



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Данијела Љ. Стојковић

СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И БИОЛОШКА
АКТИВНОСТ КОМПЛЕКСА Pd(II) СА
ЕТИЛЕНДИАМИНСКИМ И КУМАРИНСКИМ
ДЕРИВАТИМА АМИНОКИСЕЛИНА

Докторска дисертација

Ментор: др Верица В. Јевтић, доцент

Крагујевац, 2018.

I Аутор

Име и презиме: **Данијела Љ. Стојковић**

Датум и место рођења: **27.10.1986. Крагујевац, Србија**

Садашње запослење: **сарадник у настави на Агрономском факултету у Чачаку, Универзитета у Крагујевцу**

II Докторска дисертација

Наслов: **Синтеза, карактеризација и биолошка активност комплекса Pd(II) са етилендиаминским и кумаринским дериватима аминокиселина**

Број страница: **145**

Број слика: **47**; број шема: **13**; број табела: **17**

Број библиографских јединица: **124**

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

Научна област (УКД): **Хемија (54) - Неорганска хемија (546)**

Ментор: **др Верица В. Јевтић, доцент**

III Оцена и одбрана

Датум пријаве теме: **27.12.2017.**

Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: **IV-01-250/4; 11.04.2018.**

Комисија за оцену теме и подобности кандидата:

1. др Верица В. Јевтић, доцент Природно-математичког факултета у Крагујевцу, ужа научна област: Неорганска хемија

2. др Срећко Р. Трифуновић, редовни професор Природно-математичког факултета у Крагујевцу, ужа научна област: Неорганска хемија

3. др Тибор Ј. Сабо, редовни професор Хемијског факултета у Београду, ужа научна област: Општа и неорганска хемија

4. др Гордана П. Радић, ванредни професор Факултета медицинских наука у Крагујевцу, ужа научна област: Фармацеутска хемија

5. др Ненад Л. Вуковић, доцент Природно-математичког факултета у Крагујевцу, ужа научна област: Биохемија

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:

Комисија за оцену и одбрану дисертације:

1. др Срећко Р. Трифуновић, редовни професор Природно-математичког факултета у Крагујевцу, ужа научна област: Неорганска хемија (председник Комисије)

2. др Тибор Ј. Сабо, редовни професор Хемијског факултета у Београду, ужа научна област: Општа и неорганска хемија

3. др Ратомир М. Јелић, редовни професор Факултета медицинских наука у Крагујевцу, ужа научна област: Неорганска хемија

4. др Гордана П. Радић, ванредни професор Факултета медицинских наука у Крагујевцу, ужа научна област: Фармацеутска хемија

5. др Ненад Л. Вуковић, доцент Природно-математичког факултета у Крагујевцу, ужа научна област: Биохемија

Датум одбране дисертације:

Ова докторска дисертација урађена је у Институту за хемију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу у оквиру пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије под називом „Синтеза, моделовање, физичко-хемијске и биолошке особине органских једињења и одговарајућих комплекса метала”.

Овом приликом се искрено захваљујем менторки, доценту др Верици Јевтић на указаном поверењу, дивној сарадњи и великој помоћи током израде ове дисертације.

Члановима Комисије професорима др Срећку Р. Трифуновићу, др Тибору Сабоу, др Ратомиру Јелићу, др Гордани Радић и др Ненаду Вуковићу захваљујем се на уложеном напору за побољшавање квалитета ове дисертације корисним саветима и сугестијама.

Хвала драгој колегиници и мом великом пријатељу Маји Ђукић, што је увек била уз мене и пружала велику подршку, онда када ми је била најпотребнија.

Велико хвала мами Верици и тати Љубомиру на љубави и разумевању, као и на томе што су, као и увек веровали у мене и на тај начин ме подстицали да остварим свој циљ.

Хвала мом Марку пре свега на стрпљењу, љубави и подршци.

*И на крају, највеће **ХВАЛА** брату Дејану, на искреној и несебичној подршци, помоћи и безграничној љубави на сваком пољу мог живота и рада.*

САДРЖАЈ

СПИСАК СЛИКА

СПИСАК ШЕМА

СПИСАК ТАБЕЛА

ИЗВОД.....	1
SUMMARY.....	5
1. УВОД.....	9
2. ОПШТИ ДЕО.....	13
2.1. Лиганди edda-типа.....	15
2.1.1. Структура тетрадентатних лиганада edda-типа.....	15
2.2. Комплекси паладијума(II) са <i>O,O'</i> -диалкил естрима лиганада edda-типа.....	17
2.3. Биолошка активност комплекса неких прелазних метала.....	19
2.3.1. Цитотоксичност паладијум(II)-комплекса.....	20
2.3.2. Механизам антимикуробног дејства неких комплекса прелазних метала.....	24
2.4. Деривати кумарина као лиганди.....	27
2.4.1. Структура и добијање кумарина.....	27
2.4.2. Хемијске особине кумарина.....	30
2.4.3. Биохемија кумарина.....	34
2.4.4. Биолошка активност кумарина.....	36
2.5. Циљ и задаци докторске дисертације.....	44
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО.....	47
3.1. Синтезе лиганада.....	49
3.1.1. Синтеза (<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине, H_2 -(<i>S,S</i>)-eddyr.....	49
3.1.2. Синтеза <i>O,O'</i> -диалкил естара (<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-	

	- (2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине дихлор-хидрата, R ₂ -(<i>S,S</i>)-eddyr·2HCl.....	49
3.1.3.	Синтезе кумаринских деривата.....	52
3.1.3.1.	Синтеза метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]бутаноата	52
3.1.3.2.	Синтеза метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетата.....	53
3.1.3.3.	Синтеза 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етил-амино)]сирћетне киселине.....	53
3.1.3.4.	Синтеза метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)-3-(1 <i>H</i> -индол-3-ил)]пропаноата и метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)-4-(метилтио)]бутаноата.....	54
3.2.	Синтезе комплекса.....	56
3.2.1.	Синтеза дихлоридо-(<i>O,O'</i> -диетил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))ацетато-паладијум(II)-комплекса, [PdCl ₂ (det- <i>S,S</i> -eddyr)].....	56
3.2.2.	Синтеза дихлоридо-(<i>O,O'</i> -дипропил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))ацетато-паладијум(II)-комплекса, [PdCl ₂ (dpr- <i>S,S</i> -eddyr)].....	56
3.2.3.	Синтеза дихлоридо-(<i>O,O'</i> -дибутил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))ацетато-паладијум(II)-комплекса, [PdCl ₂ (dbu- <i>S,S</i> -eddyr)].....	57
3.2.4.	Синтеза дихлоридо-(<i>O,O'</i> -дипентил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))ацетато-паладијум(II)-комплекса, [PdCl ₂ (dpe- <i>S,S</i> -eddyr)].....	58
3.2.5.	Синтеза <i>bis</i> {метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етил-амино-3-метил)]бутаноато}-паладијум(II)-комплекса.....	59
3.2.6.	Синтеза хлоридо{метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етиламино)]ацетато}-паладијум(II)-комплекса.....	59

3.2.7.	Синтеза диметиламин{2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етиламино)]ацетато}-паладијум(II)-комплекса.....	60
3.2.8.	Синтеза хлоридо{метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етиламино)-3-(1 <i>H</i> -индол-3-ил)]пропаноато}-паладијум(II)-комплекса.....	61
3.2.9.	Синтеза хлоридо{метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етиламино)-4-(метилтио)]бутаноато}-паладијум(II)-комплекса.....	62
3.3.	Мерења.....	63
3.3.1.	Елементална микроанализа анализа.....	63
3.3.2.	¹ H и ¹³ C нуклеарно-магнетно-резонанциона спектроскопија..	63
3.3.3.	Инфрацрвена спектроскопија.....	63
3.3.4.	Рендгенска структурна анализа.....	63
3.3.4.1.	Рендгенска структурна анализа метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]бутаноата.....	63
3.3.4.2.	Рендгенска структурна анализа диметиламин{2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетато}-паладијум(II)-комплекса.....	64
3.4.	Биолошка мерења.....	66
3.4.1.	<i>In vitro</i> антитуморска активност.....	66
3.4.1.1.	Испитиване ћелијске линије.....	66
3.4.1.2.	Хранљиви медијум.....	66
3.4.1.3.	CLL ћелије.....	66
3.4.1.4.	МТТ тест.....	67
3.4.2.	<i>In vitro</i> антимицробни тест.....	69
3.4.2.1.	Тестирани микроорганизми.....	69
3.4.2.2.	Микродилуциона метода.....	71
3.4.3.	Интеракције паладијум(II)-комплекса.....	72
3.4.3.1.	Интеракције комплекса са молекулом DNA.....	72

3.4.3.2. Интеракције комплекса са серумом албумина (HSA).....	73
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	75
4.1. Синтеза <i>O,O'</i>-диалкил естара (<i>S,S</i>)-етилендиамин-<i>N,N'</i>-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине дихлорхидрата, R_2-(<i>S,S</i>)-eddyr·2HCl и одговарајућих паладијум(II)-комплекса, [PdCl₂(R_2-(<i>S,S</i>)-eddyr)].....	77
4.1.1. Синтезе лиганада и комплекса.....	77
4.1.2. Инфрацрвена спектроскопија <i>O,O'</i> -диалкил естара (<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине дихлорхидрата и одговарајућих паладијум(II)-комплекса.....	79
4.1.3. Нуклеарно-магнетно-резонанциона (¹ H и ¹³ C) спектроскопија <i>O,O'</i> -диалкил естара (<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине дихлорхидрата и одговарајућих паладијум(II)-комплекса.....	80
4.1.4. Резултати <i>in vitro</i> антитуморске активности R_2 -(<i>S,S</i>)-eddyr лиганада и одговарајућих паладијум(II)-комплекса према циљаним малигним ћелијама.....	82
4.1.5. Микробиолошка активност <i>O,O'</i> -диалкил естара (<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине дихлорхидрата и одговарајућих паладијум(II)-комплекса.....	85
4.1.6. Интеракције [PdCl ₂ (R_2 -(<i>S,S</i>)-eddyr)] комплекса са молекулом СТ-DNA.....	88
4.1.7. Интеракције [PdCl ₂ (R_2 -(<i>S,S</i>)-eddyr)] комплекса са серумом албумина, HSA.....	90
4.2. Синтезе деривата кумарина и одговарајућих комплекса паладијума(II).....	93

4.2.1.	Синтеза лиганда, метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етиламино-3-метил)]бутаноата и одговарајућег паладијум(II)-комплекса.....	93
4.2.1.1.	Инфрацрвена спектроскопија метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]бутаноата и одговарајућег паладијум(II)-комплекса.....	94
4.2.1.2.	Нуклеарно-магнетно-резонанциона (¹ H и ¹³ C) спектроскопија метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]бутаноата и одговарајућег паладијум(II)-комплекса.....	95
4.2.1.3.	Кристална структура лиганда, метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етиламино-3-метил)]бутаноата.....	96
4.2.1.4.	DFT прорачуни за лиганд метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етиламино-3-метил)]бутаноат и одговарајући паладијум(II)-комплекс...	100
4.2.2.	Синтеза глицинских деривата кумарина и одговарајућих паладијум(II)-комплекса.....	101
4.2.2.1.	Инфрацрвена спектроскопија глицинских деривата кумарина и одговарајућих паладијум(II)-комплекса.....	103
4.2.2.2.	Нуклеарно-магнетно-резонанциона (¹ H и ¹³ C) спектроскопија глицинских деривата кумарина и одговарајућих паладијум(II)-комплекса.....	103
4.2.2.3.	Кристална структурна анализа диметиламин-{2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетато}-паладијум(II)-комплекса.....	104
4.2.3.	Синтеза метионин и триптофан деривата кумарина и одговарајућих паладијум(II)-комплекса.....	109

4.2.3.1.	Инфрацрвена спектроскопија метионин и триптофан деривата кумарина и одговарајућих паладијум(II)-комплекса.....	110
4.2.3.2.	Нуклеарно-магнетно-резонанциона (^1H и ^{13}C) спектроскопија метионин и триптофан деривата кумарина и одговарајућих паладијум(II)-комплекса.....	111
4.2.4.	Биолошка испитивања кумаринских деривата.....	112
4.2.4.1.	Антитуморска активност свих синтетисаних кумаринских лиганата и одговарајућих паладијум(II)-комплекса.....	112
4.2.4.2.	Антимикробна активност свих синтетисаних кумаринских лиганата и одговарајућих паладијум(II)-комплекса.....	115
5.	ЗАКЉУЧАК.....	119
6.	ЛИТЕРАТУРА.....	125
	БИОГРАФИЈА.....	135
	РАДОВИ У КОЈИМА СУ ШТАМПАНИ РЕЗУЛТАТИ ОВЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ.....	137
	НАУЧНО-ИСТРАЖИВАЧКИ РАД.....	139
	ПРИЛОГ.....	145

СПИСАК СЛИКА

Слика 1.	<i>ORTEP</i> презентација структуре комплекса паладијума(II) са тетраетил (А) и тетраметил (Б) естрима edta	18
Слика 2.	Структуре платинских комплекса (А) <i>cis</i> -платина, (Б) карбоплатина, (Ц) оксалиплатина, (Д) недаплатина.....	20
Слика 3.	Структура (А) <i>cis</i> -диаминдихлоридопаладијум(II), <i>cis</i> -[PdCl ₂ (NH ₃) ₂]; (Б) <i>cis</i> -1,2-диаминциклохександихлоридо паладијум(II), <i>cis</i> -[PdCl ₂ (DACH)] комплекса.....	21
Слика 4.	Комплекс паладијума(II) са дериватом кумарина, активнији приближно 7800 пута од карбоплатине.....	22
Слика 5.	Потенцијална места на бактеријској ћелији за дејство антимикробних супстанци.....	25
Слика 6.	Паладијум(II)-јон координован за антибиотике из групе тетрациклина.....	26
Слика 7.	Паладијум(II)-комплекс са флуорохинолином као лигандом.....	27
Слика 8.	Структура кумарина.....	28
Слика 9.	Биосинтеза кумарина у биљкама	29
Слика 10.	Кето-енолна таутомерија кумарина.....	30
Слика 11.	Кисело или базно катализована хидролиза кумарина.....	31
Слика 12.	Приказ електронакцепторског дејства карбонилне групе.....	31
Слика 13.	Део резонанционих структура бензопиронског језгра.....	32
Слика 14.	Реакција кумарина са натријум-бисулфитом.....	32
Слика 15.	Реакције кумарина са јаким нуклеофилним реагенсима.....	33
Слика 16.	Реакције хидрирања кумарина.....	34
Слика 17.	Главни метаболички путеви биотрансформације кумарина.....	35
Слика 18.	Биотрансформација кумарина до сулфата и глукуронида.....	36
Слика 19.	4-хидрокси супституисани кумарини.....	38

Слика 20.	Новобиоцин.....	38
Слика 21.	Деривати 4-хидрокси кумарина као антибактеријски агенси.....	39
Слика 22.	Дикумарол.....	39
Слика 23.	7-хидроксикумарин и стилбен-кумарин.....	40
Слика 24.	Антиканцерогени агенс на Sarcom W ₂₅₆	41
Слика 25.	(+)-Каланолид А и (-)-каланолид В.....	41
Слика 26.	4-(арилоксиметил) кумарински деривати као антиинфламаторни супстрати.....	42
Слика 27.	Карбохромен.....	42
Слика 28.	7-Хидрокси-4-метил-8-пиперидин-1-ил метил-хромен-2-он.....	43
Слика 29.	Кумарински деривати са естрогеним дејством.....	43
Слика 30.	Структура МТТ.....	67
Слика 31.	Редукција МТТ до формазана.....	68
Слика 32.	Структура (<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси- -бензил))сирћетне киселине дихидрохлорида, (H ₂ -(<i>S,S</i>)-eddyr)·2HCl.....	77
Слика 33.	Нумерација атома у ¹ H и ¹³ C NMR спектрима синтетисаних естара.....	81
Слика 34.	Способност преживљавања ћелијских линија MDA-MB-231, A549 и CLL ћелија хроничне лимфоцитне леукемије 6h, 24h и 48h после третмана различитим концентрацијама испитиваних палладијум(II)-комплекса одређивана МТТ тестом. Резултати експеримената приказани су као проценат контроле (Средња вредност ± SD).....	83
Слика 35.	Електронски спектри комплекса C4 (a) и C8 (b) у <i>tris</i> -HCl пуферу након додавања CT-DNA. [C4 комплекс] = 4,1·10 ⁻⁵ mol/dm ³ , [C8 комплекс] = 6,0·10 ⁻⁵ mol/dm ³ , [DNA] = 0 - 1,7·10 ⁻⁴ mol/dm ³ ...	89
Слика 36.	Емисиони спектри (A, B) CT-DNA-EB система у <i>tris</i> -HCl пуферу након титрације комплекса C4 (A) и C8 (B). [EB] = 1,2·10 ⁻⁵ mol/dm ³ , [DNA] = 1,8·10 ⁻⁵ mol/dm ³ , [комплекс] = 0-1,4·10 ⁻⁴ mol/dm ³	89

Слика 37.	Апсорпциони спектри (а, б) ХСА ($2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$), са различитим количинама C4 (а) и C8 (б) комплекса ($0 - 15 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$) на собној температури.....	90
Слика 38.	Утицај C4 (А) и C8 (В) комплекса на флуоресцентни спектар HSA на собној температури, $[\text{HSA}] = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$, $[\text{комплекс}] = 0 - 15 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$. Стерн-Волмерова плоча F_0/F према $[\text{комплекса}]$ у флуоресцентном гашењу HSA система (С, D) у комплексу C4 (С) и у комплексу C8 (D).....	91
Слика 39.	Структуре изомера La и Lb	95
Слика 40.	Кристална структура лиганда, метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етиламино-3-метил)]бутаноата.....	97
Слика 41.	Део ланца формираног у структури лиганда L (интрамолекуларне и интермолекуларне водоничне везе су приказане као плаве и црвене испрекидане линије).....	99
Слика 42.	Део таласа формираних у структури лиганда L (интрамолекуларне и интермолекуларне водоничне везе су приказане као плаве и црвене испрекидане линије).....	99
Слика 43.	Израчунате структуре <i>bis</i> {метил-2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]бутаноато}-паладијум(II)-комплекса у <i>trans</i> - и <i>cis</i> -геометрији.....	100
Слика 44.	Структура диметиламин{2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етиламино)]ацетато}-паладијум(II)-комплекса.....	105
Слика 45.	Начин паковања у диметиламин{2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетато}-паладијум(II)-комплексу.....	106
Слика 46.	JVM-13, MOLT-4 и CLL (изоловане код пет CLL пацијената) ћелије инкубиране током 24 и 48 сати уз повећање концентрација паладијумових комплекса 1c , 2c , 3c и 4c	113
Слика 47.	<i>In vitro</i> антибактеријска и антифунгална активност паладијум(II)-комплекса и њихових одговарајућих лиганата. А) <i>Staphylococcus aureus</i> ; В) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; С) <i>Enterococcus faecalis</i> ; D) <i>Candida albicans</i>	115

СПИСАК ШЕМА

Шема 1.	Општа шема синтезе лиганда edda-типа по Берсворту.....	16
Шема 2.	Методе синтезе <i>O, O'</i> -диалкил естра лиганда H_2 -edda типа.....	16
Шема 3.	Синтеза комплекса паладијума(II) са тетраметил и тетраетил естрима edta.....	18
Шема 4.	Синтеза <i>O, O'</i> -диалкил естара (<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине дихлорхидрата, R_2 -(<i>S, S</i>)-eddyr·2HCl.....	78
Шема 5.	Синтеза $[PdCl_2(R_2-(S, S)-eddyr)]$ комплекса.....	79
Шема 6.	Синтеза метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]бутаноата и <i>bis</i> {метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етиламино)-3-метил]}бутаноато}-паладијум(II)-комплекса.....	93
Шема 7.	Синтеза метил 2-[(1-{2,4-диоксохроман-3-илиден)-етиламино)]ацетата.....	101
Шема 8.	Синтеза 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]сирћетне киселине.....	102
Шема 9.	Синтеза хлоридо {метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етил-амино)]ацетато}-паладијум(II)-комплекса.....	102
Шема 10.	Механизам хидролизе естарске везе у хлоридо {метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетато}-паладијум(II)-комплексу	107
Шема 11.	Механизам хидролизе амидних веза у диметиламин{2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетато}-паладијум(II)-комплексу.....	108
Шема 12.	Трансформација 3-ацетил-4-хидрокси кумарина до енамина 3b, 4b	109
Шема 13.	Синтеза паладијум(II)-комплекса 3c, 4c	110

СПИСАК ТАБЕЛА

Табела 1.	Приказ лиганада edda-типа и одговарајућих деривата.....	15
Табела 2.	Основни кристалографски подаци и подаци у вези са решавањем и утачњавањем структуре за метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)-3-метил]бутаноат.....	64
Табела 3.	Основни кристалографски подаци и подаци у вези са решавањем и утачњавањем структуре за диметиламин{2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетато}-паладијум(II)-комплекс..	65
Табела 4.	Списак тестираних микроорганизама.....	69
Табела 5.	Важније траке у инфрацрвеним спектрима $R_2-(S,S)$ -eddyг·2HCl лиганада и одговарајућим паладијум(II)-комплексима.....	80
Табела 6.	IC ₅₀ (μM) вредности за испитиване комплексе и лиганде, 6h, 24h и 48h након третмана MDA-MB-231, A549 и CLL на ћелијама лимфоцитне леукемије, одређене МТТ тестом.....	84
Табела 7.	Антибактеријска активност (μg/cm ³) испитиваних лиганада и одговарајућих паладијум(II)-комплекса.....	86
Табела 8.	Антибактеријска активност (μg/cm ³) антибиотика.....	87
Табела 9.	Константе гашења (K_{SV}), константе везивања (K_a), места везивања (n) у систему HSA-комплекс (C1-C8)	92
Табела 10.	Карактеристичне групе и њихова померања у IR спектрима за лиганд (L) и комплекс (C).....	94
Табела 11.	Карактеристична хемијска померања у ¹ H NMR спектру за лиганд L и одговарајући паладијум(II)-комплекс, C.....	96
Табела 12.	Одабране дужине везе [Å] и углова веза [°] за лиганд метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етиламино-3-метил]бутаноат.....	97
Табела 13.	Водоничне везе у метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етиламино-3-метил]бутаноату [Å и °].....	98

Табела 14. Одабране дужине (Å) и углови веза (°) у диметиламин{2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетато}-паладијум(II)-комплексу.....	106
Табела 15. IC ₅₀ вредности добијене МТТ тестом за испитиване паладијумове комплексе (1c, 2c, 3c и 4c) и њихове одговарајуће лиганде (1b, 2b, 3b и 4b), 24 и 48 сати након третмана JVM-13, MOLT-4 и CLL ћелијама.....	114
Табела 16. Антибактеријска и антифунгална активност испитиваних једињења.....	116
Табела 17. Антибактеријска и антифунгална активност стандардних антибиотика, ванкомицина и цефтриаксона.....	117

ИЗВОД

СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И БИОЛОШКА АКТИВНОСТ КОМПЛЕКСА Pd(II) СА ЕТИЛЕНДИАМИНСКИМ И КУМАРИНСКИМ ДЕРИВАТИМА АМИНОКИСЕЛИНА

У овој *Докторској дисертацији* описана је синтеза и карактеризација неколико нових лиганата, етилендиаминских и кумаринских деривата неких аминокиселина и одговарајућих паладијум(II)-комплекса.

Најпре је описана синтеза и карактеризација *O,O'*-диалкил естара (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине ($H_2-(S,S)\text{-eddyr}$). Ова једињења су добијена директном реакцијом између тетрадентатног лиганда (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине и одговарајућег апсолутног алкохола (етанол, 1-пропанол, 1-бутанол и 1-пентанол) у молском односу 1 : 2, уз увођење гасовитог хлороводоника. Такође, приказана је и синтеза кумаринских деривата неких аминокиселина. Поменути лиганди добијени су рефлуковањем смеше 3-ацетил-4-хидрокси кумарина, хидрохлорида метил естара аминокиселина *S*-валина, глицина, *S*-метионина или *S*-триптофана и триметиламина. Ток реакције је праћен танкослојном хроматографијом (толуен : ацетон = 8 : 2). Након завршене реакције, упаравањем растварача до половине своје запремине и додавањем 5 cm³ воде, добијени су кумарински деривати са поменути аминокиселинама. Структуре и састав изолованих лиганата претпостављене су применом елементарне микроанализе, инфрацрвене, ¹H и ¹³C NMR спектроскопије, а потврђене на бази резултата рендгенске структурне анализе у случају метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]бутаноата.

Добијени *O,O'*-диалкил естри (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине су употребљени за синтезу одговарајућих паладијум(II)-комплекса. Састав добијених квадратно-планарних паладијума(II)-комплекса потврђен је елементарном анализом, док је структура изолованих комплекса претпостављена на основу инфрацрвене, ¹H и ¹³C NMR спектроскопије.

Кумарински деривати аминокиселина су искоришћени за синтезу одговарајућих комплекса паладијума(II).

Састав добијених паладијума(II)-комплекса потврђен је на основу резултата елементалне микроанализе. Структура изолованих комплекса претпостављена је на основу инфрацрвене, ^1H и ^{13}C NMR спектроскопије, а потврђена на бази рендгенске структурне анализе у случају диметиламин-{2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетато}-паладијум(II)-комплекса.

In vitro антитуморска активност *O,O'*-диалкил естара (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине и одговарајућих паладијум(II)-комплекса испитивана је на ћелијама хуманог карцинома дојке (MDA-MB-231), хуманог карцинома плућа (A549) и хроничне лимфоцитне леукемије (CLL) коришћењем МТТ теста. Способност преживљавања испитиваних малигних ћелија одређивана је 6, 24 и 48 сати након третмана различитим концентрацијама тестираних једињења. Испитивањем је утврђено да поменути комплекси показују већу антитуморску активност од лигананда.

In vitro антимикробна активност *O,O'*-диалкил естара (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине и одговарајућих паладијум(II)-комплекса испитивана је микродилуционом методом. Том приликом одређене су минимална инхибиторна (MIC) и минимална бактерицидна/микробицидна концентрација (MBC) поменутих једињења. Испитивана једињења показују умерену активност према грам(+) бактеријама, док према грам(-) бактеријама показују слабу активност. Лиганди су показали највећу активност према клиничким и референтним сојевима бактерија *Enterococcus faecalis* и *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, док су комплекси паладијума(II) показали највећу активност према клиничкој врсти *Enterococcus faecalis*.

Афинитет везивања паладијум(II)-комплекса у молекулу CT-DNA испитиван је применом апсорпционе и флуоресцентне спектроскопије. Из добијених резултата утврђено је да се комплекс $[\text{PdCl}_2(\text{dpe}-(\text{S,S})\text{-eddyr})]$ снажно везује за CT-DNA у поређењу са преосталим комплексима.

У циљу испитивања структурних промена које су настале на хуманом серуму албумина, HSA након додавања паладијум(II)-комплекса снимљени су апсорпциони и флуоресцентни спекти. На овај начин су одређене константе везивања (K_b), као и број везивања (n) за комплекс формиран између паладијум(II)-комплекса и серума албумина,

HSA. Интензитет апсорпције прогресивно расте са додавањем паладијум(II)-комплекса, што указује да се комплекс формирао између паладијум(II)-комплекса и HSA. Добијени резултати потврђују да је интеракција између паладијум(II)-комплекса и HSA вероватно био статички процес гашења.

Интеракција паладијум(II)-комплекса са серумом албумина, HSA такође је праћена проучавањем гашења флуоресценције HSA са повећањем концентрације паладијум(II)-комплекса. У свим случајевима интензитети флуоресценције HSA се смањују са повећањем концентрације паладијум(II)-комплекса, што указује на везивање комплекса за HSA. Добијене бимолекуларне константе гашења (K_q) комплекса веће су од максималне вредности за дифузно контролисано каљење чиме је показано да каљење није изазвано динамичким већ статичким гашењем формирања комплекса. Израчунате вредности за места везивања, n је око 1 за све комплексе, што указује на постојање само једног везујућег места у HSA за све испитиване комплексе.

In vitro антитуморска активност кумаринских деривата са аминокиселинама: *S*-валин, глицин, *S*-метионин и *S*-триптофан и одговарајућих паладијум(II)-комплекса испитивана је на ћелијама хумане леукемије (JVM-13, MOLT-4) и хроничне лимфоцитне леукемије (CLL), при чему су ћелије третиране различитим концентрацијама лиганда или комплекса током 24 и 48 сати. Цитотоксични ефекти наведених лиганда и паладијум(II)-комплекса одређивани су МТТ тестом, а представљени су као IC_{50} вредности. Сви комплекси паладијума(II) су показали већу цитотоксичност у односу на одговарајуће лиганде, који нису показали цитотоксични ефекат према испитиваним ћелијама леукемије.

In vitro антимикуробна активност кумаринских деривата са поменутих аминокиселинама и одговарајућих паладијум(II)-комплекса испитивана је микродилуционом методом. Том приликом одређене су MIC_{50} , MIC_{90} , MIC и MBC/MMS вредности поменутих једињења. Интензитет антимикуробног деловања поменутих лиганда одговарајућих паладијум(II)-комплекса мењао се у зависности од врсте микроорганизма. Испитиване супстанце су показале значајно нижу антимикуробну активност у односу на комерцијалне антибиотике. У нашем истраживању, два комплекса паладијума(II) показала су већу антибактеријску активност према грам(+) бактеријама, док су друга два комплекса паладијума(II) показала већу антибактеријску активност према грам(-) бактеријама, на

основу чега претпостављамо да органски лиганди имају значајну улогу у начину антимикробног деловања.

На основу ових испитивања закључили смо да комплекси паладијума(II) имају већу антимикробну активност од својих одговарајућих лиганда и да су углавном показали јачу антифунгалну него антибактеријску активност.

Кључне речи: R_2 -(*S,S*)-eddyr лиганди, кумарински деривати аминокиселина, паладијум(II)-комплекси, инфрацрвена и NMR спектроскопија, рендгенска структурна анализа, антитуморска активност, антимикробна активност, интеракције са молекулом СТ-DNA, интеракције са хуманим серумом албумина, HSA.

SUMMARY

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF Pd(II) COMPLEXES WITH ETHYLENDIAMINE AND COUMARINE AMINO ACIDS DERIVATIVES

The synthesis and characterization of several new ligands, ethylenediamine and coumarin derivatives of some amino acids and corresponding palladium(II)-complexes are described in this PhD thesis.

Firstly, the synthesis and characterizations of *O,O'*-dialkyl esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-(2,2'-di-(4-hydroxy-benzyl)acetic acid, H₂-(*S,S*)-eddyr are described. These compounds were obtained by direct reaction between tetradentate ligand (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-(2,2'-di-(4-hydroxy-benzyl)acetic acid and the corresponding absolute alcohol (ethanol, 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol) in a molar ratio 1:2 with the addition of gaseous hydrogen-chloride. Also, the synthesis of coumarin derivatives of some amino acids are also shown. Mentioned ligands were obtained refluxing a mixture of 3-acetyl-4-hydroxy coumarin, hydrochloride methyl esters of amino acids *S*-valine, glycine, *S*-methionine or *S*-tryptophan and trimethylamine.

The progress of the reactions was monitored by TLC (toluene : acetone = 8 : 2). After the finishing of the reactions, the evaporation of solvent to the half of native volume and addition of 5 cm³ of water, the obtained coumarin derivatives with mentioned amino acids were obtained.

The obtained *O,O'*-dialkyl esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-(2,2'-di-(4-hydroxy-benzyl)acetic acids are used for synthesis of the corresponding palladium(II)-complexes. The composition of obtained square-planar palladium(II)-complexes was confirmed by elemental microanalysis, and the structure of isolated complexes is assumed on basis of infrared, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy.

The coumarin derivatives of some amino acids were used for synthesis of the corresponding palladium(II)-complexes. The composition of obtained palladium(II)-complexes was confirmed by elemental microanalysis. The structure of isolated complexes was assumed on basis of infrared, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy and confirmed on basis of X-ray diffraction

analysis in the case of dimethylamine{2-[(1-(2,4-dioxochroman-3-ylidene)ethylamino)]acetate}-palladium(II)-complex.

In vitro antitumour activity of *O,O'*-dialkyl esters of ethylenediamine-*N,N'*-di-(2,2'-di-(4-hydroxybenzyl)acetic acid and the corresponding palladium(II)-complexes were determined on the tumor cells of human breast cancer (MDA-MB-231), human lung cancer (A549) and chronic lymphocytic leukemia (CLL) using the MTT assay. The viability of the examined tumor cells was determined for 6, 24 and 48 hours after treatment with various concentrations of the tested compounds. The study found that these complexes showed greater antitumor activity than ligands.

In vitro antimicrobial activity of *O,O'*-dialkyl esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-(2,2'-di-(4-hydroxy-benzyl)acetic acid and the corresponding palladium(II)-complexes were tested with the microdilution method. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal/microbicidal concentration (MBC) of mentioned compounds were determined in this process. The compounds showed moderate activity to gram(+) bacteria, whereas according to gram(-) bacteria exhibit low activity. Ligands showed the highest activity on the clinical and reference strains of *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, while palladium(II) complexes showed the highest activity on the clinical species *Enterococcus faecalis*.

The binding affinity of the palladium(II)-complexes to CT-DNA were studied using absorption and fluorescence spectroscopy. It was found that the complex [PdCl₂(dpe-(*S,S*)-eddyr)] was strongly bind to CT-DNA compared to the remaining complexes.

In order to investigate the structural changes that occurred on the human albumin serum, HSA after addition palladium(II)-complexes, spectra of absorption and fluorescence were recorded. In this way, the binding constants (K_b) were determined, as well as the binding number (n) for the complex formed between the palladium(II)-complexes and serum albumin, HSA. The absorption intensity increase progressively with addition palladium(II)-complex, indicating that the complex was formed between palladium(II)-complexes and HSA.

Interaction of palladium(II)-complexes with albumin serum, HSA was also followed by the study of quenching HSA fluorescence with an increase in the concentration of palladium(II)-complex. In all cases, the intensities of HSA fluorescence were reduced with an increase in the concentration of the palladium(II)-complex, which indicates the binding of the HSA complex. The obtained bimolecular quenching constants (K_q) of the complexes are higher than the maximum value for diffusely controlled hardening, which shows that the quenching was not caused by

dynamic already static quenching of the complex formation. Calculated values for the binding sites, n is about 1 for all complexes, indicating the existence of only one binding site in the HSA for all tested complexes

In vitro antitumor activity of coumarin derivatives with amino acids: *S*-valine, glycine, *S*-methionine and *S*-tryptophan and the corresponding palladium(II)-complexes were investigated on human leukemia (JVM-13, MOLT-4) and chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells, treated with different concentrations of ligands or complexes for 24 and 48 hours. The cytotoxic effect of mentioned ligands and palladium(II)-complexes were determined using the MTT test and were presented as IC_{50} values. All palladium(II)-complexes showed a higher cytotoxic effect compared to the corresponding ligands, which no showed a cytotoxic effect to the tested leukemia cells.

In vitro antimicrobial activity of the coumarin derivatives with amino acids: *S*-valine, glycine, *S*-methionine and *S*-tryptophan and the corresponding palladium(II)-complexes was investigated by microdilution method. On this occasion, the MIC_{50} , MIC_{90} , MIC and MBC/MMC values of mentioned compounds were determined. The intensity of the antimicrobial activity of mentioned ligands and corresponding palladium(II)-complex was changed depending on the type of microorganism. The investigated substances showed significantly lower antimicrobial activity compared to commercial antibiotics. In our study, two palladium(II)-complexes showed greater antibacterial activity against gram(+) bacteria, while the other two palladium(II)-complexes showed greater antibacterial activity against gram(-) bacteria, which we assume that organic ligands have an important role in antimicrobial mode.

We concluded that the palladium(II)-complexes had a higher antimicrobial activity than their respective ligands and that they generally showed a stronger antifungal than antibacterial activity.

Keywords: R_2 -(*S,S*)-eddyr ligands, coumarin derivatives with amino acids, palladium(II)-complexes, infrared and NMR spectroscopy, X-ray structural analysis, antitumor activity, antimicrobial activity, interactions with DNA molecule, interactions with human serum albumin, HSA.

1. УВОД

Комплекси прелазних метала поред свог фундаменталног значаја у оквиру координационе хемије заузимају посебно место у областима бионеорганске и медицинске хемије због потенцијалне примене у лечењу различитих обољења. Откриће антитуморске активности *cis*-платине, *cis*-диаминдихлоридоплатина(II)-комплекса условило је повећано интересовање за синтезу и карактеризацију нових комплекса, али и за испитивање њихове биолошке активности.

Комплексна једињења прелазних метала са полидентатним edta и edda лигандима интензивно су проучавана још од средине прошлог века, баш због њихове способности да испољавају разноврсну биолошку активност, а самим тим и могућност примене у терапији различитих врста тумора. У том погледу синтетисан је велики број комплексних једињења платине, паладијума, кобалта, рутенијума и злата са поменутих лигандима, са циљем да се добије комплекс са што бољим и селективнијим антитуморским дејством и евентуално расветли потенцијални механизам његовог антитуморског деловања.

Поједини комплекси платине су већ у клиничкој употреби, док су неки комплекси стигли у фазу клиничких испитивања. С обзиром да комплекси паладијума(II) поседују хемијске особине сличне комплексима платине(II) веома је значајно синтетисати нове комплексе са бидентатним лигандима, *O,O'*-диалкил естрима (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине (R_2 -(*S,S*)-eddyr), као и са кумаринским дериватима неких аминокиселина, утврдити њихову геометрију и *in vitro* испитати њихову антитуморску и антимицробну активност, као и потенцијални механизам деловања.

2. ОПШТИ ДЕО

2.1. ЛИГАНДИ edda-ТИПА

2.1.1. Структура тетрадентатних лиганада edda-типа

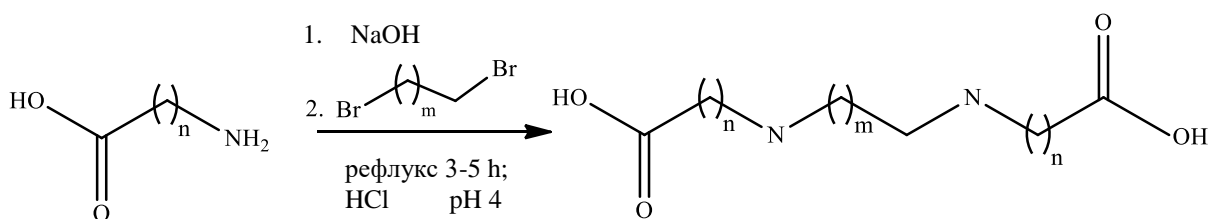
У Табели 1 приказани су неки значајнији лиганди edda-типа, који су до сада описани.

Табела 1. Приказ неких лиганада edda-типа и одговарајућих структурних деривата

Назив и формула лиганда	Скраћеница
етилендиамин- <i>N,N'</i> -диацетат $^{-}\text{OOCCH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{COO}^{-}$	edda
<i>N,N'</i> -диметил-етилендиамин- <i>N,N'</i> -диацетат $^{-}\text{OOCCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COO}^{-}$	dmedda
<i>N,N'</i> -диетил-етилендиамин- <i>N,N'</i> -диацетат $^{-}\text{OOCCH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_2\text{COO}^{-}$	dedda
<i>N,N'</i> -добензил-етилендиамин- <i>N,N'</i> -диацетат $^{-}\text{OOCCH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5)\text{CH}_2\text{COO}^{-}$	dbedda
1,2-циклохександиамин- <i>N,N'</i> -диацетат $^{-}\text{OOCCH}_2\text{NHchxNHCH}_2\text{COO}^{-}$	cdda (chxnda)
<i>N,N'</i> -диметил-1,2-циклохександиамин- <i>N,N'</i> -диацетат $^{-}\text{OOCCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{chx}(\text{CH}_3)\text{NHCH}_2\text{COO}^{-}$	(me) ₂ chxnda
етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-3-пропаноат $^{-}\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{COO}^{-}$	eddp
етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-(<i>S,S</i>)-2-пропаноат $^{-}\text{OOC}(\text{CH}_3)\text{CHNHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{COO}^{-}$	(<i>S,S</i>)-eddp
етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-(<i>S,S</i>)-2-(3-метил)-бутаноат $^{-}\text{OOC}(\text{C}_3\text{H}_7)\text{CHNHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}(\text{C}_3\text{H}_7)\text{COO}^{-}$	(<i>S,S</i>)-eddv
етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-пропаноат $^{-}\text{OOC}(\text{CH}_3)\text{CHNHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{COO}^{-}$	eddip
етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-(4-метил)-пентаноат $^{-}\text{OOC}((\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2)\text{CHNHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2)\text{COO}^{-}$	eddl
<i>N,N'</i> -диметил-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-3-пропаноат $^{-}\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^{-}$	(me) ₂ eddp
<i>N,N'</i> -диметил-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди- α -пропаноат $^{-}\text{OOC}(\text{CH}_3)\text{CHN}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COO}^{-}$	dmeddpa
1,3-пропандиамин- <i>N,N'</i> -диацетат $^{-}\text{OOCCH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{COO}^{-}$	1,3-pdda
1,3-пропандиамин- <i>N,N'</i> -ди-3-пропаноат $^{-}\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{COO}^{-}$	1,3-pddp
<i>N,N'</i> -bis-(2-аминоетил)глицинат $(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{COO}^{-}$	i-dtma

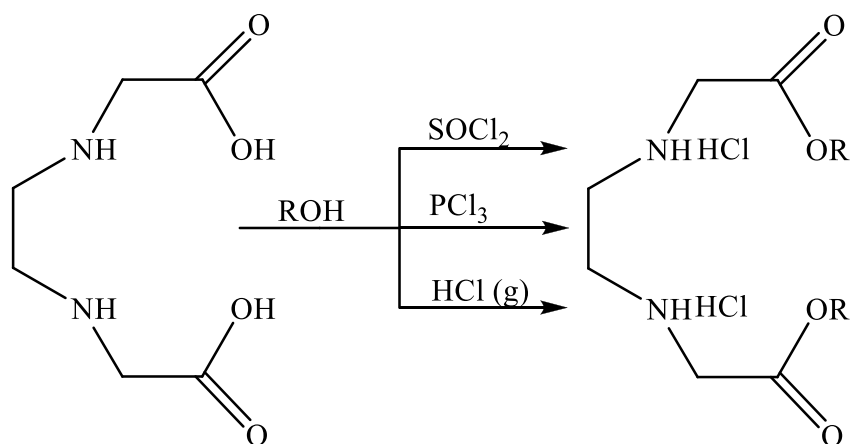
Етилендиамин-*N,N'*-диацетат (edda) потенцијални је тетрадентатни лиганд који поседује по два доhorsка атома азота и кисеоника. Из овог молекула изведен је велики број лиганата, који представљају *N*- или *C*- супституисане деривате edda лиганата или његове хомологе са продуженим диаминским ланцем (1,3-пропандиамин-*N,N'*-дисулфатна киселина, H₂pdda) или продуженим карбоксилатним ланцем (етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропионска киселина, H₂eddp) (Табела 1) [1a,1b].

Наведени лиганди се могу синтетисати по методи коју је патентирао Берсворт (Bersworth) још 1955. године (Шема 1) [2] и најчешће се координују тетрадентатно за централни метални јон.



Шема 1. Општа шема синтезе лиганата edda-типа по Берсворту

Лиганди edda-типа се врло лако могу естерификовати користећи уобичајене методе [3] што је приказано на Шеми 2.



Шема 2. Методе синтезе *O,O'*-диалкил естра лиганата H₂-edda типа

Приликом потпуног координовања естри edda-типа лиганада се углавном понашају као бидентатни лиганди. Формирање координативно-ковалентне везе остварује се преко два донорска атома азота тј. настаје κ^2N,N' -тип координовања. У неким случајевима долази до хидролизе једне или обе естарске групе, па се лиганди понашају тридентатно или тетрадентатно.

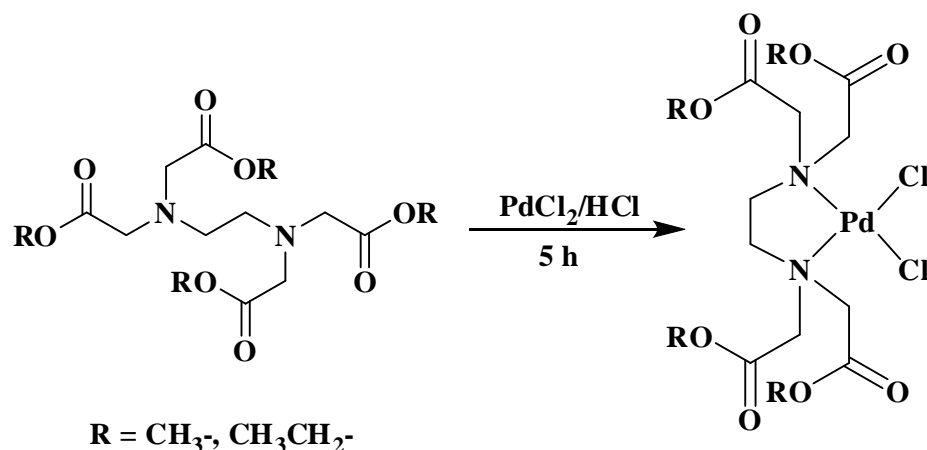
Велики број комплексних једињења са јонима метала Pd(II), Pt(II), Pt(IV), Co(III), Au(III) је синтетисан са овим лигандима. Поред свог фундаменталног значаја у оквиру координационе хемије, лиганди овог типа заузимају посебно место у бионеорганској хемији, јер неки естри поменутих киселина испољавају велику биолошку активност.

2.2. КОМПЛЕКСИ ПАЛАДИЈУМА(II) СА *O,O'*-ДИАЛКИЛ ЕСТРИМА ЛИГАНАДА EDDA-ТИПА

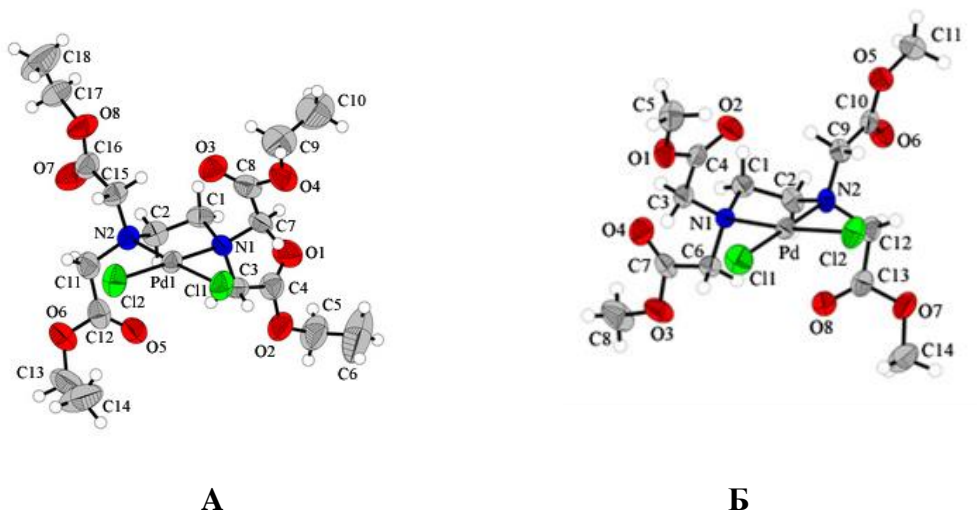
Паладијум је прелазни метал који припада платинској групи метала. Најчешће се у једињењима јавља са оксидационим стањем +2, ретко у оксидационом стању +4 јер су једињења паладијума са овим оксидационим стањем врло нестабилна. У природи га има у јако малим количинама и то у комбинацији са другим елементима платинске групе. Примену је нашао у петрохемији као катализатор, аутомобилској индустрији и у стоматологији за прављење круница и мостова за зубе.

Може се рећи да су једињења паладијума(II) структурни аналози једињења платине(II), осим што су једињења паладијума(II) 10^5 пута реактивнија, тј. лабилнија. Паладијум(II) и платина(II)-јони имају сличне хемијске особине јер имају d^8 електронску конфигурацију и граде квадратно-планарне комплексе. Паладијум спада у групу меких Луисових (Lewis) киселина, стога има изражену тежњу да гради стабилне комплексе са меким Луисовим базама, као што су лиганди са сумпором као донорским атомом. Знатан број комплекса паладијума(II) са лигандима који садрже N и O атоме је синтетисан и окарактерисан и то са edta [4-6], етилендиамином [7,8], као и са аминокиселинама [9-11].

Синтеза комплекса паладијума(II) са тетраметил и тетраетил естрима edta приказана је на Шеми 3. У новије време су објављене и кристалне структуре ових комплекса (Слика 1) [12]. Дужине веза и углови су у сагласности са литературним подацима [13-20].



Шема 3. Синтеза комплекса паладијума(II) са тетраметил и тетраетил естрима edta



Слика 1. ORTEP презентација структуре комплекса паладијума(II) са тетраетил (А) и тетраметил (Б) естрима edta

Петочлани прстен које формира етилендиамински R₄-edta са паладијумовим јоном заузима конформацију полустолице која се запажа и код других сличних комплекса [21-23]. Торзиони углови N–C–O су између *sinperiplanarnih* и *goš* конформација [24].

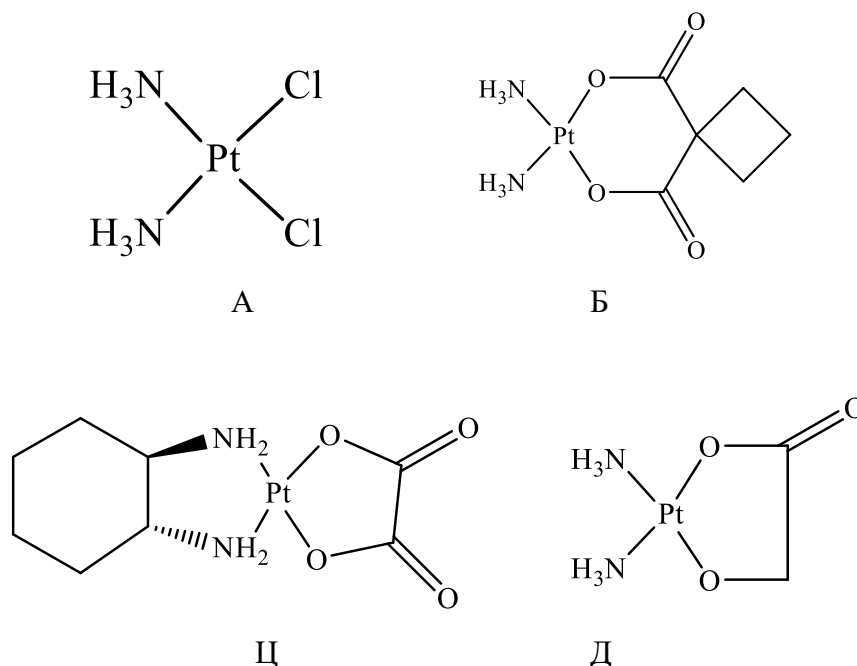
2.3. БИОЛОШКА АКТИВНОСТ КОМПЛЕКСА НЕКИХ ПРЕЛАЗНИХ МЕТАЛА

Од открића *cis*-диаминдихлоридоплатина(II)-комплекса (*cis*-платина) на Слици 2 па до данас, велики број комплексних једињења је синтетисан у циљу проналажења потенцијалног хемиотерапеутика са бољим антитуморским потенцијалом, већом селективношћу усмереној према туморским ћелијама и мањим нежељеним дејствима. У том смислу, пажња је нарочито усмерена ка синтези платинских комплекса [25,26].

Иако је синтетисано неколико хиљада једињења, једино су *cis*-платина, карбоплатина (диамин[1,1-циклобутандикарбоксилато(2)]-*O,O'*-платина(II)) и оксалиплатина (*cis*-диаминциклохексаноксалато)платина(II)) (Слика 2) у клиничкој употреби [27,28]. Ова три једињења се користе у терапији приближно 50% свих тумора. *cis*-платина се користи за лечење: карцинома плућа, главе и врата, тестиса, мокраћне бешике, грлића материце и малигних болести крви. *trans* геометријски изомер, *trans*-диаминдихлоридоплатина(II) (*trans*-платина) није показао антитуморску активност.

Карбоплатина се углавном употребљава за лечење истих малигнитета, али се због мање цитотоксичности у односу на *cis*-платину користе веће дозе овог лека. Последњих година су оксалиплатина и недаплатина (*cis*-диамин(гликолато-*O,O'*)платина(II)) (Слика 2) добиле ограничено одобрење за лечење колоректалног карцинома [29]. Међутим, ни један од ова два комплекса није показао предност у односу на *cis*-платину и карбоплатину. Главни недостаци *cis*-платине и њених аналога су развијање туморске резистенције на хемиотерапеутик и велика токсичност према здравим ћелијама тј. ткивима и органима, што има за последицу бројне нежељене ефекте: мучнина, повраћање, неуротоксичност, нефротоксичност, ототоксичност [30,31]. Због тога су истраживања настављена у правцу синтезе нових комплекса платине и других јона метала који ће

показати мању токсичност, шири спектар дејства у односу на *cis*-платину и могућност оралне примене.



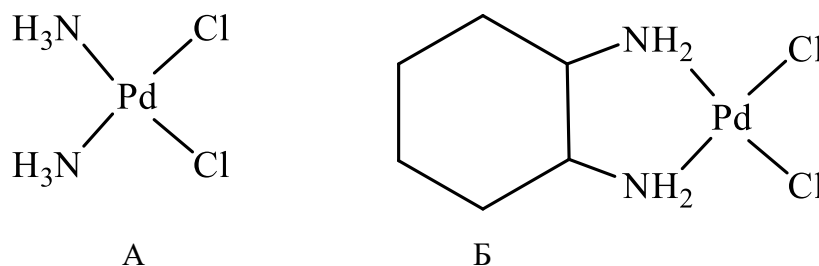
Слика 2. Структуре платинских комплекса (А) *cis*-платина, (Б) карбоплатина, (Ц) оксалиплатина, (Д) недаплатина

2.3.1. Цитотоксичност паладијум(II)-комплекса

Међу првим комплексима коришћеним у клиничким испитивањима против тумора били су комплекси паладијума(II) и то аналози *cis*-платине, *cis*-диамин-дихлоридопаладијум(II), *cis*-[PdCl₂(NH₃)₂] и *cis*-1,2-диаминциклохександихлоридо-паладијум(II), *cis*-[PdCl₂(DACH)] комплекси (Слика 3) [32].

Иако први резултати нису показали значајну антитуморску активност комплекса паладијума(II), ови комплекси су ипак много шире проучавани. Углавном су комплекси паладијума(II) због велике реактивности показивали нижу антитуморску активност од *cis*-платине [33,34].

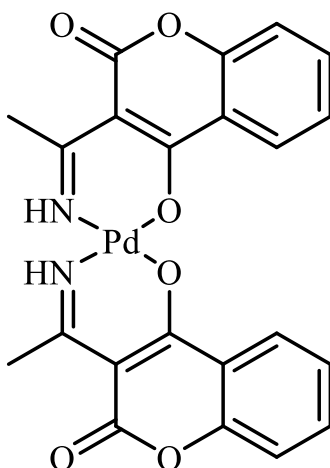
Сматра се да је нижа активност ових комплекса последица јако брзе измене лиганда и немогућности комплекса да непромењене структуре стигне до биолошке мете, чиме је повећан ризик од неповољних ефеката на биохемијске процесе у ћелији.



Слика 3. Структура (А) *cis*-диаминдихлоридопаладијум(II), $cis-[PdCl_2(NH_3)_2]$; (Б) *cis*-1,2-диаминциклохександихлоридопаладијум(II), $cis-[PdCl_2(DACH)]$ комплекса

У циљу превазилажења оваквих проблема многи аутори су предлагали да се паладијум(II)-јон координује за хелатне лиганде, чиме би се смањила реактивност паладијумовог центра повећавајући стабилност награђеног комплекса [35]. Антитуморска активност комплекса, односно успех лека, зависи и од коришћеног лиганда за координовање јер од лиганда зависи реактивност и липофилност, као и стабиловање одређених оксидационих стања метала или могућност супституције [36,37]. До сада је једина примена паладијума у медицини у лечењу брзорастућег канцера простате и то користећи радиоактивни изотоп ^{103}Pd [38,39].

Постоје и комплекси паладијума(II) који показују активност сличну *cis*-платини или карбоплатини. Комплекс паладијума са лигандом који је дериват кумарина (Слика 4) показује приближно 7800 пута већу активност у односу на карбоплатину на ћелијама А549, HeLa и K562 [40,41], чиме је потврђена претпоставка да комплекси са волуминознијим лигандима показују бољу антитуморску активност.



Слика 4. Комплекс паладијума(II) са дериватом кумарина, активнији приближно 7800 пута од карбоплатине

Такође је испитиван велики број паладијум(II)-комплекса са неутралним лигандима, као што су деривати пиридина [42,43], фосфатни деривати хинолина [44,45] или деривати пиразола [46] и тиме је доказана њихова значајна антитуморкса активност.

Услед дејства цитотоксичних комплекса, ћелије осим апоптозом, умиру и некрозом. Некроза представља неконтролисан и пасиван процес који обично захвата велики број ћелија, док је апоптоза контролисан и енергетски зависан процес који захвата једну или неколико ћелија. Некроза настаје услед знатног оштећења ћелије најчешће проузрокованог физичко-хемијским агенсима, док је апоптоза програмирана ћелијска смрт (вид ћелијског самоубиства).

Некроза је непожељан вид ћелијске смрти с обзиром да током некрозе долази до прскања ћелијске мембране, али неретко и до руптуре ћелијских органела. Након руптуре лизосома бројни лизозомални ензими могу се наћи у екстрацелуларном матриксу где узоркују деструкцију околних ћелија и ткива. Током некрозе, ћелије оштећене физичко-хемијским агенсима пролазе кроз карактеристичне промене: ћелије и њихове органеле бубре, јер је способност ћелијске мембране да контролише равнотежу течности и

електолита нарушена; ћелијски садржај се ослобађа и доспева у међућелијски простор, узоркујући инфламацију и последичну деструкцију околног ткива.

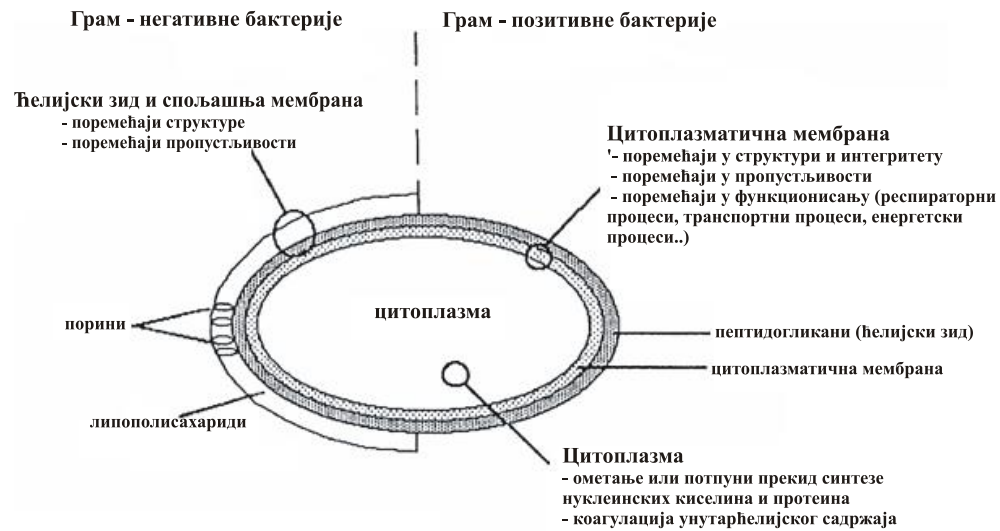
Апоптоза је пожељан вид ћелијске смрти јер представља тзв. програмирану ћелијску смрт, низ догађаја где долази до аутодеструкције ћелије без руптуре ћелијске мембране, самим тим без изласка интрацелуларног садржаја у екстрацелуларни простор. То је процес елиминисања нефункционалних ћелија. Ћелија може активно, уз утрошак енергије, да покрене властиту смрт. Саставни је део физиолошких процеса и одговор на одређена патолошка стања. Светлосном и електронском микроскопијом уочене су многе морфолошке промене на ћелији током апоптозе [47]. На почетку процеса, као први видљиви знаци апоптозе су смежуравање ћелије и пикноза једра [48]. Ћелије губе волумен, цитоплазма постаје гушћа, а органеле су збијено распоређене. Пикноза је последица кондензације хроматина при чему једро често добија облик потковице. Долази до инверзије ћелијске мембране што визуелно заокругљује апоптотски измењену ћелију. Истовремено разара се ћелијски матрикс, фрагментире једро и DNA се цепа на делове. Ове промене се одвијају на нивоу ћелије и не долази до ослобађања интрацелуларног садржаја. Потом следи бубрење ћелијске мембране и одвајање делова ћелије у апоптонска телашца. Телашца садрже цитоплазму, фрагменте једра и густо спаковане органеле. Запаљенска реакција изостаје јер апоптонске ћелије не ослобађају садржај у међућелијски простор, а апоптонска телашца бивају брзо фагоцитована [49,50].

У људском организму у просеку око 10 милијарди ћелија умире апоптозом свакодневно [51]. Апоптоза обезбеђује равнотежу између настанка и умирања ћелија и има важну улогу у ембриогенези (потпомаже формирање органа). Још једна важна улога апоптозе је да се њоме елиминишу они лимфоцити који су нефункционални, као и они лимфоцити који показују склоност ка аутодеструкцији, односно, оне ћелије које су способне да реагују против сопствених антигена. Дакле, апоптоза је одговорна за елиминацију аутореактивних клонова Т и В лимфоцита и превенцију настанка аутоимуних болести.

2.3.2. Механизам антимикуробног дејства неких комплекса прелазних метала

Данас постоји велики број различитих врста микроорганизама које се међусобно разликују према морфолошким, физиолошким и биохемијским карактеристикама. При томе поред корисних микроорганизама које употребљавамо у различите сврхе, почев од прехранбене преко медицинске до биотехнолошке употребе, веома значајну групу чине патогени микроорганизми. То је посебна група микроорганизама која изазива обољења код људи. Између људи и патогених бактерија постоји дугогодишња борба. У античко време најпре су биљке коришћене за контролу и лечење хуманих болести изазваних микроорганизмима. Касније, открићем антибиотика напредовала је борба против патогених бактерија и до тада неизлечиве болести постале су излечиве. Међутим, све већом употребом антибиотика јављала се пропорционална резистентност патогених микроорганизама. Резистентност представља одбрамбени механизам микроорганизама на дејство антимикуробних супстанци. Сикема (Sikkema) и сарадници (1995. године) су навели широк спектар адаптивних механизма на присуство липофилних једињења. Механизми деловања може се заснивати на адаптацији ћелијског омотача у погледу његовог састава или функције. Адаптације на нивоу ћелијског зида дешавају се у виду промене (повећања/смањења) његове хидрофилности, што омогућава додатну баријеру за одређене супстанце [52]. Антибактеријско дејство може бити усмерено на ћелијски зид, цитоплазматичну мембрану, као и на унутрашњост ћелије (метаболичке процесе ћелије, тј. синтезу нуклеинских киселина и протеина) (Слика 5) [53].

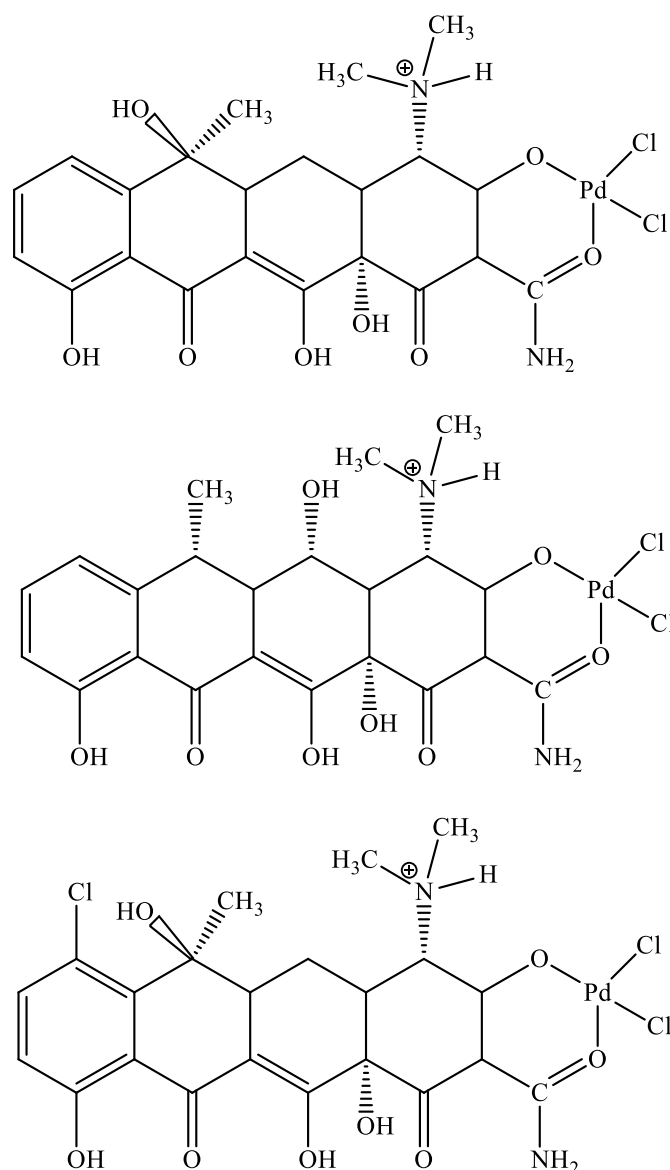
Механизам антибактеријског дејства зависи од карактеристика циљаних микроорганизама, а суштинска разлика је у различитости грађе ћелијског омотача која постоји између грам(-) и грам(+) бактерија. Због сложеније структуре, грам(-) бактерије поседују генерално већу отпорност на дејство различитих антимикуробних супстанци у односу на грам(+) бактерије [54].



Слика 5. Потенцијална места на бактеријској ћелији за дејство антимикробних супстанци

Микроорганизми су развили бројне одбрамбене механизме на дејство разних антимикробних супстанци што за последицу има повећан број инфекција изазваних резистентним или мање осетљивим бактеријама. Такође, инфекције изазване патогеним бактеријама *Candida albicans* и *Aspergillus sp.* су у све већем порасту. То је навело многе научнике на проналажење нових антимикробних агенаса који се могу ефикасно применити у борби против инфекција. Најпре су извор разних истраживања била природна једињења, а касније се радило на синтези нових једињења која би показала бољу антимикробну активност. Значајно антибактеријско и антифунгално дејство такође су показали и многи комплекси прелазних метала. Бројни синтетисани комплекси паладијума(II) су показали значајну антибактеријску активност, као и утицај на раст и метаболизам различитих група микроорганизама.

Гуера (Guerra) и сарадници су описали синтезу три комплекса паладијума(II) (Слика 6) са антибиотицима из групе тетрациклина и испитивали њихов утицај на тетрациклин осетљиве и резистентне бактеријске сојеве [55].

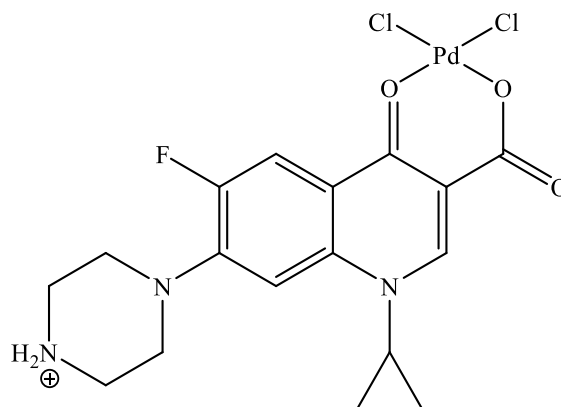


Слика 6. Паладијум(II)-јон координан за антибиотику из групе тетрациклина

Том приликом је показано да комплекс паладијума(II) са тетрациклином показује 16 пута бољу активност на резистентни сој *Echerichia coli* HB101/pBR322 у поређењу са тетрациклином.

Виера (Viera) и сарадници су 2009. године приказали синтезу и антимикуробну активност комплекса паладијума(II) са биолошки активним лигандом флуорохинолином (Слика 7), при чему је забележена значајна активност комплекса на бактерију

Mycobacterium tuberculosis вирулентни сој [56]. Флуорохинолин и други биолошки активни молекули коришћени су као лиганди за координовање и за друге јоне метала, који су такође показивали већу антимикуробну активност.



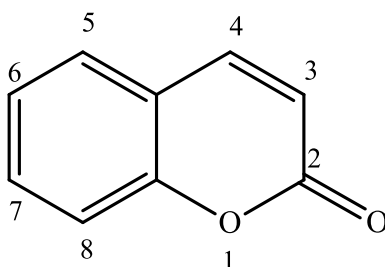
Слика 7. Паладијум(II)-комплекс са флуорохинолином као лигандом

У литератури постоје бројни радови са синтетисаним комплексима паладијума(II) који су показали значајну активност на различите врсте бактерија и гљива [57-62]. Многа ранија истраживања су показала да ароматична и хетероциклична група тиоетра игра значајну улогу у антимикуробној активности. Бројна једињења овог типа су синтетисана и испитана је њихова антибактеријска и антифунгална активност [63-66].

2.4. ДЕРИВАТИ КУМАРИНА КАО ЛИГАНДИ

2.4.1. Структура и добијање кумарина

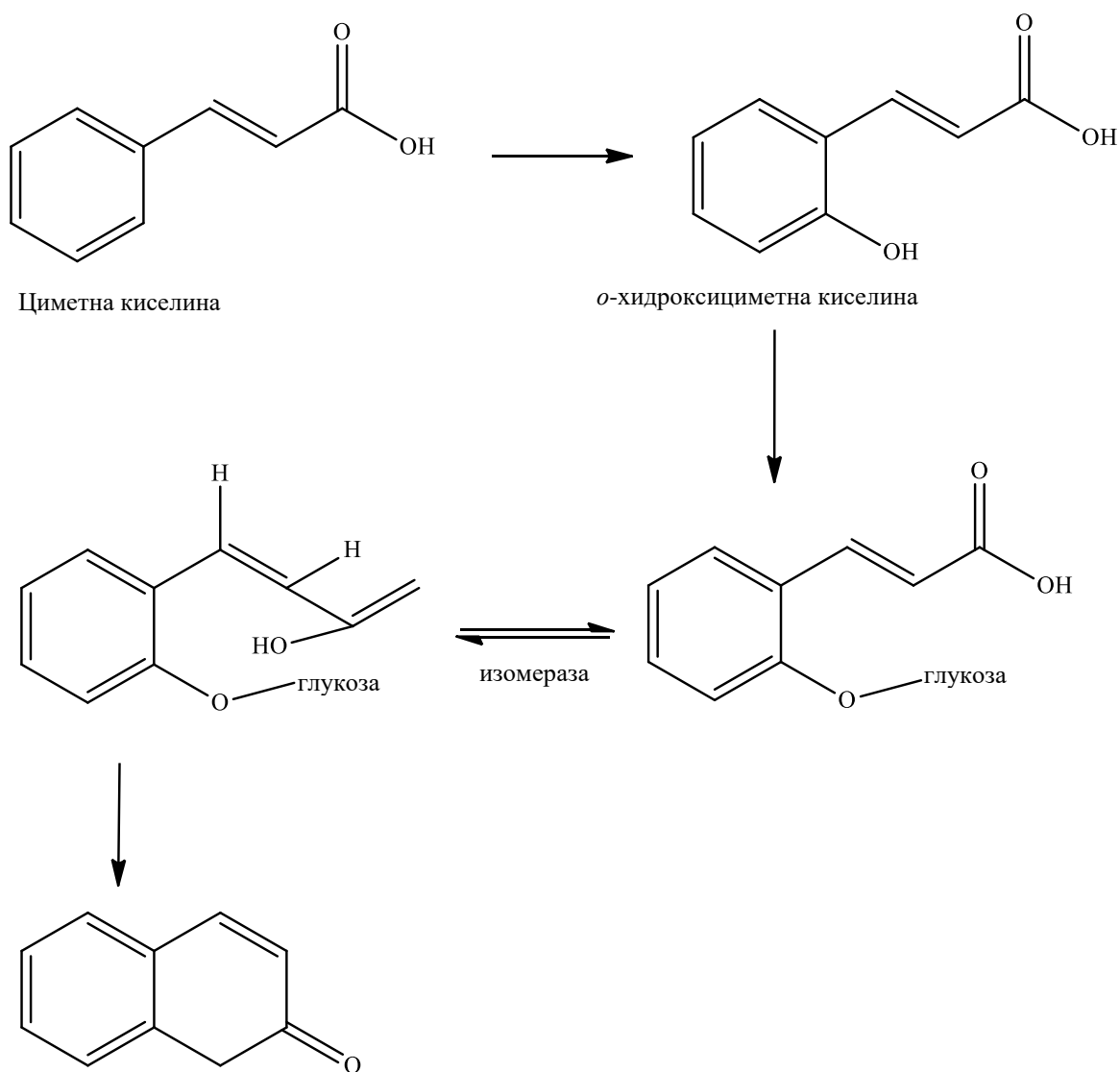
Кумарин (2H-1-бензопиран-2-он) припада групи бензопирона, а настаје кондензацијом молекула α -пирона са бензеном (Слика 8). Бензопирони се деле у две групе: бензо- α -пирони, где спадају кумарини и бензо- γ -пирони, чији су предствници флавоноиди [67]. Пиронски прстен молекула кумарина је незасићени циклични лактон [68].



Слика 8. Структура кумарина

Кумарин и његови деривати се у биљкама биосинтетишу из циметне киселине, која настаје у метаболичком циклусу шикиминске киселине. Прво долази до хидроксилације бензеновог језгра у *ortho*-положају где настаје *o*-хидроксициметна киселина, а затим се за кисеоник те хидроксилне групе веже глукоза у *ortho*-положају где долази до изомеризације двоструке везе бочног ланца помоћу ензима изомеразе. Овим поступком настаје *o*-кумаринска киселина за коју је везана глукоза, а у даљем процесу долази до отцепљења глукозе и затварања пиронског прстена и настанка кумарина (Слика 9).

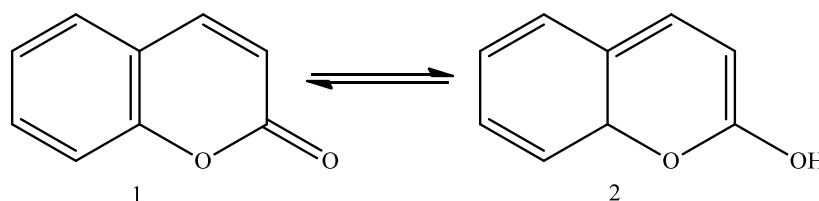
За лабораторијско добијање кумарина користе се Перкинова, Пекманова, Кноевенагелова, Дакинова, Пондорфова и Витигова синтеза [69].



Слика 9. Биосинтеза кумарина у биљкама

2.4.2. Хемијске особине кумарина

У оквиру молекула кумарина јавља се кето-енолна таутомерија (Слика 10). Кумарин може да постоји и у кето (1) и у енолној (2) форми, при чему је равнотежа очекивано померена према кето облику.

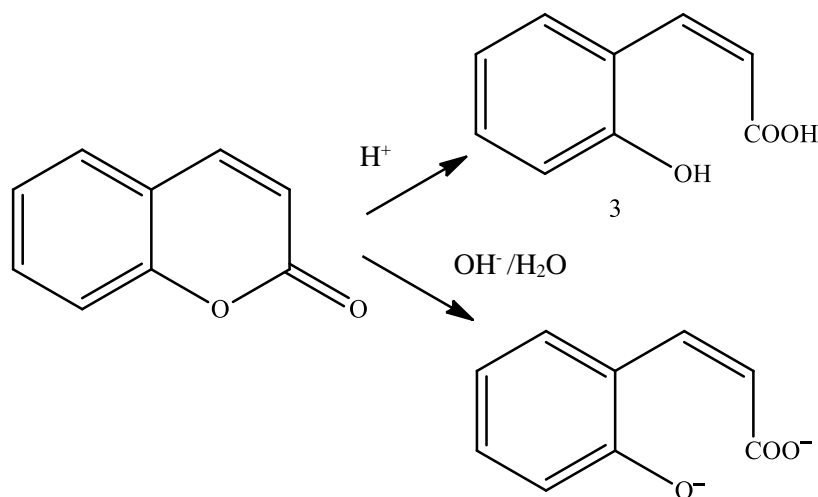


Слика 10. Кето-енолна таутомерија кумарина

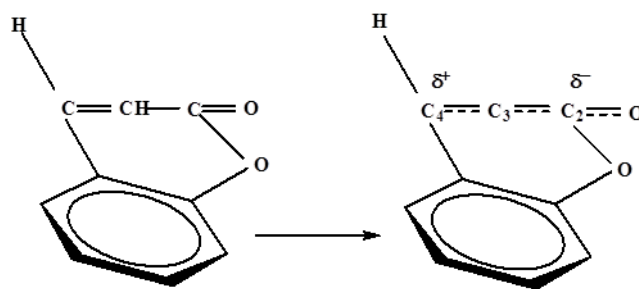
Такође, кумарини поседују хемијске особине условљене присуством лактонске структуре, двоструке везе α -пирона и ароматичног прстена.

Како је лактонски прстен циклични естар, лактони показују исти облик нестабилности као и естри, тј. подлежу кисело и базно катализованој хидролизи. У присуству киселине кумарин хидролизује уз отварање пиронског прстена у *cis*-*o*-хидроксициметну киселину (Слика 11) [70,71], док у присуству базе настаје одговарајућа со.

Двострука веза пиронског прстена у конјугацији са карбонилном групом чини јединствен систем. Електрон-акцепторски карактер карбонилне групе доприноси смањењу електронске густине на С4 угљениковом атому и њеном померању у смеру карбонилне групе. Тако угљеник С4 постаје електрофилни центар пиронског прстена, док је С3 угљеник нуклеофилни центар (Слика 12) [72].



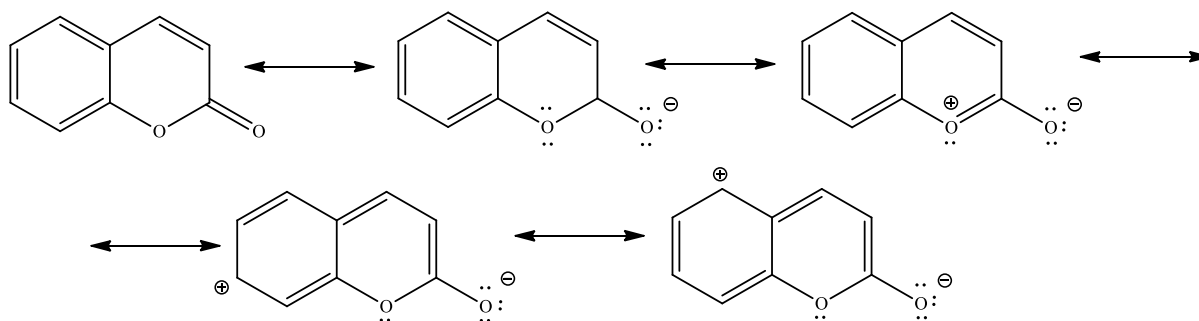
Слика 11. Кисело и базно катализована хидролиза кумарина



Слика 12. Приказ електрон-акцепторског дејства карбонилне групе

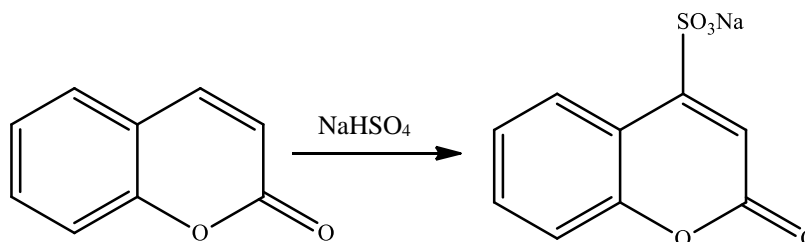
Кумарини се, због присуства ароматичног прстена, понашају као ароматична једињења тј. ступају у реакције електрофилне и нуклеofilне супституције. Од електрофилних супституција значајне су нитровање, сулфонување и диазотовање. Електрофилни агенси се притом везују за бензенов, а не за лактонски део прстена. Тако, при нитровању кумарина, долази до образовања 6-нитрокумарина у високом приносу.

Објашњење ових реакција се изводи помоћу резонантних структура из којих се јасно види да електрофилна супституција може успешно да се изводи у положајима 6 и 8 бензеновог прстена (Слика 13) [72].



Слика 13. Део резонанционих структура бензопиронског језгра

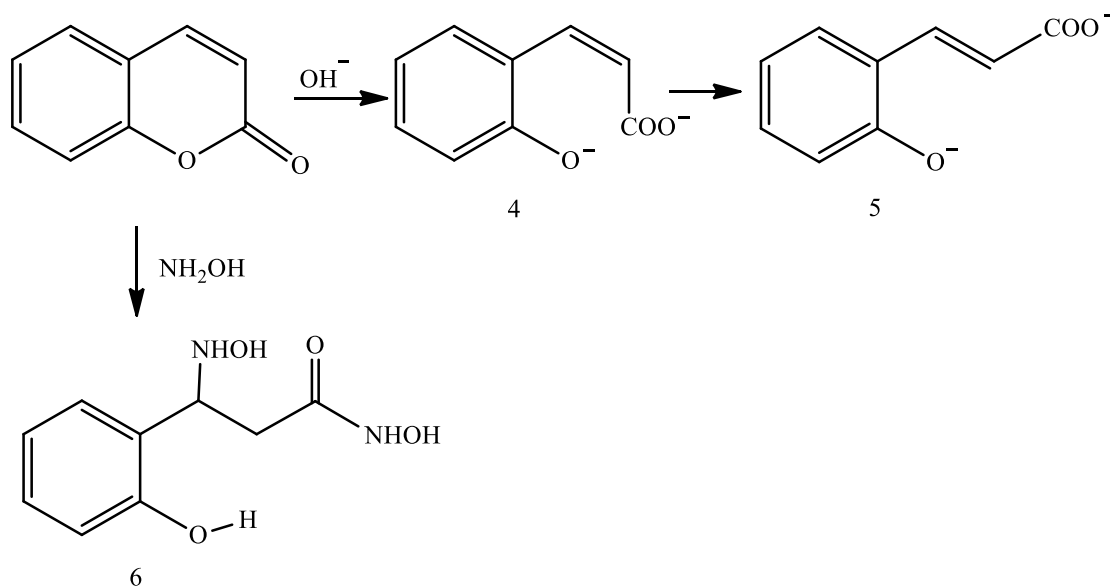
Кумарини учествују и у нуклеофилним реакцијама. Слабији нуклеофили, нпр. бисулфит, се везују за положај 4 (Слика 14). Исто теку и реакције са CN^- и MeO^- .



Слика 14. Реакција кумарина са натријум-бисулфитом

Јачи нуклеофили нападају положај 2. Базна хидролиза је пример. Након везивања нуклеофила за положај 2, долази до отварања хетероцикличног прстена на лактонском делу, уз образовање дианјона 3-(2-хидрокси-фенил)-акрилне киселине (4). Формирана двострука веза има *cis* кофигурацију (кумаринска киселина). *trans*-изомер је стабилнији (5), а добија се загревањем кумарина са натријум-етоксидом.

Хидроксиламин се, везујући за положаје 2 и 4, преводи у једињење *N*-хидрокси-3-хидроксиамино-(2-хидроксифенил)пропанамид (6) (Слика 15) [72].



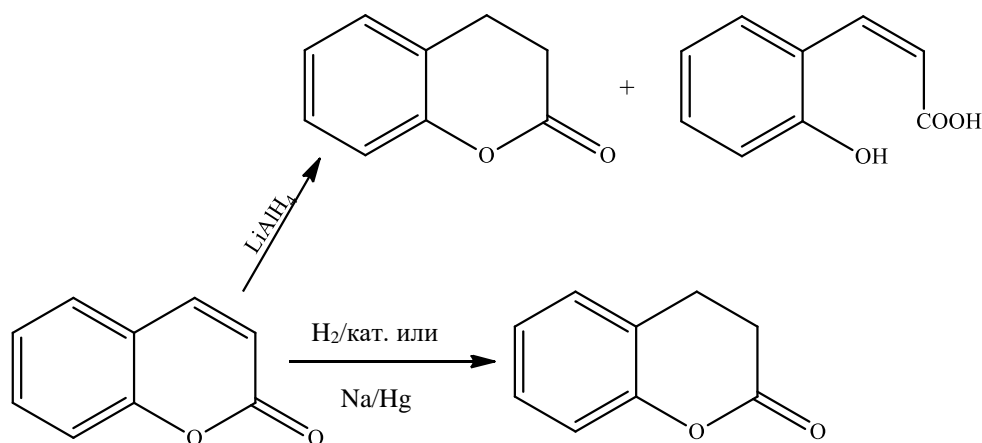
Слика 15. Реакције кумарина са јаким нуклеофилним реагенсима

Реакција хидрирања са LiAlH_4 нема примену због своје неселективности. Реакција хидрирања са водоником уз присуство катализатора, или пак реакција са амалгамисаним Na , дешава се лагано и води добијању 3,4-дихидро производа (Слика 16) [72].

4-хидроксикумарин се разликује по хемијским особинама како од самог кумарина, тако и од других хидроксикумарина. Разлог томе је присуство високо енолизованог β -кетоестарског система који знатно стабилизује кумарински прстен повећавајући му ароматичност. Бензенов прстен 4-хидроксикумарина мање је реактиван од обичног бензеновог прстена или деривата бензена, док α -пиронски прстен под благим условима ступа у реакцију супституције при чему настају 3-супституисани деривати 4-хидроксикумарина.

4-хидроксикумарин реагује, како са електрофилним, тако и са нуклеофилним реагенсима. У реакцији са електрофилним реагенсима најреактивнији је положај 3.

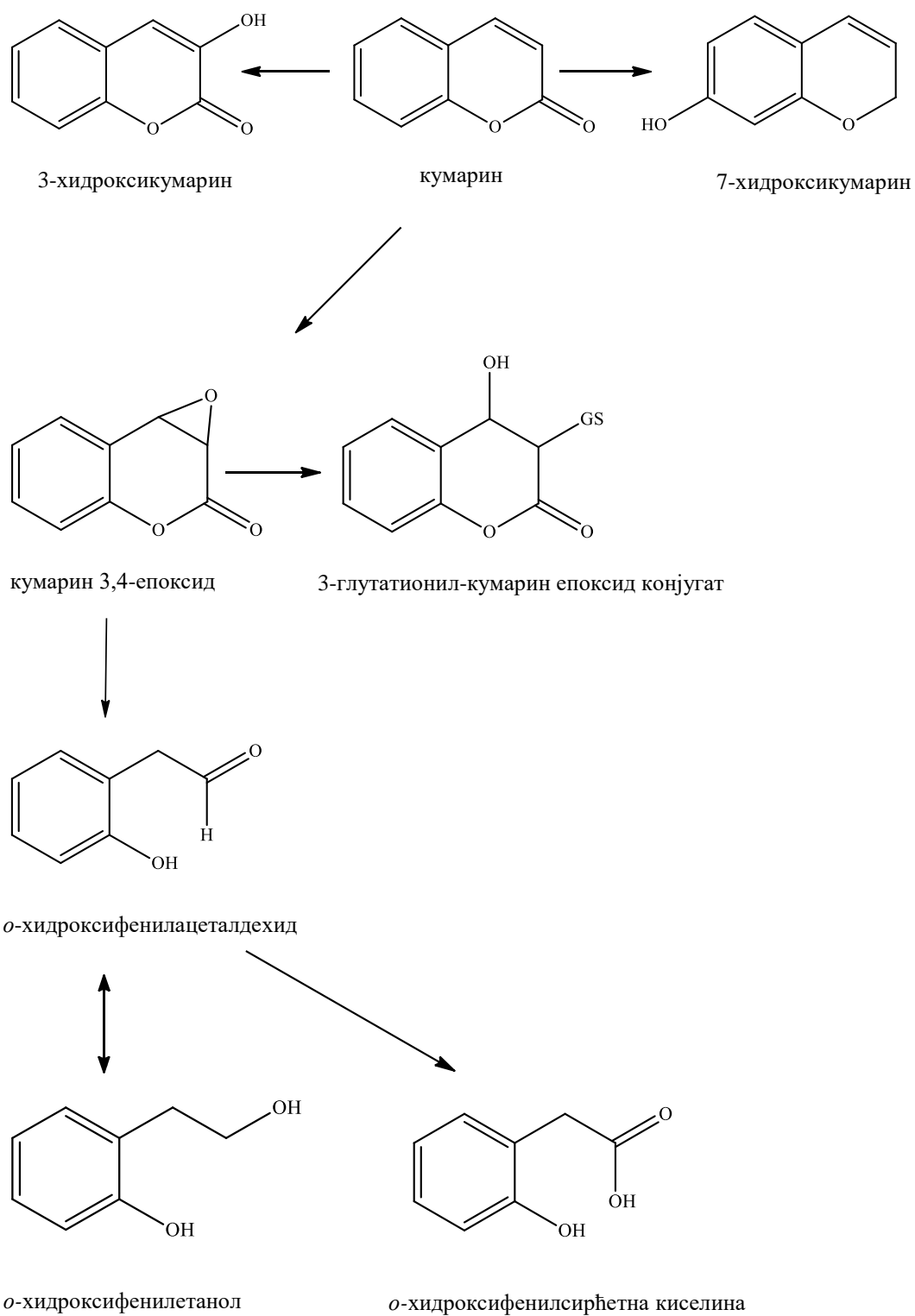
Ацетиловањем, нитровањем и брмовањем се добијају одговарајући 3-супституисани деривати 4-хидроксикумарина [72]. У реакцијама нуклеофилних супституција најреактивнији је положај 4, што и потврђују експериментални подаци [73].



Слика 16. Реакције хидрирања кумарина

2.4.3. Биохемија кумарина

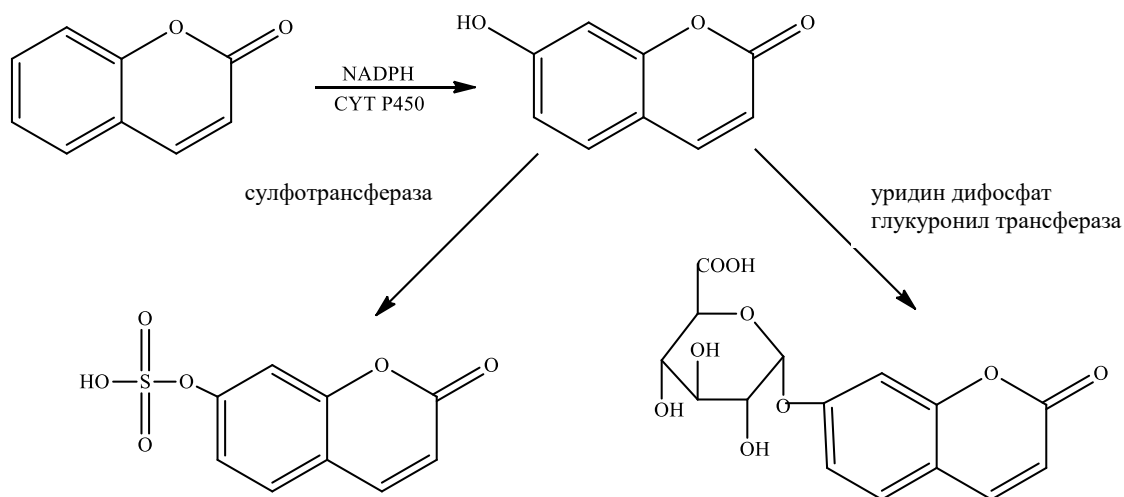
Кумарин је у многим земљама због могуће хепатотоксичности забрањен као додатак храни [74]. Као модел за проучавање хепатотоксичности коришћени су пацови. Нова истраживања показују да је метаболизам, а самим тим и штетност, код људи и пацова различита. За разлику од пацова, токсичност за људе није доказана. Код појединаца, који су узимали терапеутске дозе кумарина и до 1900 пута веће од оних, којима је човек изложен исхраном и козметичким препаратима, није утврђена веза изложености и појаве хепатотоксичности [75]. Релативна отпорност јетре људи на токсичност кумарина се повезује са 7-хидроксилацијом, основним метаболичким путем кумарина (Слика 17), која је заправо детоксикација [74].



Слика 17. Главни метаболички путеви биотрансформације кумарина

Код пацова се хепатотоксичност ове врсте приписује излучивању метаболита кумарина у жуч. Код људи се метаболити кумарина излучују путем урина у облику 7-хидроксикумарина, без излучивања у жуч [74]. Време полураспада кумарина је 1-2 сата [75], а биорасположивост кумарина у људском организму је само око 1-5% [76]. Код пацова је, за разлику од људи, доминантна реакција 3,4-епоксидација, при чему је главни метаболит *o*-хидроксифенилацеталдехид (*o*-НРА), који се повезује са акутном плућном токсичношћу, док је главни уринарни метаболит *o*-хидроксифенилацетатна киселина (*o*-НРАА) (Слика 17) [77].

Катаболизам кумарина се врши под утицајем ензима кумарин-7-хидроксилазе, при чему се кумарини специфично хидроксилију до 7-хидрокси деривата који се потом у форми сулфата или глукуронида (насталих уз учешће ензима сулфотрансферазе и уридин дифосфат глукуронил трансферазе) излучују путем урина (Слика 18) [72].



Слика 18. Биотрансформација кумарина до сулфата и глукуронида

2.4.4. Биолошка активност кумарина

Кумарини представљају велику групу једињења, веома значајну због свог разноликог биолошког дејства.

Још од давнина су се биљни екстракти, који садрже деривате кумарина, користили као лекови.

Како у кумаринском прстену постоји 6 положаја, на којима се може вршити супституција, добијен је велики број деривата кумарина. Због такве своје структуре је погодан за синтетисање нових деривата са биолошком активношћу, увођењем нових фармакофора [72]. Многи од деривата имају и клиничку примену.

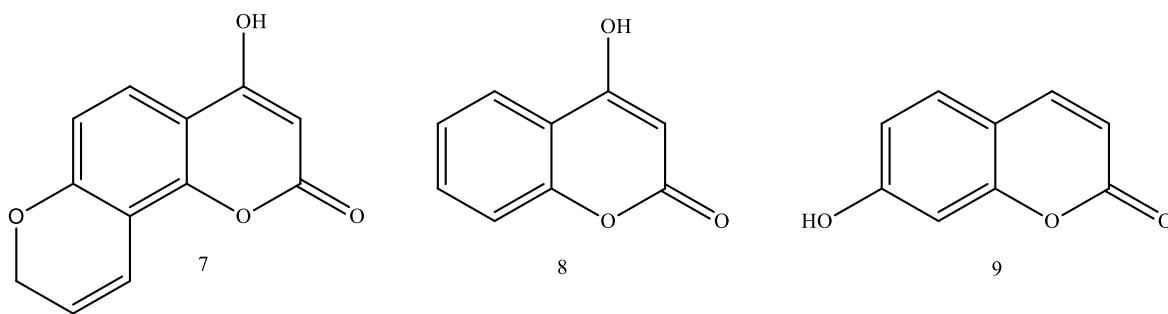
Кумарини и њихови деривати показују антиоксидативно, антимикубно, антикоагулативно дејство. Значајни су и као антиканцерогена, анти-ХИВ једињења. Затим показују естрогену функцију, делују стимулативно на централни нервни систем.. Показују и фотосензитирајуће дејство, користе се у лечењу витилига.

За велики број кумаринских деривата је утврђено да инхибирају формирање и подстичу хватање реактивних кисеоничних и реактивних азотових врста [72].

По утврђивању корелације између реактивних кисеоничних врста и њиховог учешћа у патогенези разних обољења, како и до тога да се са екстерном администрацијом са антиоксидантима може утицати на успоравање развоја болести, кумаринским супстратима се даје велика важност у борби против оксидативног стреса [72].

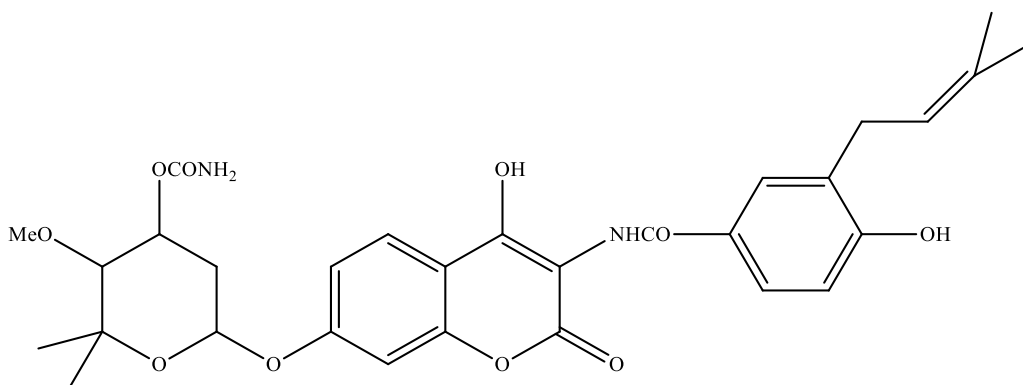
Из групе реактивних кисеоничних врста, а због своје високе реактивности, хидроксил радикали се сматрају једним од најтоксичнијих радикалских честица, значајно доприносећи оштећењу ћелијских макромолекула протеина, липида и DNA [72].

Утврђено је да значајну DPPH антирадикалску активност поседују кумарински супстрати који на положају 4 имају хидроксилну групу. 7,8-спиро супституисани 4-хидроксикумарин (7) (IC_{50} вредности $\sim 150 \mu M$) показује комплементарну активност 4-хидроксикумарину (8) (IC_{50} вредности $\sim 124 \mu M$) и неупоредиво бољу активност у односу на 7-хидрокси супституисани кумарин (9) (IC_{50} вредности $\sim 400 \mu M$) (Слика 19) [78].



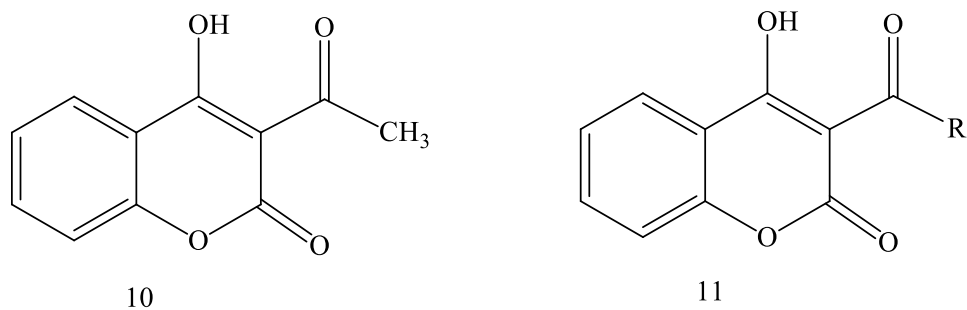
Слика 19. 4-хидрокси супституисани кумарини

Новобиоцин (Слика 20) показује антибиотску активност према грам(-) бактеријама. То откриће је уједно и био разлог испитивања антибиотског ефекта и других кумаринских деривата.



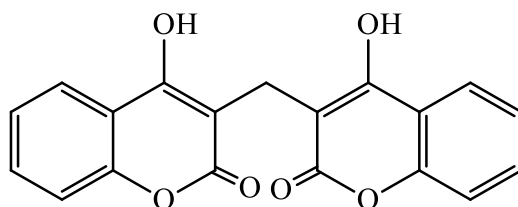
Слика 20. Новобиоцин

Уочено је да 3-ацетил-4-хидроксикумарин (10) показује антибактеријску активност на неколико врста бактерија. Такође, утврђено је да антибактеријску активност показују и једињења сличне структуре (11) (Слика 21).



Слика 21. Деривати 4-хидрокси кумарина као антибактеријски агенси

Након открића да употреба буђавог сена слатке детелине у исхрани крупне стоке инхибира синтезу витамина K_1 у јетри и стварање протромбина (доказано је присуство дикумарола) (Слика 22), започела су интензивна истраживања на синтези једињења дикумаролског типа, која имају ефекат антикоагуланата.

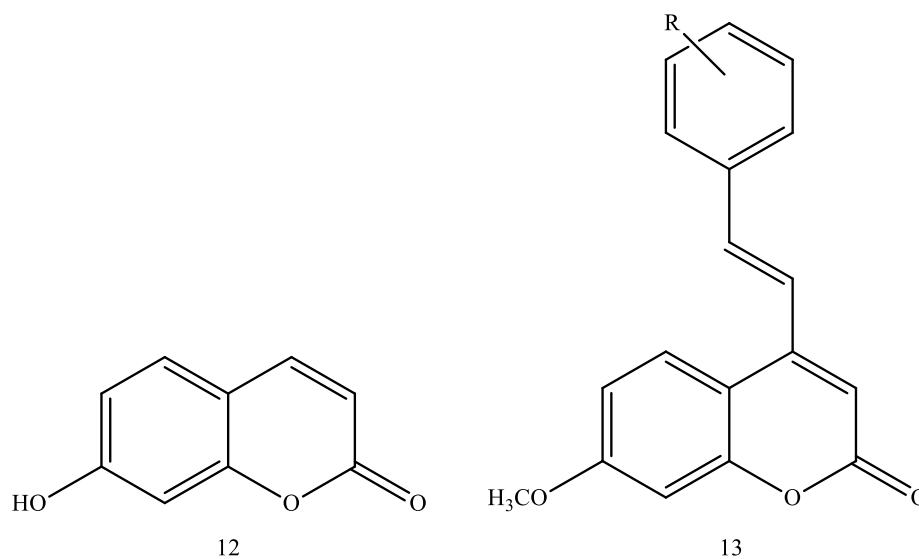


Слика 22. Дикумарол

Антикоагулантно дејство 4-хидроксикумаринских деривата се заснива на структурној аналогији са витамином К, као нафтахинонским дериватом који у положају 2 поседује изопреноидни остатак, а у положају 3 метил групу. Витамин К је кофактор посттранслационе карбоксилације остатка глутаминске киселине до γ -карбокси глутамата на *N*-терминалном делу витамин К-зависних протеина.

Увођењем халогена у ароматични прстен 4-хидроксикумарина повећава се антикоагулантно дејство, док замена кисеониковог атома у прстену са сумпором утиче на смањење активности [72].

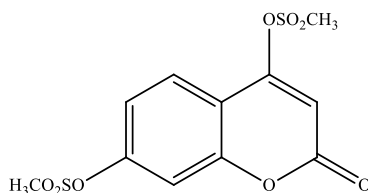
Једна од најважнијих биолошких активности кумарина, обухвата антитуморску активност. Због различитих положаја на којима је могуће спровести супституцију, та активност може да буде са минималним нуспојавама [79]. Кумарин и његови метаболити показују антитуморску активност на неколико врста тумора код људи (карцином желуца, карцином простате, малигни меланом) [80]. Такође, ублажавају нуспојаве изазване радиотерапијом [81]. Кумарини са антитуморским деловањем су 7-хидроксикумарин (12) и стилбен-кумарин (13) (Слика 23).



Слика 23. 7-хидроксикумарин и стилбен-кумарин

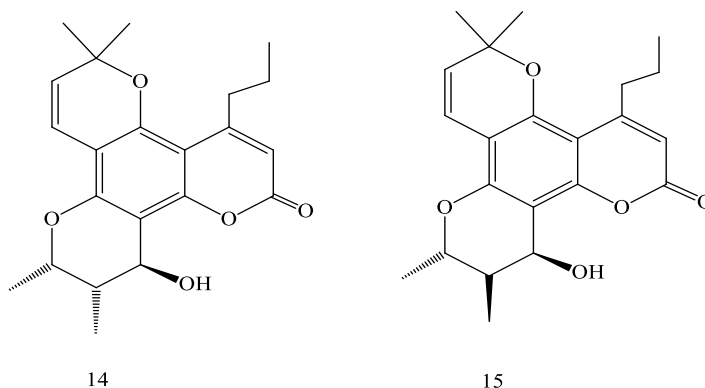
Испитивања су показала да маркумар, кумарински дериват са антикоагулантном активношћу, инхибира спонтано метастазирање тумора, док кумарински дериват са метилсулфонил групама у положајима 4 и 7 (Слика 24) дејствује антиканцерогено на Sarcom W₂₅₆ [72].

Протеин киназе имају веома важну улогу у контроли размножавања ћелија, диференцијације и метаболизма. Рецептор фактора раста, тирозин киназа, се активира путем везивања његових специфичних лиганата. Прекомерна израженост рецептора неких фактора раста је утврђена у случају људског канцера, као што је рак дојке и јетре. Инхибитори протеин киназе могу да буду потенцијално важна класа терапеутских агенаса за неке врсте канцера насталих као последица прекомерне активности протеин киназе [72].



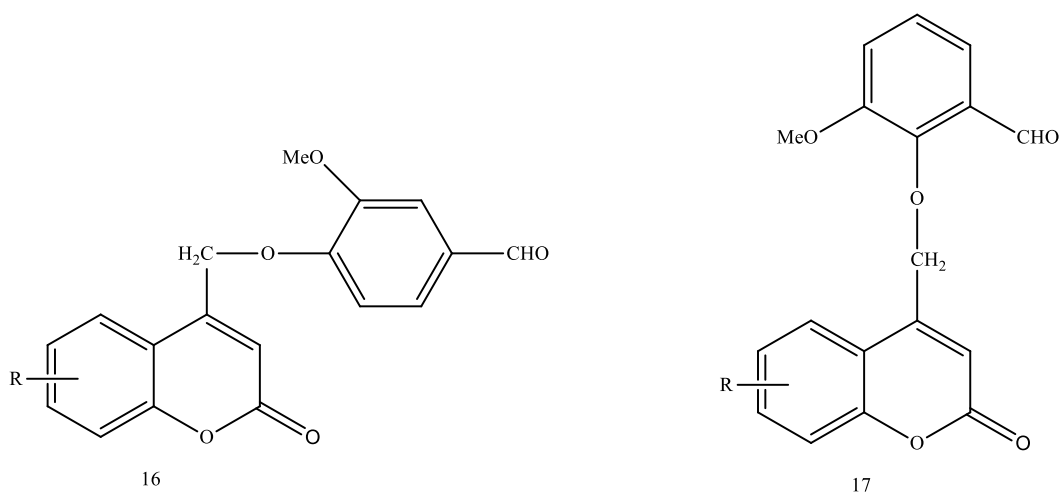
Слика 24. Антиканцерогени агенс на *Sarcom W₂₅₆*

Извесни кумарински деривати су се показали као потенцијални анти-НIV агенси (Слика 25). Ради се о кумаринима (+)-каланолиду А (14) и (-)-каланолиду В (15) изолованим из биљака *Calophyllum cerasiferum Vesque* и *Calophyllum inophyllum Linn* из породице *Clusiaceae*. Механизам дејства ових кумаринских деривата се заснива на инхибицији ензима НIV реверзне транскриптазе односно RNA-зависне DNA-полимеразе, чиме се спречава реверзна транскрипција вирусне RNA и њена интеграција у геном ћелије [72].



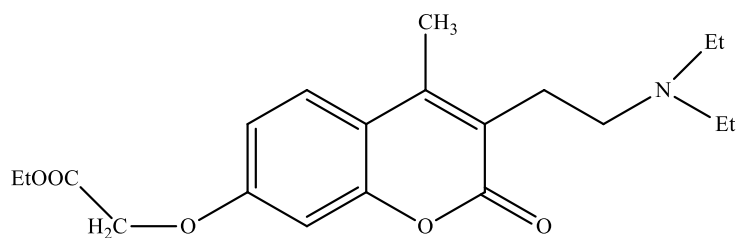
Слика 25. (+)-Каланолид А и (-)-каланолид В

Испитивања на експерименталним животињама су показала да супстрати са арилоксиметиленском групом на положају 4 кумаринског језгра поседују антиинфламаторно дејство и да је оно последица формирања карбоксилне групе у биолошким системима. Мада молекулски механизам дејства није разјашњен, 4-арилоксиметилкумарини (16) и кумарини са ванилинским остатком (17) поседују значајну антиинфламаторну активност (Слика 26) [72].



Слика 26. 4-(арилоксиметил) кумарински деривати као антиинфламаторни супстрати

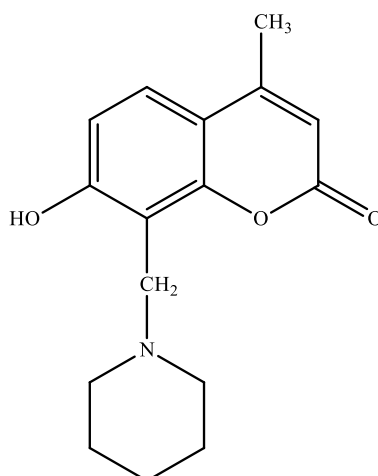
4-Метилкумарински дериват са диетиламино-етил групом у положају 3 и оксиацетатном групом у положају 7 се годинама користи у клиничкој пракси под називом интенсаин, хромонар или карбохромен употребљава за профилаксу напада ангине пекторис, односно као антиартеросклеротични агенс (Слика 27) [72].



Слика 27. Карбохромен

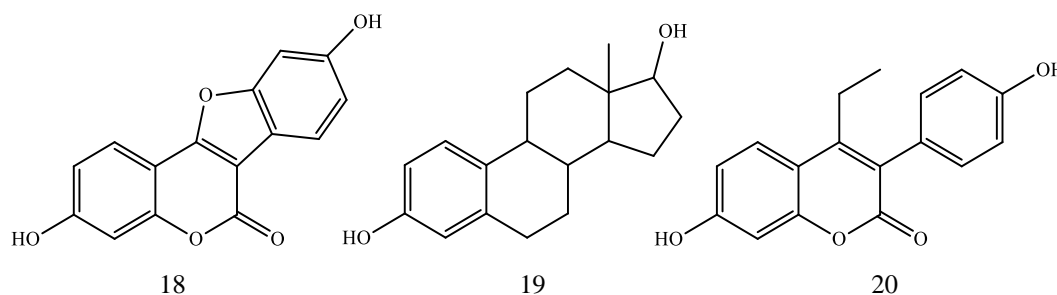
За неке од кумаринских деривата је утврђено да делују на централни нервни систем, као стимулатори његове активности.

Међу њима 4-метил-7-хидрокси супстрат са пиперидинским делом везаним преко метиленске групе у положају 8 поседује највећу активност (Слика 28) [72].



Слика 28. 7-Хидрокси-4-метил-8-пиперидин-1-ил метил-хромен-2-он

Куместрол (18) изолован из детелине *Alfaalfa* и других махуна је потенцијални естроген. Естрогена активност куместрола је последица структурне аналогије са природним хормоном естрадиолом (19). Такође, 3-супституисани кумарински дериват 4-етил-7-хидрокси-3-(4-хидрокси-фенил)-хромен-2-он (20) поседује естрогену активност (Слика 29) [72].



Слика 29. Кумарински деривати са естрогеним дејством

2.5. ЦИЉ И ЗАДАЦИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Имајући у виду значај комплекса прелазних метала, као и то да је у прошлој деценији утврђено да ова једињења имају хидролитичко дејство на молекуле нуклеинских киселина и значајну антитуморску активност са мање нежељених ефеката у оквиру ове *Докторске дисертације* предвиђена је синтеза паладијум(II)-комплекса са лигандима edda-типа, као и синтеза паладијум(II)-комплекса са кумаринским дериватима аминокиселина.

У том циљу у оквиру ове *Докторске дисертације* предвиђени су следећи задаци:

- Синтетисати тетрадентатни лиганд (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетну киселину, (H_2 -(*S,S*)-eddyr)
- Синтетисати неке *O,O'*-диалкил естре тетрадентатног лиганда (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине, (R_2 -(*S,S*)-eddyr)
- Синтетисати одговарајуће паладијум(II)-комплексе са *O,O'*-диалкил естрима (H_2 -(*S,S*)-eddyr) лиганда
- Синтетисати кумаринске деривате неких аминокиселина
- Синтетисати одговарајуће паладијум(II)-комплексе са кумаринским дериватима неких аминокиселина
- Састав добијених лиганада и комплекса утврдити на основу резултата елементарне микроанализе
- Структуру лиганада и награђених комплекса предвидети на основу њихових инфрацрвених и нуклеарно-магнетно-резонанционих спектра
- Структуру лиганада и награђених комплекса потврдити на основу рендгенске структурне анализе, где год је то могуће
- Испитати интеракцију синтетисаних паладијум(II)-комплекса са *O,O'*-диалкил естрима (H_2 -eddyr) полазног лиганда са биолошки значајним молекулима албумином хуманог серума (HSA) и дезоксирибонуклеинском киселином (DNA)

- Испитати антитуморску и антимикробну активност награђених лиганата и одговарајућих паладијум(II)-комплекса

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. СИНТЕЗЕ ЛИГАНДА

3.1.1. Синтеза (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине, H_2 -(*S,S*)-eddyr

Тетрадентатни лиганд, H_2 -(*S,S*)-eddyr, синтетисан је на основу претходно описаног поступка [82]. У раствор добијен растварањем 2,20 g (0,0550 mol) натријум-хидроксида лагано се, у малим порцијама, додаје 10,00 g (0,0550 mol) *S*-тирозина. Реакциона смеша се меша уз рефлуктовање и укапавање 5,17 g (0,0275 mol) 1,2-диброметана и истовремено додавање 2,92 g (0,0275 mol) анхидрованог натријум-карбоната. Раствор се рефлуктује још три сата. Након хлађења реакционе смеше и подешавања рН-вредности на 5 помоћу раствора хлороводоничне киселине (1:1) издваја се талог беж боје (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине. Добијени талог се процеди, добро испере водом и суши на ваздуху. Принос: 3,05 g (14,21%).

Резултати елементалне микроанализе за H_2 -(*S,S*)-eddyr, $M(C_{20}H_{24}N_2O_6) = 388,412$ g/mol, израчунато (%): C, 61,84; H, 7,21; N, 6,23; нађено (%): C, 61,79; H, 7,27; N, 6,14.

3.1.2. Синтеза *O,O'*-диалкил естара (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине дихлорхидрата, R_2 -(*S,S*)-eddyr·2HCl

Диалкил естри (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине синтетисани су по раније описаном поступку [3]. У 40,00 cm³ одговарајућег апсолутног алкохола (етанол, 1-пропанол, 1-бутанол и 1-пентанол) уводи се гасовити хлороводоник, а потом додаје 1,50 g (0,00325 mol) H_2 -(*S,S*)-eddyr лиганда и реакциона смеша рефлуктује 12 сати. Након тога, смеша се филтрира и оставља у фрижидеру неколико дана. Добијени беж талог *O,O'*-диалкил естара (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-)-бензил))сирћетне киселине у облику дихлорхидрата се одвоји цеђењем и

суши на ваздуху. Естри су прекристалисани из врелог алкохола, који је коришћен у свакој од синтеза.

Принос за *O,O'*-диетил естар (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине дихлорхидрат дихидрат, *det-S,S-eddtyr*·2HCl·2H₂O је 0,87 g (48,31%).

Резултати елементалне микроанализе за лиганд *det-S,S-eddtyr*·2HCl·2H₂O, $M(C_{24}H_{38}Cl_2N_2O_8) = 553,464$ g/mol, израчунато (%): C, 52,08; H, 5,06; N, 6,92; нађено (%): C, 51,89; H, 4,94; N, 6,73.

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3,01 (m, 4H, C¹H₂), 3,29 (t, 2H, C²H), 1,12 (d, 4H, C³H₂), 7,02 (AB q, 4H, C^{5,9}H), 6,73 (AB q, 4H, C^{6,8}H), 4,13 (q, 4H, C¹¹H₂), 0,85 (t, 6H, C¹²H₃).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 53,58 (C¹H₂), 62,03 (C²H), 27,83 (C³H₂), 130,60 (C⁴), 156,89 (C^{5,9}H), 115,52 (C^{6,8}H), 168,29 (C⁷), 170,44 (C¹⁰), 60,66 (C¹¹H₂), 14,06 (C¹²H₃).

IR ν (cm⁻¹): 3428, 2925, 2853, 1737, 1638, 1614, 1516, 1445, 1400, 1384, 1229, 1106, 1058, 826, 732, 519.

Принос за *O,O'*-дипропил естар (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине дихлорхидрат дихидрат, *dpr-S,S-eddtyr*·2HCl·2H₂O је 0,88 g (46,42%).

Резултати елементалне микроанализе за лиганд *dpr-S,S-eddtyr*·2HCl·2H₂O, $M(C_{26}H_{42}Cl_2N_2O_8) = 581,516$ g/mol, израчунато (%): C, 53,69; H, 4,82; N, 7,28; нађено (%): C, 53,44; H, 4,85; N, 7,03.

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2,99 (m, 4H, C¹H₂), 3,37 (t, 2H, C²H), 1,49 (d, 4H, C³H₂), 6,99 (AB q, 4H, C^{5,9}H), 6,69 (AB q, 4H, C^{6,8}H), 4,01 (t, 4H, C¹¹H₂), 0,82 (m, 4H, C¹²H₂), 0,72 (t, 6H, C¹³H₃).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 53,60 (C¹H₂), 60,68 (C²H), 35,39 (C³H₂), 124,51 (C⁴), 130,55 (C^{5,9}H), 115,52 (C^{6,8}H), 156,87 (C⁷), 169,17 (C¹⁰), 67,12 (C¹¹H₂), 21,36 (C¹²H₂), 10,19 (C¹³H₃).

IR ν (cm⁻¹): 3419, 2925, 2853, 1734, 1615, 1516, 1444, 1400, 1384, 1227, 1107, 1056, 824, 730, 519.

Принос за *O,O'*-дibuтил естар (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине дихлорхидрат дихидрат, *dbu-S,S-eddtyr*·2HCl·2H₂O је 0,87 g (44,13%).

Резултати елементалне микроанализе за лиганд *dbu-S,S-eddtyr*·2HCl·2H₂O, $M(C_{28}H_{46}Cl_2N_2O_8) = 609,568$ g/mol, израчунато (%): C, 55,17; H, 4,59; N, 7,61; нађено (%): C, 54,97; H, 4,76; N, 7,43.

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2,94 (m, 4H, C¹H₂), 3,01 (t, 2H, C²H), 1,46 (d, 4H, C³H₂), 7,03 (AB q, 4H, C^{5,9}H), 6,73 (AB q, 4H, C^{6,8}H), 4,04 (t, 4H, C¹¹H₂), 1,22 (m, 4H, C¹²H₂), 1,16 (m, 4H, C¹³H₂), 0,83 (t, 6H, C¹⁴H₃).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 35,39 (C¹H₂), 53,61 (C²H), 29,89 (C³H₂), 124,52 (C⁴), 130,41 (C^{5,9}H), 115,50 (C^{6,8}H), 156,82 (C⁷), 169,17 (C¹⁰), 65,31 (C¹¹H₂), 29,99 (C¹²H₂), 18,49 (C¹³H₂), 13,53 (C¹⁴H₃).

IR ν (cm⁻¹): 3413, 2931, 2873, 1736, 1637, 1615, 1516, 1446, 1401, 1384 1242, 1107, 1060, 825, 729, 523.

Принос за *O,O'*-дипентил естар (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине дихлорхидрат дихидрат, *dpe-S,S-eddtyr*·2HCl·2H₂O је 0,96 g (46,34%).

Резултати елементалне микроанализе за лиганд *dpe-S,S-eddtyr*·2HCl·2H₂O, $M(C_{30}H_{50}Cl_2N_2O_8) = 637,62$ g/mol, израчунато (%): C, 56,51; H, 4,39; N, 7,91; нађено (%): C, 56,44; H, 4,61; N, 7,71.

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2,85 (m, 4H, C¹H₂), 3,01 (t, 2H, C²H), 1,45 (d, 4H, C³H₂), 7,06 (AB q, 4H, C^{5,9}H), 6,73 (AB q, 4H, C^{6,8}H), 4,04 (t, 4H, C¹¹H₂), 1,26 (m, 4H, C¹²H₂), 1,19 (m, 4H, C¹³H₂), 1,13 (m, 4H, C¹⁴H₂), 0,85 (t, 6H, C¹⁵H₃).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 53,54 (C¹H₂), 60,68 (C²H), 27,38 (C³H₂), 124,45 (C⁴), 130,41 (C^{5,9}H), 115,46 (C^{6,8}H), 156,83 (C⁷), 169,21 (C¹⁰), 65,78 (C¹¹H₂), 35,42 (C¹²H₂), 27,53 (C¹³H₂), 21,74 (C¹⁴H₂), 13,80 (C¹⁵H₃).

IR ν (cm⁻¹): 3413, 2931, 2858, 1735, 1615, 1518, 1455, 1399, 1235, 1105, 1048, 823, 729, 518.

3.1.3. Синтезе кумаринских деривата

3.1.3.1. Синтеза метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]бутаноата

Полазни 3-ацетил-4-хидрокси кумарин је синтетисан по раније описаном поступку [40,41]. Смеша 3-ацетил-4-хидрокси кумарина (0,400 g; 0,0020 mol), хидрохлорид метил естра *S*-валина (0,335 g; 0,0020 mol) и триметиламина (0,202 g; 0,0020 mol) рефлуктује се 2 сата у 50,00 cm³ метанола. Ток реакције се прати танкослојном хроматографијом (толуен : ацетон = 8 : 2). Након завршене реакције, упаравањем растварача до половине своје запремине и додавањем 5 cm³ воде, добијају су бели кристали метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]бутаноата.

Кристали се одвајају филтрирањем и суше на ваздуху. Рекристализација се врши из 96% етанола. Принос за метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]бутаноат је 0,53 g (83%). Тачка топљења је 182-184°C.

Резултати елементалне микроанализе за метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етиламино-3-метил)]бутаноат, $M(C_{17}H_{19}NO_5) = 317,34$ g/mol, израчунато (%): C, 63,34; H, 4,41; N, 6,03; нађено (%): C, 63,34; H, 4,41; N, 6,03.

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,69 (6H, d, $^3J_{H^{3''}, H^{2''}}, H^{4''}, H^{2''} = 6,3$ Hz, CH^{3''}; CH^{4''}), 1,97 (1H, m, CH^{2''}), 2,70 (3H, s, C^{1'}CH₃), 3,84 (3H, s, COOCH₃), 4,62 (1H, m, C–H^{1''}), 7,25 (2H, m, CH⁶, CH⁷), 7,53 (1H, dd, $^3J_{H^8, H^7} = 7,96$ Hz, $^4J_{H^8, H^6} = 2,71$ Hz, CH⁸), 8,07 (1H, dd, $^3J_{H^5, H^6} = 8,14$ Hz, $^4J_{H^5, H^7} = 1,99$ Hz, C–H⁵), 12,62 (0,18 H, bs, NH) и 14,74 (0,82 H, bs, NH) из два изомера.

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 18,70 (C^{1'}CH₃), 18,92 (C^{3''}, C^{4''}), 42,35 (C^{2''}), 52,48 (C^{1''}), 53,10 (COOCH₃), 98,87 (C³), 116,46 (C⁸), 123,51 (C⁶), 126,05 (C⁵), 128,95 (C¹⁰), 133,94 (C⁷), 153,09 (C⁹), 165,94 (C²), 170,59 (CH₃OOC), 176,01 (C^{1'}) и 182,64 (C⁴).

IR ν (cm⁻¹): 3467 и 3210 (NH), 3030 (=CH), 2969 и 2850 (CH), 1743 (C=O из COOCH₃), 1706 (C=O из 2,4 диоксохроменског дела), 1609, 1571, 1487 и 1467 (C=C), 1138 (C–O–C из COOCH₃).

3.1.3.2. Синтеза метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетата

Смеша 3-ацетил-4-хидрокси кумарина (0,50 g; 0,00245 mol), хидрохлорид метил естра глицина (0,00245 mol) и триметиламина (0,20 g; 0,0020 mol) рефлуктује се 2 сата у 50 cm³ метанола. Ток реакције се прати танкослојном хроматографијом (толуен : ацетон = 8 : 2). Након завршене реакције, упаравањем растварача до половине своје запремине и додавањем 5 cm³ воде, добијају се бели кристали метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетата. Кристали се одвајају филтрирањем и суше на ваздуху. Рекристализација се врши 96% етанолом. Принос за метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетат је 0,56 g (83%). Тачка топљења је 152°C.

Резултати елементарне микроанализе за метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етиламино)]ацетат, M(C₁₄H₁₃NO₅) = 275,26 g/mol, израчунато (%): C, 61,09; H, 5,09; N, 4,76; нађено (%): C, 61,13; H, 5,01; N, 4,85.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 2,70 (3H, s, H^{2'}), 3,86 (3H, s, H^{3''}), 4,32 (2H, AB_q, J_{ABq} = 12,99 Hz, H^{1''}), 7,23 (2H, m, H⁶, H⁷), 7,55 (1H, dd, ³J = 8,10 Hz, ⁴J = 2,11 Hz, H⁸), 8,07 (1H, dd, ³J = 7,99 Hz, ⁴J = 1,90 Hz, H⁵), 12,51 (0,25 H, bs, NH) и 14,65 (0,75 H, bs, NH) из енолног и енаминског таутомера.

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 18,9 (C^{2'}), 45,4 (C^{1''}), 52,9 (C^{3''}), 98,8 (C³), 116,4 (C⁸), 123,5 (C⁵), 126,2 (C⁶), 128,2 (C¹⁰), 133,9 (C⁷), 153,6 (C⁹), 162,5 (C²), 167,8 (C^{2''}), 177,5 (C¹), 182,2 (C⁴).

IR ν(cm⁻¹): 3406 (w), 3109 (w), 2961 (w), 2911(w), 1748 (s), 1720 (s), 1617 (s), 1577 (s), 1486 (m), 1467 (s), 1428 (m), 1365 (m), 1332 (m), 1232 (m), 1215 (s), 1158 (m), 1113 (m), 1027 (w), 985 (m), 955 (m), 899 (m), 766 (m), 740 (w), 731 (w).

3.1.3.3. Синтеза 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]

сирћетне киселине

У 50 cm³ метанолског раствора 3-ацетил-4-хидрокси кумарина (0,50 g; 0,00245 mol) додаје се глицин (0,18 g; 0,00245 mol). рН-вредност реакционе смеше подешава се додавањем неколико капи концентроване хлороводоничне киселине. Бистар, безбојан

раствор се рефлуктује 3 сата. Након шест дана добијени су бели кристали 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]сирћетне киселине.

Принос за 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]сирћетну киселину је 0,47 g (73%). Тачка топљења је 132°C.

Резултати елементалне микроанализе за 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етил-амино)]сирћетну киселину, $M(C_{13}H_{11}NO_5) = 261,23 \text{ g/mol}$, израчунато (%): C, 59,77; H, 5,36; N, 4,24; нађено (%): C, 59,46; H, 5,28; N, 4,07.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) $\delta(\text{ppm})$: 2,60 (3H, s, H^{2'}), 4,50 (2H, AB_q, $J_{\text{ABq}} = 5,00 \text{ Hz}$, H^{1''}), 7,42 (2H, m, H⁶, H⁷), 7,81 (1H, dd, $^3J = 8,10 \text{ Hz}$, $^4J = 2,11 \text{ Hz}$, H⁸), 8,00 (1H, dd, $^3J = 8,00 \text{ Hz}$, $^4J = 2,00 \text{ Hz}$, H⁵), 13,74 (bs, NH и OH).

$^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, DMSO- d_6) $\delta(\text{ppm})$: 19,2 (C²), 45,9 (C^{1''}), 95,5 (C³), 116,4 (C⁸), 123,9 (C⁵), 125,5 (C⁶), 125,9 (C¹⁰), 134,4 (C⁷), 153,2 (C⁹), 159,5 (C²), 169,5 (C^{2''}), 176,5 (C^{1'}) и 178,1 (C⁴).

IR $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3502(w), 3072(w), 2917(w), 1740(m), 1650(m), 1604(s), 1560(m), 1490(m), 1463(m), 1421(m), 1359(m), 1326(m), 1293(w), 1224(m), 1144(w), 1106(w), 1039(w), 989(w), 904(w), 756(w), 717(w), 673(w), 645(w), 576(w), 519(w), 450(w).

3.1.3.4. Синтеза метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)-3-(1H-индол-3-ил)]пропаноата и метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)-4-(метилтио)]бутаноата

Смеша 3-ацетил-4-хидрокси кумарина (0,50 g; 0,00245 mol), хидрохлорид метил естра S-триптофана или S-метионина (0,00245 mol) и триметиламина (0,202 g; 0,0020 mol) рефлуктује се 2 сата у 50 cm³ метанола. Ток реакције се прати танкослојном хроматографијом (толуен : ацетон = 8 : 2). Након завршене реакције, упаравањем растварача до половине своје запремине и додавањем 5 cm³ воде, добијају се бели кристали који се одвајају филтрирањем и суше на ваздуху. Рекристализација се врши из 96% етанола.

Принос за метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)-3-(1H-индол-3-ил)]пропаноат је 0,84 g (85%), $R_f = 0,46$. Тачка топљења је 186°C.

Резултати елементалне микроанализе за метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етиламино)-3-(1*H*-индол-3-ил)]пропаноат, $M(C_{23}H_{20}N_2O_5) = 404,41$ g/mol, израчунато (%): C, 68,31; H, 6,93; N, 4,98; нађено (%): C, 68,55; H, 6,96; N, 5,03.

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 2,29 (s, 3H, CH_3-C^1), 3,43 (m, 1H, C^1), 3,77 (s, 3H, CH_3 из $COOCH_3$), 4,79 (m, 2H, C^2), 7,09 (m, 1H, C^6), 7,09 (m, 1H, C^5), 7,11 (s, 1H, C^2), 7,21 (m, 1H, C^6), 7,31 (m, 1H, C^4), 7,32 (m, 1H, C^5), 7,51 (m, 1H, C^7), 7,53 (m, 1H, C^7), 8,03 (d, 1H, C^8 , $J = 7,7$ Hz), 8,73 (s, 1H, NH), 14,81 (s, 1H, NH).

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 18,3 (CH_3-C^1), 29,4 (C^2), 53,1 (CH_3 из $COOCH_3$), 57,9 (C^1), 97,4 (C^3), 108,3 (C^7), 111,3 (C^8), 116,4 (C^5), 117,7 (C^3), 119,6 (C^4), 122,2 (C^6), 123,1 (C^5), 123,5 (C^6), 124,4 (C^9), 125,9 (C^{10}), 126,9 (C^2), 133,7 (C^7), 133,9 (C^8), 153,4 (C^9), 159,4 (C^2), 176,4 (C^1), 181,1 (C^4).

IR ν (cm^{-1}): 3420 (NH), 3051 (=CH), 2997 (CH), 1738 (C=O из $COOCH_3$), 1693 (C=O из 2,4-диоксохроманског дела), 1615, 1578, 1484 и 1438 (C=C), 1221 ($\nu_{as}C-O-C$ из $COOCH_3$), 1094 ($\nu_{as}C-O-C$ из $COOCH_3$).

Принос за метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)-4-(метилтио)]-бутаноат је 0,69 g (81%), $R_f = 0,53$. Тачка топљења је 99°C.

Резултати елементалне микроанализе за метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етиламино)-4-(метилтио)]бутаноат, $M(C_{17}H_{19}NO_5S) = 349,40$ g/mol, израчунато (%): C, 58,44; H, 4,01; N, 5,48; нађено (%): C, 58,39; H, 4,11; N, 5,55.

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 2,11 (s, 3H, S- CH_3), 2,31 (m, 2H, C^2H), 2,65 (m, 2H, C^3), 2,74 (s, 3H, CH_3-C^1), 3,84 (s, 3H, $COOCH_3$), 4,86 (m, 1H, C^1H , $^3J = 6,1$ Hz), 7,21 (m, 2H, C^6H , C^7H), 7,54 (dd, 1H, $^3J_{H^8, H^7} = 7,89$ Hz, $^4J_{H^8, H^6} = 2,14$ Hz, C^8H), 8,05 (dd, 1H, $^3J_{H^5, H^6} = 6,23$ Hz, $^4J_{H^5, H^7} = 1,91$ Hz, C^5H), 14,73 (br s, 1H, NH).

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 15,0 (S- CH_3), 18,7 (C^1-CH_3), 29,6 (C^3), 31,4 (C^2), 52,3 (CH_3 из $COOCH_3$), 55,0 (C^1), 97,4 (C^3), 116,3 (C^8), 117,7 (C^5), 123,4 (C^6), 133,8 (C^{10}), 153,3 (C^7), 159,2 (C^9), 162,2 (C^2), 169,2 (C^1), 176,9 (C^4).

IR ν (cm^{-1}): 3418 (NH), 3080 (=CH), 2994 и 2921 (CH), 1739 (C=O из $COOCH_3$), 1705 (C=O из 2,4-диоксохроманског дела), 1612, 1571, 1486 и 1469 (C=C), 1163 ($\nu_{as}C-O$ из $COOCH_3$).

3.2. СИНТЕЗЕ КОМПЛЕКСА

3.2.1. Синтеза дихлоридо-(*O,O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))-ацетато-паладијум(II)-комплекса, [PdCl₂(det-*S,S*-eddyr)]

Раствору добијеном растварањем 0,0500 g (0,153 mmol) калијум-тетрахлоридо-паладата(II) у 10 cm³ дестиловане воде додаје се 0,0846 g (0,153 mmol) *O,O'*-диетил естра (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине дихлорхидрата дихидрата, det-*S,S*-eddyr·2HCl·2H₂O. Реакциона смеша се рефлуктује 2 сата и током овог периода у малим порцијама додаје се 10 cm³ воденог раствора LiOH (0,0070 g; 0,306 mmol). Награђени комплекс [PdCl₂(det-*S,S*-eddyr)] је талог светло жуте боје, који се одваја филтрирањем, испира дестилованом водом и суши на ваздуху. Принос: 0,059 g (62,64%).

Резултати елементалне микроанализе за [PdCl₂(det-*S,S*-eddyr)], M(C₂₄H₃₂Cl₂N₂O₆Pd) = 621,816 g/mol, израчунато (%): C, 46,35; H, 4,51; N, 5,19; нађено (%): C, 45,84; H, 4,59; N, 4,95.

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 3,06 (m, 4H, C¹H₂), 3,80 (t, 2H, C²H), 3,13 (d, 4H, C³H₂), 7,11 (AB q, 4H, C^{5,9}H), 6,68 (AB q, 4H, C^{6,8}H), 3,95 (q, 4H, C¹¹H₂), 1,03 (t, 6H, C¹²H₃).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 21,82(C¹H₂), 60,93 (C²H), 19,46(C³H₂), 130,41 (C⁴), 126,91 (C^{5,9}H), 115,21 (C^{6,8}H), 156,23 (C⁷), 168,94 (C¹⁰), 61,80 (C¹¹H₂), 13,91 (C¹²H₃).

IR ν(cm⁻¹): 3421, 2980, 2927, 1730, 1613, 1515, 1446, 1241, 1105, 1026, 826, 735, 539.

3.2.2. Синтеза дихлоридо-(*O,O'*-дипропил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))-ацетато-паладијум(II)-комплекса, [PdCl₂(dpr-*S,S*-eddyr)]

Комплекс, [PdCl₂(dpr-*S,S*-eddyr)], синтетисан је на начин описан у одељку 3.2.1. користећи *O,O'*-дипропил естар (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))-

-сирћетне киселине дихлорхидрат дихидрат, $\text{dpr-}S,S\text{-eddyr}\cdot 2\text{HCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, (0,0889 g; 0,153 mmol) уместо $\text{det-}S,S\text{-eddyr}\cdot 2\text{HCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Принос: 0,058 g (58,53%).

Резултати елементалне микроанализе за $[\text{PdCl}_2(\text{dpr-}S,S\text{-eddyr})]$, $\text{M}(\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_6\text{Pd}) = 649,868 \text{ g/mol}$, израчунато (%): C, 48,05; H, 4,31; N, 5,58; нађено (%): C, 47,53; H, 4,37; N, 5,30.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) $\delta(\text{ppm})$: 2,75 (m, 4H, C^1H_2), 3,05 (t, 2H, C^2H), 2,81 (d, 4H, C^3H_2), 7,10 (AB q, 4H, $\text{C}^{5,9}\text{H}$), 6,68 (AB q, 4H, $\text{C}^{6,8}\text{H}$), 3,88 (t, 4H, C^{11}H_2), 1,39 (m, 4H, C^{12}H_2), 0,72 (t, 6H, C^{13}H_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) $\delta(\text{ppm})$: 35,13 (C^1H_2), 61,80 (C^2H), 21,58 (C^3H_2), 155,97 (C^4), 130,29 (C^5H), 115,18 (C^6H), 156,24 (C^7), 114,69 (C^8H), 126,86 (C^9H), 169,06 (C^{10}), 66,41 (C^{11}H_2), 21,35 (C^{12}H_2), 10,13 (C^{13}H_3).

IR $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3447, 2967, 2926, 1729, 1614, 1515, 1455, 1400, 1243, 1106, 1057, 824, 540.

3.2.3. Синтеза дихлоридо-(*O,O'*-дибутил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))-ацетато-паладијум(II)-комплекса, $[\text{PdCl}_2(\text{dbu-}S,S\text{-eddyr})]$

Комплекс, $[\text{PdCl}_2(\text{dbu-}S,S\text{-eddyr})]$, синтетисан је на начин описан у одељку 3.2.1. користећи *O,O'*-дибутил естар (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди(4-хидрокси-бензил)) сирћетне киселине дихлорхидрат дихидрат, $\text{dbu-}S,S\text{-eddyr}\cdot 2\text{HCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, (0,0932 g; 0,153 mmol) уместо $\text{det-}S,S\text{-eddyr}\cdot 2\text{HCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Принос: 0,066 g (64,12%).

Резултати елементалне микроанализе за $[\text{PdCl}_2(\text{dbu-}S,S\text{-eddyr})]$, $\text{M}(\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_6\text{Pd}) = 677,920 \text{ g/mol}$, израчунато (%): C, 49,60; H, 4,13; N, 5,94; нађено (%): C, 50,01; H, 4,59; N, 5,89.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) $\delta(\text{ppm})$: 2,75 (m, 4H, C^1H_2), 3,09 (t, 2H, C^2H), 2,95 (d, 4H, C^3H_2), 7,09 (AB q, 4H, $\text{C}^{5,9}\text{H}$), 6,68 (AB q, 4H, $\text{C}^{6,8}\text{H}$), 3,93 (t, 4H, C^{11}H_2), 1,43 (m, 4H, C^{12}H_2), 1,16 (m, 4H, C^{13}H_2), 0,81 (t, 6H, C^{14}H_3).

^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 30,30 (C^1H_2), 57,54 (C^2H), 30,09 (C^3H_2), 130,42 (C^4), 126,89 (C^5H), 115,46 (C^6H), 156,58 (C^7), 115,25 (C^8H), 125,63 (C^9H), 169,17 (C^{10}), 64,66 (C^{11}H_2), 18,81 (C^{12}H_2), 18,55 (C^{13}H_2), 13,63 (C^{14}H_3).

IR $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3419, 2959, 2872, 1731, 1614, 1515, 1449, 1242, 1106, 1061, 827, 734, 543.

3.2.4. Синтеза дихлоридо-(*O,O'*-дипентил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))-ацетато-паладијум(II)-комплекса, [PdCl₂(dpe-*S,S*-eddyr)]

Комплекс, [PdCl₂(dpe-*S,S*-eddyr)], синтетисан је на начин описан у одељку 3.2.1. користећи *O,O'*-дипентил естар (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди(4-хидрокси-бензил))-сирћетне киселине дихлорхидрат дихидрат, dpe-*S,S*-eddyr·2HCl·2H₂O, (0,0975 g; 0,153 mmol) уместо det-*S,S*-eddyr·2HCl·2H₂O. Принос: 0,061 g (56,46%).

Резултати елементалне микроанализе за [PdCl₂(dpe-*S,S*-eddyr)], M(C₃₀H₄₄Cl₂N₂O₆Pd) = 705,972 g/mol, израчунато (%): C, 51,04; H, 3,97; N, 6,28; нађено (%): C, 50,85; H, 3,87; N, 5,85.

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2,83 (m, 4H, C^1H_2), 3,52 (t, 2H, C^2H), 3,22 (d, 4H, C^3H_2), 6,99 (AB q, 4H, $\text{C}^{5,9}\text{H}$), 6,68 (AB q, 4H, $\text{C}^{6,8}\text{H}$), 3,92 (t, 4H, C^{11}H_2), 1,41 (m, 4H, C^{12}H_2), 1,15 (m, 4H, C^{13}H_2), 1,21 (m, 4H, C^{14}H_2), 0,82 (t, 6H, C^{15}H_3).

^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 57,46 (C^1H_2), 64,83 (C^2H), 27,65 (C^3H_2), 130,35 (C^4), 130,19 (C^5H), 125,56 (C^6H), 156,51 (C^7), 115,35 (C^8H), 129,88 (C^9H), 170,84 (C^{10}), 64,98 (C^{11}H_2), 27,49 (C^{12}H_2), 27,38 (C^{13}H_2), 21,78 (C^{14}H_2), 13,84 (C^{15}H_3).

IR $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3435, 2957, 2858, 1732, 1614, 1516, 1454, 1399, 1245, 1108, 1057, 823, 730, 545.

3.2.5. Синтеза *bis*{метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]бутаноато}-паладијум(II)-комплекса

У раствор добијен растварањем 0,0500 g (0,153 mmol) калијум-тетра-хлоридопаладата(II) додаје се двострука количина 0,0971 g (0,306 mmol) метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]бутаноата, који се претходно раствори у 10 cm³ метанола и реакциона смеша меша 3 сата.

Током тог периода награђени *bis*{метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етиламино-3-метил)]бутаноато}-паладијум(II)-комплекс издваја се у облику жутог талога. Талог се одваја филтрирањем и суши на ваздуху. Принос: 0,056 g (49,6%).

Резултати елементалне микроанализе за *bis*{метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]бутаноато}-паладијум(II)-комплекс, $M(C_{34}H_{36}N_2O_{10}Pd) = 739,05$ g/mol, израчунато (%): C, 55,25; H, 3,79; N, 4,91; нађено (%): C, 55,89; H, 3,68; N, 4,82.

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,60 (6H, d, ³J_{H^{3''},H^{2''}}; H^{4''},H^{2''}} = 6.01 Hz, CH^{3''}; CH^{4''}), 2,35 (1H, m, CH^{2''}), 2,62 (3H, s, C¹CH₃), 3,76 (3H, s, COOCH₃), 4,91 (1H, m, CH^{1''}), 7,30 (2H, m, CH⁶, CH⁷), 7,66 (1H, m, CH⁸), 7,99 (1H, dd, ³J_{H⁵,H⁶} = 8,00 Hz, ⁴J_{H⁵,H⁷} = 2,00 Hz, CH⁵).}}}

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 17,42 (C¹CH₃), 18,75 (C^{3''}, C^{4''}), 31,13 (C^{2''}), 52,67 (C^{1''}), 53,17 (COOCH₃), 96,78 (C³), 116,36 (C⁸), 120,28 (C⁶), 123,80 (C⁵), 125,76 (C¹⁰), 134,30 (C⁷), 152,87 (C⁹), 161,72 (C²), 169,87 (CH₃OOC), 177,08 (C¹), 180,60 (C⁴).

IR ν (cm⁻¹): 3011 (=CH), 2958, 2925 и 2851 (CH), 1742 (C=O из COOCH₃), 1708 (C=O из кумарина), 1606 (C=N), 1570, 1543 и 1486 (C=C), 1138 (C-O-C из COOCH₃), 526 (Pd-O), 463 (Pd-N).

3.2.6. Синтеза хлоридо{метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетато}-паладијум(II)-комплекса

Раствору добијеном растварањем 0,0500 g (0,153 mmol) калијум-тетрахлоридо-паладата(II) додаје се иста количина (0,153 mmol) метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-

-илиден)етиламино]ацетата, претходно раствореног у 10 cm^3 метанола. Реакциона смеша се меша 3 сата и током тог периода награђени хлоридо{метил 2-[(1-(2,4-диоксо хроман-3-илиден)етиламино]ацетато}-паладијум(II)-комплекс се издваја у облику жутог талога. Талог се одваја филтрирањем, испира малом количином метанола и суши на ваздуху. Принос: 0,030 g (47,0%).

Резултати елементалне микроанализе за хлоридо{метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино]ацетато}-паладијум(II)-комплекс, $M(\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{ClNO}_5\text{Pd}) = 416,12 \text{ g/mol}$, израчунато (%): C, 40,41; H, 3,37; N, 2,91; нађено (%): C, 39,99; H, 3,62; N, 2,71.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2,97 (3H, s, H^2), 3,15 (3H, s, $\text{H}^{3''}$), 4,47 (2H, s, $\text{H}^{1''}$), 7,30 (2H, m, H^6 , H^7), 7,65 (1H, t, $^3J = 8,0 \text{ Hz}$, H^8), 7,89 (1H, d, $^3J = 8,0 \text{ Hz}$, H^5).

IR $\nu(\text{cm}^{-1})$: 2962(w), 1676(s), 1606(m), 1566(m), 1483(m), 1454(w), 1402(w), 1366(w), 1291(w), 1250(w), 1216(w), 1115(w), 1084(w), 1021(w), 994(w), 945(w), 909(w), 878(w), 751(w), 684(w).

3.2.7. Синтеза диметиламин{2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино]ацетато}-паладијум(II)-комплекса

Претходно синтетисани комплекс (описан у одељку 3.2.10.) кристалисао је из система диметилсулфоксид-вода (1:1) тако што је добијени талог комплекса растворен у малој количини диметилформаида. Добијени раствор је заједно са чашом остављен у већој чаши са дестилованом водом. Већа чаша је затворена парафилмом и остављена на собној температури и на тамном месту. Након седам дана добијени су жути кристали диметиламин{2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино]ацетато}-паладијум(II)-комплекса.

Резултати елементалне микроанализе за диметиламин {2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино]ацетато}-паладијум(II)-комплекс, $M(\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6\text{Pd}) = 428,74 \text{ g/mol}$, израчунато (%): C, 42,02; H, 6,53; N, 4,23; нађено (%): C, 41,34; H, 6,47; N, 4,46.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2,35 (3H, s, H^2), 2,40 (6H, s, CH_3 из диметиламина), 2,52 (1H, s, NH из диметиламина), 4,41 (2H, $\text{H}^{1''}$), 7,27 (2H, m, H^7),

7,31 (2H, m, H⁶), 7,63 (1H, td, ³J = 8,00 Hz, ⁴J = 2,00 Hz, H⁸), 7,98 (1H, dd, ³J = 8,00 Hz, ⁴J = 1,50 Hz, H⁵).

IR $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3227(m), 3071(w), 3020(w), 2986(w), 2936(w), 1690(s), 1660(s), 1601(m), 1573(m), 1482(m), 1440(w), 1403(m), 1348(m), 1292(w), 1269(w), 1245(w), 1214(w), 1141(w), 1108(w), 1081(w), 1064(w), 1026(w), 986(w), 939(w), 903(w), 759(m), 684(w), 617(w), 580(w), 530(w).

3.2.8. Синтеза хлоридо{метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)-3-(1H-индол-3-ил)]пропаноато}-паладијум(II)-комплекса

Раствору добијеном растварањем 0,0500 g (0,153 mmol) калијум-тетрахлоридо-паладата у 10 cm³ дестиловане воде додаје се иста количина (0,153 mmol) метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)-3-(1H-индол-3-ил)]пропаноата, раствореног у 10 cm³ метанола. Реакциона смеша се меша 3 сата и током тог периода издваја се жути талог награђеног комплекса. Талог се одвоји филтрирањем и суши на ваздуху. Принос: 0,027 g (31,39%).

Резултати елементарне микроанализе за хлоридо{метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)-3-(1H-индол-3-ил)]пропаноато}-паладијум(II)-комплекс,

$M(\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}_6\text{Pd}) = 564,288 \text{ g/mol}$, израчунато (%): C, 48,95; H, 4,96; N, 3,75; нађено (%): C, 48,81; H, 4,94; N, 3,80.

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) $\delta(\text{ppm})$: 2,44 (s, 3H, CH₃-C²), 3,24 (m, 2H, C¹), 3,37 (s, 3H, CH₃ из COOCH₃), 7,01 (m, 1H, C⁷), 7,01 (m, 1H, C⁶), 7,05 (m, 1H, C⁵), 7,40 (m, 1H, C⁴), 8,67 (s, 1H, NH), 7,18 (s, 1H, C²), 5,24 (m, 2H, C²), 7,32 (m, 1H, C⁵), 7,28 (m, 1H, C⁶), 7,90 (m, 1H, C⁷), 7,99 (d, 1H, C⁸, *J* = 7,7 Hz).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) $\delta(\text{ppm})$: 18,65 (CH₃-C¹), 28,64 (C²), 53,2 (C¹), 57,25 (CH₃ из CH₃OOC), 96,5 (C³), 107,2 (C³), 111,6 (C⁷), 116,2 (C⁸), 117,8 (C¹⁰), 119,9 (C⁵), 120,15 (C⁴), 121,2 (C⁶), 123,7 (C⁵), 124,6 (C⁶), 125,8 (C⁹), 126,95 (C⁷), 133,3 (C²), 136,03 (C⁸), 153,05 (C⁹), 158,3 (C²), 163,31 (C¹), 176,2 (C⁴).

IR $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3421 (NH), 2953, 2925, 2852 (CH), 1737 (C=O из COOCH_3), 1697 (C=O из 2,4-диоксохроманског дела), 1604 (C=N), 1572, 1486, 1466 и 1437 (C=C), 1213 ($\nu_{\text{as}}\text{C-O-C}$ из COOCH_3), 1060 ($\nu_{\text{s}}\text{C-O-C}$ из COOCH_3), 526 (Pd-O), 469 (Pd-N).

3.2.9. Синтеза хлорида {метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)-4-(метилтио)]бутаноато}-паладијум(II)-комплекса

Комплекс хлорида {метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)-4-(метилтио)]бутаноато}-паладијум(II) синтетисан је на начин описан у одељку 3.2.8. користећи метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)-4-(метилтио)]бутаноат уместо метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)-3-(1*H*-индол-3ил)]пропаноата. Принос: 0,029 g (38,67%).

Резултати елементалне микроанализе за хлорида {метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)-4-(метилтио)]бутаноато}-паладијум(II)-комплекс,

$M(\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClNSO}_5\text{Pd}) = 490,234 \text{ g/mol}$, израчунато (%): C, 41,65; H, 2,86; N, 3,70; S, 6,53; нађено (%): C, 41,59; H, 2,80; N, 3,74; S, 6,51.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) $\delta(\text{ppm})$: 2,34 (s, 3H, S- CH_3), 2,43 (m, 2H, $\text{C}^{2''}$), 2,48 (m, 2H, $\text{C}^{3''}$), 2,63 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}^1$), 3,42 (s, 3H, CH_3OOC), 3,81 (m, 1H, $\text{C}^{1''}\text{H}$, $^3J = 6.1 \text{ Hz}$), 7,34 (m, 2H, C^6H , C^7H), 7,68 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-8, H-7}} = 7,89 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H-8, H-6}} = 2,14 \text{ Hz}$, C^8H), 7,88 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-5, H-6}} = 6,23 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H-5, H-7}} = 1,91 \text{ Hz}$, C^5H).

$^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) $\delta(\text{ppm})$: 17,74 (S- CH_3), 20,1 ($\text{CH}_3\text{-C}^1$), 21,6 ($\text{C}^{3''}$), 28,8 ($\text{C}^{2''}$), 53,2 (CH_3 из COOCH_3), 60,0 ($\text{C}^{1''}$), 109,6 (C^3), 116,1 (C^8), 117,9 (C^5), 123,9 (C^6), 125,9 ($\text{C}^{7''}$), 134,2 (C^{10}), 153,5 (C^7), 161,5 (C^9), 169,9 (C^2), 173,5 ($\text{C}^{1'}$), 173,7 (C^4).

IR $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3139 (=CH), 2934 и 2852 (CH), 1738 (C=O из COOCH_3), 1693 (C=O 2,4-диоксохроманског дела), 1601 (C=N), 1566, 1485 и 1421 (C=C), 1207 (C-O-C из COOCH_3), 528 (Pd-O), 467 (Pd-N).

3.3. МЕРЕЊА

3.3.1. Елементална микроанализа

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

3.3.2. ^1H и ^{13}C нуклеарно-магнетно-резонанциона спектроскопија

Снимање нуклеарно-магнетно-резонанционих спектра синтетисаних једињења вршена су помоћу спектофотометра Varian Gemini-200 NMR користећи DMSO- d_6 или CDCl_3 као раствараче. Хемијска померања су дата у односу на триметилсилан (TMS) као стандард.

3.3.3. Инфрацрвена спектроскопија

Инфрацрвени спектри снимљени су на PerkinElmer, Spectrum One FT-IR спектрофотометру.

3.3.4. РЕНДГЕНСКА СТРУКТУРНА АНАЛИЗА

3.3.4.1. Рендгенска структурна анализа метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]бутаноата

Беличасти провидни кристали метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]бутаноата погодни за рендгенску анализу добијени су прекристалисавањем из смеше метанол-вода у односу 1:2. Подаци о монокристалу прикупљени су на

дифрактометру Oxford Diffraction Xcalibur 2 са Sapphire 2 CCD детектором. Коришћено је МоК α ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) (Табела 2.), монохроматизовано зрачење графитног монохроматора. Подаци су обрађени помоћу Crysalis CCD софтвера [83], док је Crysalis RED [83] коришћен за корекцију апсорпције. У Табели 2 су приказани детаљнији подаци.

Табела 2. Основни кристалографски подаци и подаци у вези са решавањем и утачњавањем структуре за метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)-3-метил]бутаноат

Формула	C ₁₇ H ₁₉ NO ₅	F(000)	336
M	317,33	Z	2
Кристални систем	Моноклиничан	D _c (g/cm ³)	1,342
Просторна група	P2 ₁	λ (Å)	0,71073
Величина кристала (mm)	0,41 x 0,18 x 0,09	μ (mm ⁻¹)	0,099
a (Å)	5,1467(2)	Температура (K)	173(2)
b (Å)	12,9904(5)	Θ (°)	3,14-26,49
c (Å)	11,8223(5)	Сакупљене рефлексije	6596
α (°)	90	Независне рефлексije	3260
β (°)	96,644(4)	Посматране рефлексije	3260
γ (°)	90	I > 2 σ (I)	R ₁ = 0,0385, wR ₂ = 0,0773
V (Å ³)	785,10(5)	R	R ₁ = 0,0528, wR ₂ = 0,0842

3.3.4.2. Рендгенска структурна анализа диметиламин{2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетато}-паладијум(II)-комплекса

Монокристали диметиламин{2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетато}-паладијум(II)-комплекса погодни за рендгенску анализу добијени су прекристалисавањем претходно синтетисаног комплекса (3.2.10.) из смеше диметилформаид-вода у односу 1:1.

Подаци о кристалу прикупљени су на APEX2 дифрактометру са CCD детектором на температури 273,15 K и применом МоК α зрачења ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$). Кристална структура решена је применом SUPERFLIP [84] и Fourier метода, а утачњена коришћењем програма

SHELXL2013 [85], имплементираног у WinGX [86]. Анализа дужина и углова веза извршена је помоћу SHELXL2013, а слике молекула применом DIAMOND [87]. Лоренцови и поларизациони ефекти кориговани су коришћењем SADABS програма [88].

За решавање структуре примењене су и директне методе употребом SIR2011 [89] и побољшана коришћењем full-matrix, least-square процедура применом SHELXL97 [90] имплементираних у Olex2 пакету [91]. У Табели 3 су приказани детаљнији подаци.

Табела 3. Основни кристалографски подаци и подаци у вези са решавањем и утачњавањем структуре за диметиламин{2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетато}-паладијум(II)-комплекс

Формула	$C_{15}H_{18}N_2O_6Pd$	F(000)	864
М	428,71	Z	4
Кристални систем	Моноклиничан	D_c (g/cm ³)	1,835
Просторна група	$P2_1/n$	λ (Å)	0,71073
Величина кристала (mm)	0,35 x 0,2 x 0,012	μ (mm ⁻¹)	1,231
a (Å)	14,425(5)	Температура (К)	293,15
b (Å)	6,913(2)	Θ (°)	3,466-64,286
c (Å)	15,918(5)	Сакупљене рефлексije	23580
α (°)	90	Независне рефлексije	5123
β (°)	102,100(6)	Посматране рефлексije	5123
γ (°)	90	$I > 2\sigma(I)$	$R_1 = 0,0548, wR_2 = 0,1338$
V (Å ³)	1552,1(9)	R	$R_1 = 0,1347, wR_2 = 0,1746$

3.4. БИОЛОШКА МЕРЕЊА

3.4.1. *In vitro* антитуморска активност

3.4.1.1. Испитиване ћелијске линије

За испитивање цитотоксичности као циљне ћелијске линије у оквиру ове докторске дисертације коришћене су: MDA-MB-231 (ћелијске линије хуманог карцинома дојке), A549 (ћелијске линије хуманог карцинома плућа), JVM 13 (ATCC® CRL-3003™) и MOLT-4 (ATCC® CRL-1582™) (ћелијске линије хумане леукемије) као и CLL ћелије (ћелије хроничне лимфоцитне леукемије изоловане из периферне крви оболелих).

3.4.1.2. Хранљиви медијум

MDA-MB-231 ћелије гајене су на RPMI 1640 медијуму, док су A549 ћелије гајене на DMEM медијуму. Оба медијума допуњена су 10% феталним серумом говечета, пеницилином/стрептомицином и *L*-глутамином. Ћелије су одржаване у једнослојној култури у 25 cm² коштаног ткива (Nunclon™). Ћелије су за експерименте припремљене поступком трипсинизације са трипсином и EDTA. Ћелијске линије хумане леукемије JVM 13 (ATCC® CRL-3003™) и MOLT-4 (ATCC® CRL-1582™) добијене су као донација са Медицинског факултета у Београду (одсек за биохемију), а одржаване су у медијуму културе који се састоји од RPMI-1640, 2 mM *L*-глутамин, 100 µg/cm³ стрептомицина и 100 IU пеницилина, допуњен инактивираним 10% феталним серумом говечета (FBS).

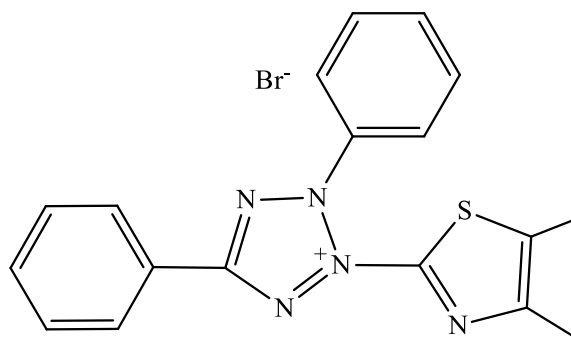
3.4.1.3. CLL ћелије

Хронична лимфоцитна леукемија (CLL) једна је од најчешћих леукемија код одраслих, док деца ретко обољевају. Код CLL, превише матичних ћелија крви постају абнормални лимфоцити који не достижу одређену зрелост и самим тим губе функцију.

Ове ћелије се називају „ћелије леукемије” и нису у стању да се боре против инфекције. Исто тако, како се број ћелија леукемије повећава у крви и коштаном сржи долази до претеране акумулације у коштаном сржи, те се смањује простор за продукцију зрелих здравих ћелија крвних лоза. Због свих ових фактора може доћи до инфекције, анемија и крварења. Око 80 % CLL је удружено са карактеристичним хромозомским аберацијама (13q14 који садрже 2 miRNA mir-15a mir16-1; 11q23 који кодира ATM; 17p13 који кодира p53). Осим тога, присутне су и епигенетске промене: хипометилација BCL-2; метилација промотор за DAPK1, молекула који у случају стреса ћелије, недостатка фактора раста изазива апоптозу или аутофагију у зависности од ћелије и окружења [92].

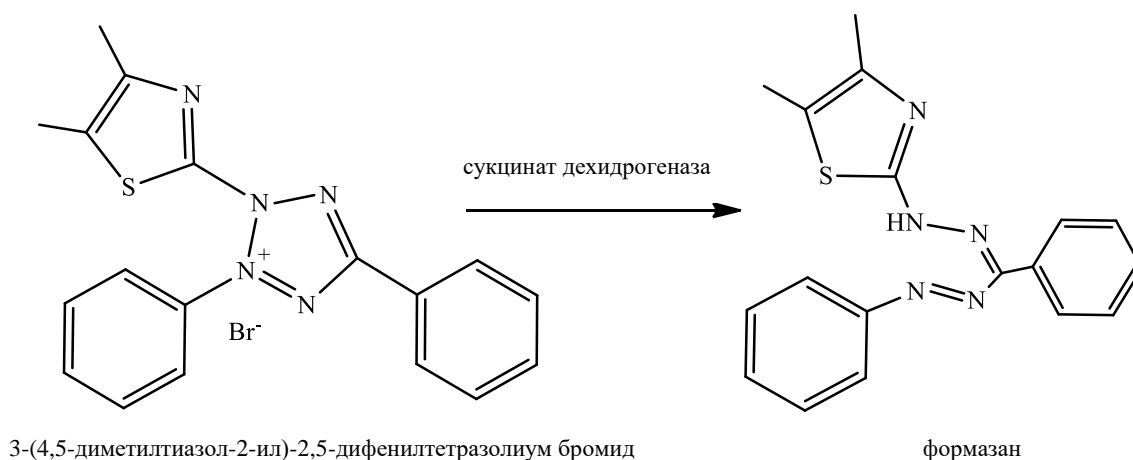
3.4.1.4. МТТ тест

МТТ тест је метода којом се индиректно одређује одрживост ћелија [50,51]. МТТ, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (Слика 30) је кристал жуте боје, растворљив у води, који због позитивног наелектрисања лако пролази кроз ћелијску мембрану. У метаболички активним ћелијама се МТТ редукује до несолубилних љубичастих кристала формазана. Митохондријална редуктаза (сукцинат-деhidрогеназа), активна само у живим ћелијама, катализује ову реакцију, па је редукција првобитног једињења до формазана директно пропорционална броју живих ћелија (Слика 31).



Слика 30. Структура МТТ

Ефекат испитиване супстанце се одређује поређењем интензитета боје који дају ћелије излагане само медијуму и интензитета који дају ћелије излагане испитиваној супстанци. Настали формазан се раствара у органским растварачима и интензитет боје се одређује спектофотометријски.



Слика 31. Редукација МТТ до формазана

Сва испитивана једињења најпре су растворена у диметилсулфоксиду до концентрације 20 mM, филтрирана кроз 0,22 mm Milipore филтер папир, а потом су разблажена хранљивим медијумом до одговарајућих радних концентрација тако да коначна концентрација диметилсулфоксида у медијуму није прелазила 0,5% (v/v).

За засејавање ћелија коришћене су микротитар плоче са 96 бунарића (Sarstedt™). У сваки бунарић додаје се по 200 mm³ одговарајућег медијума за културу. Свака концентрација испитиваних једињења тестирана је по три пута у инкубатору на 37°C и у влажној атмосфери од 5% CO₂. Контролне ћелије садржавале су одређену количину диметилсулфоксида. Културни медијум са одговарајућом количином испитиваних једињења, али без ћелија коришћен је као бленк (слепа проба). Одрживост култивисаних ћелија одређена је МТТ тестом [93].

Укратко, ћелије су третиране различитим разблажењима испитиваних једињења (25 μM, 50 μM, 100 μM и 250 μM) и такође су култивисане у медијуму ћелијске кутуре која

садржи одређену количину диметилсулфоксида (контрола). Након 6h, 24h и 48h инкубације уклања се средство за културу и додаје МТТ раствор.

После додатних 4h инкубације уклања се средство за МТТ и додаје се 150 mm³ врелог диметилсулфоксида како би се растворили крисали формаза.

Отвори се протресу 10 минута, а потом мери абсорбанца на 595 nm мулти-функционалним читачем микротитар плоча (Zenith 3100, Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria).

Процент мртвих ћелија је израчунат помоћу формуле:

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

где је: Е-отвор са испитиваним супстанцама; Б-слепа проба (бленк); К-отвор са нетретираним ћелијама.

IC₅₀ концентрација се дефинише као концентрација супстанце која за 50% инхибира ћелијско преживљавање у односу на нетретирану контролу.

3.4.2. *In vitro* антимицробни тест

3.4.2.1. Тестирани микроорганизми

Антимицробна активност лиганада диалкилестара edda-типа и њихових одговарајућих паладијум(II)-комплекса одређена је тестирањем на 11 врста микроорганизма. Тестирања су вршена на 11 врста патогених бактерија, укључујући 6 стандардних врста и 5 клиничких изолата (Табела 4).

Табела 4. Списак тестираних микроорганизма

Грам-позитивне бактерије	Грам-негативне бактерије
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922
<i>Bacillus cereus</i> , clinical strain	<i>Escherichia coli</i> , clinical strain
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>Staphylococcus aureus</i> , clinical strain	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , clinical strain
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Salmonella enterica subspecies enterica serovar enteritidis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> , clinical strain	

Тестирани бактеријски сојеви су обезбеђени из колекције микроорганизама Центра за микробиологију, Института за јавно здравље у Врању.

Све испитиване супстанце (по 3 mg) растворене су у 150 mm³ диметилсулфооксида (SIGMA D-8779), а затим разблажене са 1350 mm³ физиолошког раствора до коначне (шток) концентрације од 2000 mg/cm³ (10% DMSO).

Антимикробна активност кумаринских деривата и њихових одговарајућих паладијум(II)-комплекса одређена је тестирањем на 3 стандардна бактеријска соја (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) и клиничког соја квасца (*Candida albicans*). Суспензија квасца и бактеријске суспензије припремљене су директним узимањем колоније са подлоге и растварањем у 5 cm³ стерилног физиолошког раствора. Густина суспензије подешавана је у односу на 0,5 Mc Farland стандард (0,5 cm³ 1:17% w/v BaCl₂ · 2H₂O + 99,5 cm³ 1% w/v H₂SO₄) [94] визуелним упоређивањем или спектофотометријски.

Спектрофотометар се подеси на таласну дужину од 620 nm за бактерије и 513 nm за квасце како би се добила апсорбанција од 0,08 - 0,10 за бактерије и 0,09 - 0,13 за квасце. Овим се добија суспензија која садржи 1 - 1,5 · 10⁸ CFU/cm³ за бактерије и 0,5 - 2,5 · 10⁴/cm³ за квасце. 100 mm³ сваког инокулума се ресуспендује у 2000 mm³ физиолошког раствора и тиме добија коначна концентрација од 5 · 10⁶ CFU/cm³ за бактерије и 10³ CFU/cm³ за квасце. Део (10 mm³ - 5 · 10⁴ бактерија или 10 ћелија квасца) сваког соја инокулиран је у микроплоче са 96 бунарића. Коначна концентрација бактерија у сваком бунарићу је 5 · 10⁵ CFU/cm³ и 10² CFU/cm³ за квасце [95].

Деривати кумарина, као и њихови одговарајући паладијум(II)-комплекси растворени су у диметилсулфооксиду (DMSO), а затим разблажени физиолошким раствором до коначне концентрације диметилсулфооксида од 10% пре тестирања. Конценровани шток раствори припремају се тако што се 1 mg испитане супстанце раствори у 50 mm³ DMSO, затим се додаје 450 mm³ нормалног физиолошког раствора и тиме се добија коначна концентрација од 2000 μg/cm³. Комерцијални антибиотици, ванкомицин и цефтриаксон (Галеника а.д., Београд) растворени су у стерилном физиолошком раствору (Торлак, Београд).

3.4.2.2. Микродилуциона метода

Антимикробна активност испитивана је микродилуционом методом у складу са CLSI стандардима [96] изражена је као минимална инхибиторна концентрација (MIC) и минимална бактерицидна /микробицидна концентрација (MBC).

Суспензије директне колоније припремљене су коришћењем културе бујона преко ноћи. Густина суспензије подешавана је упоређивањем са 0,5 McFarland стандардом ($1 \cdot 10^8$ CFU/cm³). Двоструко серијско разблажење тестираних једињења припремљено је на микротитар плочи са 96 бунарића (у опсегу од 1000 до 15,625 µg/cm³) на инокулираном хранљивом бујону до коначне концентрације од $5,0 \cdot 10^5$ CFU/cm³ за сваки бактеријски сој. Плоче су прекривене пластичним поклопцем и инкубирани на 37°C током 18-24 сати, а инокулум квасца на 37°C током 48 сати. Након инкубације, узима се по 10 mm³ разблажења из сваког бунарића без видљивог раста и наноси на плоче са хранљивим агарима (Торлак, Београд, Србија) чиме се омогућује раст на 37°C преко ноћи. На овај начин утврђује се минимална бактерицидна/микробицидна концентрација (MBC/MMC) тестираних једињења. Најнижа концентрација тестираних једињења на агарској плочи, без видљивог бактеријског раста (нула колонија), дефинисана је као MBC/MMC. Стандардни комерцијални антибиотици, ванкомицин и цефтриаксон су коришћени као позитивна контрола. Поред тога, као контрола коришћени су бактеријски раст и раст квасца у присуству 5% DMSO. Концентрација DMSO је додатно смањена због двоструког серијског разблажења. Такође, у оквиру сваког испитивања рађени су тест бактеријске и гљивичне контаминације и тест хранљивих својстава (тест плодности).

MIC₉₀ дефинисана је као најмања концентрација испитаних супстанци која инхибирају видљив раст бактерија и квасца (нпр. нема замућености).

MIC₅₀ дефинисана је као највиша концентрација са видљивим растом бактерија и квасца (нпр. најмања замућеност).

MIC се дефинише као најмања концентрација тестираних једињења која инхибира видљиви раст сваког тестираног организма.

3.4.3. Интеракције паладијум(II)-комплекса

3.4.3.1. Интеракције комплекса са молекулом DNA

Афинитет везивања паладијум(II)-комплекса у молекулу DNA испитиван је применом апсорпционе и флуоресцентне спектроскопије. Ради поређења испитивани су и одговарајући платина(II)-комплекси [97].

Апсорпциона спектроскопија једна је од најкориснијих метода у проучавању везивања једињења са DNA [98]. Интеракција металних комплекса са базним паровима DNA праћена је хипохромном сменом са малим црвено/плавим померањем [99]. Хиперхромна смена може се приписати и спољашњем утицају (електростатичким интеракцијама) или капацитету комплекса за уклањање хеликолошке структуре DNA [100,101]. Хиперхромизам је примећен је у интеракцији многих лекова са DNA [102]. Обзиром да се испитивани паладијум(II)-комплекси приписују интралигандној π - π^* транзицији, апсорпциони врхови су на 276-280 nm. Повећање концентрације DNA повећава апсорбанцу паладијум(II)-комплекса. Ова повећана апсорбанца (хиперхромизам) указује на то да постоје јаке интеракције између комплекса и базних парова DNA [103]. Хиперхромизам може бити резултат везивања са молекулима који имају -ОН групу [104]. У двоструком хеликсу DNA постоје места за везивање водоника, па вероватно због тога -ОН група формира водоничне везе са DNA и тиме доводи до хиперхромизма. У циљу утврђивања јачине везивања комплекса паладијум(II) са СТ-DNA, одређивана је константа везивања комплекса, K_b , коришћењем података спектралне титрације и применом следеће једначине [105]:

$$\frac{[\text{DNA}]}{\varepsilon_a - \varepsilon_f} = \frac{[\text{DNA}]}{\varepsilon_b - \varepsilon_f} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_a - \varepsilon_f)};$$

где су: [DNA] - концентрација DNA у базним паровима, коефицијенти апсорпције ε_a , ε_f и ε_b одговарају апсорпцији комплекса ($A_{\text{obsd}}/\text{комплекс}$), коефицијенту екстинције за слободни

комплекс и коефицијенту екстинције комплекса у везаној форми. Константе везивања (K_b) за комплексе су израчунате из односа нагиба и пресека.

3,8-диамино-5-етил-6-фенилфенантридијумбромид (ЕВ) неспецифично интереагује са DNA и тиме емитује снажну флуоресценцију.

Да би потврдили везивни мод и упоредили афинитете везивања испитиваних комплекса, рађени су експерименти замене етидијум-бромида. Емисиони спектри ЕВ везани за СТ-DNA у одсуству и присуству комплекса паладијума(II) забележени су за $[EB] = 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, $[DNA] = 1,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ и повећавају се са концентрацијом сваког комплекса. Интензитет емисионог појаса ЕВ/DNK на 613 nm смањује се са повећањем концентрације комплекса. Ово смањење ЕВ флуоресценције (до 25% почетног интензитета флуоресценције) показује ривалитет комплекса са ЕВ у везивању са DNA. Гашење DNA-ЕВ флуоресценције за испитиване паладијум(II)-комплексе указује на то да у стању замене ЕВ из комплекса DNA-ЕВ, комплекси интерагују са СТ-DNA интеркалативним режимом. Параметар гашења одређује се према Стерн-Волмеровој (Stern-Volmer) једначини [106]:

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [\text{комплекс}] = 1 + K_{SV} [\text{комплекс}];$$

где су F_0 - интензитет емисије у одсуству комплекса, F - интензитет емисије у присуству комплекса, K_{SV} - Стерн-Волмерова константа гашења, K_q - бимолекуларна константа гашења, τ_0 - (10^{-8} s) [107] животни век флуорофора у одсуству гашења, $[\text{комплекс}]$ - концентрација комплекса. Вредност K_{SV} представља нагиб F_0/F плоче у односу на концентрацију комплекса.

3.4.3.2. Интеракције комплекса са серумом албумина (HSA)

Серум албумина (HSA) има важну улогу у транспорту биолошки активних једињења (лекова, природних производа, металних јона, комплекса метала итд.) у крви.

Везивање једињења за протеине крвне плазме може довести или до губитка или до побољшања биолошких особина првобитног једињења.

У циљу испитивања структурних промена које су настале на HSA након додавања паладијум(II)-комплекса (одређивањем константе везивања K_b и броја везивања (n) за комплекс формиран између паладијум(II)-комплекса и HSA) снимљени су апсорпциони и флуоресцентни спектри.

Промене у UV-Vis апсорпционим спектрима праћене су под симулираним физиолошким условима у присуству и одсуству паладијум(II)-комплекса у опсегу од 240-440 nm. Концентрација HSA је била фиксирана на $2,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$, док је концентрација комплекса варира од 0,0 до $15,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$. Интеракција HSA са поменутим комплексима испитивана је праћењем гашења флуоресценције HSA са повећањем концентрације паладијум(II)-комплекса. Мерења флуоресценције вршена су у опсегу од 300-450 nm након експлоатације на 295 nm. Обе, и експлоатациона и емисиона решетка се постављају на 10 nm. Експерименти флуоресцентне титрације су изведени са фиксном концентрацијом HSA ($2,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$) док се концентрација комплекса постепено повећава. Сва мерења су извршена на температури околине.

Подаци о интензитету флуоресценције такође, могу се користити да би се добила константа везивања, K_a и број места везивања, n . Када се мали молекули независно везују за скуп еквивалентних места на макромолекулу, равнотежа између слободних и везаних молекула представљена је једначином [103]:

$$\log (F_0-F)/F = \log K_a + \log[\text{комплекс}]$$

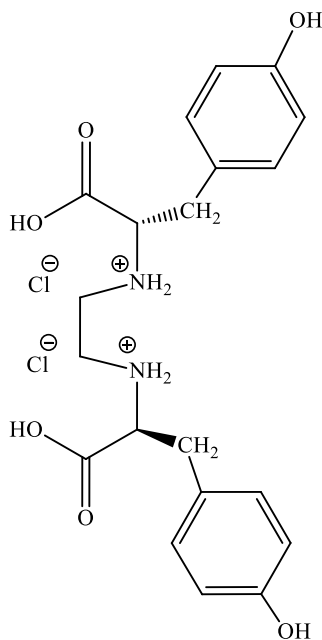
где су F_0 и F - интензитети флуоресценције у одсуству и присуству гашења, K_a - константа везивања или константа асоцијације за мале молекул-протеин интеракције, n - број места везивања по протеину, $[Q]$ - концентрација гашења. Вредности за K_a и n добијене су из пресека и нагиба $\log(F_0-F)/F$ плоче у односу на $\log(Q)$.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. Синтеза *O,O'*-диалкил естара (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине дихлорхидрата, R_2 -(*S,S*)-eddyr·2HCl и одговарајућих паладијум(II)-комплекса, [PdCl₂(R₂-(*S,S*)-eddyr)]

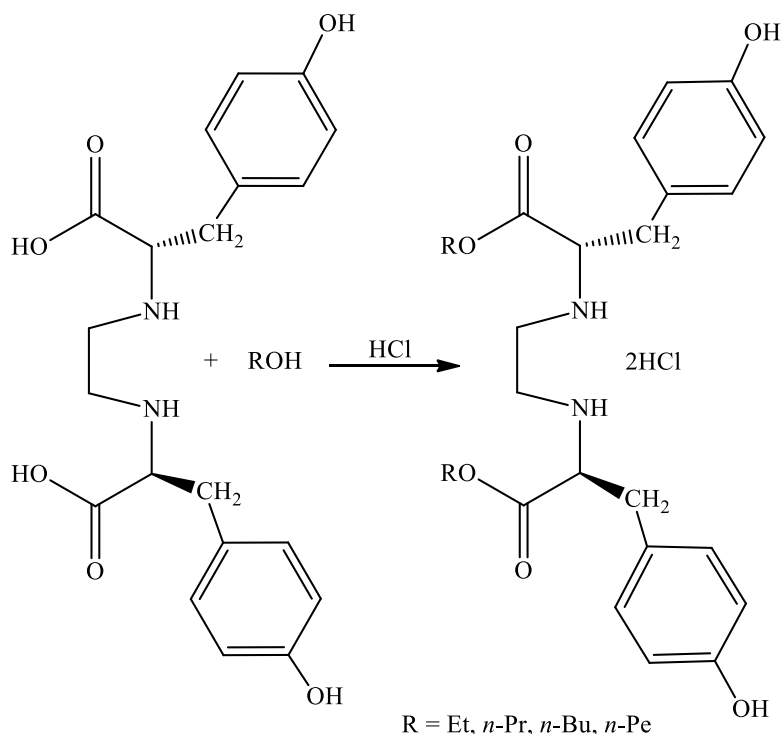
4.1.1. Синтезе лиганата и комплекса

У реакцији натријумове соли *S*-тирозина и 1,2-диброметана у молском односу 1:1 добијена је (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетна киселина. Подешавањем рН-вредности на 5 наведена киселина се таложи у облику соли, *zwitter* јона. Додавањем неколико капи концентроване хлороводоничне киселине добијена H₂-(*S,S*)-eddyr киселина се прекристалише, при чему се наведена киселина издваја као дихидрохлорид, H₂-(*S,S*)-eddyr·2HCl (Слика 32).



Слика 32. Структура (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине дихидрохлорида, (H₂-(*S,S*)-eddyr)·2HCl

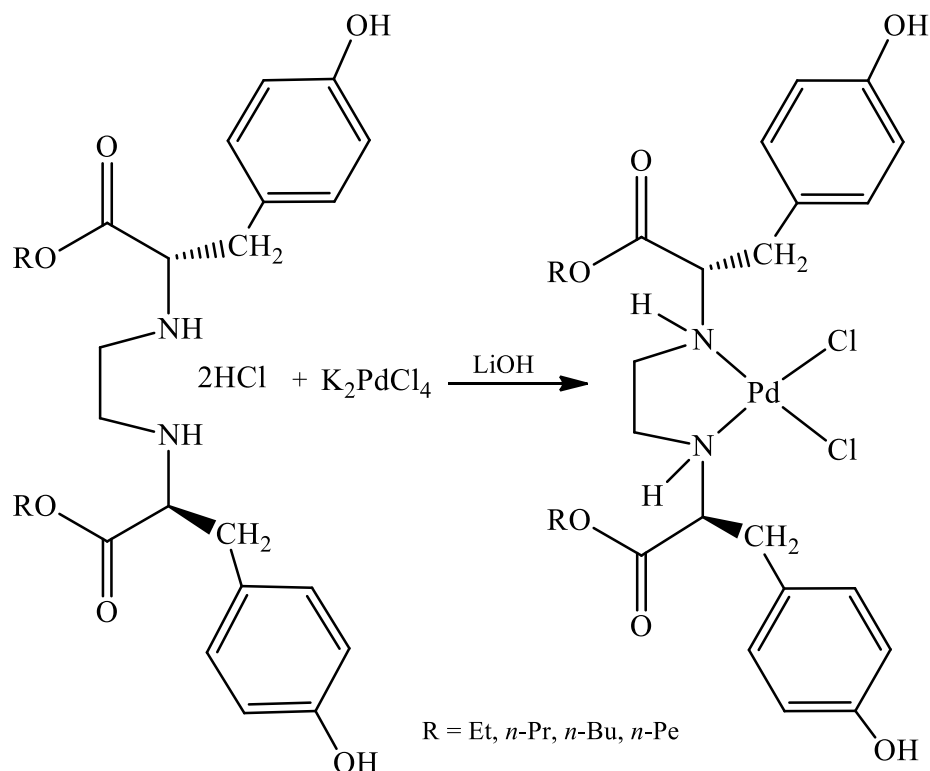
Естерификацијом добијене $H_2-(S,S)$ -eddyr·2HCl киселине наглађени су етил-, пропил-, бутил- и пентил-естри (S,S) -етилендиамин- N,N' -ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) сирћетне киселине (Шема 4).



Шема 4. Синтеза O,O' -диалкил естара (S,S) -етилендиамин- N,N' -ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине дихлорхидрата, $R_2-(S,S)$ -eddyr·2HCl

Синтетисани лиганди се делимично растварају у води, док се добро растварају у диметилсулфоксиду. Одговарајући комплекси паладијума(II) синтетисани су у реакцији између добијених естара $R_2-(S,S)$ -eddyr·2HCl и калијум-тетрахлоридопаладата(II) у молском односу 1:1 и уз додатак литијум-хидроксида (Шема 5). Синтетисани комплекси се растварају у диметилсулфоксиду.

Резултати елементарне микроанализе за наглађене лиганде и комплексе су у сагасности са израчунатим вредностима (експериментални део 3.1.2. за лиганде; 3.2.1. - 3.2.4. за паладијум(II)-комплексе).



Шема 5. Синтеза $[PdCl_2(R_2-(S,S)-eddyr)]$ комплекса

4.1.2. Инфрацрвена спектроскопија O,O' -диалкил естара (S,S) -етилендиамин- $-N,N'$ -ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине дихлорхидрата и одговарајућих паладијум(II)-комплекса

У Табели 5 приказане су најважније траке у инфрацрвеним спектрима изолованих $R_2-(S,S)$ -eddyr естара и њихових одговарајућих паладијум(II)-комплекса. Присуство трака у наведеним $[PdCl_2(R_2-(S,S)-eddyr)]$ комплексима које припадају валенционим вибрацијама секундарне амино групе у области од $3208-3226\text{ cm}^{-1}$ потврђују претпоставку да су $R_2-(S,S)$ -eddyr лиганди координовани за паладијум(II)-јон преко два атома азота. Такође, наведени $[PdCl_2(R_2-(S,S)-eddyr)]$ комплекси немају апсорпциону траку протонване амино

групе која је уочена у спектрима диалкил-естара, R_2 -(*S,S*)-eddyr и то на 3428 cm^{-1} за лиганд $\text{det}-(S,S)\text{-eddyr} \cdot 2\text{HCl}$, на 3419 cm^{-1} за $\text{dpr}-(S,S)\text{-eddyr} \cdot 2\text{HCl}$ лиганд и на 1413 cm^{-1} за $\text{dbu}-(S,S)\text{-eddyr} \cdot 2\text{HCl}$ и $\text{dpe}-(S,S)\text{-eddyr} \cdot 2\text{HCl}$ лиганде.

Табела 5. Важније траке у инфрацрвеним спектрима R_2 -(*S,S*)-eddyr · 2HCl лиганада и одговарајућим паладијум(II)-комплексима

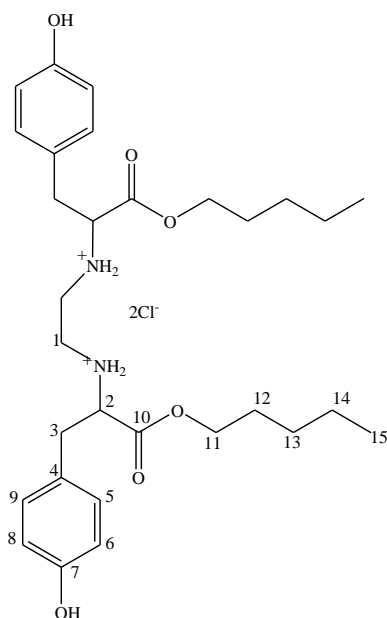
	$\nu(\text{C}=\text{O})$	$\nu(\text{C}-\text{O})$	$\nu(\text{CH}_3)$	$\nu(\text{R}-\text{NH}_2^+)$
$\text{det}-(S,S)\text{-eddyr} \cdot 2\text{HCl}$	1737	1229	2925	3208
$\text{dpr}-(S,S)\text{-eddyr} \cdot 2\text{HCl}$	1734	1227	2925	3211
$\text{dbu}-(S,S)\text{-eddyr} \cdot 2\text{HCl}$	1736	1242	2931	3220
$\text{dpe}-(S,S)\text{-eddyr} \cdot 2\text{HCl}$	1735	1235	2931	3226
$[\text{PdCl}_2(\text{det}-(S,S)\text{-eddyr})]$	1730	1241	2980	-
$[\text{PdCl}_2(\text{dpr}-(S,S)\text{-eddyr})]$	1729	1243	2967	-
$[\text{PdCl}_2(\text{dbu}-(S,S)\text{-eddyr})]$	1731	1242	2959	-
$[\text{PdCl}_2(\text{dpe}-(S,S)\text{-eddyr})]$	1732	1245	2957	-

Остале апсорпционе траке нађене су у истим областима за наведене паладијум(II)-комплексе, као и у полазним лигандима што указује да није дошло до координовања преко другог атома за паладијум(II)-јон, а то значи да координација није извршена преко кисеоникових атома карбоксилних група.

4.1.3. Нуклеарно-магнетно-резонанциона (^1H и ^{13}C) спектроскопија *O,O'*-диалкил естара (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине дихлорхидрата и одговарајућих паладијум(II)-комплекса

^1H и ^{13}C NMR спектроскопски подаци за $[\text{PdCl}_2(R_2-(S,S)\text{-eddyr})]$ комплексе потврђују претпоставку да је координовање лиганада за паладијум(II)-јон извршено преко два атома азота из *O,O'*-диалкил естара (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине. Координовање доводи до померања (до 0,9 ppm) етилендиаминског моста у спектрима поменутих комплекса и тиме јасно указује на координацију преко атома

азота. Нумерација атома у ^1H и ^{13}C NMR спектрима синтетисаних естара дата је на Слици 33.



Слика 33. Нумерација атома у ^1H и ^{13}C NMR спектрима синтетисаних естара

Синглет на око 9,3 ppm, потиче из -ОН групе из остатка аминокиселине, тирозина у ^1H NMR спектрима $[\text{PdCl}_2(\text{R}_2\text{-}(S,S)\text{-eddyr})]$ комплекса указује на то да нема координовања преко атома кисеоника из ове групе са паладијум(II)-јоном. Сигнали за метил протоне су пронађени у распону од 0,72-1,03 ppm за $[\text{PdCl}_2(\text{R}_2\text{-}(S,S)\text{-eddyr})]$ комплексе. Широки сигнали атома водоника који припадају секундарним amino групама, у ^1H NMR спектрима налазе се између 4,7-5,1 ppm за $[\text{PdCl}_2(\text{R}_2\text{-}(S,S)\text{-eddyr})]$ комплексе. Померање на око 170 ppm у ^{13}C NMR спектрима поменутих комплекса указује на присуство угљениковог атома у оквиру естарске -COOR групе, као и на то да кисеоник из поменуте групе није учествовао у координовању.

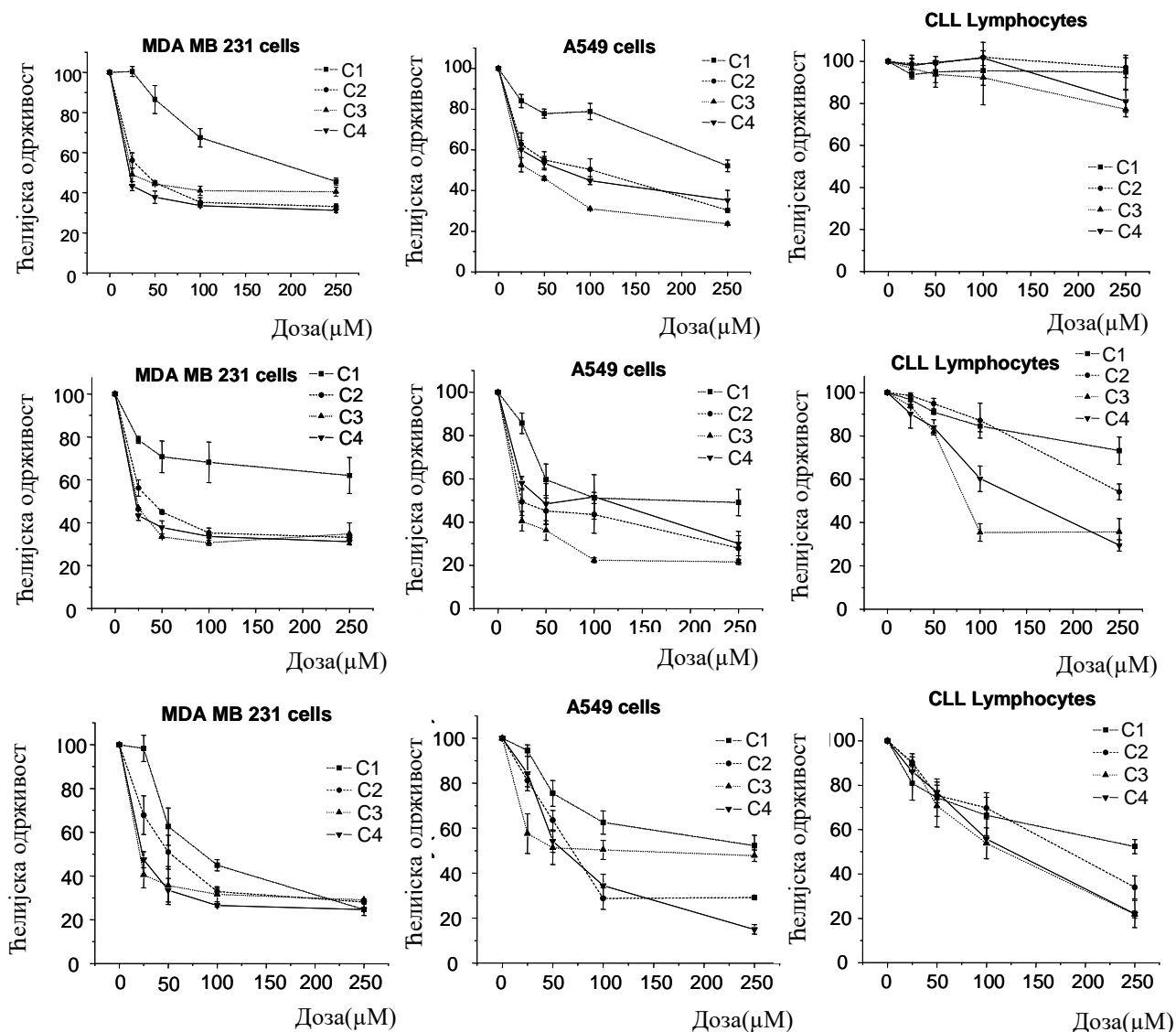
Координовањем $\text{R}_2\text{-}(S,S)\text{-eddyr}$ лиганата за паладијум(II)-јон оба асиметрична угљеникова атома задржавају S апсолутну конфигурацију. Истовремено, азотови атоми из етилендиаминског прстена координовањем постају асиметрични. Услед тога могуће је очекивати три диастереоизомера: (R,R) , (S,S) и (R,S) . Да би се утврдило који изомер или изомери су формиран и коришћени су квантни хемијски прорачуни [108].

Израчунавања су показала да је (*R,R*) диастереоизомер (конфигурација N атома) структурно прихватљив за све комплексе.

Резултати NMR спектроскопије показују присуство само једног изомера [108] и DFT израчунавања могу указати на то да се (*R,R*) конфигурација N атома може доделити овом изомеру. Обзиром да постоји скуп сигнала у NMR спектрима поменутих комплекса, претпостављамо да је структура комплекса иста као у претходно испитиваним комплексима [108].

4.1.4. Резултати *in vitro* антитуморске активности R_2 -(*S,S*)-eddyr лиганада и одговарајућих паладијум(II)-комплекса према циљаним малигним ћелијама

In vitro антитуморска активност R_2 -(*S,S*)-eddyr лиганада и одговарајућих паладијум(II)-комплекса испитивана је на три различите ћелијске линије: хумани карцином дојке (MDA-MB-231 ћелијске линије), хумани карцином плућа (A549 ћелијске линије) и према ћелијама хроничне лимфоцитне леукемије (CLL). Способност преживљавања испитиваних малигнућих ћелија, 6h, 24h и 48h након третмана са повећањем концентрација комплекса приказана је на Слици 34. Резултати ових експеримената приказани су у Табели 6 као IC_{50} вредности (концентрација једињења која доводи до смањења преживљавања малигнућих ћелија за 50 %), одређене МТТ тестом.



Слика 34. Способност преживљавања ћелијских линија MDA-MB-231, A549 и CLL ћелија хроничне лимфоцитне леукемије 6h, 24h и 48h после третмана различитим концентрацијама испитиваних паладијум(II)-комплекса одређивана MTT тестом. Резултати експеримената приказани су као проценат контроле (Средња вредност ± SD)

Табела 6. IC₅₀ (μM) вредности за испитиване комплексе и лиганде, 6h, 24h и 48h након третмана MDA-MB-231, A549 и CLL на ћелијама лимфоцитне леукемије, одређене МТТ тестом

MDA-MB-231			
испитивана једињења	6 h	24 h	48 h
[PdCl ₂ (det-(S,S)-eddyr)]	217 ± 3	252 ± 38	135 ± 4
[PdCl ₂ (dpr-(S,S)-eddyr)]	362 ± 59	70 ± 7	72 ± 11
[PdCl ₂ (dbu-(S,S)-eddyr)]	28 ± 31	31 ± 12	36 ± 20
[PdCl ₂ (dpe-(S,S)-eddyr)]	51 ± 10	39 ± 17	18 ± 13
det-(S,S)-eddyr · 2HCl	1017 ± 887	213 ± 13	225 ± 10
dpr-(S,S)-eddyr · 2HCl	529 ± 139	176 ± 19	203 ± 11
dbu-(S,S)-eddyr · 2HCl	162 ± 62	142 ± 18	132 ± 12
dpe-(S,S)-eddyr · 2HCl	211 ± 96	205 ± 16	197 ± 13
A549			
	6 h	24 h	48 h
[PdCl ₂ (det-(S,S)-eddyr)]	278 ± 28	212 ± 38	244 ± 33
[PdCl ₂ (dpr-(S,S)-eddyr)]	104 ± 17	84 ± 27	109 ± 10
[PdCl ₂ (dbu-(S,S)-eddyr)]	14 ± 12	21 ± 18	131 ± 94
[PdCl ₂ (dpe-(S,S)-eddyr)]	76 ± 47	77 ± 48	94 ± 9
det-(S,S)-eddyr · 2HCl	388 ± 88	247 ± 33	351 ± 94
dpr-(S,S)-eddyr · 2HCl	281 ± 5	121 ± 15	195 ± 20
dbu-(S,S)-eddyr · 2HCl	171 ± 12	131 ± 20	257 ± 36
dpe-(S,S)-eddyr · 2HCl	340 ± 69	177 ± 18	318 ± 49
CLL lymphocytes			
	6 h	24 h	48 h
[PdCl ₂ (det-(S,S)-eddyr)]	2077 ± 339	503 ± 156	266 ± 22
[PdCl ₂ (dpr-(S,S)-eddyr)]	1623 ± 241	275 ± 26	181 ± 9
[PdCl ₂ (dbu-(S,S)-eddyr)]	586 ± 140	156 ± 7	138 ± 9
[PdCl ₂ (dpe-(S,S)-eddyr)]	660 ± 151	165 ± 14	143 ± 14
det-(S,S)-eddyr · 2HCl	2778 ± 207	1668 ± 516	2305 ± 761
dpr-(S,S)-eddyr · 2HCl	7345 ± 14	328 ± 32	279 ± 7
dbu-(S,S)-eddyr · 2HCl	1733 ± 118	1467 ± 802	418 ± 142
dpe-(S,S)-eddyr · 2HCl	1180 ± 117	1015 ± 523	951 ± 195

Испитивана једињења су показала цитотоксичне ефекате према тестираним ћелијским линијама и ти ефекти су зависили од дозе испитиваних једињења. Коefицијенти корелације били су већи од 0,7 (од 0,713 до 0,988) на третираним ћелијским линијама и CLL ћелијама хроничне лимфоцитне леукемије. Комплекси паладијума и лиганди узроковали су значајно смањење преживљавања ћелија у зависности од дозе 6 сати након третмана.

IC₅₀ вредности комплекса су неколико пута ниже од вредности одговарајућих лиганда (Табела 6) за MDA-MB-231 и A549 ћелијске линије. Међутим, продужена инкубација испитиваних једињења није показала значајан ефекат (6h на супрот 24h и 6h у односу на 48h, p>0,05), тако да цитотоксичност очигледно није зависила од времена за MDA-MB-231 и A549 ћелијске линије.

С друге стране, нижа антитуморска активност комплекса и лиганда према CLL ћелијама у поређењу са хуманим ћелијским линијама добијена је 6 сати након инкубације. Смањење преживљавања ћелија такође је зависило од дозе. Поред тога, добијени резултати указују на то да је цитотоксичност паладијумових комплекса и лиганда зависила од времена код CLL ћелија хроничне лимфоцитне леукемије. Наиме, IC₅₀ вредност за CLL ћелије хроничне лимфоцитне леукемије одређивне у присуству повећане концентрације [PdCl₂(dbu-(S,S)-eddyr)] комплекса и након 6h била је 586 ± 141 μM, након 24h 156 ± 7 μM и након 48h 138 ± 9 μM (p <0,05). Комплекси [PdCl₂(dpe-(S,S)-eddyr)], а посебно [PdCl₂(dbu-(S,S)-eddyr)] су показали највећу антитуморску активност према свим третираним ћелијама. Комплекс [PdCl₂(det-(S,S)-eddyr)] показује неколико пута нижу цитотоксичност од [PdCl₂(dbu-(S,S)-eddyr)] и [PdCl₂(dpe-(S,S)-eddyr)] комплекса. Значајна разлика у активности [PdCl₂(dpr-(S,S)-eddyr)] и [PdCl₂(dbu-(S,S)-eddyr)] комплекса није запажена. Тај цитотоксични ефекат евидентан је након 6 сати инкубације за ћелијске линије хуманог карцинома MDA-MB-231 и A541, искључујући CLL ћелије, које морају бити инкубирани најмање 24 часа. Испитивања су показала да поменути комплекси имају већу антитуморску активност од лиганда.

4.1.5. Микробиолошка активност *O,O'*-диалкил естара (S,S)-етилендиамин-*-N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине дихлорхидрата и одговарајућих паладијум(II)-комплекса

У Табели 7 су приказани резултати *in vitro* испитивања антибактеријске активности R₂-(S,S)-eddyr лиганда и њихових паладијум(II)-комплекса. Ради поређења приказани су и резултати одговарајућих платина(II)-комплекса [97].

Табела 7. Антибактеријска активност ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) испитиваних лиганата и одговарајућих паладијум(II) и платина(II)-комплекса

лиганди и одговарајући комплекси		BC		EC		SA		PA		EF		SE
		ref	cli	ref	cli	ref	cli	ref	cli	ref	cli	ref
det-(S,S)-eddyr-2HCl	MIC	$>10^3$	10^3	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	10^3	500	$>10^3$	$>10^3$
	MBC	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$
[PdCl ₂ (det-(S,S)-eddyr)]	MIC	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	10^3	10^3	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$
	MBC	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	10^3	10^3	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$
[PtCl ₂ (det-(S,S)-eddyr)]	MIC	$>10^3$	$>10^3$	10^3	$>10^3$	10^3	$>10^3$	10^3	$>10^3$	$>10^3$	10^3	$>10^3$
	MBC	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$
dpr-(S,S)-eddyr-2HCl	MIC	$>10^3$	10^3	$>10^3$	$>10^3$	500	$>10^3$	$>10^3$	10^3	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$
	MBC	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$
[PdCl ₂ (dpr-(S,S)-eddyr)]	MIC	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	10^3	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$
	MBC	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$
[PtCl ₂ (dpr-(S,S)-eddyr)]	MIC	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	10^3	$>10^3$	10^3	$>10^3$	10^3	500	$>10^3$
	MBC	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	10^3	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	10^3	10^3	$>10^3$
dbu-(S,S)-eddyr-2HCl	MIC	$>10^3$	10^3	10^3	$>10^3$	10^3	$>10^3$	$>10^3$	10^3	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$
	MBC	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$
[PdCl ₂ (dbu-(S,S)-eddyr)]	MIC	10^3	10^3	$>10^3$	10^3	10^3	10^3	10^3	10^3	$>10^3$	125	10^3
	MBC	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	10^3	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	500	$>10^3$
[PtCl ₂ (dbu-(S,S)-eddyr)]	MIC	10^3	500	$>10^3$	$>10^3$	10^3	10^3	10^3	$>10^3$	10^3	500	$>10^3$
	MBC	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	10^3	$>10^3$
dpe-(S,S)-eddyr-2HCl	MIC	$>10^3$	10^3	$>10^3$	10^3	10^3	$>10^3$	$>10^3$	10^3	10^3	500	$>10^3$
	MBC	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	10^3	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	500	$>10^3$
[PdCl ₂ (dpe-(S,S)-eddyr)]	MIC	10^3	10^3	10^3	10^3	10^3	10^3	10^3	10^3	10^3	500	$>10^3$
	MBC	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	10^3	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$
[PtCl ₂ (dpe-(S,S)-eddyr)]	MIC	10^3	500	$>10^3$	$>10^3$	10^3	10^3	500	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$
	MBC	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	10^3	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$	$>10^3$

BC - *Bacillus cereus* ATCC 10876, EC - *Escherichia coli* ATCC 25922, SA - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, PA - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, EF - *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, SE - *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *enteritidis* ATCC 13076

Испитивана једињења показују умерену активност према грам(+) бактеријама, док према грам(-) бактеријама показују слабу активност. Антибактеријска активност према грам(+) бактеријама била је у опсегу концентрација: MIC/MBC= 125-1000/500-1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, док је референтни антибиотик ванкомицин показао следећи ефекат MIC/MBC = $<15,625-31,25/<15,625-250$ $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ (Табела 8). Лиганди су показали највећу активност према клиничким и референтним сојевима бактерија *Enterococcus faecalis* и *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 у опсегу концентрација MIC/MBC = 500/500-1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Табела 8. Антибактеријска активност ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) антибиотика

Бактеријске врсте	Ванкомицин		Цефтриаксон	
	МИС	МВС	МИС	МВС
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	31,25	250	250	>1000
<i>Bacillus cereus</i> , clinical strain	<15,625	<15,625	31,25	31,25
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	500	>1000	<15,625	<15,625
<i>Escherichia coli</i> , clinical strain	500	500	62,5	62,5
<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 25923	<15,625	<15,625	<15,625	62,5
<i>Staphylococcus aureus</i> , clinical strain	<15,625	<15,625	31,25	62,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , ATCC 27853	250	>1000	500	>1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , clinical strain	500	>1000	15,625	31,25
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<15,625	62,5	500	1000
<i>Enterococcus faecalis</i> , clinical strain	<15,625	31,25	>1000	>1000
<i>Salmonella enterica subspecies enterica serovar enteritidis</i>	250	250	<15,625	<15,625

Комплекси паладијума(II) и платине(II) показали су највећу активност према клиничкој врсти *Enterococcus faecalis* ([PdCl₂(dbu-(S,S)-eddyr)] MIC/MBC = 125/500 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$; [PdCl₂(dpe-(S,S)-eddyr)] MIC/MBC = 500/>1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$; [PtCl₂(dpr-(S,S)-eddyr)] MIC/MBC = 500/1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ и [PtCl₂(dbu-(S,S)-eddyr)] комплекс MIC/MBC = 500/1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$). Платина(II) комплекси показали су већу активност у односу на клиничку врсту *Bacillus cereus* ([PtCl₂(dbu-(S,S)-eddyr)] MIC/MBC = 500/>1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ и [PtCl₂(dpe-(S,S)-eddyr)] MIC/MBC = 500/>1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) у поређењу са комплексима паладијума(II). Грам(-) бактерије показале су већу отпорност. Само [PtCl₂(dpe-(S,S)-eddyr)] комплекс показао је анти-бактеријски ефекат према соју бактерије *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853 (MIC /MBC = 500/>1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$).

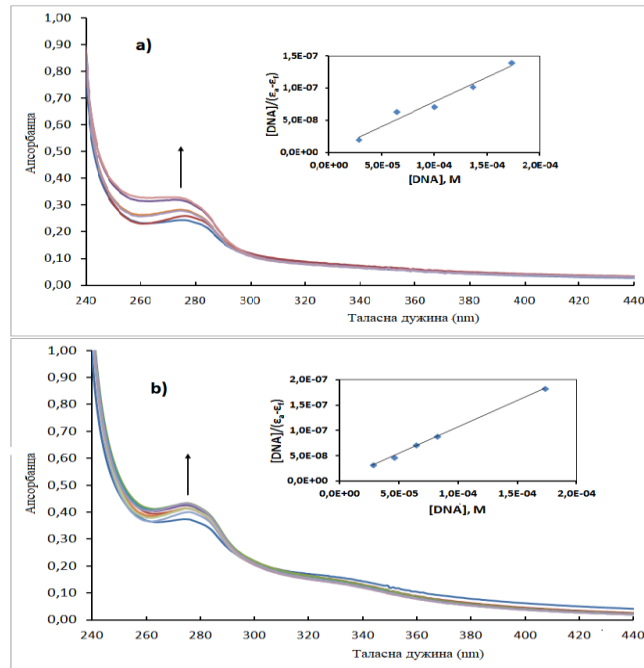
Референтни и клинички сојеви бактерија *Escherichia coli* и *Salmonella enterica subspecies enterica serovar enteritidis* показали су најмању осетљивост, где испитивана једињења у највећој концентрацији (1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) нису показала MIC/MBC ефекте. Закључак ових испитивања је да поменути комплекси показују више инхибиторних ефеката од одговарајућих лиганда.

4.1.6. Интеракције [PdCl₂(R₂-(S,S)-eddyr)] комплекса са молекулом CT-DNA

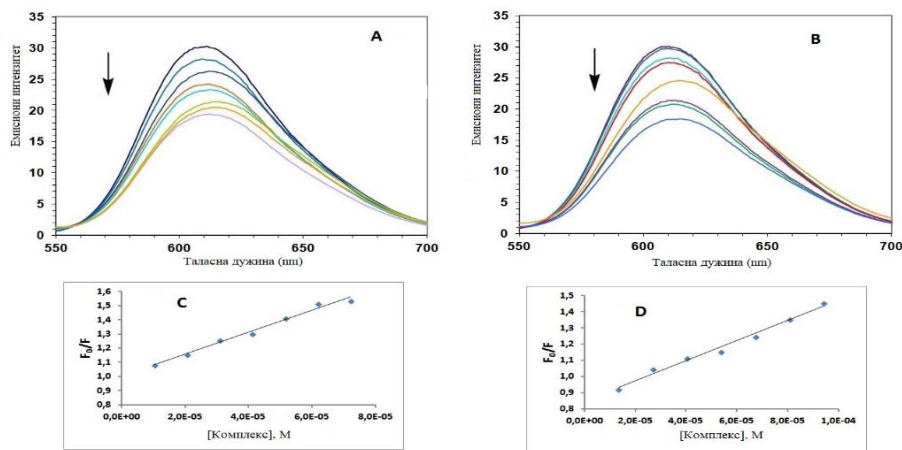
Константе везивања (K_b) за паладијум(II)-комплексе израчунате су из односа нагиба и пресека (Слика 35). Ради поређења дате су и вредности константи везивања (K_b) за одговарајуће платина(II)-комплексе [97]. Вредности константи везивања биле су: 4,91; 8,17; 9,45; 11,4; 3,45; 7,45; 8,13 и 9,35) · 10⁴ dm³/mol за све комплексе (C1-C8). Из добијених резултата утврђено је да се комплекси [PdCl₂(dpe-(S,S)-eddyr), C8 и [PtCl₂(dpe-(S,S)-eddyr), C4 снажно везују за CT-DNA у поређењу са преосталим комплексима, услед присуства алкил група са већим бројем угљеникових атома. Ове вредности су у сагласности са онима који су добро успостављене везивањем жлеба, а не класичном интеркалацијом [109]. Константна везивања (K_b) за платина(II)-комплексе је нешто већа него за паладијум(II)-комплексе, што указује на јачу способност везивања платина(II)-комплекса за молекул CT-DNA.

Емисиони спектри EB везаног за CT-DNA у одсуству и присуству комплекса паладијума(II) или платине(II) су забележени за [EB] = 1,2 · 10⁻⁵ mol/dm³, [DNA] = 1,8 · 10⁻⁵ mol/dm³ повећавајући количину сваког комплекса. Интензитет емисионог опсега система EB/DNA на 613 nm смањује се са повећањем концентрације комплекса (Слика 36). Ово смањење EB флуоресценције (до 25% почетног интензитета флуоресценције EB-DNA) (Слика 36) показује ривалитет комплекса са EB у везивању са DNA. Гашење DNA-EB флуоресценције за комплексе C1-C8 указује да поменути комплекси могу заменити EB из комплекса DNA-EB, као и да су могуће интеракције са CT-DNA интеркалативним начином.

Вредност константе гашења, K_{sv} добија се из нагиба плоче F_0/F и [комплекса]. Слика 36 приказује Стерн-Волмерове плоче (C) за C4 комплекс и (D) за C8 комплекс. Вредности константе гашења (K_{sv}) биле су: 4,65; 6,60; 7,33; 7,72; 2,40; 4,39; 5,95 и 6,29 · 10³ dm³/mol за комплексе C1-C8. Израчунате константе показују да се сви комплекси могу везати између парова базе DNA и да се комплекси платине(II) снажније могу везивати за DNA од паладијум(II)-комплекса. Ови резултати су у складу са подацима о апсорпцији.



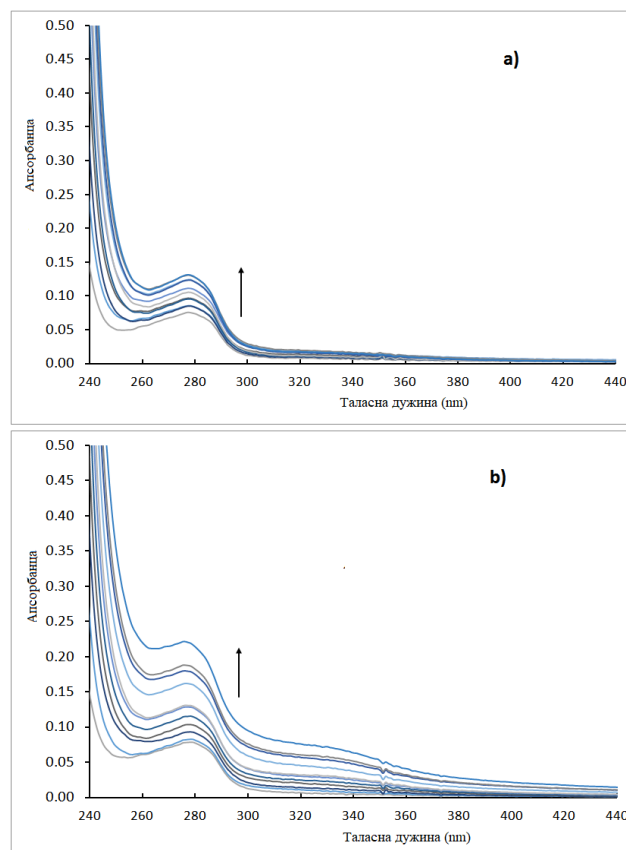
Слика 35. Електронски спектри комплекса **C4** (a) и **C8** (b) у *tris*-HCl пуферу након додавања CT-DNA. $[C4 \text{ комплекс}] = 4,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, $[C8 \text{ комплекс}] = 6,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, $[DNA] = 0 - 1,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$



Слика 36. Емисиони спектри (A, B) CT-DNA-EB система у *tris*-HCl пуферу након титрације комплекса **C4** (A) и **C8** (B). $[EB] = 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, $[DNA] = 1,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, $[\text{комплекс}] = 0 - 1,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$

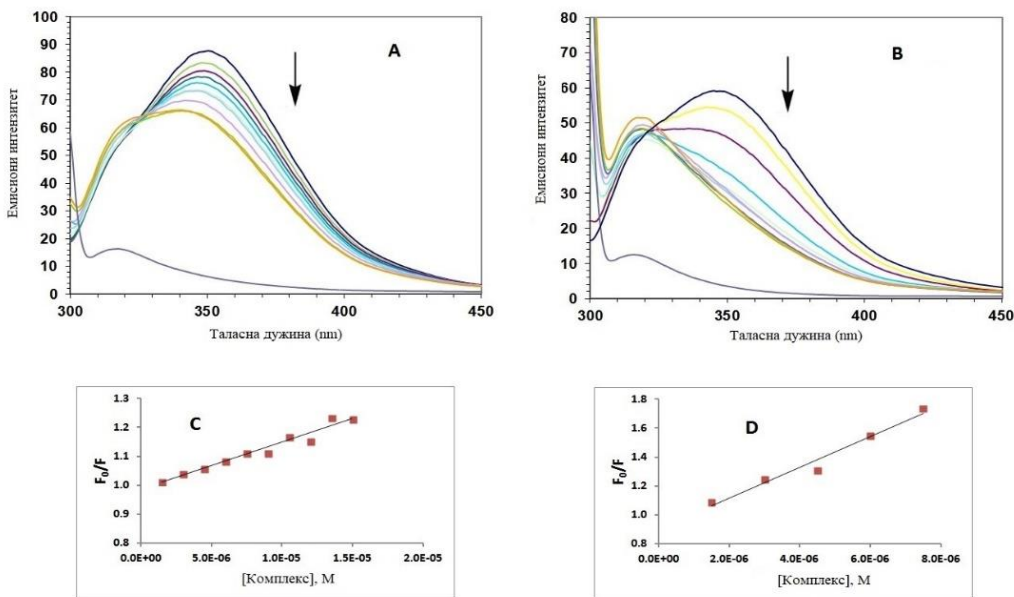
4.1.7. Интеракције $[\text{PdCl}_2(\text{R}_2\text{-}(S,S)\text{-eddyr})]$ -комплекса са серумом албумина, HSA

У циљу испитивања структурних промена које су се догодиле у серуму албумина, HSA након додавања комплекса паладијума(II), као и одређивања константи везивања (K_b) и броја места везивања (n) за комплексе формиране између паладијум(II)-комплекса и серума албумина, HSA снимали смо апсорпционе и флуоресцентне спектре. Такође су ради поређења снимљени апсорпциони и флуоресцентни спектри за одговарајуће платина(II)-комплексе [97]. UV-Vis апсорпциони спектри система HSA-комплекс (Слика 37) снимани су под симулираним физиолошким условима.



Слика 37. Апсорпциони спектри (a, b) HSA ($2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$), са различитим количинама C4 (a) и C8 (b) комплекса ($0 - 15 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$) на собној температури

Интензитет апсорпције на 280 nm прогресивно расте (Слика 37) са додавањем паладијум(II) или платина(II)-комплекса, што указује да се комплекс формирао између паладијум(II) или платина(II)-комплекса и HSA и да се полипептидни ланац, HSA сукцесивно повећава додавањем комплекса. HSA има слабу апсорпцију на 280 nm због лакоће кумулативне апсорпције остатака три ароматичне аминокиселине (trp, tyr, phe) [106]. Резултати су указали да су остаци ароматичних аминокиселина промењени и да је терцијарна структура HSA оштећена. Добијени резултати потврђују да је интеракција између паладијум(II) или платина(II)-комплекса HSA вероватно био статички процес гашења. Интеракција паладијум(II) и платина(II)-комплекса са серумом албумина, HSA такође је праћена проучавањем гашења флуоресценције HSA са повећањем концентрације паладијум(II) или платина(II)-комплекса. Тако су емисиони спектри HSA у присуству различитих концентрација паладијум(II) или платина(II)-комплекса забележени у опсегу таласних дужа од 300-450 nm поред ексцитације протеина на 295 nm. Репрезентативни флуоресцентни емисиони спектри су приказани на Слици 38.



Слика 38. Утицај C4 (A) и C8 (B) комплекса на флуоресцентни спектар HSA на собној температури, $[HSA] = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$, $[\text{комплекс}] = 0 - 15 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$. Стерн-Волмерова плоча F_0/F према $[\text{комплекса}]$ у флуоресцентном гашењу HSA система (C, D) у комплексу C4 (C) и у комплексу C8 (D)

Са слике се може видети да се у свим случајевима интензитети флуоресценције HSA смањују са повећањем концентрације паладијум(II) и платина(II) комплекса, што указује на везивање комплекса за HSA. Међутим, максимална таласна дужина емисије HSA се благо помера (око 2 nm) након додавања комплекса, па се на основу остатака из триптофана [106] може закључити да се не излажу било којој промени поларитета, а интеракција може настати преко хидрофобне регије која се налази унутар HSA. Одговарајуће константе гашења, Стерн-Волмерове K_{SV} и константе брзине гашења K_q дате су у Табели 9.

Табела 9. Константе гашења (K_{SV}), константе везивања (K_a), места везивања (n) у систему HSA-комплекс (C1-C8)

Систем	$K_{SV} \cdot 10^4$ (dm ³ /mol)	$K_q \cdot 10^{12}$ (dm ³ /mol·s)	$K_a \cdot 10^5$ (dm ³ /mol)	n
HSA-C1	3,96	3,96	0,79	1,06
HSA-C2	1,47	1,47	1,07	1,11
HSA-C3	2,44	2,44	1,42	1,16
HSA-C4	2,90	2,90	2,12	1,23
HSA-C5	5,58	5,58	0,59	0,99
HSA-C6	7,59	7,59	0,96	1,00
HSA-C7	9,33	9,33	1,06	1,04
HSA-C8	10,70	10,70	1,85	1,08

Као што је приказано у Табели 9, добијене бимолекуларне константе гашења (K_q) C1-C8 комплекса су по редоследу $10^{12} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ и веће су од максималне вредности за дифузно контролисано гашење (тј. $2,0 \cdot 10^{10} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), [110] чиме показују да гашење није изазвано динамичким већ статичким гашењем формирања комплекса.

Израчуната вредности за места везивања, n је око 1 (Табела 9) за све комплексе, што указује на постојање само једног везујућег места у HSA за све комплексе. Из вредности K_a се закључује да комплекс C4 интерагује са HSA јаче од осталих комплекса.

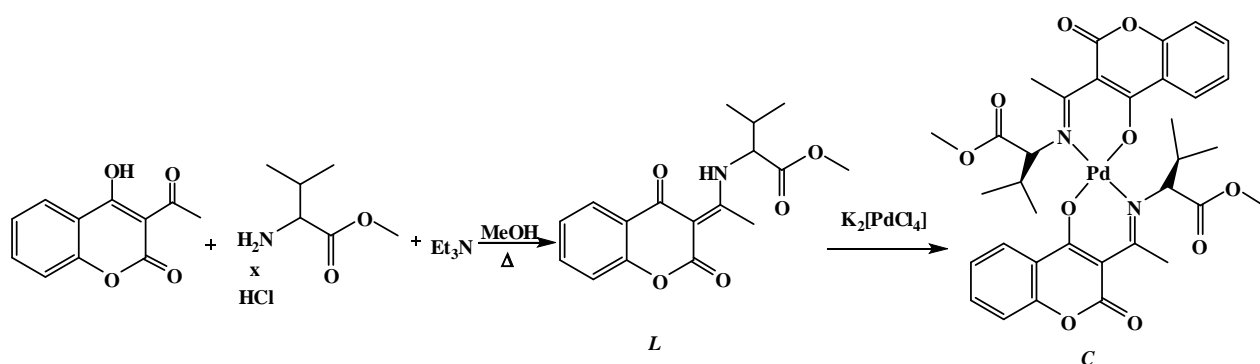
Вредности K_a и n прате редослед: за платина(II)-комплексе; C4 ($2,12 \cdot 10^5 \text{ dm}^3/\text{mol}$, **1,23**) > C3 ($1,42 \cdot 10^5 \text{ dm}^3/\text{mol}$, **1,16**) > C2 ($1,07 \cdot 10^5 \text{ dm}^3/\text{mol}$, **1,11**) > C1 ($0,79 \cdot 10^5 \text{ dm}^3/\text{mol}$, **1,06**) и за паладијум(II) комплексе; C8 ($1,85 \cdot 10^5 \text{ dm}^3/\text{mol}$, **1,08**) > C7 ($1,06 \cdot 10^5 \text{ dm}^3/\text{mol}$, **1,04**) > C6

($0,96 \cdot 10^5 \text{ dm}^3/\text{mol}$, **1,00**) > **C5** ($0,59 \cdot 10^5 \text{ dm}^3/\text{mol}$, **0,99**). Вредности за n су повезане са константама везивања K_a , обзиром да постоји директна веза између константе везивања и броја везујућих места [111]. Константе везивања (K_a) добијене за платина(II)-комплексе су више од константи добијене за паладијум(II)-комплексе, што указује на јачу способност платина(II)-комплекса да се везују за HSA.

4.2. Синтезе деривата кумарина и одговарајућих комплекса паладијума(II)

4.2.1. Синтеза лиганда метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]бутаноата и одговарајућег паладијум(II)-комплекса

Рефлуктовањем смеше 3-ацетил-4-хидрокси кумарина, хидрохлорида метил естра *S*-валина и триметиламина (Шема 9) током 2 сата, упаравањем растварача до половине своје запремине и додавањем 5 cm^3 воде, добијен је лиганд метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]бутаноат. Комплекс, *bis*{метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)-метил)]бутаноато}-паладијум(II) добијен је директном реакцијом калијум-тетрахлоридопаладата(II) и претходно синтетисаног лиганда у молском односу 1:2 (Шема 6).



Шема 6. Синтеза метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]-бутаноата и *bis*{метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)-3-метил]}-бутаноато}-паладијум(II)-комплекса

Резултати елементалне микроанализе за награђени лиганд и комплекс су у сагасности са израчунатим вредностима (експериментални део 3.1.3.1. за лиганд; 3.2.9. за паладијум(II)-комплекс).

4.2.1.1. Инфрацрвена спектроскопија метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]бутаноата и одговарајућег паладијум(II)-комплекса

У IR спектру лиганда, метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]бутаноата уочене су карактеристичне траке на 3467 и 3210 cm^{-1} за NH групу, на 1743 cm^{-1} за карбонилну групу из COOCH_3 и на 1706 cm^{-1} за карбонилну групу из 2,4-диоксохроманског дела. IR спектрални подаци добијеног паладијум(II)-комплекса показали су значајне разлике у поређењу са лигандом. Вибрација вретена NH групе у лиганду није присутна у комплексу. Такође, уочене су траке на 1606 cm^{-1} и 463 cm^{-1} које потичу од C=N и Pd-N веза и својим присуством указују да атом азота учествује у координацији (Табела 10). Присуство трака на 526 cm^{-1} која потиче од везе Pd-O и идентификованог кумарин-лактонског померања на 1708 cm^{-1} указују да формирање паладијум(II)-комплекса изазива трансформацију лиганда из енамино у имино облик.

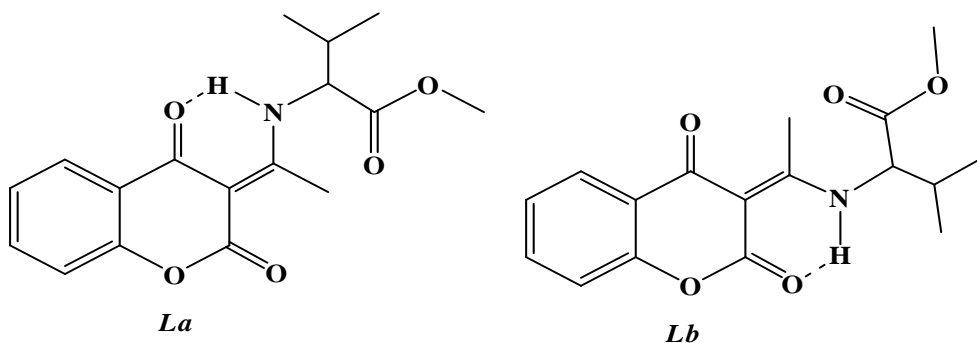
Табела 10. Карактеристичне групе и њихова померања у IR спектима за лиганд и комплекс

Једињења	$\nu(\text{cm}^{-1})$				
	NH	C=O	C=N	Pd-O	Pd-N
<i>L</i>	3467 и 3210	1706	/	/	/
<i>C</i>	/	1708	1606	526	463

4.2.1.2. Нуклеарно-магнетно-резонанционна (^1H и ^{13}C) спектроскопија метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]бутаноата и одговарајућег паладијум(II)-комплекса

У ^1H NMR спектру лиганда сигнали 2,4-диоксохроманских протона (четири ароматична протона) појавили су се на 7,25 ppm (мултиплети од CH и CH7), 7,53 ppm (дублет-дублета од CH8) и на 8,07 ppm (дублет од CH5). Метил протони са C1' угљениковог атома показују синглет на 2,70 ppm, док је синглет из COOCH₃ забележен на 3,87 ppm.

Померања NH групе на 12,62 ppm и 14,74 ppm, показала су да једињење *L* у раствору хлороформа постоји у два облика. На основу односа интеграла (0,82 : 0,18), стабилнији изомер *La* (структура са водоничном везом између NH протона и C4 атома карбонилне групе) показао је померање NH протона на 14,74 ppm за разлику од изомера *Lb* (структура са водоничном везом између NH протона и C2 атома карбонилне групе) (Слика 39).



Слика 39. Структуре изомера *La* и *Lb*

У ^{13}C NMR спектру, C1' угљеников атом уочава се на 176,01 ppm, док је метил угљеников атом, везан за C1' забележен на 18,70 ppm. Две карбонилне групе из 2,4-диоксохроманског остатка, лактона и кетона, налазе се на 165,94 ppm и 182,64 ppm. Хемијска померања шест ароматичних угљеника уочена су на: 116,46 ppm (C8), 123,51 ppm (C6), 126,05 ppm (C5), 128,95 ppm (C10), 133,94 ppm (C7) и 153,09 ppm (C9), док се C3 угљеников атом налази на 98,87 ppm. Угљеников атом карбонилне групе из метилестра, као

и угљеников атом са C1'' положаја, налазе се на 170,59 ppm и 52,48 ppm. Основни врх у MS спектру на 258 m/z одговара M-COONH₃ јонском фрагменту.

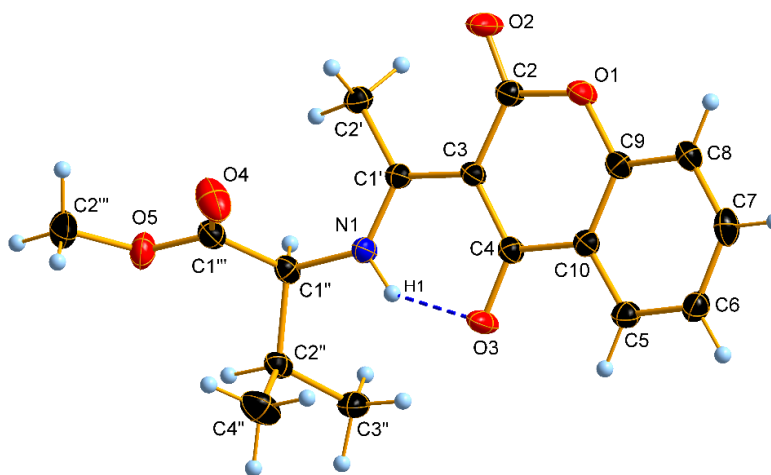
У ¹H NMR спектру паладијум(II)-комплекса, C се не уочавају проширени синглети NH групе енаминског лиганда. Протони метил групе везани за C1' показују померања на 2,62 ppm, што је за 0,08 ppm ниже него у лиганду L. Међутим, примећени су мултиплети CH₂ протона из C1'' и CH протона из C2'' на вишим фреквенцијама (4,91 ppm и 2,35 ppm) (Табела 11).

Табела 11. Карактеристична хемијска померања у ¹H NMR спектру за лиганд L и одговарајући паладијум(II)-комплекс, C

¹ H NMR (200 MHz) δ(ppm)		
Једињења		
L (DMSO-d ₆)	C (DMSO-d ₆)	δ(ppm)
2,70 (s, 3H, CH ₃ C ^{1'})	2,62 (s, 3H, CH ₃ C ^{1'})	-0,08
4,62 (m, 2H, CH ₂ C ^{2''})	4,91 (m, 2H, CH ₂ C ^{2''})	0,29
1,97 (m, 1H, CHC ^{1''})	2,35 (m, 1H, CHC ^{1''})	0,38
14,74 и 12,62 (br s, 1H, NH)	/	/

4.2.1.3. Кристална структура лиганда, метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етиламино-3-метил)]бутаноата

Кристална структурна анализа лиганда (Слика 40) указује на то да се једињење у чврстом стању јавља у кето-енолном таутомерном облику при чему је стабилизовано интрамолекуларном N1-H1...O3=C4 водоничном везом и конјугованим системом двоструке везе, потврђујући тиме доминацију стабилнијег *La* изомера у раствору. Посматрањем O3=C4-C3=C1'-N1-H1 фрагмента можемо запазити изједначавање C3-C4 (1,434(4) Å) и C3=C1' (1,437(4) Å) дужине везе (Табела 12) иако су једноструке и двоструке везе формалне. Егзоциклична C3=C1' двострука веза има *E* геометрију, очигледно због ефекта поменуте водоничне везе.



Слика 40. Кристална структура лиганда, метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етиламино-3-метил)]бутаноата

Табела 12. Одабране дужине везе [\AA] и углова веза [$^\circ$] за лиганд метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етиламино-3-метил)]бутаноат

C4-O3	1,259(3)	N1-C1''-C1'''	110,7(2)
C4-C3	1,434(4)	N1-C1''-C2''	109,4(2)
C3-C1'	1,437(4)	O3-C4-C3	123,6(2)
C3-C2	1,452(4)	O3-C4-C10	118,8(2)
C1'-N1	1,321(3)	C4-C3-C1'	120,5(2)
C1''-N1	1,456(3)	C1'-C3-C2	119,0(2)
C2''-C1''	1,539(4)	C1'-N1-C1''	128,6(2)
C1'''-O4	1,197(3)	N1-C1'-C3	117,5(2)
C1'''-O5	1,332(3)	N1-C1'-C2'	119,2(2)
C2-O2	1,204(3)	C3-C1'-C2'	123,3(2)

Такође, уочено је издужење и скраћивање C4=O3 (1,259(3) \AA) и C1'-N1 (1,321(3) \AA) веза. Исте дужине везе (у оквиру 3σ) примећене су у 3-[(1-бензиламино)етилиден]-2*H*-хромен-2,4(3*H*)-диону [112]. Међутим, у сличном једињењу, 3-[1-((2-хидрокси-фенил)амино)етилиден]-2*H*-хромен-2,4(3*H*)-диону [113] еквиваленција C3-C4 (1,437(3) \AA) и C3 = C1'(1,42(3) \AA) дужина веза није у потпуности постигнута, иако су све друге описане

дужине везе једнаке (у оквиру 3σ) одговарајућим везама у лиганду **L**. Ефекат π -електрона у лиганду **L** је јак због планарности и ароматичности кумаринског дела молекула (највеће одступање од средње равни је 0,029(2) Å за атом O2). Штавише, због делокализације π -електрона, не само да је кумарин-прстенасти систем планаран, већ укључује и кумаринске прстенове заједно са C2"-C1"-N1-C1'-C2' фрагментом, који је такође у суштини планаран, што је показано максималним одступањем од 0,114 (3) Å на C1" атому. Све друге дужине и углови веза у лиганду **L** су у очекиваном опсегу [114].

Молекул **L** се сам стабилизује интрамолекуларном N1-H1...O3 водоничном везом формирајући циклични S6 мотив [115] (Табела 13).

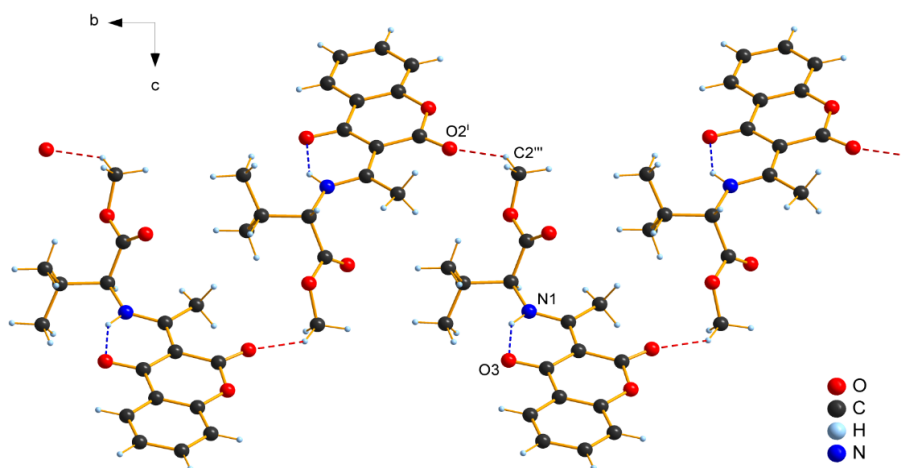
Табела 13. Водоничне везе у метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етиламино-3-метил)бутаноату [Å и °]

D-H...A	$d(D-H)$	$d(H...A)$	$d(D...A)$	$\angle(DHA)$
N1-H1...O3	0,88	1,77	2,529(3)	142,9
C2"-H2B...O2 ⁱ	0,98	2,52	3,394(4)	148,0
C3"-H3"В...O3 ⁱⁱ	0,98	2,41	3,325(4)	154,6

Симетријске трансформације које се користе за стварање еквивалентних атома:

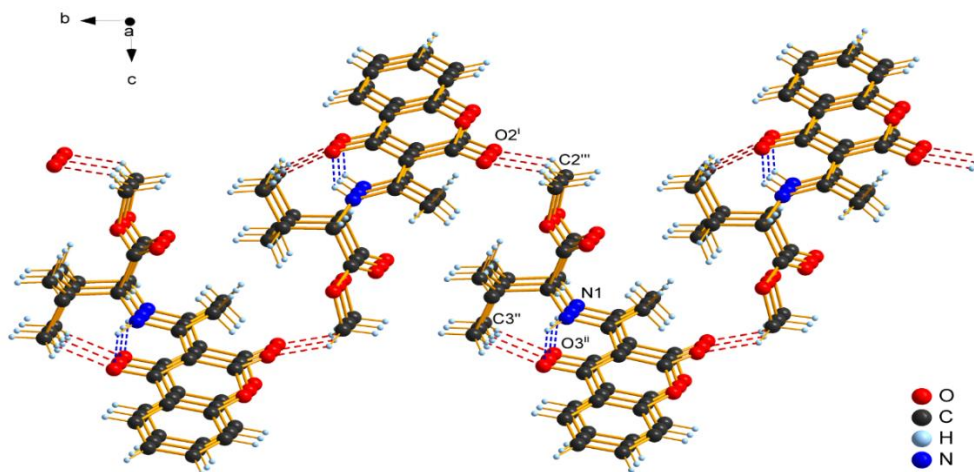
(i) = $-x-1, y+1/2, -z$; (ii) = $x-1, y, z$.

Паковање молекула регулисано је интермолекуларним C-H...O водоничним везама и паковањем π - π интеракција. C2"-H2B...O2ⁱ водонична веза гради C10 мотив ланца [139] и на тај начин повезује молекуле формирајући тако бесконачни *zig-zag* ланац дуж b осе (Слика 41) на суседни ланац помоћу C3"-H3"В...O3ⁱⁱ водоничне везе (која производи C9 мотив ланца [115]) формирајући таласе у ab равни (Слика 42).



Слика 41. Део ланца формираног у структури лиганда **L** (интрамолекуларне и интермолекуларне водоничне везе су приказане као плаве и црвене испрекидане линије);

[Симетрични код: $(i) = -x-1, y+1/2, -z$]



Слика 42. Део таласа формираних у структури лиганда **L** (интрамолекуларне и интермолекуларне водоничне везе су приказане као плаве и црвене испрекидане линије)

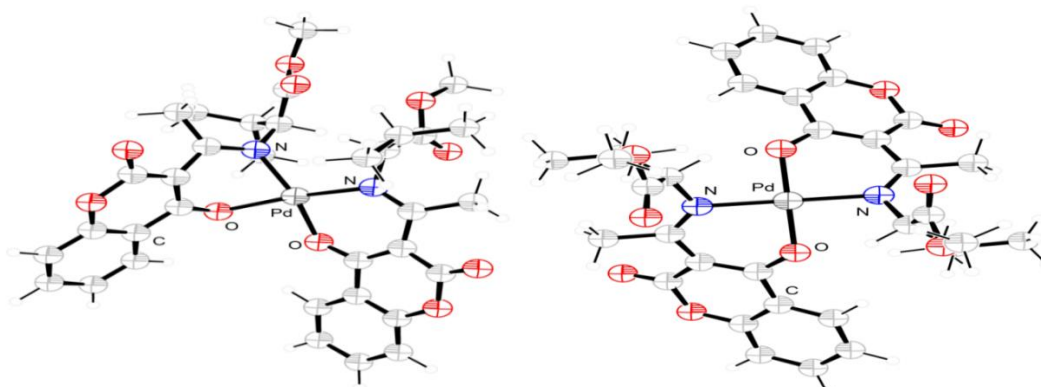
[Симетрични кодови: $(i) = -x-1, y+1/2, -z$; $(ii) = x-1, y, z$]

Следећа стабилизација тако формиране равни потиче од π - π интеракција [116] између фенил и пиран-2,4-дионских прстенова из кумаринског дела у два суседна ланца, што је доказано растојањем између центара прстенова (Cg) (3,716(2) Å) и углом између центра нормалног фенил прстена и центра вектор везујућег прстена (23,2°). И на крају, структура је стабилизована помоћу C-H...Cg (π -прстена) интеракције, која укључује C2'-H2'В и пиран-2,4-дионски прстен (са растојањем H2'В...Cg од 2,77 Å и C2'-H2'В...Cg угао од 125°).

4.2.1.4. DFT прорачуни за лиганд метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етиламино-3-метил)]бутаноат и одговарајући паладијум(II)-комплекс

Структурни изомери лиганда, *La* и *Lb* одређивани су DFT прорачунима. Изомер *La* је енергетски повољнији (1,93 kcal/mol) и енергетски стабилнији од изомера *Lb*.

У реакцији лиганда метил-2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]-бутаноата са калијум-тетрахлоридопаладатом(II) могу се добити два изомера, *cis* и *trans*, организовани κ^2 -N,O лигандима. Како би утврдили који од два изомера је формиран, коришћени су хемијски прорачуни. Израчунате структуре *bis*{метил-2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]бутаноато}паладијум(II)-комплекса приказане су на Слици 43.

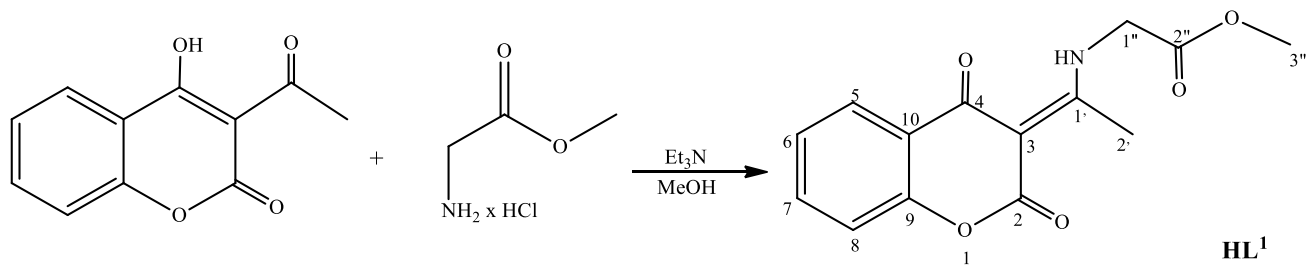


Слика 43. Израчунате структуре *bis*{метил-2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етиламино-3-метил)]бутаноато}-паладијум(II)-комплекса у *trans*- и *cis*-геометрији

Структуре су потпуно оптимизоване без икаквих ограничења симетрије и пронађено је да представљају равнотежу структура. Израчунати резултати за *bis*{метил-2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]бутаноато}-паладијум(II)-комплекс показали су да је *trans* изомер структурно и синтетички изводљив. Разлике у енергији између *trans*- и *cis*- *bis*{метил-2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]бутаноато}-паладијум(II) изомера је 11,2 kcal/mol. DFT прорачуни су у сагласности са резултатима NMR спектроскопије, где се примећује присуство само једног изомера, стога DFT израчунавања показују да изоловани изомер може бити додељен *trans* изомеру наведеног паладијум(II)-комплекса.

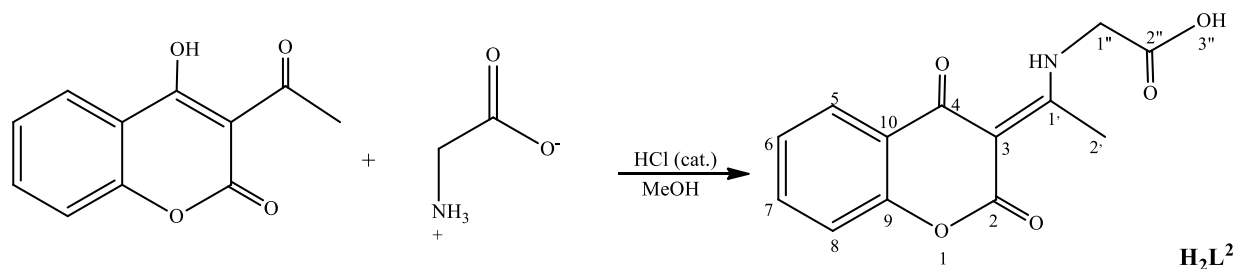
4.2.2. Синтезе глицинских деривата кумарина и одговарајућих паладијум(II)-комплекса

Смеша 3-ацетил-4-хидроксикумарина, метил естра глицин хидрохлорида и триметиламина се након 2h рефлуктовања упари до половине запремине растварача и додавањем 5 cm³ воде добија се бела чврста супстанца метил 2-[(1-{2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетат, (**HL**¹) (Шема 7).



Шема 7. Синтеза метил 2-[(1-{2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетата

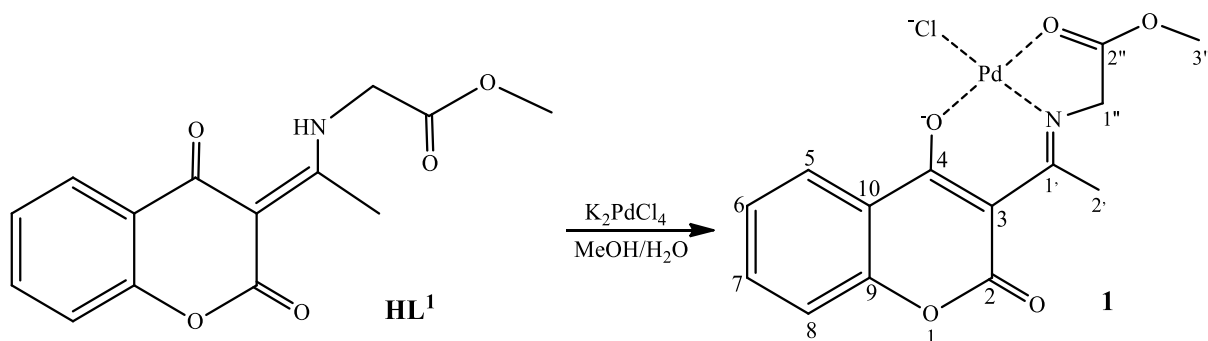
Метанолском раствору 3-ацетил-4-хидроксикумарина додаје се глицин и безбојни раствор се рефлукује 3 сата. Додавањем неколико капи концентроване хлороводоничне киселине подешава се рН-вредност реакционе смеше. Стајањем, након неколико дана бела чврста супстанца, 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]сирћетна киселина, (H_2L^2) се издваја из раствора (Шема 8).



Шема 8. Синтеза 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]сирћетне киселине

Воденом раствору калијум-тетрахлоридопаладата(II) додаје се иста количина енамина HL^1 , раствореног у метанолу. Након 3 сата мешања добијен је жути талог хлоридо {метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетато}-паладијум(II)-комплекса (**1**) (Шема 9).

Прекристалисавањем комплекса **1** из система DMF/ H_2O (однос 1:1) након седам дана на собној температури добијени су кристали диметиламин{2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетато}-паладијум(II)-комплекса (**2**).



Шема 9. Синтеза хлоридо {метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]-ацетато}-паладијум(II)-комплекса

Поред тога, покушали смо синтезу комплекса **2** реакцијом лиганда H_2L^2 , калијум-тетрахлоридопаладата(II) и диметиламина или његовог хидрохлорида у односу 1 : 1 : 1 у раствору вода /метанол (однос 1 : 1). Нажалост, комплекс **2** нисмо могли да добијемо под наведеним експерименталним условима.

4.2.2.1. Инфрацрвена спектроскопија глицинских деривата кумарина и одговарајућих паладијум(II)-комплекса

У IR спектру лиганда, HL^1 запажа се широка трака на 3406 cm^{-1} и она одговара вибрацијама NH групе. Вибрације карбонилне групе глицин метил естра и карбонилне групе из кумаринског дела уочене су на 1748 и 1720 cm^{-1} .

У IR спектру H_2L^2 лиганда широка трака на 3502 cm^{-1} одговара вибрацијама OH групе из његовог карбоксилног дела и вибрацији NH групе. Ова трака није била уочена у IR спектру комплекса **2**, што указује на координовање лиганда у депротонованом облику. Уместо тога, запажена је оштра трака на 3227 cm^{-1} , што одговара вибрацијама NH групе из координованог диметиламина. Координација карбоксилата показује батохромско померање $\nu(\text{C}=\text{O})$ од 1740 cm^{-1} у спектру H_2L^2 лиганда на 1690 cm^{-1} у спектру комплекса **2**. Трака из имино групе $\nu(\text{C}=\text{N})$ некоординованог лиганда померена је са 1650 cm^{-1} на 1660 cm^{-1} . Координација депротоноване енолне групе из H_2L^2 лиганда доводи до померања $\nu(\text{C}-\text{O})$ од 1224 cm^{-1} у спектру H_2L^2 до 1245 cm^{-1} у спектру комплекса **2**.

4.2.2.2. Нуклеарно-магнетно-резонанциона (^1H и ^{13}C) спектроскопија глицинских деривата кумарина и одговарајућих паладијум(II)-комплекса

У ^1H NMR спектру лиганда HL^1 , сигнал метил протона из $\text{C}2'$ атома запажа се на 2,70 ppm, док је сигнал метил протона из естарске групе (CH_3'') уочен на 3,86 ppm. Резонанце на 12,51 и 14,65 ppm одговарају OH и NH групама таутомерних облика HL^1 лиганда. Вредност δ NH протона указује на *E* конформацију HL^1 лиганда и интра-молекулско везивање водоника са кето кисеониковим атомом [117].

Претходна рендгенска и DFT испитивања деривата кумарина показала су да је кето таутомер са N-H...O водоничним везама енергетски стабилнији од енолног облика који садржи O-H...N водоничне везе [118]. На основу ових испитивања претпостављамо да је кето облик главни таутомерни облик **HL**¹ лиганда. У ¹³C NMR спектру лиганда **HL**¹, сигнал C1' атома налази се на 177,5 ppm, док је сигнал метил C2' атома забележен на 18,9 ppm. Сигнали две карбонилне групе из 2,4-диоксохроманског дела, лактона (C2) и кетона (C4), уочени су на 162,5 ppm и 182,2 ppm.

У ¹H NMR спектру комплекса **1**, сигнали атома водоника из OH и NH група (12,51 и 14,65 ppm) лиганда нису били запажени, што указује на то да се лиганд координовао у депротонаном облику. Координовање **HL**¹ преко атома азота из имино групе довела је до смањења сигнала метил H2' и метилен H1" атома водоника. У ¹H NMR спектру комплекса **1** померен је сигнал естарске метил групе лиганда, што указује на то да кисеоник из естарске групе учествује у координовању. Координовање преко атома кисеоника из C4 кумаринског дела доводи до вишеструког померања сигнала H5, H6, H7 и H8.

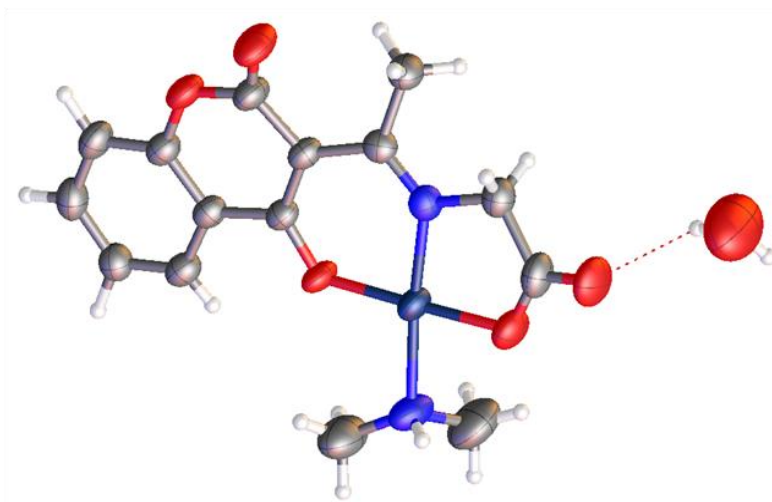
Из ¹H NMR спектра комплекса **2** може се уочити да је лиганд **H₂L²** координован у депротонаном облику обзиром да нису присутни сигнали киселих протона. Сигнал атома водоника из метиленске групе H1" померен је услед координовања карбоксилатног кисеоника. Координовање лиганда преко атома азота имино групе доводи до наглог померања метил H2' сигнала. Запажено померање H5 сигнала, као и смањен низ сигнала H6, H7 и H8 указују на координацију преко атома кисеоника из C4 кумаринског дела. Сигнали метил групе и NH групе из диметиламинског лиганда уочени су на 2,40 и 2,52 ppm.

Из NMR спектра закључујемо да се лиганд **H₂L²** координовао преко иминског атома азота, атома кисеоника из C4 кумаринског дела и карбоксилног атома кисеоника.

4.2.2.3. Кристална структурна анализа диметиламин{2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетато}-паладијум(II)-комплекса

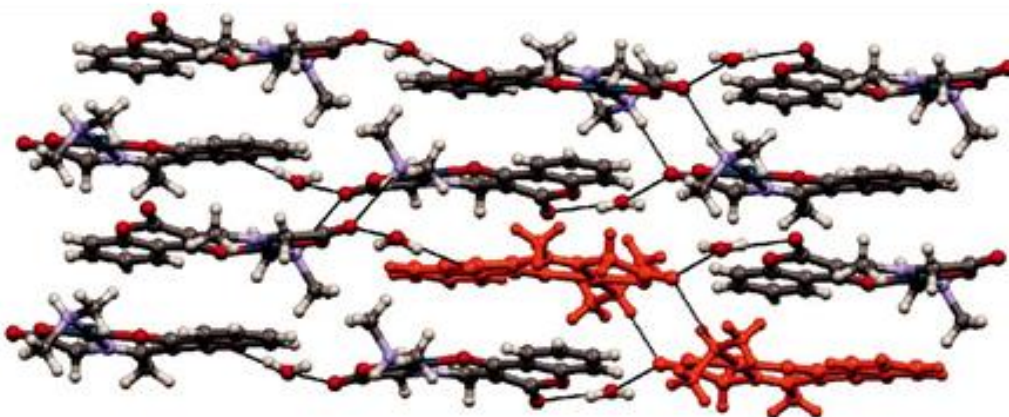
У комплексу **2** (Слика 44), Pd(II)-катјон координује се са једним молекулом лиганда, и то преко кисеониковог атома кето групе из 2,4-диоксохроманског дела, преко иминског атома азота и преко карбоксилног атома кисеоника.

Осим тога, један молекул диметиламина такође учествује у координовању, што указује на квадратно-планарну структуру паладијумовог комплекса.



Слика 44. Структура диметиламин{2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетато}-паладијум(II)-комплекса

Провера молекулске геометрије [119] није показала значајна одступања од просечних CCDC вредности за све параметре везивања, осим углова C4-C3-N1, O5-C6-O4 и C15-N2-C14, који су статистички мањи од просека, вероватно због међусобног одбијања атома C4 и O4, као и због координације преко N2 атома. Одабране дужине и углови веза у комплексу **2** дати су у Табели 14. Асоцијација молекула у кристалу одвија се интермолекулским водоничним везама између координованог атома азота из диметиламина N2-H и карбоксилног атома кисеоника O1 (N2...O1 (*i*) = 2,997(8) Å, N2-H...O1 (*i*) = 157(5)°, *i* = -*x* + 2, -*y* + 1, -*z*), формирајући центрo-симетрични димер. Димери су премошћени молекулима воде који делују као доноси водоничне везе у интеракцији са карбоксилним кисеоником O1 (O6...O1 = 2,84(1) Å, O6-H...O1 = 142,1(9)°) и карбонилним кисеоником O4 суседног молекула (O6...O4 (*ii*) = 3,00(1) Å, O6-H...O4 (*ii*) = 172,1(9)°, *ii* = *x* + 1/2, -*y* + 1/2, *z* - 1/2), формирајући слојеве. На Слици 45 наранџастом бојом приказани су слојеви водоничних веза, формиране од димера премошћене молекулима воде.



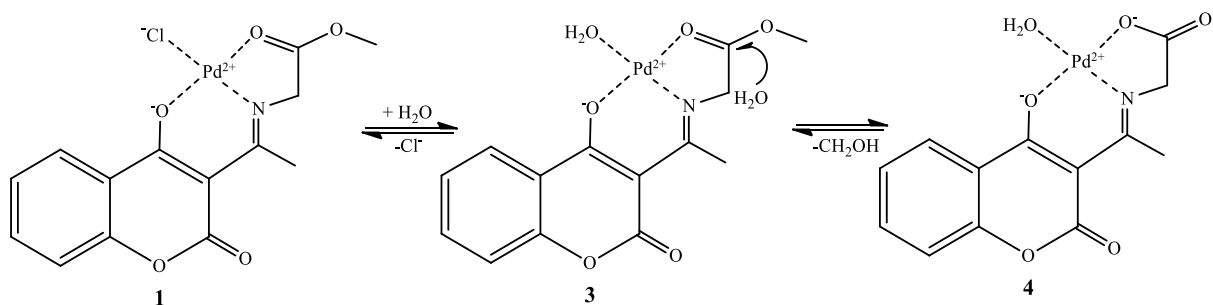
Слика 45. Начин паковања у диметиламин{2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетато}-паладијум(II)-комплексу

Табела 14. Одабране дужине веза (Å) и углови веза (°) у диметиламин{2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетато}-паладијум(II)-комплексу

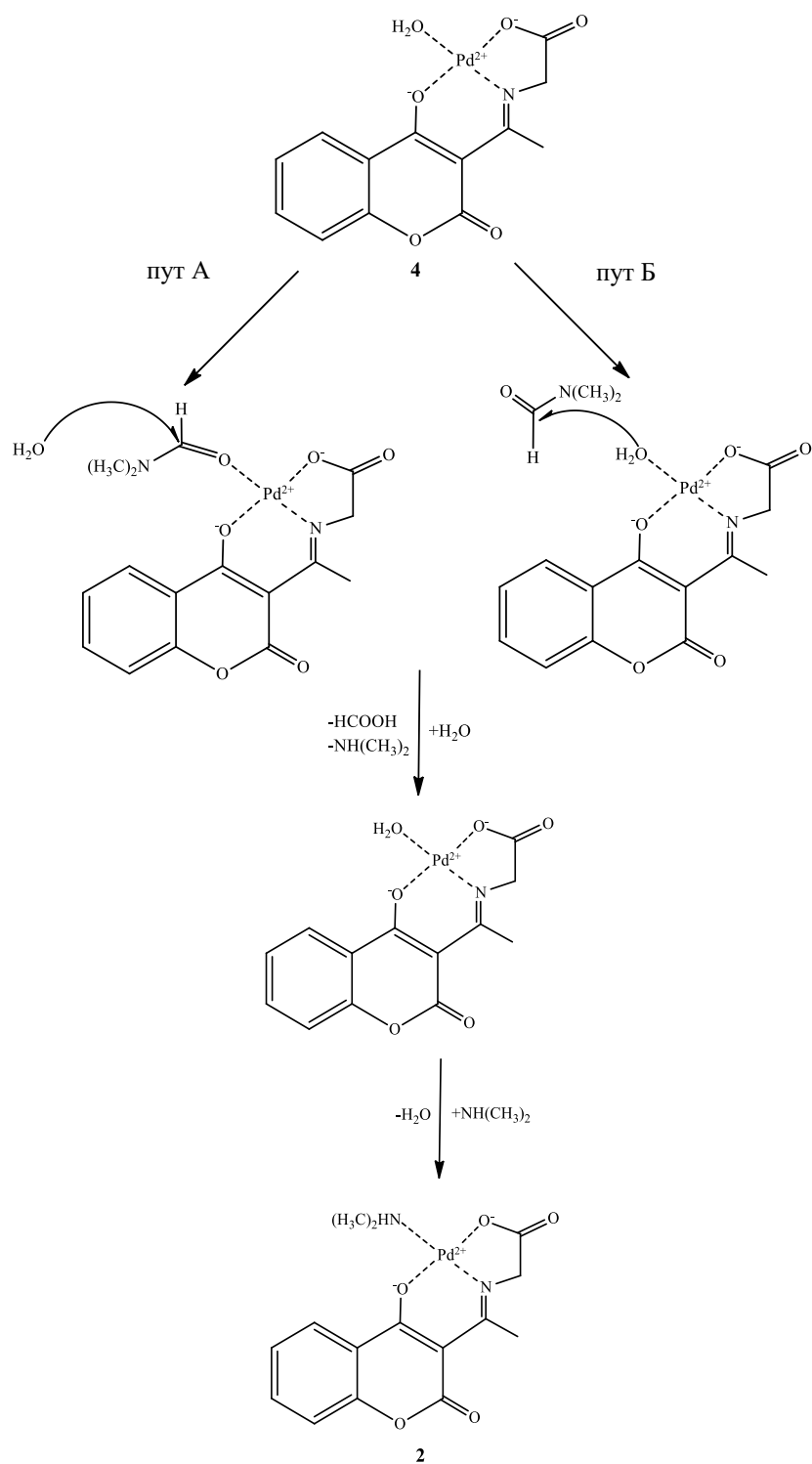
Pd1-OAA	1,991(5)	O2-Pd1-OAA	178,8(2)
Pd1-O2	1,965(3)	C13-C16-N3	111,9(5)
Pd1-N3	1,967(4)	Pd1-OAA-C13	113,9(4)
Pd1-N1	2,055(5)	Pd1-O2-C11	124,0(3)
C2-N1	1,44(1)	N3-Pd1-O2	93,3(2)
OAA-C13	1,272(7)	O2-Pd1-N1	92,2(2)
C16-C13	1,53(1)	N1-Pd1-OAA	89,0(2)
N3-C16	1,467(8)	O2-C11-C5	127,1(4)
C9-N3	1,287(8)	N3-C9-Pd1	31,5(2)
C5-C11	1,401(6)	N3-C16-Pd1	70,8(2)
O2-C11	1,301(5)		
C9-C5	1,485(7)		
C13-O3	1,228(8)		

Узимајући у обзир механизам реакције хидролизе, која се десила током прекристалисавања комплекса **1** из система DMF/H₂O, претпостављамо да се комплекс **3** иницијално формирао у реакцији супституције између хлоридног лиганда и молекула воде (Шема 10). У комплексу **3**, паладијум(II) као Луисова киселина поларизује естарску карбонилну групу и на тај начин активира атом угљеника из естарске карбоилне групе при нападу молекула воде из растварача. Хидролиза естарске групе комплекса **3** доводи до стварања неутралног комплекса **4** који катализује хидролизу амидне везе

диметилформаида. Постоје два могућа пута реакције (А и Б) за хидролизу диметилформаида комплексом **4** (Шема 11). Један од њих (пут А) подразумева супституцију молекула воде са карбонилном групом диметилформаида, након чега следи спољашњи напад поларизованог амидног угљениковог атома молекулом воде из растварача. У другом могућем путу реакције (пут Б), координовање молекула воде за паладијум(II)-јон у комплексу **4** повећава његову нуклеофилиност и олакшава његов напад на амидни угљеников атом у некоординованом диметилформамиду. Замена молекула воде у комплексу **4** диметиламино, формираним у реакцији хидролизе довела је до стварања комплекса **2**.



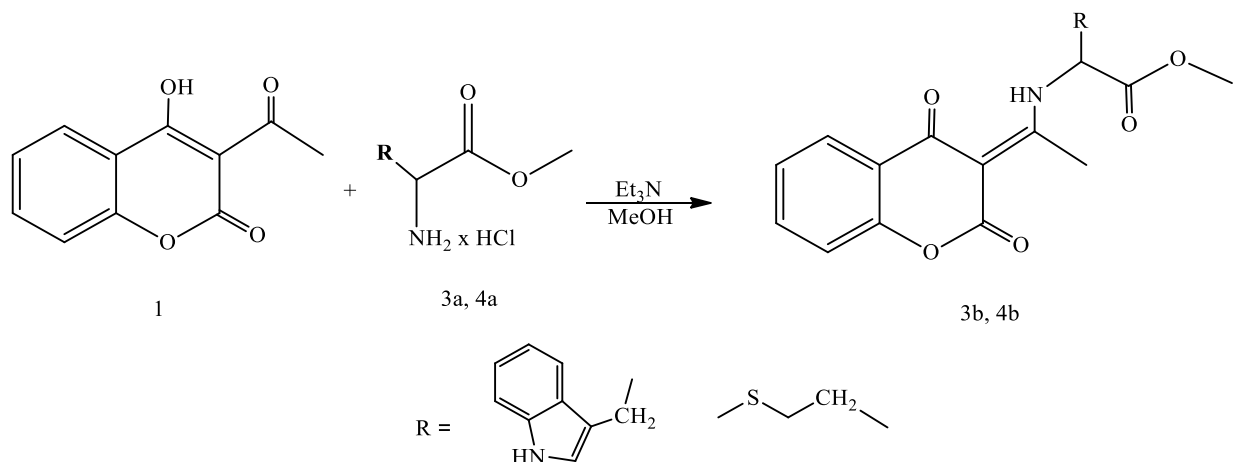
Шема 10. Механизам хидролизе естарске везе у хлоридо {метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетато}-паладијум(II)-комплексу



Шема 11. Механизам хидролизе амидних веза у диметиламин{2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетато}-паладијум(II)-комплексу

4.2.3. Синтезе метионин и триптофан деривата кумарина и одговарајућих паладијум(II)-комплекса

Синтезе лиганата метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)-3-(1H-индол-3-ил)]пропаноата, **3b** и метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)-4-(метилтио)]бутаноата, **4b** вршене су по већ описаном поступку у одељцима 3.2.1. и 3.2.2. (Шема 12).

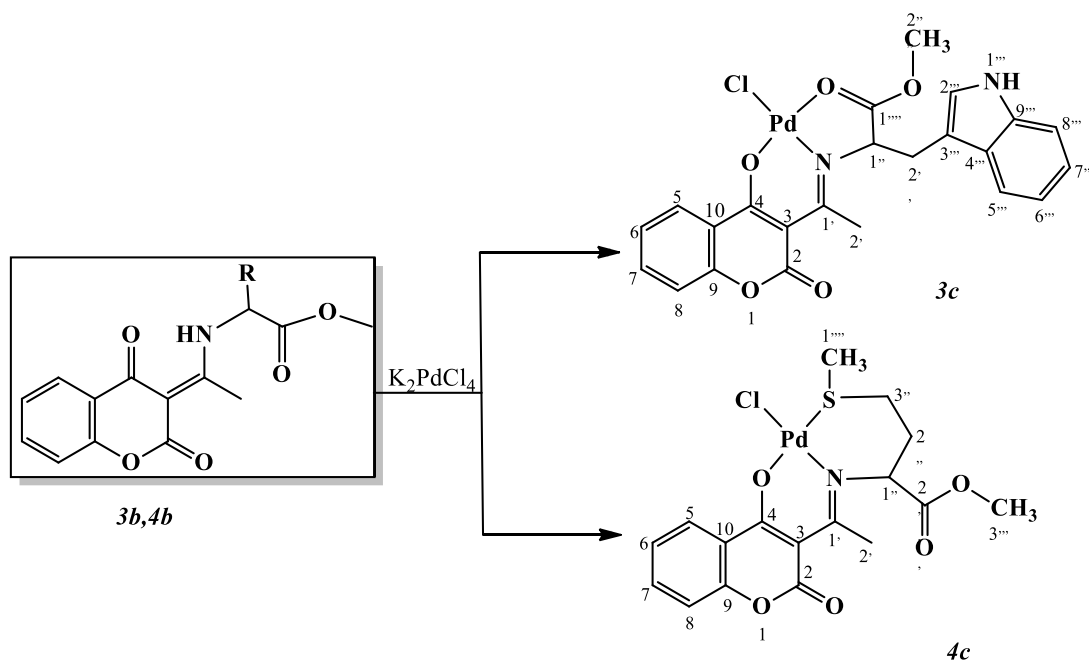


Шема 12. Трансформација 3-ацетил-4-хидрокси кумарина до енамина **3b**, **4b**

Одговарајући паладијум(II)-комплекси добијени су директном реакцијом калијум-тетрахлоридопаладата(II) и претходно синтетисаних енамина **3b** и **4b** у молском односу 1:1 (Шема 13).

Синтетисани лиганди су растворни у метанолу, док су њихови одговарајући паладијум(II)-комплекси растворни у диметилсулфоксиду.

Резултати елементалне микроанализе за награђене лиганде и комплексе су у сагласности са израчунатим вредностима (експериментални део 3.1.3.4. за лиганде; 3.2.8. и 3.2.9. за паладијум(II)-комплексе).



Шема 13. Синтеза паладијум(II)-компкса **3c**, **4c**

4.2.3.1. Инфрацрвена спектроскопија метионин и триптофан кумаринских деривата и одговарајућих паладијум(II)-компкса

IR спектри енамина (**3b** и **4b**) показали су карактеристичне опсеге за NH групу на 3420 cm^{-1} за лиганд **3b** и на 3418 cm^{-1} за лиганд **4b**. Вибрације карбонилне групе, COOCH_3 из одговарајућих енамина (**3b** и **4b**) нађене су на 1738 и 1739 cm^{-1} , док су карбонилне групе из 2,4-диоксохроманског дела уочене на 1693 и 1705 cm^{-1} .

У IR спектрима одговарајућих паладијум(II)-компкса запажа се значајна разлика у поређењу са IR спектрима за поменуте лиганде. Тако се у IR спектрима комплекса (**3c** и **4c**) уместо сигнала NH групе, запажају карактеристичне траке од C=N везе на 1604 cm^{-1} и на 1601 cm^{-1} . Стога се формирањем паладијум(II)-компкса, енамино облик лиганда преводи у имино облик. Поред тога, уочене су и траке од Pd-O везе на 526 cm^{-1} и 528 cm^{-1} и Pd-N везе на 469 cm^{-1} и 467 cm^{-1} . Траке у 2,4-диоксохроманском делу комплекса уочене су на 1697 cm^{-1} и 1693 cm^{-1} (**3c** и **4c**) и оне се не разликују од посматраних трака у одговарајућим лигандима (**3b** и **4b**).

4.2.3.2. Нуклеарно-магнетно-резонанционна (^1H и ^{13}C) спектроскопија метионин и триптофан кумаринских деривата и одговарајућих паладијум(II)-комплекса

У ^1H NMR спектрима лиганда **3b** и **4b**, синглети метил протона са $\text{C1}'$ атома уочени су на 2,29 и 2,74 ppm, док су синглети COOCH_3 атома запажени на 3,77 и 3,84 ppm. Енамино, NH протони поменутих лиганда се као проширени синглети налазе на 14,81 и 14,73 ppm.

У ^{13}C NMR спектрима лиганда **3b** и **4b**, $\text{C1}'$ атоми уочени су на 176,1 и 169,2 ppm, док је метил угљеник везан за $\text{C1}'$ атом забележен на 18,35 и 18,70 ppm. Сигнали C2 атома се налазе на 159,4 и 162,2 ppm, док су сигнали C4 атома забележени на 176,2 и 176,9 ppm.

У ^1H NMR спектрима одговарајућих паладијум(II)-комплекса **3c** и **4c**, проширени синглети NH протона нису уочени. Сигнали метил протона са $\text{C1}'$ атома запажени су на 2,3, 2,44 и 2,43 ppm, што је за 0,4 и 0,31 ppm ниже у **4c** комплексу него у одговарајућем лиганду, док у спектру **3c** комплекса сигнал метил протона са $\text{C1}'$ атома показује за 0,15 ppm већу резонанцу. Уочени су такође нижи сигнали који одговарају синглетима COOCH_3 атома и који се у спектрима поменутих комплекса, (**3c** и **4c**) налазе на 3,37 и 3,42 ppm. На основу ових спектралних података закључујемо да су у грађењу паладијум(II)-комплекса учествовали кисеоник са $\text{C4}'$ атома, који припада кумаринском делу и азот из имино групе.

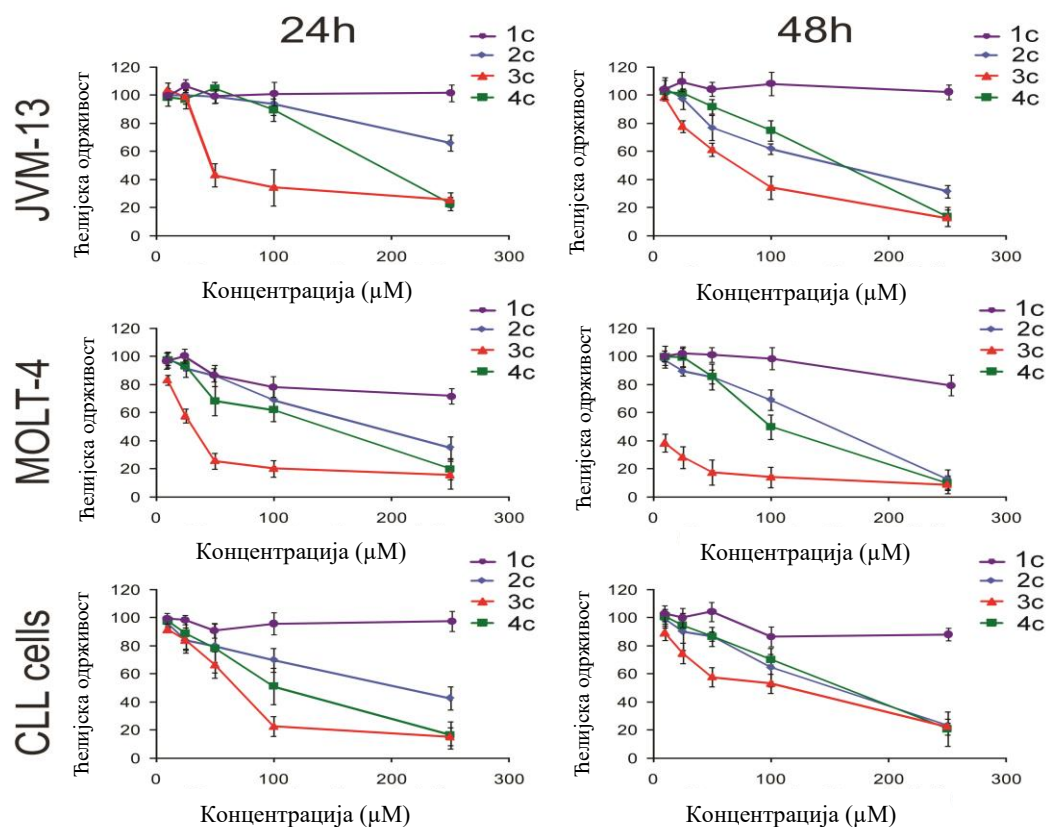
^{13}C NMR спекти паладијум(II)-комплекса, **3c** и **4c** значајно се разлику у поређењу са спектрима одговарајућих лиганда. У комплексу **3c** уочавају се одговарајући угљеникови атоми који показују нижу резонанцу, изузев метил угљеника везаног за $\text{C1}'$ атом, који показује за 0,35 ppm већу резонанцу. Наведени угљеникови атоми су у спектру **4c** комплекса показали већу резонанцу за $\text{C1}'$ атом, као и метил угљеникови атоми везани за $\text{C1}'$ и C2 атоме, док је код C4 атома смањена резонанца.

4.2.4. Биолошка испитивања кумаринских деривата

4.2.4.1. Антитуморска активност свих синтетисаних кумаринских лиганада и њихових одговарајућих паладијум(II)-комплекса

Цитотоксична активност синтетисаних лиганда метил 2-[(1-(2,4 диоксохроман-3-илиден)етиламино-3-метил)]бутаноата (**1b**), метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетата (**2b**), метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)-3-(1H-индол-3-ил)]пропаноата (**3b**), метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)-4-(метилтио)]бутаноата (**4b**), као и њихових паладијум(II)-комплекса (**1c**, **2c**, **3c** и **4c**) испитивана је на ћелијама хумане леукемије (JVM-13, MOLT-4) и ћелијама хроничне лимфоцитне леукемије (CLL), при чему су ћелије третиране различитим концентрацијама лиганада или комплекса током 24 и 48 сати, а резултат је број преосталих преживелих ћелија након третмана. Број преживелих ћелија након третмана, које се посматрају након 24 и 48 сати са повећањем концентрација одабраних паладијумских комплекса приказана је на Слици 49. Цитотоксични ефекати наведених лиганада и паладијум(II)-комплекса одређивани су МТТ тестом, а представљени су као IC₅₀ вредности. Добијени резултати приказани су у Табели 16.

Комплекс **1c** је мало утицао на одрживост испитиваних ћелија леукемије након 24 и 48 сати третмана, са IC₅₀ вредностима преко 450 µM (Табела 15). Резултати МТТ теста показали су да третман наведених ћелија током 24 и 48 сати наведеним комплексима смањује способност преживљавања ћелија карцинома на начин који зависи од дозе (Слика 46). Само су комплекси **2c** и **3c** показали временски завистан цитотоксични ефекат према MOLT-4 и JVM-13 ћелијама (24 сати у односу на 48 сати p < 0,05). Остали испитивани комплекси нису показали цитотоксични ефекат према наведеним ћелијама.



Слика 46. JVM-13, MOLT-4 и CLL (изоловане код пет CLL пацијената) ћелије инкубиране током 24 и 48 сати уз повећање концентрација паладијумових-комплекса 1c, 2c, 3c и 4c

Резултати МТТ теста указују на то да је комплекс **3c** показао највишу цитотоксичност према JVM-13, MOLT-4 и CLL ћелијама у поређењу са другим тестираним једињењима након 24 и 48 сати третмана (Слика 46). Након 48 сати инкубације, IC_{50} вредности за комплекс **3c** биле су $73,3 \pm 12,7 \mu\text{M}$, $5,6 \pm 3,4 \mu\text{M}$ и $76,7 \pm 18,1 \mu\text{M}$ за JVM-13, MOLT-4 и CLL ћелије. Одговарајући лиганд **3b** је показао ниску цитотоксичност према свим наведеним ћелијама са IC_{50} вредностима од $442,7 \pm 77,6 \mu\text{M}$, $286,3 \pm 65,2 \mu\text{M}$ и $423,9 \pm 68,2 \mu\text{M}$ за JVM-13, MOLT-4 и CLL ћелије (Табела 15).

Табела 15. IC₅₀ вредности добијене МТТ тестом за испитиване паладијумове комплексе (**1c**, **2c**, **3c** и **4c**) и њихове одговарајуће лиганде (**1b**, **2b**, **3b** и **4b**), 24 и 48 сати након третмана JVM-13, MOLT-4 и CLL ћелијама

JVM-13			MOLT-4		
	24 h	48 h		24 h	48 h
1c	>500	>500	1c	>500	420,7±35,8
2c	369,8 ±27,6	126,4±12,9	2c	187,8±22,4	128,4±13,1
3c	47,2±11,3	73,3±12,7	3c	32,9±9,2	5,6±3,4
4c	161,3±22,1	138,8±16,5	4c	145,5±11,2	112,7±13,5
1b	>500	>500	1b	>500	453,0±62,5
2b	>500	>500	2b	>500	>500
3b	481,9±97,2	442,7±77,6	3b	288,7±57,1	286,3±65,2
4b	>500	>500	4b	447,3±69,7	448,7±53,1

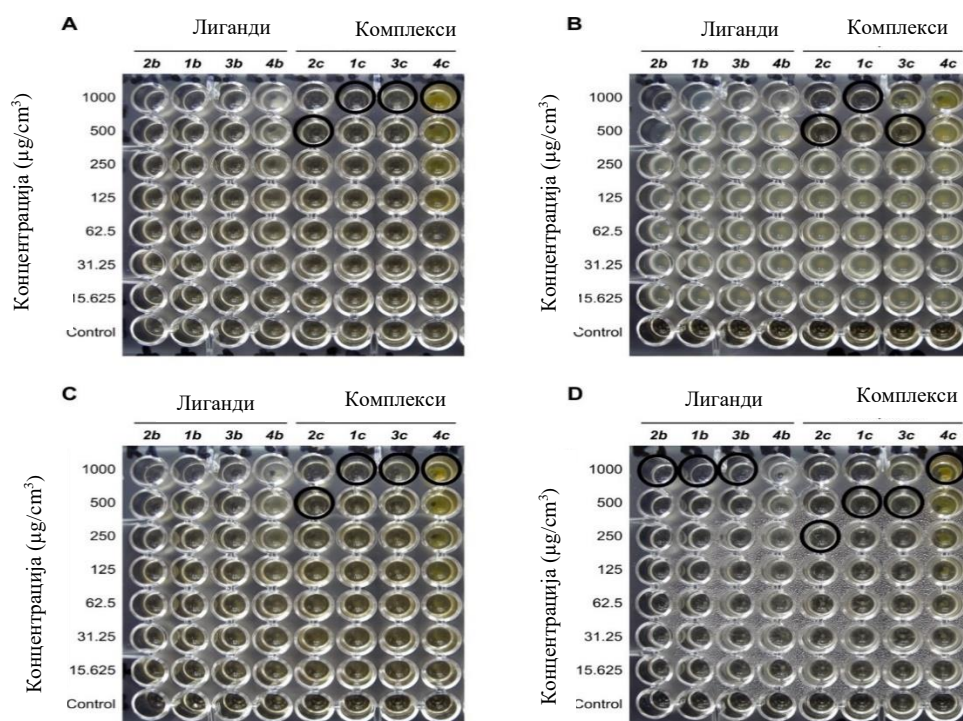
CLL cells		
	24 h	48 h
1c	>500	>500
2c	207,7±18,6	138,4±19,6
3c	78,3±14,8	76,7±18,1
4c	107,1±17,6	113,5±20,3
1b	>500	>500
2b	>500	>500
3b	463,8±86,4	423,9±68,2
4b	>500	>500

IC₅₀ вредности за комплексе **2c** и **4c** биле су значајно ниже у поређењу са комплексом **3c**, али без значајне разлике у цитотоксичном ефекту између **2c** и **4c** комплекса према испитиваним ћелијама (**2c** на супрот **4c**, $p > 0,05$). Лиганд **2b** је показао најнижу цитотоксичност после 48 сати, са IC₅₀ вредностима преко 500 μM према свим испитиваним ћелијама. Осим тога, инкубација испитиваних ћелија наведеним комплексима и лигандима током 24 и 48 сати није имала утицаја на одрживост ових ћелија у концентрацијама нижим од 250 μM у поређењу са нетретираним ћелијама. Једини изузетак је лиганд **3b** који смањује одрживост MOLT-4 ћелија на $88,4 \pm 7,6\%$ и $83,4 \pm 8,5\%$ у концентрацији од 100 μM након 24 и 48 сати инкубације. Високу антитуморску активност према JVM-13, MOLT-4 и CLL ћелијама после 48 сати инкубације показао је **3c** комплекс. Цитотоксичност поменутог комплекса је 48 сати након инкубације била највиша према MOLT-4 ћелији са IC₅₀ = $5,6 \pm 3,4 \mu\text{M}$.

Овим испитивањима дошли смо до закључка да су сви комплекси паладијума(II) показали већи цитотоксични ефекат у односу на одговарајуће лиганде, који нису показали цитотоксични ефекат према испитиваним ћелијама леукемије.

4.2.4.2. Антимикробна активност свих синтетисаних кумаринских лиганда и одговарајућих паладијум(II)-комплекса

Резултати *in vitro* испитивања антимикробне активности лиганда и одговарајућих паладијум(II)-комплекса (Слика 47) приказани су као вредности MIC₅₀, MIC₉₀, MBC и MMC у $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ у Табели 16. MIC₅₀, MIC₉₀, MBC и MMC вредности комерцијалних антибиотика дате су у Табели 17.



Слика 47. *In vitro* антибактеријска и антифунгална активност паладијум(II)-комплекса и одговарајућих лиганда. А) *Staphylococcus aureus*; В) *Pseudomonas aeruginosa*; С) *Enterococcus faecalis*; Д) *Candida albicans*

Интензитет антимикуробног деловања лиганда и одговарајућих паладијум(II)-комплекса мењао се у зависности од врсте микроорганизама. Испитиване супстанце су показале значајно нижу антимикуробну активност у односу на комерцијалне антибиотике. Антибиотици, ванкомицин и цефтриаксон нису показали никакву активност против *C. albicans*, што је и било очекивано.

Табела 16. Антибактеријска и антифунгална активност испитиваних једињења

Врсте		<i>Staphylococcus Aureus</i> ATCC 25923	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Candida albicans</i> , clinical strain
Једињења					
1b	¹ МИС ₅₀	1000±0,0	1000±0,0	1000±0,0	500±0,0
	² МИС ₉₀	>10 ³	>10 ³	>10 ³	833,3±288,7
	³ МВС/ММС	>10 ³	>10 ³	>10 ³	>10 ³
2b	¹ МИС ₅₀	1000±0,0	833,3±288,7	1000±0,0	500±0,0
	² МИС ₉₀	>10 ³	>10 ³	>10 ³	833,3±288,7
	³ МВС/ММС	>10 ³	>10 ³	>10 ³	>10 ³
3b	¹ МИС ₅₀	833,3±288,7	1000±0,0	1000±0,0	1000±0,0
	² МИС ₉₀	>10 ³	>10 ³	>10 ³	>10 ³
	³ МВС/ММС	>10 ³	>10 ³	>10 ³	>10 ³
4b	¹ МИС ₅₀	833,3±288,7	1000±0,0	1000±0,0	666,7±288,7
	² МИС ₉₀	>10 ³	>10 ³	>10 ³	1000±0,0
	³ МВС/ММС	>10 ³	>10 ³	>10 ³	>10 ³
1c	¹ МИС ₅₀	333,3±144,3	416,7±144,3	416,7±144,3	208,3±72,2
	² МИС ₉₀	666,7±288,7	833,3±288,7	833,3±288,7	416,7±144,3
	³ МВС/ММС	833,3±288,7	>10 ³	1000±0,0	666,7±288,7
2c	¹ МИС ₅₀	208,3±72,2	166,7±72,2	208,3±72,2	166,7±72,2
	² МИС ₉₀	416,7±144,3	333,3±144,3	416,7±144,3	208,3±72,2
	³ МВС/ММС	666,7±288,7	500±0,0	833,3±288,7	333,3±144,3
3c	¹ МИС ₅₀	416,7±144,3	>10 ³	416,7±144,3	666,7±288,7
	² МИС ₉₀	833,3±288,7	>10 ³	833,3±288,7	1000±0,0
	³ МВС/ММС	>10 ³	>10 ³	>10 ³	>10 ³
4c	¹ МИС ₅₀	333,3±144,3	208,3±72,2	666,7±288,7	166,7±72,2
	² МИС ₉₀	666,7±288,7	416,7±144,3	833,3±288,7	416,7±144,3
	³ МВС/ММС	1000±0,0	500±0,0	1000±0,0	1000±0,0

МИС, минимална инхибиторна концентрација ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$);

МВС/ММС, минимална бактерицидна концентрација/минимална микробицидна концентрација ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$);

¹МИС₅₀, ²МИС₉₀ и ³МВС/ММС су вредности за три мерења (средња вредност ± SD).

Посматране вредности MIC_{50} и MIC_{90} лиганда су биле у распону од $500 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ до $1000 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ и $833,3 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ до $> 1000 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. MIC_{50} и MIC_{90} вредности комплекса биле су у распону од $166,7 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ до $666,7 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ и $208,3 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ до $> 1000 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ у зависности од врсте микроорганизама и тестираног једињења.

Табела 17. Антибактеријска и антифунгална активност стандардних антибиотика, ванкомицина и цефтриаксона

Врсте	Ванкомицин			Цефтриаксон		
	¹ MIC_{50}	² MIC_{90}	³ МВС/ММС	¹ MIC_{50}	² MIC_{90}	³ МВС/ММС
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<15,625	<15,625	<15,625	<15,625	<15,625	15,625
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>1000	>1000	>1000	26,0±9,0	52,1±18,0	62,5±0,0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	20,8±9,0	41,7±18	62,5±0,0	416,7±144,3	500±0,0	833,3±288,7
<i>Candida albicans</i> , clinical strain	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

Највећу антимикуробну активност показао је комплекс **2c**, чије су најниже вредности MIC_{50} и MIC_{90} биле $166,7 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ и $208,3 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, а ММС против *C. albicans* $500 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Антимикуробна активност комплекса **2c** и **4c**, била је већа према грам(-) него према грам(+) бактеријама, MIC_{50} вредности су биле $166,7 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ и $208,3 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, док су вредности МВС/ММС биле $500 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Комплекс **1c** је показао мању активност према бактерији *Pseudomonas aeruginosa*, али је активнији против стафилокока и ентерокока. Такође, добијени резултати указују да је комплекс **2c** ефикаснији према грам(+) бактеријама од комплекса **4c** и **1c**. Међутим, комплекс **3c** је показао мању активност од комплекса **2c**, **4c** и **1c**, нарочито према грам(+) кокама и квасцу. Лиганди су показали активност само према *Candida albicans*.

Комплекс **3c** је показао сличан антимикуробни ефекат као и лиганд и његови одговарајући комплекси Cu(II) , Ni(II) , Mn(II) и Fe(II) у истраживању Ал-Схалана (Al-Shaalan) [120]. Утврђено је да ова једињења имају већу активност према грам(+) кокама и према *Candida albicans*, док су према грам(-) бактеријама активни само при 100% концентрацији [120,121]. У складу са нашим резултатима за комплексе **3c** и **1c** недавне студије нових синтетисаних лиганда и одговарајућих паладијум(II)-комплекса указују да комплекси показују антимикуробну активност према грам(+) бактеријама, али да нису били активни према грам(-) бактеријама [122]. Међутим, наши резултати за комплексе **2c** и **4c**

нису у складу са претходним студијама [120-122]. У нашем истраживању, два комплекса паладијума(II) показала су већу антибактеријску активност према грам(+) бактеријама, док су друга два комплекса паладијума(II) показала већу антибактеријску активност према грам(-) бактеријама, на основу чега претпостављамо да органски лиганди имају значајну улогу у начину антимикуробног деловања. Ћелијски зид је различит код грам(+) и грам(-) бактерија, што указује на то да бактеријски ћелијски зид није мета за напад паладијум(II)-комплекса.

На основу ових испитивања закључили смо да комплекси паладијума(II) имају већу антимикуробну активност од својих одговарајућих лиганда у поређењу са неким ранијим студијама [123,124] и да су углавном показали јачу антифунгалну него антибактеријску активност.

5. ЗАКЉУЧАК

У овој Докторској дисертацији описане су синтезе:

- ❖ (S,S) -етилендиамин- N,N' -ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине, $(H_2-(S,S)-eddyr)$;
- ❖ O,O' -диалкил естара (S,S) -етилендиамин- N,N' -ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) сирћетне киселине дихлорхидрата, $R_2-(S,S)-eddyr \cdot 2HCl$, (R = етил, пропил, бутил, пентил);
- ❖ Одговарајућих паладијум(II)-комплекса са наведеним O,O' -диалкил естрима $(H_2-(S,S)-eddyr)$ киселине;
- ❖ Кумаринских деривата аминокиселина (глицин, S -валин, S -метионин, S -триптофан);
- ❖ Одговарајућих паладијум(II)-комплекса са наведеним дериватима кумарина.

Награђени лиганди и комплекси окарактерисани су елементалном микроанализом, инфрацрвеном и нуклеарно-магнетно-резонанционом спектроскопијом. Рендгенском структурном анализом су потврђене претпостављене структуре.

Резултати елементалних микроанализа су у сагласности са претпостављеним саставом лиганда и комплекса.

Анализом IR спектра утврђено је да се O,O' -диалкил естри (S,S) -етилендиамин- N,N' -ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине $(R_2-(S,S)-eddyr)$ координују за паладијум(II)-јон бидентатно преко два азотова атома из диаминског ланца лиганда. Код кумаринских деривата аминокиселина координовање је извршено преко кисеониковог атома кето групе из 2,4-диоксохроманског дела и преко иминског атома азота, само у случају кумаринског деривата са аминокиселином S -валин. Код деривата са аминокиселинама глицин и S -триптофан координовање је поред доносних атома кисеоника из кето групе из 2,4-диоксохроманског дела, иминског атома азота извршено и преко карбоксилног атома кисеоника, док је у случају деривата са аминокиселином S -метионин трећи доносни атом био атом сумпора.

Број, положај и изглед сигнала у ^1H и ^{13}C NMR спектрима потврђују структуру полазних лиганата и добијених паладијум(II)-комплекса.

Рендгенска структурна анализа лиганда, метил 2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)-етиламино-3-метил)]бутаноата указује на то да се једињење у чврстом стању јавља у кето-енолном таутомерном облику при чему је стабилизовано интрамолекулском N1-H1...O3=C4 водоничном везом и конјугованим системом двоструке везе, потврђујући тиме доминацију стабилнијег (*La*) изомера у раствору.

Такође, рендгенском структурном анализом потврђена је структура диметиламин{2-[(1-(2,4-диоксохроман-3-илиден)етиламино)]ацетато}-паладијум(II)-комплекса, тачније да се паладијум(II)-катјон координује са једним молекулом лиганда и то преко кисеониковог атома кето групе из 2,4-диоксохроманског дела, преко иминског атома азота и преко карбоксилног атома кисеоника. Осим тога, један молекул диметилamina такође учествује у координовању, што указује на квадратно-планарну структуру паладијумовог комплекса.

Испитивањем антитуморске активности *O,O'*-диалкил естара (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине и одговарајућих паладијум(II)-комплекса утврђено је да су комплекси показивали знатно вишу активност у односу на одговарајуће лиганде, а исто је утврђено и испитивањем кумаринских деривата аминокиселина и њихових одговарајућих паладијум(II)-комплекса.

Испитивањем антимикробне активности *O,O'*-диалкил естара (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне киселине и одговарајућих паладијум(II)-комплекса утврђено је да су испитивана једињења показивала умерену активност према грам(+) бактеријама, док су према грам(-) бактеријама показивала слабу активност.

На основу испитивања антимикробне активности кумаринских деривата аминокиселина и одговарајућих паладијум(II)-комплекса утврђено је да су комплекси паладијума(II) показивали већу антимикробну активност од својих одговарајућих лиганата и да су углавном показивали јачу антифунгалну него антибактеријску активност.

Применом апсорпционе и флуоресцентне спектроскопије испитиван је афинитет везивања паладијум(II)-комплекса у молекулу CT-DNA. Ради поређења испитивани су и одговарајући платина(II)-комплекси. Из добијених резултата утврђено је да је константна везивања (K_b) за платина(II)-комплексе нешто већа него за паладијум(II)-комплексе, што указује на јачу способност везивања платина(II)-комплекса за молекулу CT-DNA.

Структурне промена које су настале на хуманом серуму албумина, HSA након додавања паладијум(II)-комплекса праћене су снимањем апсорпционих и флуоресцентних спектра. Такође, ради поређења праћене су и структурне промене након додавања одговарајућих платина(II)-комплекса. Добијени резултати потврђују да је интеракција између паладијум(II) или платина(II)-комплекса и HSA вероватно био статички процес гашења.

Интеракција паладијум(II) и платина(II)-комплекса са серумом албумина, HSA такође је праћена проучавањем гашења флуоресценције HSA са повећањем концентрације паладијум(II) или платина(II)-комплекса. Константе везивања (K_a) добијене за платина(II)-комплексе су више од константи добијене за паладијум(II)-комплексе, што указује на јачу способност платина(II)-комплекса да се везују за HSA.

Резултати ове *Докторске дисертације* верификовани су објављивањем резултата испитивања у пет научних радова у часописима са SCI листе и три саопштења на домаћим конференцијама.

6. ЛИТЕРАТУРА

- [1a] T. S. Sabo, S. R. Grgurić-Šipka, S. R. Trifunović, *Synth. React. Inorg. Met. org. Chem.* **32** (2002) 1661.
- [1b] D. J. Radanović, *Coord. Chem. Rev.* **54** (1984) 159.
- [2] F. C. Bersworth, *British Patent* **723** (1955) 316.
- [3] D. B. Haydock, T. P. C. Mulholland, *J. Chem. Soc. C* (1971) 2389.
- [4] M. Kaplun, M. Sandström, D. Boström, A. Shchukarev, P. Peresson, *Inorg. Chim. Acta* **358** (2005) 527.
- [5] D. J. Robinson, C. H. L. Kennard, *J. Chem. Soc. A* (1970) 1008.
- [6] X. M. Luo, X. H. Chen, S. Shanmuga Sundara Raj, H. K. Fun, L. G. Zhu, *Acta Crystallogr. Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* **55** (1999) 1220.
- [7] S. Baggio, L. M. Amzel, L. N. Becka, *Acta Crystallogr. Sect. B: Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.* **26** (1970) 1698.
- [8] J. R. Wiesner, E. C. Lingafelter, *Inorg. Chem.* **5** (1966) 1770.
- [9] I. A. Baidina, N. V. Podberezskaia, V. V. Bakakin, E. V. Golubovskaya, N. A. Shestakova, G. D. Malchikov, *J. Struct. Chem.* **20** (1979) 463.
- [10] I. A. Baidina, N. V. Podberezskaia, S. V. Borisov, *J. Struct. Chem.* **21** (1980) 659.
- [11] V. Z. Pletnev, Yu. A. Zolotarev, N. M. Galitskii, A. I. Verenich, *J. Struct. Chem.* **33** (1992) 98.
- [12] G. N. Kaluđerović, H. Schmidt, Ch. Wagner, K. Merzweiler, D. Steinborn, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **72** (2007) 560.
- [13] J. Reedijk, *Inorg. Chim. Acta* **198-200** (1992) 873.
- [14] M. J. Bloemink, J. Reedijk in *Metal ions in biological systems*, ed. H. Sigel and A. Sigel, M. Dekker, New York **32** (1996) 641.
- [15] J. Reedijk, *Chem. Comm.* (1996) 801.
- [16] T. W. Hambley, *Coord. Chem. Rev.* **166** (1997) 181.
- [17] T. G. Appleton, *Coord. Chem. Rev.* **166** (1997) 313.
- [18] B. K. Keppler In: *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, Ed. B. K. Keppler, VCH, Weinheim, Germany 1993, p. 3.
- [19] M. Hartman, B. K. Keppler, *Comments Inorg. Chem.* **16** (1995) 339.

- [20] M. H. Heim, In: *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, Ed. B. K. Keppler, VCH, Weinheim, Germany 1993, p. 16.
- [21] B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, *Nature* **205** (1965) 698.
- [22] B. Rosenberg, L. Van Camp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, *Nature* **222** (1969) 385.
- [23] M. Tucker, C. Colvin, D. Martin, Jr. *Inorg. Chem.* **3** (1964) 1373.
- [24] M. Peyrone, *Ann. Chem. Pharm.* **51** (1845) 1.
- [25] R. J. Mayer, *J. Clin. Oncol.* **30** (2012) 3325.
- [26] I. Kostova, *Recent. Pat. Anti-Canc.* **1** (2006) 1.
- [27] D. K. Kim, H. T. Kim, J. H. Tai, Y. B. Cho, T. S. Kim, K. H. Kim, J. G. Park, W. S. Hong, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **37** (1995) 1.
- [28] D. K. Kim, H. T. Kim, Y. B. Cho, J. H. Tai, J. S. Ahn, T. S. Kim, K. H. Kim, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **35** (1995) 441.
- [29] C. P. Saris, P. J. M. Van de Vaart, F. A. Blommert, R. Rietbroek, A. C. Begg, *Proceedings of 7th International Symposium on Platinum and other metal coordination compounds in Cancer Chemotherapy (ISPCC)*, Amsterdam, the Netherlands 1995, 042.
- [30] H. P. Varbanov, M. A. Jakupec, A. Roller, F. Jensen, M. Galanski, B. K. Keppler, *J. Med. Chem.* **56** (2013) 330.
- [31] G. Sava, G. Jaouen, E. A. Hillard, A. Bergamo, *Dalton Trans.* **41** (2012) 8226.
- [32] J. L. Butour, S. Wimmer, F. Wimmer, P. Castan, *Chem. Biol. Inter.* **104** (1997) 165.
- [33] E. R. Jamieson, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **99** (1999) 2467.
- [34] J. Ruiz, J. Lorenzo, L. Sanglas, N. Cutillas, C. Vicente, M. D. Villa, F. X. Avilés, G. López, V. Moreno, J. Pérez, D. Bautista, *Inorg. Chem.* **45** (2006) 6347.
- [35] C. Navarro-Ranninger, J. M. Pérez, F. Zamora, V. M. González, J. R. Masaguer, C. Alonso, *J. Inorg. Biochem.* **52** (1993) 37.
- [36] S. Ray, R. Mohan, J. K. Singh, M. K. Samantaray, M. M. Shaikh, D. Panda, P. Ghosh, *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007) 15042.
- [37] T. Storr, K. H. Thompson, C. Orvig, *Chem. Soc. Rev.* **35** (2006) 534.
- [38] L. Potters, Y. Cao, E. Calugaru, T. Torre, P. Fearn, X. H. Wang, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **50** (2001) 605.
- [39] N. N. Stone, P. G. Stock, *Eur. Urol.* **41** (2002) 427.

- [40] E. Budzisz, B. K. Keppler, G. Giester, M. Woźniczka, A. Kufelnicki, B. Nawrot, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2004) 4412.
- [41] E. Budzisz, U. Krajewska, M. Rozalski, *Pol. J. Pharmacol.* **56** (2004) 473.
- [42] G. Zhao, H. Lin, P. Yu, H. Sun, S. Zhu, X. Su, Y. Chen, *J. Inorg. Biochem.* **73** (1999) 145.
- [43] F. Huq, H. Tayyem, P. Beale, J. Q. Yu, *J. Inorg. Biochem.* **101** (2007) 30.
- [44] L. Tušek-Božić, J. Matijašić, G. Bocelli, P. Sgarbotto, A. Furlani, V. Scarcia, A. Papaioannou, *Inorg. Chim. Acta* **185** (1991) 229.
- [45] L. Tušek-Božić, J. Matijašić, G. Bocelli, G. Calestani, A. Furlani, V. Scarcia, A. Papaioannou, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1991) 195.
- [46] T. A. K. Al-Allaf, L. J. Rashan, *Boll. Chim. Farm.* **140** (2001) 205.
- [47] K. Kurosaka, M. Takahasni, N. Watanabe, Y. Kobayashi, *J. Immunol.* **171** (2003) 4672.
- [48] A. G. Renehan, C. Booth, C. S. Potten. What is apoptosis, and why is it important? *Brit. Med. Journal* **322** (2001) 1536.
- [49] G. N. Kaluđerović, V. M. Đinović, Z. D. Juranić, T. P. Stanojković, T. J. Sabo, *J. Inorg. Biochem.* **99** (2005) 488.
- [50] D. Nijhawan, N. Honarpour, X. Wang, Apoptosis is neural development and disease. *Annu Rev. Neurosci.* **23** (2000) 73.
- [51] G. N. Kaluđerović, Đ. Miljković, M. Momčilović, V. M. Đinović, M. Mostrarica Stojković, T. J. Sabo, V. Trajković, *Int. J. Cancer.* **116** (2005) 479.
- [52] J. Sikkema, J. A. M. de Bont, B. Poolman, *Microbiology Reviews* **59(2)** (1995) 201.
- [53] S. P. Denyer, G. S. A. B. Stewart, *International Biodeterioration and Biodegradation* **41(3)** (1998) 261.
- [54] M. Nevas, A. Korhonen, M. Lindstrom, P. Turkki, H. Korkeala, *Journal of Food Protection* **67(1)** (2004) 199.
- [55] W. Guerra, E. De Andrade Azevedo, A. R. de Souza Monteiro, M. Becciarelli-Rodriguz, E. Chartone-Souza, A. M. Amaral Nascimento, A. P. Soares Fontes, I. Le. Moyes, E.C. Pereira-Maia, *J. Inorg. Biochem.* **99** (2005) 2348.
- [56] L. M. M. Vieira, M. V. de Almeida, M. C. S. Lourenco, F. A. F. M. Bezerra, A. P. S. Fontes, *Eur. J. of Med. Chem.* **44** (2009) 4107.
- [57] D. Kovala-Demertzi, M. A. Demertzis, J. R. Miller, C. Papadopoulou, C. Dodorou, G. Filousis, *J. Inorg. Biochem.* **86** (2001) 555.

- [58] R. R. Coombs, M. K. Ringer, J. M. Blacquire, J. C. Smith, J. S. Neilsen, Y.-S. Uh, J. B. Gilbert, L. J. Leger, H. Zhang, A. M. Irving, S. L. Wheaton, C. M. Vogels, S. A Westcott, *Transit. Metal. Chem.* **30** (2005) 411.
- [59] M. Ali, M. Aminul, R. Butcher, C. Karen, *Transit. Metal Chem.* **31** (2006) 79.
- [60] I. Kizilcikli, Y. D. Kurt, B. Akkurt, A. Y. Genel, S. Birteksöz, G. Ötük, B. Ülküseven, *Folia Microbiol.* **52** (2007) 15.
- [61] N. M. Aghatabay, M. Somer, M. Senel, B. Dulger, F. Guçin, *Eur. J. Med. Chem.* **42** (2007) 1069.
- [62] M. K. Biyala, K. Sharma, S. Swami, N. Fahmi, R. Vir Singh, *Transit. Metal Chem.* **33** (2008) 377.
- [63] V. Climesova, J. Koci, M. Pour, J. J. Stachel, K. Waissner, J. Kaustova, *Eur. J. Pharm. Chem.* **37** (2002) 409.
- [64] J. Valdez, R. Cedillo, A. Hernandez-Campos, L. Yepey, F. Hernandez-Luis, G. Navarrete-Vazquez, A. Tapia, R. Cortes, M. Hernandez, R. Castillo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12** (2002) 222.
- [65] T. C. Kühler, M. Swanson, B. Christenson, C. A. Klintonberg, B. Lamm, J. Fagerhag, G. Roberto, M. Ölwegard-Halvarsson, V. Shcherbuchin, T. Elebring, E. Sjöström, *J. Med. Chem.* **45** (2002) 4282.
- [66] M. Andrzejewska, L. Yepez-Mulia, A. Tapia, R. Cedillo-Rivera, A. E. Laudy, B. J. Starsciak, Z. Kazimierzczuk, *Eur. J. Pharm. Chem.* **21** (2004) 323.
- [67] A. Lacy, R. O' Kennedy, Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer, *Curr. Pharm. Des.* **10** (2010) 3797.
- [68] T. W. Graham Solomons, Craig B. Fryhle, *Organic Chemistry*. Wiley (2011).
- [69] S. Saker, L. Nahar, Chemistry of Pharmacy Students General, *Organic and Natural Product Chemistry* (2007) 363.
- [70] L. D. Quin J. Tyrell, *Fundamentals of Heterocyclic Chemistry, Importance in Nature and in the Syntesis of Pharmaceuticals*, Wiley (2010).
- [71] J. A. Joule, K. Millis, *Heterocyclic Chemistry*, 5th Edition Wiley (2010).
- [72] S. Sukdolak, S. Solujić, N. Vuković, *Hemija i biohemija kumarina*, Prirodno-matematički fakultet Kragujevac (2007).

- [73] H. A. Kuznecova, *Prirodni kumarini i furokumarini*, Nauka, Lenjingrad (1967).
- [74] M. Molnar, M. Čačić, *Biološka aktivnost derivata kumarina*, Pregledni rad (2011).
- [75] B. G. Lake, *Food and Toxicology* **37** (1999) 423.
- [76] J. R. S. Hoult, M. Paya, *Gen. Pharmacol.* **27** (1996) 713.
- [77] European Food Safety Authority, *EFSA Journal* **104** (2004) 1.
- [78] V. Panteleon, I. K. Kostakis, P. Marakos, N. Pouli, I. Andreadou, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **18** (2008) 5781.
- [79] A. Thakur, R. Singla, V. Jaitak, *Eur. J. Med. Chem.* **101** (2015) 476.
- [80] I. Kostova, *Curr. Med. Chem. Anti Canc. Agents* **5** (2005) 29.
- [81] B. Ramesh, K. V. Pugalendi, *Yale J. Biol. Med.* **78** (2005) 131.
- [82] L. N. Schoenberg, D. W. Cooke, C. F. Liu, *Inorg. Chem.* **7** (1968) 2386.
- [83] *CrysAlis CCD, CCD Data Collection GUI*, Oxford Diffraction, Oxford, UK (2007).
- [84] L. Palatinus and G. Chapuis, *J. Appl. Crystallogr.* **40** (2007) 786.
- [85] G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr.* **C71** (2015) 3.
- [86] L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* **32** (1999) 837.
- [87] K. Brandenburg, *DIAMOND (Version 3.2i)*, Crystal Impact GbR, Bonn, Germany (2012).
- [88] SAINT: SAX, *Area Detector Integration*, Siemens Analytical instruments INC., Madison, Wisconsin, USA; SADABS: *Siemens Area Detector Absorption Correction Software*, G. Sheldrick, 1996, University of Göttingen, Germany.
- [89] M. C. Burla, R. Caliandro, B. Carrozzini, G. L. Cascarano, C. Giacovazzo, M. Mallamo, A. Mazzone, G. Polidori, Sir2011, 2011, Istituto di Ricerca per lo Sviluppo di Metodologie Cristallografiche CNR, Bari, Italy.
- [90] Shelxl 97, *Program for structure refinement*, 1997, G. Sheldrick, University of Göttingen, Germany.
- [91] O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard, H. Puschmann, *J. Appl. Crystallogr.* **42** (2009) 339.
- [92] S. J. Gardai, K. A. McPhillips, S. C. Frasch, W. J. Janssen, A. Starefeldt, J. E. Murphy-Ullrich, D. L. Bratton, P. A. Oldenborg, M. Michalak, P. M. Henson, *Cell* **104** (2011) 487.
- [93] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **65(1,2)** (1983) 55.
- [94] J. M. Andrews, *J. Antimicrob. Chemoth.* **56** (2005) 60.

- [95] Clinical and Laboratory Standard Institute. 2013. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; approved Standard, 23th ed. M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- [96] Clinical and Laboratory Standards Institute 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20th informational supplement (M100-S20). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- [97] D. Lj. Stojković, V. V. Jevtić, G. P. Radić, M. B. Đukić, R. M. Jelić, M. M. Zarić, M. V. Anđelković, M. S. Mišić, D. D. Baskić, S. R. Trifunović, *New J. Chem.* **42** (5) (2018) 3924.
- [98] A. F. Tanius, D. Y. Ding, D. A. Patrick, C. Bailly, R. R. Tidwell, W. D. Wilson, *Biochemistry* **39** (2010) 1209.
- [99] Z. C. Liu, B. D. Wang, B. Li, Q. Wang, Z. Y. Yang, T. R. Li and Y. Li, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 5353.
- [100] R. F. Pasternack, E. J. Gibbs and J. J. Villafranca, *Biochemistry* **22** (1983) 2406.
- [101] G. Pratviel, J. Bernadou and B. Meunier, *Adv. Inorg. Chem.* **45** (1998) 251.
- [102] P. J. Cox, G. Psomas and C. A. Bolos, *Bioorgan. Med. Chem.* **17** (2009) 6054.
- [103] A. Patra, S. Sen, S. Sarkar, E. Zangrando and P. Chattopadhyay, *J. Coord. Chem.* **65** (2012) 4096.
- [104] M. Hazra, T. Dolai, A. Pandey, S. Kumar Dey and A. Patra, *Bioinorg. Chem. Appl.* **2014** (2014) 1.
- [105] A. Wolfe, G. H. Shimer Jr. and T. Meehan, *Biochemistry* **26** (1987) 6392.
- [106] J. R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd edn. Springer, New York, USA 2006.
- [107] J. R. Lakowicz and G. Weber, *Biochemistry* **12** (1973) 4161.
- [108] J. M. Vujić, G. N. Kaluđerović, M. Milovanović, B. B. Zmejkovski, V. Volarević, D. Živić, P. M. Đurđević, N. Arsenijević, S. R. Trifunović, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 4559.
- [109] R. Sinha, M. M. Islam, K. Bhadra, G. S. Kumar, A. Banerjee and M. Maiti, *Bioorgan. Med. Chem.* **14** (2006) 800.
- [110] W. R. Ware, *J. Phys. Chem.* **66** (1962) 455.
- [111] P. Sathyadevi, P. Krishnamoorthy, R. R. Butorac, A. H. Cowley, N. S. H. Bhuvanesh and N. Dharmaraj, *Dalton Trans.* **40** (2011) 9690.

- [112] N. Raman, A. Sakthivel, R. Jeyamurugan, *J. Chil. Chem. Soc.* **54** (2009) 354.
- [113] A. Brahmia, T. Ben Ayed, R. Ben Hassen, *Acta Crystallogr.* **E69** (2013) o1296.
- [114] F. H. Allen, *Acta Crystallogr.* **B58** (2002) 380.
- [115] J. Bernstein, R. E. Davis, L. Shimoni, N. L. Chang, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **34** (1995) 1555.
- [116] C. J. Janiak, *Chem. Soc. Dalton Trans.* (2000) 3885.
- [117] P. Y. Kuo, D. Y. Yang, *J. Org. Chem.* **73** (2008) 6455.
- [118] M. Małecka, S. J. Grabowski, E. Budzisz, *Chem. Phys.* **297** (2004) 235.
- [119] a) F. H. Allen, O. Kennard, R. Taylor, *Acc. Chem. Res.* **16** (1983) 146;
b) I. J. Bruno, J. C. Cole, P. R. Edgington, M. Kessler, C. F. Macrae, P. McCabe, J. Pearson, R. Taylor, *Acta Crystallogr.* **B 58** (2002) 389.
- [120] N. H. Al-Shaalan, *Molecules* **16(10)** (2011) 8629.
- [121] S. J. Sabounchei, P. Shahriary, *Curr. Top Med. Chem.* **13(24)** (2013) 3026.
- [122] G. D. de Souza, M. A. Rodrigues, P. P. Silva, E. C. Pereira-Maia, F. V. Botelho, T. A. de Campos, E. D. F. Franca, K. J. de Almeida, W. Guerra, *Croat. Chem. Acta* **86(2)** (2013) 201.
- [123] M. K. Samota, G. Seth, *Heteroatom Chem.* **21(1)** (2010) 44.
- [124] G. P. Radić, V.V. Glodović, Z. R. Ratković, S. B. Novaković, S. Garcia-Granda, L. Roces, L. Menéndez-Taboada, I. Radojević, O. D. Stefanović, Lj. R. Čomić, S. R. Trifunović, *J. Mol. Struct.* **1029** (2012) 180.

БИОГРАФИЈА



Данијела Љ. Стојковић је рођена 27.10.1986. године у Крагујевцу. Основну и средњу Медицинску школу, општи смер, завршила је са одличним успехом. Студије хемије на Природно-математичком факултету, смер: Заштита животне средине уписала је школске 2005/06. године, где је дипломирала 2011. године са просечном оценом 8,91. На Докторске академске студије, смер Неорганска хемија, у Институту за хемијске науке Природно-математичког факултета у Крагујевцу уписала се школске 2011/12. године.

Бави се истраживачким радом из области неорганске и бионеорганске хемије. Предмет њеног истраживања су синтеза, карактеризација и биолошка активност комплекса паладијума(II) са етилендиаминским и кумаринским дериватима аминокиселина.

За период 2012-2014. године ангажована је као истраживач-приправник (број одлуке 120/V-2) на ПМФ-у у Крагујевцу, а од 27.08.2014. као истраживач-сарадник (број одлуке 680/IX-2) на Пројекту број 172016 „Синтеза, моделовање, физичко-хемијске и биолошке особине органских једињења и одговарајућих комплекса метала” Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Од 01.10.2016. године до данас запослена је на Агрономском факултету у Чачку као сарадник у настави за ужу научну област Хемија, при чему активно учествује у раду са студентима изводећи вежбе из Опште и неорганске хемије, Биохемије и Органске хемије на свим смеровима.

Учествовала је на билатералним пројектима између Републике Србије и Републике Белорусије (2014-2015.) „Развој нових хемотерапеутских агенаса широког спектра деловања на бази комплекса биометала”; на билатералном пројекту између Републике Србије

и

Републике Словачке (2014-2015) „Синтеза и карактеризација Pd(II), Pt(II) и Au(III) комплекса и њихова биолошка активност” и на билатералном пројекту између Републике Србије и Републике Црне Горе (2017-2018) „Синтеза, карактеризацијаи биолошки аспекти нових дитиокарбаматних комплекса неких прелазних матала”.

Учествовала је у организацији XXII конференције Српског кристалографског друштва у Смедереву 2015. године, као и 53. Саветовања Српског хемијског друштва у Крагујевцу, 2016. године. Члан је Српског хемијског и Српског кристалографског друштва.

До сада има осам објављених радова у међународним часописима (један M21, три M22 и четири M23), дванаест саопштења на домаћим и два на међународним конференцијама.

**РАДОВИ У КОЈИМА СУ ШТАМПАНИ РЕЗУЛТАТИ ОВЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

1. Danijela Lj. Stojković, Verica V. Jevtić, Gordana P. Radić, Danijela V. Todorović, Marija Petrović, Milan Zarić, Ivana Nikolić, Dejan Baskić, Srećko R. Trifunović,
Stereospecific ligands and their complexes. XXII. Synthesis and antitumor activity of palladium(II) complexes with some esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-(2,2'-di(4-hydroxy-benzyl))-acetic acid, Journal of Inorganic Biochemistry **143** (2015) 111-116; ISSN: 0162-0134; DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2014.12.001; IF = 3,205, **M21**
2. Danijela Lj. Stojković, Alessia Bacchi, Davide Capucci, Milica R. Milenković, Božidar R. Čobeljić, Srećko R. Trifunović., Katarina K. Anđelković, Verica V. Jevtić, Nenad Vuković, Milena D. Vukić, Dušan M. Sladić,
Synthesis and characterization of palladium(II) complexes with glycine coumarin derivatives, Journal of the Serbian Chemical Society **81(12)** (2016) 1383-1392; ISSN: 0352-5139; DOI: 10.2298/JSC160915087S; IF = 0,822, **M23**
3. Danijela Lj. Stojković, Verica V. Jevtić, Nenad Vuković, Milena Vukić, Ivan Potočňák, Ivanka R. Zelen, Milan M. Zarić, Milena M. Mišić, Dejan Baskić, Goran N. Kaluđerović, Srećko R. Trifunović,
Crystal and molecular structure of a new palladium(II) complex with a coumarin-valine derivative, Journal of Structural Chemistry **58(3)** (2017) 550-557; ISSN: 0022-4766; DOI: 10.1134/S0022476617030179; IF = 0,521, **M23**
4. Danijela Lj. Stojković, Verica V. Jevtić, Gordana P. Radić, Maja B. Đukić, Ratomir M. Jelić, Milan M. Zarić, Marija V. Anđelković, Milena S. Mišić, Dejan D. Baskić, Srećko R. Trifunović,
Stereospecific ligands and their complexes. XXIV. Synthesis, characterization and some biological properties of Pd(II) and Pt(II) complexes with R₂-S,S-eddtyr, New Journal of Chemistry **42(5)** (2018) 3924-3935; ISSN: 1144-0546;

DOI: 10.1039/c7nj04437b; IF = 3,201, **M22**

5. Danijela Lj. Stojković, Verica V. Jevtić, Nenad Vuković, Milena Vukić, Petar Čanović, Milan M. Zarić, Milena M. Mišić, Dragče M. Radovanović, Dejan Baskić, Srećko R. Trifunović,

Synthesis, characterization, antimicrobial and antitumor reactivity of new palladium(II) complexes with methionine and tryptophane coumarine derivatives, Journal of Molecular Structure **1157** (2018) 425-433; ISSN: 0022-2860; DOI: 10.1016/j.molstruc.2017.12.095; IF = 2,011, **M22**

НАУЧНО-ИСТРАЖИВАЧКИ РАД

1. Списак радова

- 1.1. D. Lj. Stojković, V. V. Jevtić, G. Radić, I. Potočňák, S. R. Trifunović,
*Stereospecific ligands and their complexes. Part XVII. Synthesis and characterization of ethylenediamine-*N,N'*-di-*S,S*-2-(3-methyl)butanoic acid and its platinum(IV) complex with bromido ligands. Crystal structure of *s-cis*-[PtBr₂(*S,S*-eddv)]·H₂O, *Journal of Molecular Structure* **1065-1066** (2014) 16-20; ISSN: 0022-2860; DOI: 10.1016/j.molstruc.2014.02.030; IF = 1,602, **M23***
- 1.2. D. Lj. Stojković, V. V. Jevtić, G. P. Radić, D. S. Đačić, M. G. Ćurčić, S. D. Marković, V. M. Đinović, V. P. Petrović, S. R. Trifunović,
*Stereospecific ligands and their complexes. Part XII. Synthesis, characterization and in vitro antiproliferative activity of platinum(IV) complexes with some *O,O'*-dialkyl esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoic acid against colon cancer (HCT-116) and breast (MDA-MB-231) cell lines, *Journal of Molecular Structure* **1062** (2014) 21-28;
ISSN: 0022-2860; DOI: 10.1016/j.molstruc.2014.01.020; IF = 1,602, **M23***
- 1.3. D. Lj. Stojković, V. V. Jevtić, G. P. Radić, D. V. Todorović, M. Petrović, M. Zarić, I. Nikolić, D. Baskić, S. R. Trifunović,
*Stereospecific ligands and their complexes. XXII. Synthesis and antitumor activity of palladium(II) complexes with some esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-(2,2'-di(4-hydroxy-benzyl))-acetic acid, *Journal of Inorganic Biochemistry* **143** (2015) 111-116; ISSN: 0162-0134; DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2014.12.001; IF = 3,205, **M21***
- 1.4. D. Lj. Stojković, A. Bacchi, D. Capucci, M. R. Milenković, B. R. Čobeljić, S. R. Trifunović, K. K. Anđelković, V. V. Jevtić, N. Vuković, M. D. Vukić, D. M. Sladić,

Synthesis and characterization of palladium(II) complexes with glycine coumarin derivatives, Journal of the Serbian Chemical Society **81(12)** (2016) 1383-1392; ISSN: 0352-5139; DOI: 10.2298/JSC160915087S; IF = 0,822, **M23**

- 1.5. D. Lj. Stojković, V. V. Jevtić, N. Vuković, M. Vukić, I. Potočňák, I. R. Zelen, M. M. Zarić, M. M. Mišić, D. Baskić, G. N. Kaluđerović, S. R. Trifunović, *Crystal and molecular structure of a new palladium(II) complex with a coumarin-valine derivative, Journal of Structural Chemistry* **58(3)** (2017) 550-557; ISSN: 0022-4766; DOI: 10.1134/S0022476617030179; IF = 0,521, **M23**
- 1.6. D. Lj. Stojković, V. V. Jevtić, G. P. Radić, M. B. Đukić, R. M. Jelić, M. M. Zarić, M. V. Anđelković, M. S. Mišić, D. D. Baskić, S. R. Trifunović, *Stereospecific ligands and their complexes. XXIV. Synthesis, characterization and some biological properties of Pd(II) and Pt(II) complexes with R₂-S,S-eddtyr, New Journal of Chemistry* **42(5)** (2018) 3924-3935; ISSN: 1144-0546; DOI: 10.1039/c7nj04437b; IF = 3,201, **M22**
- 1.7. D. Lj. Stojković, V. V. Jevtić, N. Vuković, M. Vukić, P. Čanović, M. M. Zarić, M. M. Mišić, D. M. Radovanović, D. Baskić, S. R. Trifunović, *Synthesis, characterization, antimicrobial and antitumor reactivity of new palladium(II) complexes with methionine and tryptophane coumarine derivatives, Journal of Molecular Structure* **1157** (2018) 425-433; ISSN: 0022-2860; DOI: 10.1016/j.molstruc.2017.12.095; IF = 2,011, **M22**
- 1.8. E. H. Avdović, D. Lj. Stojković, V. V. Jevtić, M. Kosić, B. Ristić, Lj. Harhaji-Trajković, M. Vukić, N. Vuković, Z. S. Marković, I. Potočňák, S. R. Trifunović, *Synthesis, characterization and cytotoxicity of a new palladium(II) complex with a coumarin-derived ligand 3-(1-(3-hydroxypropylamino)ethylidene)chroman-2,4-dione. Crystal structure of the 3-(1-(3-hydroxypropylamino)ethylidene)chroman-2,4-dione, Inorganica Chimica Acta* **466** (2017) 188-196; ISSN: 0020-16936; DOI: 10.1016/j.ica.2017.06.015; IF = 2,264, **M22**

2. **Списак саопштења на међународним научним конференцијама који су штампани у изводу**

- 2.1. N. L. Vuković, M. D. Vukić, S. R. Trifunović, D. Lj. Stojković, V. V. Jevtić, M. Kacainova,
Seasonal variation in chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oils of various plant organs of wild growing Nepeta cataria from Serbia
11th International Scientific Conference of Biotechnology and quality of raw materials and foodstuffs, Nitra, Slovakia, 2016, 79;
ISBN: 978-80-552-1452-8, **M34**
- 2.2. S. R. Trifunović, N. L. Vuković, M. D. Vukić, D. Lj. Stojković, V. V. Jevtić, D. R. Ilić, M. Kacainova,
Antibacterial activity of structurally modified butyrolactones with amino acids,
International Scientific Symposium Bioengineering of animal resources 2016, Temišvar, Rumunija, 2016, 48;
ISSN: 2501-725X, **M34**

3. **Списак саопштења на домаћим научним конференцијама који су штампани у изводу**

- 3.1. D. Lj. Stojković, G. P. Radić, V. V. Glođović, I. Potočňak, S. R. Trifunović,
Synthesis and crystal structure of dibromido-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-2-(3-methyl)butanoato-platinum(IV) complex,
XIX Conference of the Serbian Crystallographic Society, Bela Crkva, 2012, 70;
ISSN: 0354-5741, **M64**
- 3.2. D. Lj. Stojković, V. V. Jevtić, N. Vuković, S. Sukdolak, G. P. Radić, O. R. Klisurić, S. R. Trifunović,

- Synthesis, characterization and crystal structure of 3-(1-(2-hydroxyethylamino)-ethylidene) chroman-2,4-dione-palladium(II) complex,*
XX Conference of the Serbian Crystallographic Society, Avala, Beograd, 2013, 22;
ISSN: 0354-5741, **M64**
- 3.3. V. V. Jevtić, S. R. Trifunović, D. Lj. Stojković, G. P. Radić, N. L. Vuković, S. B. Sukdolak, S. B. Novaković, G. A. Bogdanović,
Synthesis and crystal structure of methyl 2-methyl-2-(2-oxotetrahydrofuran-3-yl)-4-thiazolidine-4-carboxylate,
XXI Conference of the Serbian Crystallographic Society, Užice, 2014, 78;
ISBN: 978-86-912959-1-2, **M64**
- 3.4. D. Lj. Stojković, V. V. Jevtić, N. L. Vuković, S. B. Sukdolak, G. P. Radić, I. Potočňak, Srećko R. Trifunović,
Synthesis and crystal structure of methyl 2-(1-(2,4-dioxochroman-3-ylidene)-ethyl-amino)-3-methylbutanoate,
XXI Conference of the Serbian Crystallographic Society Užice, 2014, 32;
ISBN: 978-86-912959-1-2, **M64**
- 3.5. D. Lj. Stojković, V. V. Jevtić, N. L. Vuković, M. D. Vukić, G. P. Radić, I. Potočňak, S. R. Trifunović,
Synthesis and crystal structure of 2-acetylbutyrolactone with methyl ester of L-tyrosine,
XXII Conference of the Serbian Crystallographic Society, Smederevo, 2015, 41;
ISBN: 978-86-912959-2-9, **M64**
- 3.6. G. P. Radić, D. Capucci, A. Bacchi, D. Lj. Stojković, V. V. Jevtić, N. L. Vuković, M. D. Vukić, K. K. Anđelković, S. R. Trifunović,
Synthesis and crystal structure of palladium(II) complex with methyl 2-(1-(2,4-dioxochroman-3-ylidene)ethylamino)acetate,

- XXII Conference of the Serbian Crystallographic Society, Smederevo, 2015, 43;
ISBN: 978-86-912959-2-9, **M64**
- 3.7. D. Lj. Stojković, V. V. Jevtić, S. R. Trifunović,
*Synthesis and characterization of platinum(II) complex with ethyl ester of (S,S)-
-ethylenediamine-N,N'-di-(2,2'-di(4-hydroxy)-benzyl-acetic acid,*
Third Conference of Young Chemists of Serbia, Beograd, 2015, 46;
ISBN: 978-86-7132-059-7, **M64**
- 3.8. D. Lj. Stojković, V. V. Jevtić, S. R. Trifunović, N. L. Vuković, M. D. Vukić,
I. Potočnak, E. H. Avdović, S. Jovičić,
*Synthesis and crystal structure of 3-(1-(3-hydroxypropylamino)ethylidene)chroman
-2,4-dione,*
XXIII Conference of the Serbian Crystallographic society, Andrievlje, 2016, 85;
ISBN: 978-86-912959-3-6, **M64**
- 3.9. M. D. Vukić, N. L. Vuković, D. Lj. Stojković, S. R. Trifunović,
*Antibacterial and cytotoxic activities of naphthoquinone pigments from *Onosma
visianii* Clem,*
Fourth conference of young chemists of Serbia, Beograd, Srbija, 2016, 67;
ISBN: 978-86-7132-064-1, **M64**
- 3.10. D. Lj. Stojković, V. V. Jevtić, S. R. Trifunović, N. L. Vuković, M. D. Vukić, O. R.
Klisurić, E. H. Avdović, S. Jovičić,
*Synthesis and crystal structure of methyl ester of phenylalanine ammonium-
-thiocyanate,*
XXIV Conference of the Serbian Crystallographic Society, Vršac, 2017, 27;
ISBN: 978-86-912959-3-6, **M64**
- 3.11. V. V. Jevtić, D. Lj. Stojković, N. L. Vuković, M. D. Vukić, D. D. Baskić, S. R.
Trifunović, Z. B. Leka,

Antimicrobial and antitumor reactivity of new palladium(II) complexes with some amino acid derivatives,

54th Meeting of the Serbian Chemical Society, Beograd, 2017, 71;

ISBN: 978-86-7132-067-2, **M64**

- 3.12. E. H. Avdović, V. V. Jevtić, M. P. Kasalović, D. Lj. Sojković, J. Jovičić, N. Vuković, Z. Marković, I. Potočňák, S. R. Trifunović,

Synthesiss and crystal structure of 3-(1-m-toluidino-ethylidene)-chromane 2,4-dione,

XXV Konferencija Srpskog kristalografskog društva, Bajina Bašta (2018), 46;

ISBN: 978-86-912959-4-3, **M64**

4. Spisak saopšteња na domaћim naučnim konferencijama koji su štampani u celini

- 4.1. D. Lj. Stojković, V. V. Jevtić, S. R. Trifunović,

Antibacterial activity of platinum(II) and palladium(II) complexes with some alkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-(2,2'-di(4-hidroxy)-benzyl acetic acid,

XXII Savetovanje o biotehnologiji, Čačak, Srbija, 2017, 623;

ISBN: 978-86-87611-48-1, **M63**

ПРИЛОГ



Stereospecific ligands and their complexes. XXII. Synthesis and antitumor activity of palladium(II) complexes with some esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-(2,2'-di(4-hydroxy-benzyl))-acetic acid[☆]

Danijela Lj. Stojković^a, Verica V. Jevtić^{a,*}, Gordana P. Radić^b, Danijela V. Todorović^b, Marija Petrović^c, Milan Zarić^d, Ivana Nikolić^d, Dejan Baskić^b, Srećko R. Trifunović^a

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

^b Centre for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

^c Department of Laboratory Diagnostics, Clinical Center Kragujevac, Zmaj Jovina St. 30, 34000 Kragujevac, Serbia

^d Department of Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 July 2014

Received in revised form 1 December 2014

Accepted 1 December 2014

Available online 10 December 2014

Keywords:

Palladium(II) complexes

Infrared spectroscopy

¹H and ¹³C NMR spectroscopy

Cytotoxicity

ABSTRACT

Four new ligands and their palladium(II) complexes of general formula R₂-S,S-eddtyr (**L1–L4**) and [PdCl₂(R₂-S,S-eddtyr)] (**C1–C4**) (R = ethyl, *n*-propyl, *n*-butyl and *n*-pentyl; S,S-eddtyr·2HCl = ethylenediamine-*N,N'*-di-(2,2'-di(4-hydroxy-benzyl))-acetic acid dihydrochloride) have been synthesized and characterized by microanalysis, infrared, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. Cytotoxicity for ligands and complexes on two different cell lines (human breast cancer, MDA-MB-231 and human lung cancer, A549 cell lines) and human chronic lymphocytic leukemia cells (CLL) was investigated using MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The discovery of cisplatin led scientists to synthesize many platinum-based drugs that could potentially be less toxic to healthy tissue [1–3] and overcome the resistance of some tumors to this drug [4,5].

The success of metallodrugs is closely linked to the proper choice of ligands, as they play a crucial role in modifying reactivity and lipophilicity, in stabilizing specific oxidation states and in imparting substitution inertness [6,7].

The aim of developing non-platinum anticancer complexes is overcoming the main limits of platinum drugs: narrow range of activity, acquired after treatment resistance, and severe toxicity on healthy tissue [1–5]. Non-platinum complexes may exhibit anticancer activity and toxic side-effects markedly different from that of platinum based drugs for a number of reasons. Palladium derivatives have also been a subject of wide examination due to their structural analogy with Pt(II) complexes. However, initial results were not very encouraging because the Pd(II) derivatives generally showed lower anticancer activity than

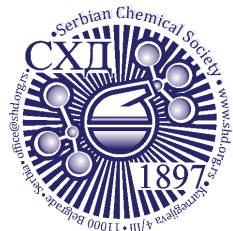
cisplatin. This behavior may be related to the more labile nature of palladium(II) relative to platinum(II) complexes [8,9]. Rapid ligand exchange was thought to diminish the possibility of Pd(II) complexes to reach the biological target unchanged and increase the risk of adverse effects on biochemical processes occurring in normal cells. In order to overcome these problems, several authors [10] have suggested that the use of chelating ligands may reduce the reactivity of the palladium center. Generally, Pd(II) complexes are divided into two major groups: Pd(II) complexes with sulfur donor ligands and Pd(II) complexes with nitrogen and other donor ligands. Cytotoxic activity of Pd(II) complexes with thiosemicarbazones was shown against MCF-7, TK-10 and UACC-62 human tumor cell lines. They showed lower IC₅₀ values and were more cytotoxic in these cell lines than cisplatin [11]. Other Pd(II) complexes with sulfur donor ligands showed a moderate to low cytotoxicity *in vitro* against various human tumor cell lines [12]. Some Pd(II) complexes containing the bidentate ligand 9-aminoacridine showed higher cytotoxic activity against human ovarian cancer cells than both cisplatin and the free ligands [13].

A number of palladium(II) complexes with neutral ligands such as pyridine derivatives [14,15], phosphonate derivatives of quinoline [16] or pyrazole derivatives [17] have been investigated and their significant cytotoxic activity has been proved. *In vitro* antitumor activity of some complexes was compared to that of cisplatin [18–22], and as a result of these findings *N,N* bidentate esters, R₂edda-type ligands, containing hiral C-atoms with S

[☆] For Part XXI see D. Ilić, V.V. Jevtić, M.M. Vasojević, M.Ž. Jelić, I.D. Radojević, Lj. R. Čomić, S.B. Novaković, G.A. Bogdanović, I. Potočnik, S.R. Trifunović (Polyhedron, submitted).

* Corresponding author. Tel.: +381 34300263.

E-mail address: glodjovicv@yahoo.com (V.V. Jevtić).



J. Serb. Chem. Soc. 81 (12) 1383–1392 (2016)
JSCS–4935

Synthesis and characterization of palladium(II) complexes with glycine coumarin derivatives

DANIJELA LJ. STOJKOVIĆ^{1#}, ALESSIA BACCHI², DAVIDE CAPUCCI², MILICA R. MILENKOVIĆ^{3#}, BOŽIDAR ČOBELJIĆ^{3#}, SREĆKO R. TRIFUNOVIĆ^{1#}, KATARINA ANĐELKOVIĆ^{3#}, VERICA V. JEVTIĆ^{1#}, NENAD VUKOVIĆ¹, MILENA VUKIĆ¹ and DUŠAN SLADIĆ^{3*#}

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia, ²Dipartimento di Chimica, University of Parma, Parco Area delle Scienze 17 A, I 43124 Parma, Italy and ³Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 12–16, 11000 Belgrade, Serbia

(Received 15 September, revised 25 September, accepted 27 September 2016)

Abstract: A Pd(II) complex with methyl 2-([1-(2,4-dioxochroman-3-ylidene)ethyl]amino)acetate was synthesized. The structures of both the ligand and its Pd(II) complex were determined by elemental analysis, and IR and NMR spectroscopy. Recrystallization of the Pd(II) complex from DMF/water solution resulted in its hydrolysis and the formation of the dimethylamine (2-([1-(2,4-dioxochroman-3-ylidene)ethyl]amino)acetato)palladium(II) complex, the structure of which was determined by elemental analysis, IR, ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopy and X-ray analysis.

Keywords: coumarin-derived ligands; crystal structure; mechanism of hydrolysis.

INTRODUCTION

Coumarins (derivatives of 2*H*-1-benzopyran-2-one) are of great interest in medicinal chemistry because of their wide range of pharmacological activity.^{1–6} Metal complexes with coumarin derivatives have been investigated because of their anticoagulant,⁷ antimicrobial⁸ and antitumor activities.^{9–11} Among the complexes with coumarin derivatives, Pd(II) complexes have attracted considerable attention because of their significant antitumor activity.^{12–15} Following these findings, in this work the synthesis of methyl 2-([1-(2,4-dioxochroman-3-ylidene)ethyl]amino)acetate (**HL**¹) and its chlorido Pd(II) complex (**1**) are reported. Attempts to obtain monocrystals of complex **1** from DMF/water solution resulted in its hydrolysis and the formation of dimethylamine(2-([1-(2,4-dioxochroman-

* Corresponding author. E-mail: dsladic@chem.bg.ac.rs

Serbian Chemical Society member.

doi: 10.2298/JSC160915087S



CRYSTAL AND MOLECULAR STRUCTURE OF A NEW PALLADIUM(II) COMPLEX WITH A COUMARIN-VALINE DERIVATE

D. Lj. Stojković¹, V. V. Jevtić^{1*}, N. Vuković¹,
M. Vukić¹, I. Potočňák², I. R. Zelen³,
M. M. Zarić³, M. M. Mišić⁴, D. Baskić^{5,6},
G. N. Kaluđerović⁷, and S. R. Trifunović¹

UDC 548.73:547.13:546.98

The new coumarine derivate with methyl ester of 2-((Z)-1(2,4-dioxochroman-3-ylidene)ethylamino)-3-methylbutanoic acid and the corresponding palladium(II) complex are synthesized and characterized by microanalysis, infrared, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. The proposed structure of the ligand was confirmed based on the X-ray structural study.

DOI: 10.1134/S0022476617030179

Keywords: coumarine-derived ligand, palladium(II) complex, crystal structure.

INTRODUCTION

Coumarins and their derivatives are widely spread in nature, especially in the world of plants, although they are also found in the metabolites of microorganisms and animals [1]. Coumarine derivatives have spasmolytic, antiarrhythmic, cardiotonic, and photodynamic properties [2], as well as antioxidant [3] and antitumor activity [4]. Metal complexes with coumarine derivatives are also used in significant anticoagulant [5, 6] and antitumor activity [2, 7] investigations. Some researchers showed that cerium(III), zirconium(IV), copper(II), zinc(II), bismuth(III), and cadmium(II) were significantly cytotoxic *in vitro* [8, 9].

The initial results of antitumor testing of palladium complexes, due to their structural analogy with platinum(II) complexes, were not very encouraging. The palladium(II) complexes generally showed a lower antitumor activity than cisplatin. This could be explained due to a more labile nature of the palladium(II) complexes in comparison to the corresponding platinum(II) complexes [10]. However, some palladium(II) complexes exerted a higher antitumor activity in comparison to cisplatin and carboplatin. Budzisz et al. found that the palladium(II) complex with 4-hydroxy-3-(1-iminoethyl)-2H-chromen-2-one was 7800 times more active than carboplatin [11].

The rapid emergence of pan-resistant bacterial strains is a major medical problem throughout the world. Some resistant strains have developed mechanisms of resistance to all existing antibiotics. The great number of newly synthesized

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia; *glodjovicv@yahoo.com. ²Institute of Chemistry, P. J. Šafárik University in Košice, Košice, Slovakia. ³Department of Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia. ⁴Public Health Institute, Vranje, Serbia. ⁵Centre for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia. ⁶Public Health Institute, Kragujevac, Serbia. ⁷Department of Bioorganic Chemistry, Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Halle (Saale), Germany. The text was submitted by the authors in English. *Zhurnal Strukturnoi Khimii*, Vol. 58, No. 3, pp. 578-585, March-April, 2017. Original article submitted December 15, 2015; revised April 11, 2016.



Cite this: DOI: 10.1039/c7nj04437b

Stereospecific ligands and their complexes. XXIV. Synthesis, characterization and some biological properties of Pd(II) and Pt(II) complexes with R₂-S,S-eddtyr†‡

Danijela Lj. Stojković,^a Verica V. Jevtić,^b Gordana P. Radić,^c Maja B. Đukić,^b Ratomir M. Jelić,^c Milan M. Zarić,^d Marija V. Anđelković,^d Milena S. Mišić,^e Dejan D. Baskić^{f,g} and Srećko R. Trifunović^b

Four new platinum(II) complexes of general formula [PtCl₂(R₂-S,S-eddtyr)] (R = ethyl, *n*-propyl, *n*-butyl and *n*-pentyl); S,S-eddtyr = ethylenediamine-*N,N'*-di-(2,2'-di(4-hydroxy)-benzyl-acetic acid) have been synthesized and characterized by microanalysis, and infrared, ¹H NMR and ¹³C NMR spectroscopy. The *in vitro* antimicrobial activity of ligands **L1–L4** [L = R₂-S,S-eddtyr; R = ethyl (**L1**), *n*-propyl (**L2**), *n*-butyl (**L3**), *n*-pentyl (**L4**)], platinum(II) complexes **C1–C4** [PtCl₂(R₂-S,S-eddtyr)] [R = ethyl (**C1**), *n*-propyl (**C2**), *n*-butyl (**C3**), *n*-pentyl (**C4**)] and palladium(II) complexes **C5–C8** [PdCl₂(R₂-S,S-eddtyr)] [R = ethyl (**C5**), *n*-propyl (**C6**) or *n*-butyl (**C7**) or *n*-pentyl (**C8**)] was investigated. The cytotoxicity of ligands and platinum(II) complexes was investigated using MTT assay. The interaction of platinum and palladium complexes [MCl₂(R₂-S,S-eddtyr)] (M = Pt or Pd) with calf thymus DNA (CT-DNA) was investigated using UV-Vis absorption and fluorescence spectroscopy. The association constant (*K_b*) estimated from the absorption spectral study and the quenching constant (*K_{SV}*) calculated from relevant fluorescence quenching data indicate a non-covalent interaction between the metal complex and DNA. Ethidium bromide (EB) competitive studies revealed that complexes **C1–C8** could interact with CT-DNA through intercalation. Furthermore, the interactions between human serum albumin (HSA) and the platinum(II) and palladium(II) complexes were also investigated by UV-Vis absorption and fluorescence spectroscopy, showing that the new complexes could strongly bind with HSA.

Received 20th November 2017,
Accepted 25th January 2018

DOI: 10.1039/c7nj04437b

rsc.li/njc

Introduction

Approximately half of all the patients receiving anticancer chemotherapy are being treated with a platinum-based drug.¹

Over the past years, agents such as carboplatin and cisplatin have dominated the treatment of various cancers.² However, despite the widespread use of these drugs, they may provoke severe side effects and that is why other platinum complexes are investigated as potential anticancer agents.

Antimicrobials are used to treat infections by different disease-causing microorganisms, including bacteria, mycobacteria, viruses, parasites and fungi. In a vast majority of cases where antimicrobials are used, the microorganisms have found a way to evade or resist the antimicrobial agents.^{3,4} Bacterial resistance to antibiotics poses a serious threat to the successful treatment of infectious diseases and is becoming a major clinical and public health problem, leading to increased morbidity and mortality.^{5–7} There have been numerous attempts towards synthesis of new compounds acting against multi-resistant microorganisms.⁸ The synthesis and evaluation of the biological activity of the new metal-based compounds is the field of growing interest.

In some previously published papers, synthesis and characterization of the palladium(II) complexes with R₂-S,S-eddtyr

^a University of Kragujevac, Faculty of Agronomy, Cara Dušana 34, 32000 Čačak, Republic of Serbia

^b University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia.

E-mail: glodjovicv@yahoo.com; Fax: +381(0)34335040; Tel: +381(0)34300263

^c University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia

^d University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Biochemistry, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia

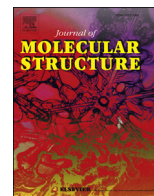
^e Public Health Institute Vranje, Republic of Serbia

^f Public Health Institute Kragujevac, Republic of Serbia

^g University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Centre for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia

† For Part XXIII see V. V. Jević, G. P. Radić, O. D. Stefanović, I. D. Radojević, S. Vasić, Lj. R. Čomić, V. M. Đinović and S. R. Trifunović, *Inorg. Chim. Acta*, 2016, **442**, 105.

‡ Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c7nj04437b



Synthesis, characterization, antimicrobial and antitumor reactivity of new palladium(II) complexes with methionine and tryptophane coumarine derivatives

Danijela Lj Stojković^a, Verica V. Jevtić^b, Nenad Vuković^b, Milena Vukić^b, Petar Čanović^c, Milan M. Zarić^c, Milena M. Mišić^d, Dragče M. Radovanović^e, Dejan Baskić^{f,g}, Srećko R. Trifunović^{b,*}

^a University of Kragujevac, Faculty of Agronomy, Cara Dušana 34, 32000 Čačak, Serbia

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

^c University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Biochemistry, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

^d Public Health Institute, J.J. Lunge 1, 17500 Vranje, Serbia

^e University of Kragujevac, Department of Surgery, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

^f University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Centre for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

^g Public Health Institute, Nikole Pašića 1, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 July 2017

Received in revised form

23 December 2017

Accepted 26 December 2017

Available online 27 December 2017

Keywords:

Coumarine-derived ligands

Palladium(II) complexes

Cytotoxicity

Antimicrobial activity

ABSTRACT

In reaction of 3-acetyl-4-hydroxy coumarine with methionine methyl ester hydrochloride and tryptophane methyl ester hydrochloride the corresponding enamine ligands were obtained. Palladium (II) complexes were prepared in reaction of potassium-tetrachloridopalladate (II) and corresponding enamine. All compounds were characterized by microanalysis, infrared, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. *In vitro* antitumor activity of the mentioned ligands and corresponding palladium (II) complexes, as well as me-Gly and me-Val ligands and [Pd (me-Gly)Cl] and [Pd (me-Val)₂] complexes was determined by MTT assay against two leukemia cell lines (JVM-13 and MOLT-4) and against primary leukemic cells isolated from chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients. Antimicrobial activity of the tested compound was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum microbicidal concentration (MMC) against three reference bacterial strains: *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and one clinical isolate of yeast: *Candida* spp.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Coumarine and their derivatives represent very important class of the natural compounds that exhibit a wide spectrum of biological activity such as cytotoxic activity against several human tumor cell lines [1,2] as well as spasmolytic, antiarrhythmic, cardiotonic and photodynamic [3] and antioxidant [4] activity. They are also used in flavoring food and in cosmetic products as fragrances [5–7]. Anti-coagulant [8,9] and antitumor activity [2,10–12] of the metal complexes was investigated.

Although palladium (II) complexes have structural analogy with

platinum (II) complexes, those complexes generally showed lower antitumor activity than cisplatin due to the fact that palladium (II) complexes are more labile in comparison to the corresponding platinum (II) complexes [13]. However, some of palladium (II) complexes exerted higher antitumor activity in comparison with cisplatin and carboplatin [14].

Moreover, the emergence and spread of antibiotic resistance in bacteria lead to the increased need for new antibacterial agents. There are numerous attempts to synthesize new compounds that might be active against multiresistant microorganisms. A large number of newly synthesized metal complexes have been studied for their antimicrobial activity. The synthesis of metal complexes with organic bioactive ligands is becoming increasingly important field in science research [15–17]. The experimental analyses so far have suggested that antimicrobial activities of organic ligands and

* Corresponding author.

E-mail address: srecko@kg.ac.rs (S.R. Trifunović).

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, _____ Данијела Љ. Стојковић _____, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Синтеза, карактеризација и биолошка активност комплекса Pd(II)

са етипендиаминским и кумаринским дериватима аминокиселина

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

Овом Изјавом такође потврђујем:

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

У _____ Крагујевцу _____, _____ године,


_____ потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Данијела Љ. Стојковић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Синтеза, карактеризација и биолошка активност комплекса Pd(II)

са етилендиаминским и кумаринским дериватима аминокиселина

која је одбрањена на Природно-математичком факултету

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам


не дозвољавам¹

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

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

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

у Крагујевцу _____, _____ године,



потпис аутора

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