvinov, G.A. Chmutova, *Russ. J. Gen. Chem.* 73 (2003) 1130–1136.
- [19] J. Belmar, F.R. Pérez, J. Alderete, C. Zúñiga, *J. Braz. Chem. Soc.* 16 (2005) 179–189.
- [20] B.T. Thaker, K.R. Surati, S. Oswal, R.N. Jadeja, V.K. Gupta, *Struct. Chem.* 18 (2007) 295–310.
- [21] K.R. Kim, J.L. Kwon, J.S. Kim, Z. No, H.R. Kim, H.G. Cheon, *Eur. J. Pharmacol.* 528 (2005) 37–42.



Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

# Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bmcl](http://www.elsevier.com/locate/bmcl)

## Antiproliferative activity and QSAR studies of a series of new 4-aminomethylidene derivatives of some pyrazol-5-ones

Violeta Marković<sup>a</sup>, Slavica Erić<sup>b</sup>, Tatjana Stanojković<sup>c</sup>, Nevenka Gligorijević<sup>c</sup>, Sandra Arandžević<sup>c</sup>, Nina Todorović<sup>d</sup>, Snežana Trifunović<sup>e</sup>, Nedeljko Manojlović<sup>f</sup>, Ratomir Jelić<sup>f</sup>, Milan D. Joksović<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Sciences, Department of Chemistry, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>b</sup> Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Vojvode Stepe 450, 11000 Belgrade, Serbia

<sup>c</sup> Institute of Oncology and Radiology of Serbia, Pasterova 14, 11000 Belgrade, Serbia

<sup>d</sup> Institute for Chemistry, Technology and Metallurgy, Njegoševa 12, 11000 Belgrade, Serbia

<sup>e</sup> Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 16, PO Box 158, 11000 Belgrade, Serbia

<sup>f</sup> Medical Faculty, University of Kragujevac, S. Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 8 April 2011

Revised 6 June 2011

Accepted 8 June 2011

Available online 16 June 2011

#### Keywords:

Pyrazolones  
Antiproliferative activity  
Breast cancer  
Angiogenesis  
QSAR studies

### ABSTRACT

Twenty five 4-aminomethylidene derivatives obtained from 3-phenyl-2-pyrazolin-5-one and 1,3-diphenyl-2-pyrazolin-5-one were synthesized and tested for their antiproliferative activity against human breast cancer MDA-MB-361 and MDA-MB-453 cell lines. The compounds derived from 1,3-diphenyl-2-pyrazolin-5-one exhibited the most remarkable activity in the treatment of both cell lines. In vitro antiproliferative activities were accompanied by an important apoptotic fraction of both cell lines; also, compounds inhibited key endothelial cell functions implicated in invasion and angiogenesis. QSAR methods were performed in order to analyze the influence of structural features of the compounds investigated on the antiproliferative potential on MDA-MB-361 and MDA-MB-453 cancer cells. One-parameter heuristic analysis was performed and different whole molecule and fragmental descriptors were considered for rationalization of mechanism of interaction of these compounds with active place of hypothetical target included in tumorigenesis.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Chemistry and applications of pyrazolone derivatives represent a very active research area due to a wide range of biological activities and outstanding pharmacological properties. Among them, antipyrine (2,3-dimethyl-1-phenylpyrazol-5-one) and its analogs aminopyrine, dipyrone and propyphenazone are known for a long time as antipyretic, analgesic and anti-inflammatory substances.<sup>1</sup> Recently, a new pyrazol-5-one compound, edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one, Radicut<sup>®</sup>, Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation) has been developed as a promising drug for the treatment of brain ischemia,<sup>2</sup> and its pharmacological actions were attributed to its antioxidant activity as a potent hydroxyl radical scavenger.<sup>3</sup>

The importance of pyrazolone derivatives has also been increased by their application as antitumor agents. For example, certain diphenyl pyrazolone derivatives were studied for their regulatory activity on TNF- $\alpha$  production in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells.<sup>4</sup> Some pyrazolone compounds derived from edaravone inhibited the protease-resistant prion protein accumulation, a component which is considered to be responsible for the pathogenesis.<sup>5</sup> Furthermore, a new compound,

4,4-dichloro-1-(2,4-dichlorophenyl)-3-methylpyrazol-5-one is found to be a specific potent catalytic blocker of human telomerase, and, therefore, a valuable substance for medical treatment of cancer and related diseases.<sup>6</sup> It was discovered that thiaziazole substituted pyrazol-5-ones were potent KDR kinase inhibitors in regulating angiogenesis which is important for the proliferation of tumor cells.<sup>7</sup>

It is known that toxic side effects of cytotoxic drugs are manifested through production of an irreversible damage to normal cell lines affecting cellular metabolic pathways.<sup>8–10</sup> From this point of view, it is important to minimize the toxic or other unwanted actions and retain favorable pharmacological potential of the new antitumor compounds. For this purpose, we assumed that incorporation of nontoxic biomolecule into the heterocyclic scaffold could have attractive biological results, comparable with those obtained by introduction of the confirmed antitumor pharmacophore. In our intention to evaluate the efficacy of biomolecule moiety, two classes of 4-aminomethylidene derivatives of two pyrazol-5-ones were synthesized. The first class contains amino acid moiety, while the second one is characterized by presence of the known antitumor 3-aminopyrazole pharmacophore.<sup>11,12</sup> The substituents were selected to provide a good coverage of polar, steric, electron-donating or withdrawing properties for QSAR analysis.

\* Corresponding author. Tel.: +381 34 336223; fax: +381 34 335040.

E-mail address: [mjoksovic@kg.ac.rs](mailto:mjoksovic@kg.ac.rs) (M.D. Joksović).

Indeed, we observed no significant difference in inhibition of human breast cancer MDA-MB-361 cells between two pyrazol-5-one derivatives with 5-methyl-3-aminopyrazole and phenylalanine moiety including both enantiomers of amino acid.

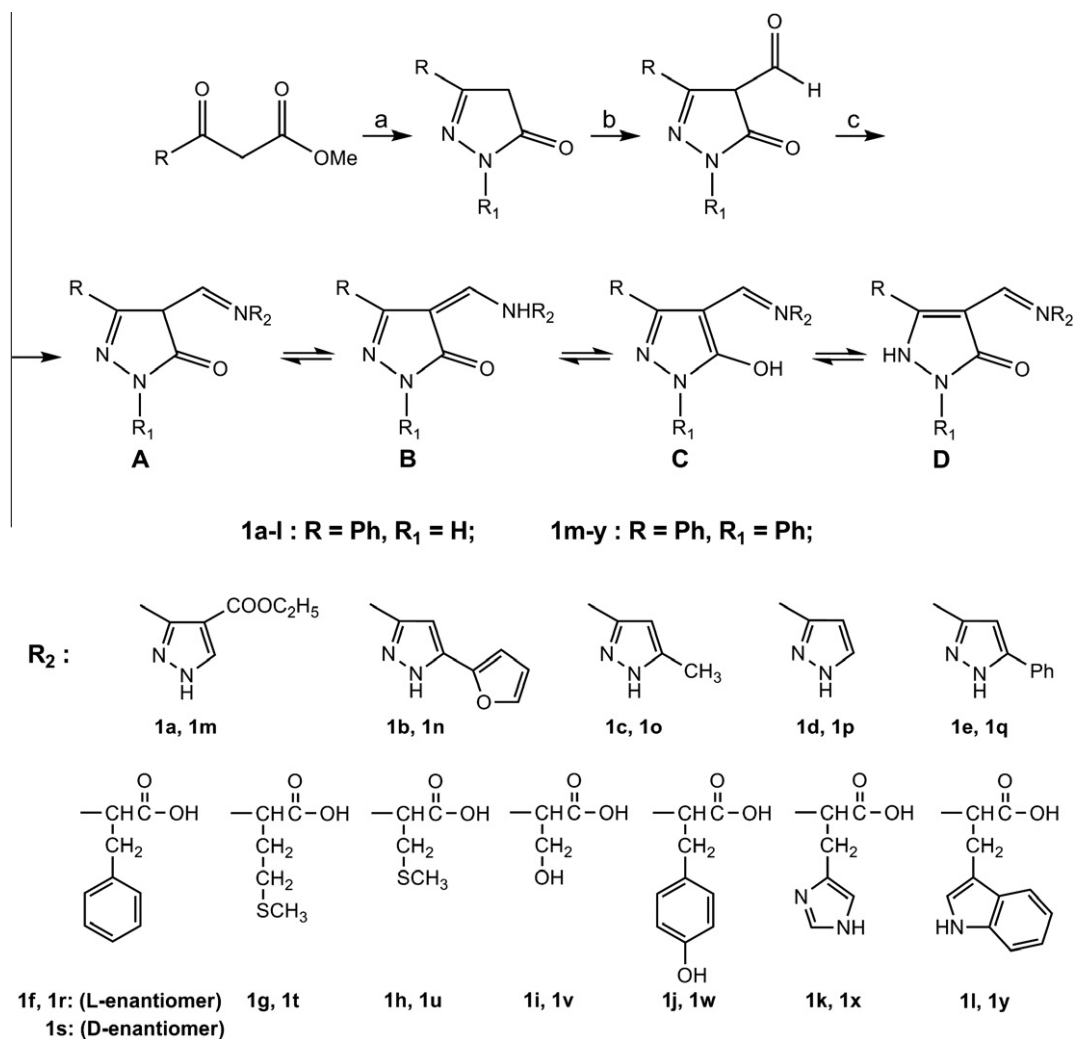
All pyrazol-5-one derivatives were synthesized according to Scheme 1. Pyrazolone compounds (3-phenyl-2-pyrazolin-5-one and 1,3-diphenyl-2-pyrazolin-5-one), obtained by the condensation reaction of  $\beta$ -keto esters with hydrazine or phenylhydrazine were formylated under Vilsmeier conditions with  $\text{POCl}_3$  and *N,N*-dimethylformamide.<sup>13</sup> The formed aldehyde was then reacted with selected 3-aminopyrazoles and amino acids affording the desired 4-aminomethylidene derivatives of pyrazol-5-ones **1a–1y** in moderate to good yields.<sup>14</sup> In the reaction of 4-formylpyrazolone precursor with 3-aminopyrazoles the presence of catalitical amount of *p*-toluenesulfonic acid is necessary to prevent enolization of carbonyl group and a shift of tautomeric equilibria towards starting tautomeric form with exocyclic double bond.

The aminomethylidene derivatives of 4-formylpyrazol-5-ones **1a–1y** can exist in four tautomeric forms as depicted in Scheme 1, in dependence on the position and substituent kind of pyrazolone nucleus, structural variations of 3-aminopyrazole moiety and solvent polarity.

The IR spectra of amine derivatives exhibit two characteristic bands in the range of  $3415\text{--}3436\text{ cm}^{-1}$  and  $1656\text{--}1680\text{ cm}^{-1}$

which can be assigned to  $\nu(\text{N-H})$  and  $\nu(\text{C=O})$  and respectively, indicating the tautomer **B** with exocyclic double bond as a predominant form. Like amines, in the IR spectra of the amino acid derivatives of pyrazol-5-ones, the presence of the strongest absorption band positioned at  $1650\text{--}1670\text{ cm}^{-1}$  may be attributed to  $\nu(\text{C=O})$  vibrations of the pyrazolone ring confirming the tautomeric form **B** in the solid state. In addition, amino acid derivatives show also a wide band for the O-H stretch in the region of  $3220\text{--}3285\text{ cm}^{-1}$  while the carbonyl stretch appears as a medium intense band between  $1710$  and  $1736\text{ cm}^{-1}$ . These observations are in accordance with IR spectra of some aminomethylidene derivatives of pyrazol-5-one<sup>15</sup> and are consistent with the X-ray analysis of similar compounds.<sup>16</sup>

On the basis of information obtained from  $^1\text{H}$  NMR spectra of amine derivatives in  $\text{DMSO-}d_6$  solution, we can conclude that only compound **1m** exists in tautomeric form **B** due to appearance of a doublet for exocyclic CH and NH protons as a result of the coupling between them with the relatively large geminal coupling constant of 13.0 Hz. All other amine derivatives of both pyrazol-5-ones and amino acid derivatives of 3-phenyl-2-pyrazolin-5-one were present in the form of OH (**C**) or NH (**D**) tautomer. The NH (**D**) form requires a signal in the higher field<sup>15</sup> that was not observed in our spectra, although an averaged signal set can not be excluded as a consequence of a rapid chemical exchange on the NMR timescale



**Scheme 1.** Reagents and conditions: (a)  $\text{PhNHNH}_2$  or  $\text{NH}_2\text{NH}_2$ , EtOH, reflux, 3 h; (b) DMF,  $\text{POCl}_3$ , heat,  $80^\circ\text{C}$ , 1.5 h; (c) for amines: *p*-TSA, EtOH, reflux, 2 h; for amino acids: EtOH, reflux 4 h.

between OH (**C**) and NH (**D**) tautomer.<sup>17</sup> It is important to point out here that this signal was strongly deshielded in most of the cases because of intramolecular hydrogen bonding with other N/O atoms.

However, amino acid derivatives of 1,3-diphenyl-2-pyrazolin-5-one exist only in tautomeric form **B**. All these compounds display doublets for exocyclic CH protons and vicinal NH protons. Moreover, for methine proton of amino acid moiety an additional doublet of doublets (dd) splitting into ddd occurred because of coupling with the vicinal NH proton, instead of expected dd for any other tautomeric form.

Antiproliferative activity of all synthesized compounds **1a–1y** was evaluated against MDA-MB-361 (estrogen-dependent) and MDA-MB-453 (estrogen-nondependent) human breast cancer cells with cisplatin (*cis*-DDP) as referent cytostatic. It is noteworthy to emphasize that MDA-MB-361 cell line is resistant towards widely used cytostatic drugs such as Paclitaxel, Doxorubicin and 5-fluorouracil.<sup>18</sup> Table 1 represents the results of cytotoxic activity.

The compounds derived from 1,3-diphenyl-2-pyrazolin-5-one (**1m–1y**) showed the most potent antiproliferative activity against both cell lines. Compounds **1n**, **1o**, **1q**, **1r**, **1s**, **1t** and **1u** exhibited stronger cytotoxicity in inhibition of MDA-MB-361 type cell line in comparison with cisplatin, with **1o** as the most active one. Estrogen-nondependent cancer cell line MDA-MB-453 was less sensitive to the application of this group of compounds, but generally keeping the same relative activity. In this case, the most active one appeared to be **1q**, compound containing 5-phenylpyrazole moiety, with IC<sub>50</sub> value being approximately 2-fold higher than cisplatin. On the other hand, compounds derived from 3-phenyl-2-pyrazolin-5-one (**1a–1l**) showed significantly lower activity regarding both cell lines. The cytotoxicity increases only upon introduction of phenyl group into pyrazole moiety (**1e**). Certainly, we did not exclude the influence of tautomerism on antiproliferative activity, but results reported herein showed that the introduction of the second phenyl group can overcome the effect of tautomerism on

**Table 1**  
IC<sub>50</sub> (μM) for the 72 h of action of investigated compounds and cisplatin on the MDA-MB-361 and MDA-MB-453 cells determined by MTT test

Compounds	MDA-MB-361	MDA-MB-453
	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)	
<b>1a</b>	120.57 ± 6.44	74.61 ± 4.41
<b>1b</b>	63.71 ± 2.69	20.86 ± 2.01
<b>1c</b>	96.05 ± 1.17	93.00 ± 2.83
<b>1d</b>	95.34 ± 3.16	74.86 ± 0.98
<b>1e</b>	42.66 ± 2.71	11.53 ± 0.96
<b>1f</b>	67.05 ± 5.62	94.78 ± 3.40
<b>1g</b>	105.11 ± 5.33	42.15 ± 2.35
<b>1h</b>	97.36 ± 1.33	105.23 ± 0.31
<b>1i</b>	104.61 ± 6.77	23.69 ± 0.09
<b>1j</b>	61.06 ± 1.39	29.77 ± 2.75
<b>1k</b>	113.33 ± 0.71	73.89 ± 4.88
<b>1l</b>	93.63 ± 2.02	41.66 ± 5.11
<b>1m</b>	24.65 ± 0.36	19.35 ± 2.90
<b>1n</b>	13.36 ± 1.31	12.36 ± 2.23
<b>1o</b>	9.98 ± 1.35	10.24 ± 0.41
<b>1p</b>	51.01 ± 2.93	34.66 ± 1.51
<b>1q</b>	12.17 ± 0.07	8.75 ± 0.08
<b>1r</b>	11.53 ± 0.66	10.43 ± 1.74
<b>1s</b>	11.88 ± 0.28	9.66 ± 2.14
<b>1t</b>	12.47 ± 1.35	9.43 ± 0.74
<b>1u</b>	14.22 ± 1.78	9.46 ± 1.05
<b>1v</b>	52.75 ± 3.97	49.01 ± 3.31
<b>1w</b>	24.79 ± 2.88	10.92 ± 0.43
<b>1x</b>	87.24 ± 1.66	71.11 ± 0.58
<b>1y</b>	33.86 ± 0.87	9.75 ± 1.01
Cis-DDP	14.74 ± 0.36	3.75 ± 0.12

<sup>a</sup> Concentrations of examined compounds that induced a 50% decrease in MDA-MB-361 and MDA-MB-453 cell survival (expressed IC<sub>50</sub> (μM)).

cytotoxicity, suggesting planar aromatic requirements for better cytotoxic activity. In diphenylpyrazolone derivatives the presence of the additional phenyl group could also lead to the emphasized contribution of the sulphur containing amino acid side chain, related to the better possibilities for interactions with various active centers. This is indicated by much higher IC<sub>50</sub> values for methionine and S-methyl cysteine derivatives **1g** and **1h** than the corresponding **1t** and **1u**.

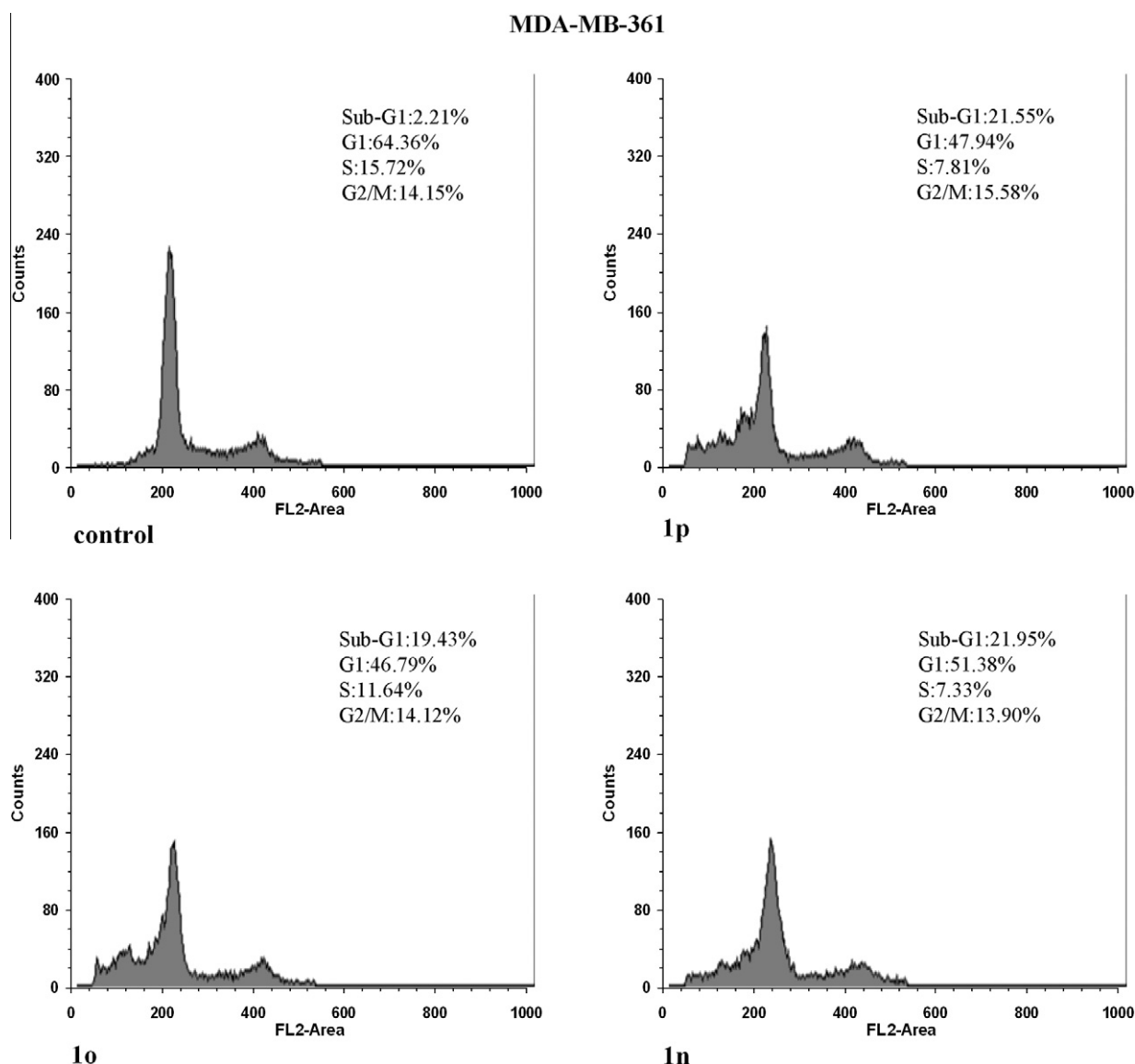
Since these compounds did not show significant antioxidant activity, it was supposed that their mechanism of action is not connected with free radical scavenging activity. Therefore, we chose to examine the mechanism of action of **1a–1y** by cytofluorimetric analysis, using propidium iodide to label DNA. After treatment of MDA-MB-453 and MDA-MB-361 cells with **1a–1y** (IC<sub>50</sub>), the cells were harvested and analyzed with a FACScalibur flow cytometer. A representative cell cycle analysis of cancer cell lines treated with some compounds for 24 h is given in Fig. 1. We observed that in vitro antiproliferative activity was accompanied by an important sub-G1 fraction of MDA-MB-453 and MDA-MB-361 cell lines after treatment with pyrazolone compounds. An increase in cells containing sub-G1 amounts of DNA was observed, indicating that the tested compounds induced apoptosis. Specially, the **1m–1y** showed the strongest increase in the percentage of the sub-G1 population in the both cell line, and led to a G0/G1 cell cycle block. This was consistent with the compounds inducing apoptosis in a cell cycle-dependent manner.

In order to examine the effect of our investigated pyrazolones on angiogenesis in vitro, the tube formation assay was performed. Angiogenesis involves endothelial cells proliferation, migration and capillary tube formation. When seeded onto matrigel in the presence of appropriate media MS1 cells start to reorganize, forming polygon structures. In our experiment MS1 endothelial cells were treated with sub-toxic concentrations of investigated compounds in order to distinguish among growth inhibitory effect of tested pyrazolones and their potential to inhibit tube-like structures formation. The strongest anti-angiogenic effect was observed in the group of compounds exhibiting relatively low antiproliferative activity (up to 100 μM), which were applied at 30 μM concentration (compounds **1c**, **1g**, **1h**, **1i**, **1k**, **1l**). Some results are presented in Fig. 2. Among the compounds applied at concentration of 3 μM, compounds **1r**, **1p**, **1o**, **1n**, **1q** show potential to inhibit characteristics of angiogenic behavior of endothelial cells, although this may account to their antiproliferative potential. Other tested pyrazolones did not exhibit any significant anti-angiogenic effect.

In this work, we performed QSAR analysis of newly synthesized derivatives of pyrazol-5-one which differ at position 1 and 4. Whole set of 25 compounds was divided in two subsets: subset 1, composed of compounds without substituent at position 1 (**1a–1l**), and subset 2, containing compounds with phenyl ring at position 1 of pyrazol-5-one (**1m–1y**). Heuristic analysis for calculation and selection of the most significant descriptors was performed for whole set and two subsets. Number of whole molecule and fragmental descriptors were calculated and analyzed, where fragments represented variable substituents connected to amino group at position 4 of pyrazol-5-one.

The results of one-parameter analysis for activity of compounds on MDA-MB-453 are presented in Table 2. The five most significant descriptors calculated for all 25 molecules belong to the group of topological, geometrical and quantum-chemical descriptors. Geometrical descriptors such as ZX shadow ( $S_{ZX}$ ,  $r^2 = 0.5405$ ) and Molecular Surface Area (MSA,  $r^2 = 0.5038$ ) were found to be important factors for interaction with target, which indicates that size and shape of the whole molecule play crucial role in binding to hypothetical precise active site of enzyme. Polarizability of the molecules, described by ALFA Polarizability descriptor ( $\alpha$ ,



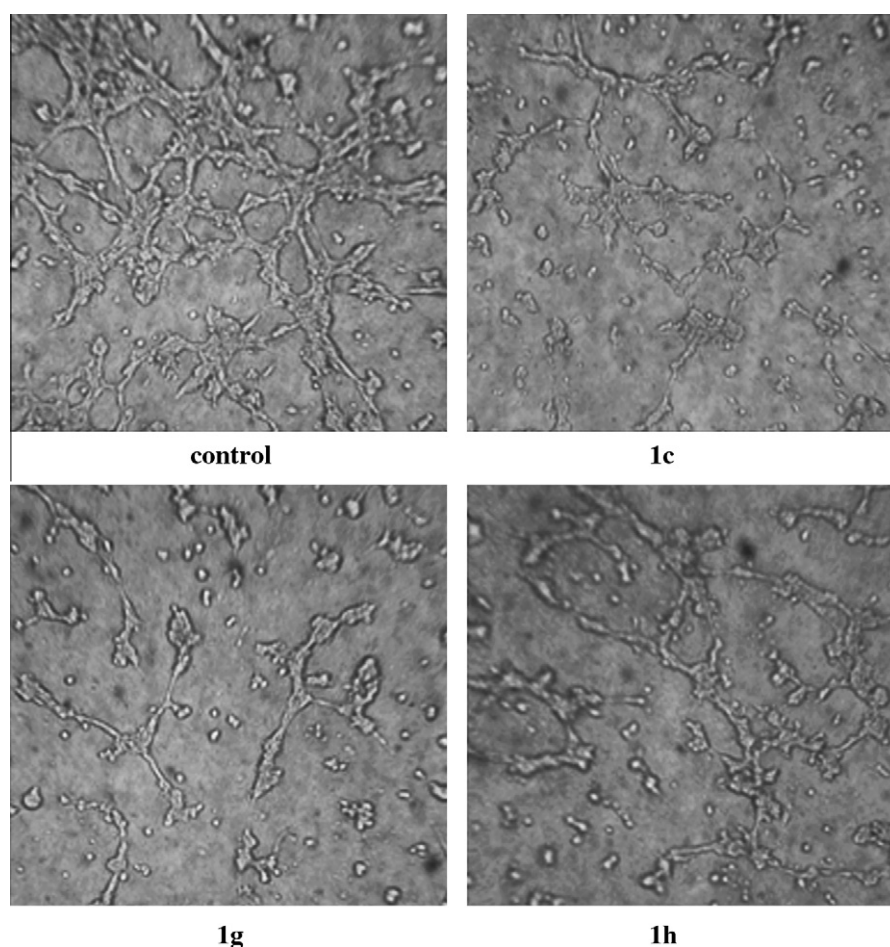


**Fig. 1.** Cell cycle distribution after 24 h of continuous action of ( $IC_{50}$ ) compounds **1p**, **1o**, and **1n** in MDA-MB-361 cell lines. After a 24 h exposure to compounds concentration, cells were harvested and subjected to PI flow cytometry.

$r^2 = 0.5244$ ), as well as polar surface area described by Surface Weighted Partial Positive Charged Surface Area ( $^qWPSA-1$ ,  $r^2 = 0.5081$ ), indicate the importance of polarity of the molecules for antiproliferative activity. The most important descriptor which is, as results show, Complementary Information Content ( $^1CIC$ ,  $r^2 = 0.5571$ ), derived from number of atoms and atomic layers in the coordination sphere around given atoms, could be connected with the size of molecule and connectivity of atoms which is important for interactions with potential target. Fragmental descriptors related to substituents of amino group at position 4 of pyrazol-5-one did not appear to be very significant in whole set analysis.

As it was mentioned above, subsets 1 and 2 differ in phenyl substituent at position 1 of pyrazol-5-one. The most significant descriptors calculated for subset 1 differ from the most significant descriptors calculated for whole set, but for both sets is important geometrical descriptor ZX Shadow ( $S_{ZX}$ ). Regardless of existence of substituent at position 1 and type of substituent at position 4, geometry of the molecules is important for fitting to the main

cavity of active site. For subset 1, polarity again plays significant role, as well as quantum-chemical properties described by descriptor  $\epsilon_{LUMO+1}$ , ( $r^2 = 0.3456$ ), which describes the energy of the second lowest unoccupied molecular orbit. The most significant descriptor obtained by analysis of subset 2 include fragmental descriptors (marked with prefix f- in the name of descriptor), therefore the structural features of variable fragments connected to amino group at position 4 play more important role in case of subset 2, probably because planar phenyl group at position 1 influence a more favorable conformation of fragment during interactions with active site. It indicates an existence of hydrophobic pocket at active place interacting with phenyl ring, so that the substituent at position 4 is properly oriented and placed for interaction with other residues of active site. Even more, we considered possible existence of more than one active site for interactions with enzyme. The most significant descriptor is f-Fractional H-donor Charged Surface Area ( $^qf-FHDCA$ ,  $r^2 = 0.8129$ ) which is indicative for hydrogen bonding interactions between fragment and residues. Since correlation coefficient is so high, it gives us some guidance in further synthesis



**Fig. 2.** Angiogenesis in vitro: tube formation on collagen. Representative micrographs of tube formation in MS1 cells treated for 24 h with tested compounds (**1c**, **1g**, **1h**) at concentration 30  $\mu\text{M}$ , versus control.

**Table 2**  
The most significant descriptors for antiproliferative activity on MDA-MB-453 cells selected by heuristic method

	Whole set ( $n = 25$ )		<b>1a–1l</b> ( $n = 12$ )		<b>1m–1y</b> ( $n = 13$ )	
1.	$r^2 = 0.5571$ $F = 28.93$	${}^1\text{CIC}$	$r^2 = 0.3589$ $F = 5.60$	$p_{\text{H}}^{\text{max}}$	$r^2 = 0.8129$ $F = 47.80$	${}^{\text{q}}\text{f-FHDCA}$
2.	$r^2 = 0.5405$ $F = 27.05$	$S_{\text{ZX}}$	$r^2 = 0.3518$ $F = 5.43$	${}^{\text{e}}\text{RPCG}$	$r^2 = 0.7190$ $F = 28.15$	${}^{\text{e}}\text{FPSA-3}$
3.	$r^2 = 0.5244$ $F = 25.36$	$\alpha$	$r^2 = 0.3458$ $F = 5.29$	$S_{\text{ZX}}$	$r^2 = 0.6548$ $F = 20.87$	${}^{\text{q}}\text{f-FHBSA}$
4.	$r^2 = 0.5081$ $F = 23.76$	${}^{\text{q}}\text{WPSA-1}$	$r^2 = 0.3456$ $F = 5.28$	$\varepsilon_{\text{LUMO}+1}$	$r^2 = 0.6023$ $F = 16.66$	$f - V_{\text{C}}^{\text{avg}}$
5.	$r^2 = 0.5038$ $F = 23.35$	$\text{MSA}$	$r^2 = 0.3145$ $F = 4.59$	$P''$	$r^2 = 0.5689$ $F = 14.52$	$f - E_{\text{ex}}^{\text{max}}(\text{CH})$

${}^1\text{CIC}$ —complementary information content (order 1);  $S_{\text{ZX}}$ —ZX Shadow;  $\alpha$ —Alfa molecular polarizability;  ${}^{\text{q}}\text{WPSA-1}$ —surface weighted partial positive charged surface area (PPSA-1) [Semi-MO PC];  $\text{MSA}$ —molecular surface area;  $p_{\text{H}}^{\text{max}}$ —maximum bond order of a hydrogen atom;  ${}^{\text{e}}\text{RPCG}$ —relative positive charge [Zefirov's PC];  $\varepsilon_{\text{LUMO}+1}$ —energy of the second lowest unoccupied molecular orbit;  $P''$ —ratio of polarity parameter (difference between the most positive and negative atomic charges in the molecule) to square distance between the charge extremes—polarity parameter/square distance;  ${}^{\text{q}}\text{FHDCA}$ —fractional H-donor charged surface area [Semi-MO PC];  ${}^{\text{e}}\text{FPSA-3}$ —fractional partial positive charged surface area (PPSA-3) [Zefirov's PC];  ${}^{\text{q}}\text{FHBSA}$ —fractional H-bonding charged surface area (HBSA) [Semi-MO PC];  $V_{\text{C}}^{\text{avg}}$ —average valency of a carbon atom;  $E_{\text{ex}}^{\text{max}}(\text{CH})$ —maximum exchange energy for a C–H bond.

Note:  $f$ - prefix denotes a fragmental descriptor.

of new analogs. Descriptors such as  $f$ -Fractional H-bonding Charged Surface Area ( ${}^{\text{q}}\text{f-FHBSA}$ ,  $r^2 = 0.6548$ ) also confirm the role of hydrogen bond interactions of fragment.

One parameter analysis of descriptors significant for activity on MDA-MB-361 cells for whole set and subsets 1 and 2 is presented in Table 3. As for activity on MDA-MB-453 cells, fragmental descriptors were not selected as the most significant for whole data set. Regarding the most significant descriptors chosen by heuristic method, such as Fractional H-bonding Charged Surface Area ( ${}^{\text{q}}\text{FHBSA}$ ,  $r^2 = 0.7154$ ), H-acceptor Dependent H-donor Charged Surface Area relative to Total Molecular Surface Area (HA-dep  ${}^{\text{q}}\text{HDCA-1/TMSA}$ ,  $r^2 = 0.6843$ ) and Fractional H-donor Charged

Surface Area ( ${}^{\text{q}}\text{FHDCA}$ ,  $r^2 = 0.6422$ ), hydrogen bonding interaction prevail in interaction with active site. Complementary Information Content ( ${}^2\text{CIC}$ ,  $r^2 = 0.6767$ ) is descriptor that is also chosen among the most important descriptors, as it was in case of activity on MDA-MB-453 cells. Polar surface area described by descriptor Fractional Partial Positive Charged Surface Area is also significant ( ${}^{\text{e}}\text{FPSA-3}$ ,  $r^2 = 0.7014$ ). For subset 1, fragmental descriptors are also not the most significant, and the activity of subset mostly depend on topological factors, described by Average Structural Information Content ( ${}^2\text{SIC}_{\text{avg}}$ ,  $r^2 = 0.7905$ ), Average Complementary Information Content ( ${}^1\text{CIC}_{\text{avg}}$ ,  $r^2 = 0.7745$ ) and Average Bonding Information Content ( ${}^2\text{BIC}_{\text{avg}}$ ,  $r^2 = 0.7569$ ), as well as geometrical factors such

**Table 3**

The most significant descriptors for antiproliferative activity on MDA-MB-361 cells selected by heuristic method

	Whole set (n = 25)		1a–1l (n = 12)		1m–1y (n = 13)	
1.	$r^2 = 0.7154$ $F = 57.81$	<sup>q</sup> FHBSA	$r^2 = 0.7905$ $F = 37.74$	<sup>2</sup> SIC <sub>avg</sub>	$r^2 = 0.7776$ $F = 38.47$	<sup>q</sup> f-FHDCA
2.	$r^2 = 0.7014$ $F = 54.02$	<sup>q</sup> FPSA-3	$r^2 = 0.7745$ $F = 34.34$	<sup>1</sup> CIC <sub>avg</sub>	$r^2 = 0.6688$ $F = 22.21$	<sup>q</sup> FPSA-3
3.	$r^2 = 0.6843$ $F = 49.86$	HA-dep <sup>q</sup> HDCA-1/TMSA	$r^2 = 0.7569$ $F = 31.13$	<sup>2</sup> BIC <sub>avg</sub>	$r^2 = 0.6284$ $F = 18.60$	f-HA-dep <sup>q</sup> HDCA-1/TMSA
4.	$r^2 = 0.6767$ $F = 48.13$	<sup>2</sup> CIC	$r^2 = 0.6659$ $F = 19.93$	S <sub>ZX</sub>	$r^2 = 0.5810$ $F = 15.25$	f-HA-dep <sup>q</sup> HDCA-2/TMSA
5.	$r^2 = 0.6422$ $F = 41.28$	<sup>q</sup> FHDCA	$r^2 = 0.6371$ $F = 17.55$	V <sub>C</sub> <sup>avg</sup>	$r^2 = 0.5788$ $F = 15.11$	f- <sup>q</sup> HDSA

<sup>q</sup>FHBSA—fractional H-bonding charged surface area (HBSA) [Semi-MO PC]; <sup>q</sup>FPSA-3—fractional partial positive charged surface area (PPSA-3) [Zefirov's PC]; HA-dep <sup>q</sup>HDCA-1/TMSA—H-acceptor dependent H-donor charged surface area relative to total molecular surface area (HDCA-1/TMSA) [Semi-MO PC]; <sup>2</sup>CIC—complementary information content (order 2); <sup>q</sup>FHDCA—fractional H-donor charged surface area [Semi-MO PC]; <sup>2</sup>SIC<sub>avg</sub>—average structural information content (order 2); <sup>1</sup>CIC<sub>avg</sub>—average complementary information content (order 1); <sup>2</sup>BIC<sub>avg</sub>—average bonding information content (order 2); S<sub>ZX</sub>—ZX Shadow; V<sub>C</sub><sup>avg</sup>—average valency of a carbon atom; HA-dep <sup>q</sup>HDCA-2/TMSA—H-acceptor dependent H-donor charged surface area relative to total molecular surface area (HDCA-2/TMSA) [Semi-MO PC]; <sup>q</sup>HDSA—H-donors surface area [Semi-MO PC].

Note: f- prefix denotes a fragmental descriptor.

as ZX Shadow (S<sub>ZX</sub>,  $r^2 = 0.6659$ ). Concerning subset 2, fractional descriptors appear to be more important, and they are connected with hydrogen bonding donor/acceptor ability of the fragment at position 4 of pyrazol-5-one, including: f-Fractional H-donor Charged Surface Area (<sup>q</sup>f-FHDCA,  $r^2 = 0.7776$ ), f-H-acceptor Dependent H-donor Charged Surface Area relative to Total Molecular Surface Area (f-HA-dep <sup>q</sup>HDCA-1/TMSA,  $r^2 = 0.6284$ ), f-H-donors Surface Area (f-<sup>q</sup>HDSA,  $r^2 = 0.5788$ ). The correlation coefficients of those descriptors with activity are pretty high, which again indicates that once the rest of the structure is fixed by additional hydrophobic interactions of phenyl ring with hypothetical hydrophobic pocket of target, and size and shape of molecules basic selection provides good fitting with active place, the activity on the target mostly depends on fragment at position 4. Generally, compounds from subset 2, containing phenyl ring, showed slightly better activities on both cells tested.

In conclusion, QSAR analysis supported the hypothesis that investigated compounds act by inhibiting the enzymes included in tumorigenesis rather than as free radical scavengers. Heuristic method showed that the most significant factors for activity of the compounds are geometrical and topological, including size and shape of the molecule. It could also be concluded that aromatic ring at position 1 of pyrazol-5-one plays significant role in hydrophobic interactions, whilst substituents connected to amino group at position 4 mainly interact by formation of hydrogen bonds with active place.

### Acknowledgments

The authors are grateful to the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia for financial support (Grant Nos 172016 and 175011).

### Supplementary data

Supplementary data (spectral data, Treatment of tumor cell lines, Flow cytometry analysis, in vitro angiogenesis assay and QSAR analysis) associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bmcl.2011.06.025.

### References and notes

- Himly, M.; Jahn-Schmid, B.; Pittertschatscher, K.; Bohle, B.; Grubmayr, K.; Ferreira, F.; Ebner, H.; Ebner, C. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2003**, *111*, 882.
- Watanabe, T.; Tahara, M.; Todo, S. *Cardiovasc. Ther.* **2008**, *26*, 101.
- Abe, S.; Kirima, K.; Tsuchiya, K.; Okamoto, M.; Hasegawa, T.; Houchi, H.; Yoshizumi, M.; Tamaki, T. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 186.
- Braña, M. F.; Gradillas, A.; Ovalles, A. G.; López, B.; Acero, N.; Llinares, F.; Muñoz Mingarro, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 9.
- Kimata, A.; Nakagawa, H.; Ohyama, R.; Fukuuchi, T.; Ohta, S.; Suzuki, T.; Miyata, N. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5053.
- Kakiuchi, Y.; Sasaki, N.; Satoh-Masuoka, M.; Murofushi, H.; Murakami-Murofushi, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *320*, 1351.
- Tripathy, R.; Ghose, A.; Singh, J.; Bacon, E. R.; Angeles, T. S.; Yang, S. X.; Albom, M. S.; Aimone, L. D.; Herman, J. L.; Mallamo, J. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1793.
- Van de Vrie, W.; Jonker, A. M.; Marquet, R. L.; Eggermont, A. M. M. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1994**, *120*, 533.
- Longhi, A.; Ferrari, S.; Bacci, G.; Specchia, S. *Anti-Cancer Drugs* **2007**, *18*, 737.
- Kimura, Y.; Okuda, H. *Jpn. J. Cancer Res.* **1999**, *90*, 765.
- Pevarello, P.; Brasca, M. G.; Amici, R.; Orsini, P.; Traquandi, G.; Corti, L.; Piutti, C.; Sansonna, P.; Villa, M.; Pierce, B. S.; Pulici, M.; Giordano, P.; Martina, K.; Fritzen, E. L.; Nugent, R. A.; Casale, E.; Cameron, A.; Ciomei, M.; Roletto, F.; Isacchi, A.; Fogliatto, G.; Pesenti, E.; Pastori, W.; Marsiglio, A.; Leach, K. L.; Clare, P. M.; Fiorentini, F.; Varasi, M.; Vulpetti, A.; Warpehoski, M. A. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3367.
- Pevarello, P.; Brasca, M. G.; Orsini, P.; Traquandi, G.; Longo, A.; Nesi, M.; Orzi, F.; Piutti, C.; Sansonna, P.; Varasi, M.; Cameron, A.; Vulpetti, A.; Roletto, F.; Alzani, R.; Ciomei, M.; Albanese, C.; Pastori, W.; Marsiglio, A.; Pesenti, E.; Fiorentini, F.; Bischoff, J. R.; Mercurio, C. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2944–2956.
- Wallace, D. J.; Straley, J. M. *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 3825.
- General procedure for the preparation of 1a–1e and 1m–1q. A mixture of aldehyde (1.5 mmol), amine (3 mmol) and *p*-toluenesulphonic acid monohydrate (0.011 g, 0.06 mmol) in ethanol (10 mL) was heated to reflux for 2 h. After cooling, the precipitate was filtered off, washed with a little cold ethanol and dried in vacuo over anhydrous CaCl<sub>2</sub>.
- General procedure for the preparation of 1f–1l and 1r–1y. A mixture of aldehyde (1.5 mmol) and amino acid (1.8 mmol) in ethanol (10 mL) was heated to reflux for 4 h. After removal of the solvent under reduced pressure, 40 mL of water was added and the suspension was stirred for additional 1 h at room temperature. The precipitate was filtered off, washed with a little cold chloroform and dried in vacuo over anhydrous CaCl<sub>2</sub>.
- Belmar, J.; Pérez, F. R.; Alderete, J.; Zúñiga, C. *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 179.
- Thaker, B. T.; Surati, K. R.; Oswal, S.; Jadeja, R. N.; Gupta, V. K. *Struct. Chem.* **2007**, *18*, 295.
- Holzer, W.; Kautsch, C.; Laggner, C.; Claramunt, R. M.; Pérez-Torralba, M.; Alkorta, I.; Elguero, J. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 6791.
- Liedtke, C.; Wang, J.; Tordai, A.; Symmans, W. F.; Hortobagyi, G. N.; Kiesel, L.; Hess, K.; Baggerly, K. A.; Coombes, K. R.; Pusztai, L. *Breast Cancer Res. Treat.* **2010**, *121*, 301.



## ***Биографија са подацима о досадашњем раду***

Виолета Марковић рођена је 02.07.1985. године у Meulan-у, Француска. Основну школу „Светозар Марковић” у Рековцу и Прву крагујевачку гимназију завршила је као носилац дипломе „Вук Караџић“. Природно-математички факултет у Крагујевцу, студијска група Хемија, уписала је школске 2004/2005, где је и дипломирала 2008. године, са просечном оценом у току студија 9,83. Исте године уписала је докторске академске студије на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, смер Органска хемија под менторством др Милана Јоксовића, доцента Природно-математичког факултета у Крагујевцу.

По упису на докторске студије, у периоду од 25. 11. 2008. до 31. 12. 2010. Виолета Марковић је радила као истраживач-приправник на истраживачком пројекту бр. 142042 Министарства за науку и технолошки развој Владе Републике Србије. Од 01.01.2011. ради на истраживачком пројекту бр. 172016 Министарства просвете и науке Владе Републике Србије. У звање истраживач-сарадник изабрана је 16. 02. 2011. на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, где и сада ради.

Виолета Марковић ангажована је у настави на предметима Хемија животне средине, Слободно-радикалске реакције и Интермедијери у органској хемији у Институту за хемију, где успешно води експерименталне вежбе од почетка докторских студија.

После завршетка експерименталног дела докторске дисертације Виолета Марковић је у овире програма стипендирања Basileus провела шест месеци на Универзитету у Риму (La Sapienza, Università di Roma, Facoltà di Farmacia, Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco) у истраживачкој групи професора Bruno-a Votta-е где се бавила тоталном синтезом неких фармаколошки значајних природних производа.