

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Julijana D. Tadić

Sinteza, struktura i svojstva novih potencijalno
biološki aktivnih azo derivata 2(1*H*)-pirimidinona

Doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Julijana D. Tadić

Sinteza, struktura i svojstva novih potencijalno
biološki aktivnih azo derivata 2(1*H*)-pirimidinona

Doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Julijana D. Tadić

Synthesis, structure and properties of novel
potentially biological active azo derivatives of
2(*1H*)-pyrimidinone

Doctoral dissertation

Belgrade, 2021

Mentor:

Dr Dušan Mijin, *redovni profesor*
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Članovi komisije:

Dr Slobodan Petrović, *profesor emeritus*
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Tatjana Stanojković, *naučni savetnik*
Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije

Dr Željko Vitnik, *naučni savetnik*
Univerziteta u Beogradu, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju,
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Dr Jelena Ladarević, *naučni saradnik*
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Marina Mihajlović, *naučni saradnik*
Inovacionog centra Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije, koji se tiče sinteze jedinjenja, je urađen na Katedri za organsku hemiju i Katedri za organsku hemijsku tehnologiju, Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Ispitivanje citotoksične aktivnosti urađeno je u Laboratoriji za modifikatore biološkog odgovora, Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju, Instituta za onkologiju i radiologiju Republike Srbije. Kvantno-hemijski proračuni izvršeni su u Centru za hemiju, Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerziteta u Beogradu, Instituta od nacionalog značaja za Republiku Srbiju. Ovde iskazujem zahvalnost svima koji su dali doprinos u izradi ove doktorske disertacije.

Na početku, želim da se zahvalim mom mentoru, prof. dr Dušanu Mijinu, na dragocenom znanju koje mi je preneo, svim savetima, dobronamernim kritikama, razumevanju, idejama tokom planiranja i izvođenja eksperimenata, kao i u toku pisanja naučnih radova, patentnih prijava, i ove disertacije, koji su proizašli iz naše lepe i dugogodišnje saradnje.

Prof. dr Slobodanu Petroviću se zahvaljujem na podršci i vrednim savetima koji su mi pomogli kako u naučnom, tako i u ličnom usavršavanju.

Prof. dr Mići Jovanoviću, profesoru u penziji Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, se zahvaljujem na ukazanom poverenju i pruženoj prilici da se bavim naučno-istraživačkim radom, u okviru njegovog istraživačkog tima. Takođe, zahvaljujem mu se na vrednim lekcijama o nauci i životu uopšte.

Dr Tatjani Stanojković, načelniku Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju, Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije se zahvaljujem na uspostavljenoj lepoj saradnji i velikodušnoj pomoći pri ispitivanju citotoksične aktivnosti. Dr Ivani Matić, višem naučnom saradniku Laboratorije za modifikatore biološkog odgovora, se zahvaljujem na značajnoj pomoći pri analizi i diskusiji citotoksičnih svojstava.

Dr Željku Vitniku, naučnom savetniku, i dr Vesni Vitnik, naučnom savetniku, Centra za hemiju, Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerziteta u Beogradu, se zahvaljujem na pomoći, strpljenju i razumevanju pri izradi kvantno-hemijskih proračuna. Zahvaljujem im se i na važnom doprinosu u pisanju naših radova, kao i na svim sugestijama i savetima koje su mi dali u toku pisanja disertacije.

Dr Marini Mihajlović, naučnom saradniku Inovacionog centra Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu, se zahvaljujem što me je uvela u svet mikroreaktora, kao i na njenom interesovanju i podršci tokom izrade i pisanja disertacije. Hvala na brojnim sugestijama i divnoj radnoj atmosferi u Laboratoriji 531a, Katedre za organsku hemijsku tehnologiju.

Dr Jeleni Lađarević, naučnom saradniku Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, se od srca zahvaljujem na ogromnoj pomoći i podršci tokom pisanja disertacije. Hvala na brojnim dragocenim savetima, optimizmu i prijatnoj radnoj atmosferi na Katedri za organsku hemiju.

Dr Slavici Porobić, naučnom saradniku, Laboratorije za radijacionu hemiju i fiziku „Gama“, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, zahvaljujem na velikodušnoj pomoći pri termičkoj analizi, kao i na svim savetima i podršci u toku izrade disertacije.

Ivani Gazikalović, istraživaču saradniku Inovacionog centra Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu, zahvaljujem na značajnoj pomoći pri određivanju antimikrobne aktivnosti,

koje je urađeno na Katedri za biohemijsko inženjersvo i biotehnologiju, Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Dr Nenadu Jankoviću, višem naučnom saradniku Instituta za informacione tehnologije u Kragujevcu, kao i koleginići Emiliji Milović zahvaljujem na pomoći pri snimanju fluorescentnih spektara, koje je urađeno na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Kragujevcu.

Dr Mariji Vukčević, višem naučnom saradniku Katedre za analitičku hemiju i kontrolu kvaliteta, Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu zahvaljujem na pomoći pri masenoj spektrometriji. Dr Milošu Petkoviću, docentu Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, mnogo hvala za velikodušnu pomoć pri snimanju NMR spektara.

Dragom kolegi Luki Matoviću, najlepše se zahvaljujem na velikoj podršci, pomoći i brojnim savetima, koje mi je pružao u našoj svakodnevnoj komunikaciji. Dragoj koleginići Dr Aniti Lazić, posebno zahvaljujem na velikodušnoj pomoći i sugestijama pri izradi disertacije. Kolegama Dr Nemanji Trišoviću, Kristini Gak Simić, Petru Batiniću, Dr Aleksandri Bogdanović i Dr Nataši Valentić hvala na kolegijalnosti i prijatnoj radnoj atmosferi na Katedri za organsku hemiju.

Dragim koleginićama Dr Ani Dajić, Dr Milici Karanac i dragom kolegi Dr Stefanu Mandiću-Rajčeviću hvala što su me srdačno prihvatili, od samog početka mog angažovanja na projektu, na kom smo zajedno radili na Katedri za organsku hemijsku tehnologiju. Hvala za mnogobrojne trenutke podrške, solidarnosti, hvala za sve savete, optimizam i pozitivnu energiju.

Mojim dragim prijateljicama i koleginićama Milici Svetozarević i Aleksandri Mašulović iskreno zahvaljujem na velikoj podršci i razumevanju koje su mi pružile u svim fazama izrade ove disertacije. Hvala na svim savetima, divnoj radnoj atmosferi i još lepšem druženju.

Mom mentoru prof. dr Dušanu Mijinu, kao i prof. dr Mići Jovanoviću zahvaljujem na ukazanom poverenju i prilici da radim sa njihovim studentima, što mi je dalo vredno iskustvo. Hvala svim studentima, sa kojima sam sarađivala u toku izrade ove disertacije.

Mojim dragim prijateljima Tamari Belin i Gorkom Đuriću mnogo hvala za svu podršku, razumevanje i pozitivnu energiju koju mi daju sve ove godine.

Mom Saletu, hvala za neprestanu podršku, beskrajnu ljubav, snagu i volju, koju mi pruža u našem zajedničkom životu, što me inspiriše da idem dalje ka ostvarenju snova.

* * *

Na kraju, mojoj porodici, mami Aleksandri, tati Draganu, braći Radovanu i Petru, nema reči kojima bih iskazala zahvalnost za sve što čine za mene, za безусловnu ljubav i za oslonac koji predstavljaju u mom životu. Njima, s ljubavlju posvećujem ovu doktorsku disertaciju.

U Beogradu, jun 2021.

Julijana Tadić

Rezime

Heterociklični azo derivati predstavljaju značajnu klasu sintetskih boja. Ova jedinjenja dobijaju pažnju kako u akademskim istraživanjima, tako i u industrijskim krugovima, pre svega zahvaljujući izuzetnim svojstvima za bojenje, ali i zbog širokog spektra bioloških aktivnosti koje ispoljavaju. U ovoj doktorskoj disertaciji sintetisana su nova heterociklična azo jedinjenja i njihova struktura, svojstva i biološka aktivnost su temeljno proučavani. Prvo su sintetisani polazni heterociklični molekuli – 2-piridoni i 3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-oni (DHPM), koji su potom korišćeni za dobijanje ciljanih azo derivata. Sinteza različitih 2-piridona ispitana je korišćenjem metode kontinualnog protoka, u kapilarnom mikroreaktoru, u cilju razvijanja efikasnijeg sintetskog postupka. U Biđinelijskoj (*Biginelli*) reakciji je sintetisan derivat DHPM-a sa nitro-grupom u fenilnom jezgru, a zatim je izvršena njegova redukcija do amino derivata, koristeći blage reakcione uslove. Nakon toga, DHPM derivat je diazotovan i kuplovan sa 2-piridonima, pri čemu se prvi put dobijaju azo jedinjenja koja u svojoj strukturi sadrže fragmente i 2-piridona i dihidropirimidinona. Hemijska struktura jedinjenja potvrđena je eksperimentalnim podacima (elementalnom analizom, termičkom analizom, ESI-MS, ATR-FTIR i NMR spektroskopijom) i kvantno-hemijskom (DFT) proračunima. Pomoću DFT metode dobijeni su parametri optimizovane geometrije, teorijski FT-IR, NMR, UV-Vis spektri, oblik i energije graničnih molekulskih orbitala (E_{HOMO} , E_{LUMO} , ΔE). Poređenjem izračunatih i eksperimentalnih rezultata ustanovljeno je dobro slaganje podataka. Kako bi se rasvetlila reaktivnost ispitivanih molekula izračunate su mape elektrostatičkih molekulskih potencijala, kao i kvantno-hemijski molekulski deskriptori. Fotofizička svojstva proučavanih azo derivata ispitana su korišćenjem UV-Vis i fluorescentne spektroskopije. Ova analiza je pružila detaljne informacije o azo-hidrazon tautomeriji, interakcijama rastvarača sa molekulima boja, kao i uticaju pH sredine na kiselo-bazna svojstva datih molekula. Proučavanjem sposobnosti sintetisanih boja da emituju zračenje, ustanovljena su njihova fluorescentna svojstva, što je naročito značajno sa stanovišta otkrivanja novih fluorescentnih azo boja. Dalje je ispitana potencijalna biološka aktivnost novih azo derivata određivanjem *in vitro* antioksidativnih, antimikrobnih i antikancerogenih svojstava. Antioksidativna aktivnost je procenjena ABTS metodom. Antimikrobna svojstva su određena metodom difuzije na agarnoj podlozi, a test je sproveden na patogenim sojevima *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-pozitivna bakterija), *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram-negativna bakterija) i *Candida albicans* ATCC 24433 (oportunistička gljivica). Citotoksična svojstva su proučavana prema humanim malignim ćelijskim linijama: PC-3 (adenokarcinom prostate), A549 (karcinom pluća), K562 (hronična mijeloidna leukemija), koristeći MTT test. Takođe, citotoksičnost novih azo derivata određena je i prema humanim normalnim fibroblastima pluća MRC-5, kako bi se odredila selektivnost u citotoksičnom dejstvu. Dejstvo derivata, sa najboljim citotoksičnim svojstvima, na promenu u distribuciji ciljanih K562 ćelija u pojedinim fazama ćelijskog ciklusa, ispitano je analizom na protočnom citometru. Na ovaj način rasvetljen je mehanizam citotoksičnog delovanja izabranog azo jedinjenja. Na kraju, primenom *in silico* modela izračunati su fizičko-hemijski deskriptori i farmakokinetički parametri, na osnovu kojih je procenjena oralna aktivnost ispitivanih azo jedinjenja.

Ključne reči: Biđinelijska reakcija, sinteza metodom kontinualnog protoka, fluorescentna spektroskopija, antikancerogena svojstva, leukemija, ćelijski ciklus, ADME

Naučna oblast: Hemijske nauke

Uža naučna oblast: Organska hemija

Abstract

Heterocyclic azo derivatives represent a significant class of synthetic dyes. They have gained attention both in academia and industry, due to its exceptional coloration properties and a broad range of biological activities. In this doctoral dissertation, novel heterocyclic azo compounds have been synthesized and their structure, properties and biological activity have been thoroughly investigated. The starting heterocyclic molecules, 2-pyridones and 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones (DHPM) were synthesized, and then were used in order to obtain the target azo derivatives. The synthesis of different 2-pyridones was studied using the continuous flow synthesis method, in a capillary microreactor, in order to develop a more efficient synthetic approach. In the Biginelli reaction, a DHPM derivative with a nitro group in the phenyl ring was synthesized, and then its reduction to the amino DHPM was performed, using mild reaction conditions. Thereafter, the amino DHPM was diazotized and coupled with different 2-pyridones, giving the series of novel azo compounds. The chemical structure of the azo compounds was confirmed by experimental data (elemental analysis, thermal analysis, ESI-MS, ATR-FTIR and NMR spectroscopy) and quantum chemical (DFT) calculations. Using the DFT method, the parameters of optimized geometry, calculated FT-IR, NMR, UV-Vis spectra and frontier molecular orbital energies (E_{HOMO} , E_{LUMO} , ΔE) were obtained. By comparing the calculated and experimental results, a good correlation of the data was established. In order to elucidate the reactivity of the investigated molecules, maps of electrostatic molecular potentials were calculated, as well as quantum chemical molecular descriptors. The photophysical properties of the studied azo dyes were examined using UV-Vis and fluorescence spectroscopy. This analysis provided detailed information on azo-hydrazone tautomerism, solvent interactions with dye molecules, and the influence of pH of the medium on the acid-base properties of the studied molecules. Moreover, fluorescent properties of the novel dyes were established, which is important discovery since the fluorescent azo dyes are infrequent. The potential biological activity of the novel azo derivatives was investigated by determining *in vitro* antioxidant, antimicrobial and anticancer properties. Antioxidant activity was assessed by the ABTS method. Antimicrobial properties were determined by agar well diffusion method, and the test was performed on pathogenic strains: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-positive bacteria), *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram-negative bacteria) and *Candida albicans* ATCC 24433 (opportunistic yeast). Cytotoxic properties were studied against human cancer cell lines: PC-3 (prostate adenocarcinoma), A549 (lung cancer), K562 (chronic myelogenous leukemia), using the MTT assay. Also, the cytotoxicity of novel azo dyes was determined against human normal lung fibroblasts MRC-5, in order to determine selectivity in cytotoxic action. The cell cycle analysis of most prominent compound was examined in K562 cells, by flow cytometry, to study its mechanism of anticancer action. Finally, physicochemical parameters and ADME properties of novel compounds were calculated *in silico* in order to evaluate its oral activity.

Keywords: Biginelli reaction, continuous flow synthesis, fluorescence spectroscopy, anticancer properties, leukemia, cell cycle analysis, ADME

Scientific field: Chemical sciences

Scientific subfield: Organic chemistry

Spisak skraćenica i simbola

- A549 – humana maligna ćelijska linija karcinoma pluća
ABTS – 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)-diamonijum-so
ADME – Apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija
ATR-FTIR – Prigušena ukupna refleksija – Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (engl. *Attenuated Total Reflectance – Fourier Transform-Infrared Spectroscopy*)
¹³C NMR – Nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija ugljenika (engl. *C-13 Nuclear Magnetic Resonance*)
CF₃COOD – Deuterisana trifluorosirćetna kiselina
DTA – Diferencijalna termička analiza (engl. *Differential thermal analysis*)
DTG – Diferencijalna termogravimetrijska analiza (engl. *Differential thermogravimetric analyses*)
DHPM – 3,4-dihidropirimidin-2(1H)-on
DFT – Teorija funkcionala gustine (engl. *Density Functional Theory*)
DMSO – Dimetil-sulfoksid
DMSO-*d*₆ – Deuterisani dimetil-sulfoksid
DMF – *N,N'*-dimetilformamid
ESI-MS – Elektrosprej jonizacija – Masena spektrometrija (engl. *Electrospray Ionisation – Mass Spectrometry*)
K562 – humana maligna ćelijska linija hronične mijeloidne leukemije
MTT – 3-(4,5-dimetoltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolijum-bromid
¹H NMR – Nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija vodonika (engl. *Protonic Nuclear Magnetic Resonance*)
HOMO – Najviša popunjena molekulska orbitala (engl. *Highest Occupied Molecular Orbital*)
LSER – Linearna korelacija energije solvatacije (engl. *Linear Solvation Energy Relationship*)
LUMO – Najniža nepopunjena molekulska orbitala (engl. *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*)
PC-3 – Humana maligna ćelijska linija adenokarcinoma prostate
TG – Termogravimetrijska analiza (engl. *Thermogravimetry analysis*)
UV-Vis – Ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija (engl. *Ultraviolet-Visible Spectroscopy*)

Sadržaj

Uvod	1
1. Teorijski deo	3
1.1. Heterociklična jedinjenja azota.....	3
1.2. 2-Piridon: Struktura i svojstva.....	3
1.3. Sinteza 2-piridona.....	4
1.3.1. Sinteza 2-piridona iz heterocikličnih jedinjenja.....	5
1.3.2. Sinteza 2-piridona iz acikličnih jedinjenja.....	6
1.4. Sinteza metodom kontinualnog protoka.....	8
1.5. Biđinelijeva reakcija	11
1.5.1. Mehanizam Biđinelijeve reakcije.....	12
1.5.2. Sinteza Biđinelijevih proizvoda	13
1.6. Biđinelijevi proizvodi sa biološkim svojstvima	15
1.6.1. Antikancerogena aktivnost.....	15
1.6.2. Antimikrobna aktivnost.....	17
1.6.3. Antiinflamatorna aktivnost	19
1.6.4. Antioksidativna aktivnost	21
1.6.5. Biđinelijevi proizvodi kao blokatori kalcijumovih kanala.....	22
1.7. Azo boje.....	23
1.8. Heterociklične azo boje.....	24
1.8.1. Sinteza heterocikličnih azo boja	25
1.8.2. Biološka svojstva heterocikličnih azo derivata.....	27
1.8.3. Antimikrobna svojstva	28
1.8.4. Antikancerogena svojstva	30
1.8.5. Antioksidativna svojstva.....	31
1.8.6. Antiinflamatorna svojstva.....	32
1.9. Fotofizička svojstva heterocikličnih boja.....	34
2. Eksperimentalni deo	36
2.1. Materijali i metode	36
2.2. Sinteza.....	37
2.2.1. Sinteza 2-piridona	38
2.2.1.1. Konvencionalna sinteza 6-hidroksi-2-piridona.....	38
2.2.1.2. Konvencionalna sinteza 1-supstutuisanih-3-cijano-4,6-dimetil-2-piridona.....	39
2.2.1.3. Sinteza 6- i 1,6-supstutuisanih-3-cijano-4-metil-2-piridona metodom kontinualnog protoka u kapilarnom mikroreaktoru	40

2.2.2. Biđinelijeva reakcija – Sinteza etil-6-metil-4-(4-nitrofenil)-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilata.....	41
2.2.3. Redukcija DHPM-a B1 – Sinteza etil-4-(4-aminofenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilata.....	42
2.2.4. Sinteza DHPM-azo piridonskih boja.....	42
2.3. Termička analiza.....	45
2.4. Kvantno-hemijska proračuni	45
2.5. Fotofizička svojstva	46
2.6. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti	46
2.7. <i>In vitro</i> ispitivanje antimikrobne aktivnosti	46
2.8. <i>In vitro</i> ispitivanje citotoksične aktivnosti	47
2.9. Analiza faza ćelijskog ciklusa	48
2.10. <i>In silico</i> analiza fizičko-hemijskih i ADME parametara	48
3. Rezultati i diskusija.....	49
3.1. Sinteza 6- i 1,6-supstituisanih-3-cijano-4-metil-2-piridona metodom kontinualnog protoka u kapilarnom mikoreaktor u	49
3.2. Sinteza DHPM-azo piridonskih boja.....	51
3.3. Termička analiza.....	53
3.4. Kvantno-hemijski proračuni	55
3.4.1. Konformaciona analiza.....	55
3.4.2. Vibraciona analiza	57
3.4.3. NMR analiza.....	59
3.5. Fotofizička svojstva	60
3.5.1. UV-Vis spektralna analiza u etanolu	60
3.5.2. Uticaj promene pH rastvora na UV-Vis apsorpcione spektre.....	64
3.5.3. Uticaj rastvarača na UV-Vis apsorpcione spektre.....	67
3.5.4. Fluorescentna spektralna analiza	71
3.5.5. Analiza MEP mapa.....	75
3.5.6. Analiza kvantno-hemijskih deskriptora	75
3.6. Studija biološke aktivnosti.....	77
3.6.1. Antioksidativna aktivnost	77
3.6.2. Antimikrobna aktivnost	78
3.6.3. Citotoksična aktivnost	79
3.6.4. Analiza faza ćelijskog ciklusa	80
3.6.5. <i>In silico</i> analiza fizičko-hemijskih i ADME parametara.....	81
Zaključak.....	83

Literatura	86
Biografija autora.....	103
Izjava o autorstvu.....	107
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada.....	108
Izjava o korišćenju	109
Ocena izveštaja o proveru originalnosti doktorske disertacije	111

Uvod

Azo jedinjenja su obojene supstance koje predstavljaju najznačajniju grupu sintetskih organskih boja. Tradicionalno se najviše koriste u proizvodnji boja, za bojenje tekstilnih vlakana, a sa razvojem tehnologije pronašle su primenu u grafičkoj, optičkoj i elektronskoj industriji. Biološka aktivnost azo jedinjenja poznata je još od pre tzv. ere antibiotika, a jedan od prvih lekova koji se koristio za bakterijske infekcije bio je azo derivat nazvan Prontozil. Azo jedinjenja se jednostavno sintetišu u reakciji diazo-kuplovanja, polazeći od komponente za diazotovanje i komponente za kuplovanje, čijim variranjem je moguće sintetisati bezbroj različitih azo derivata. Mnoga istraživanja ukazuju da azo boje sa heterocikličnim fragmentima pokazuju bolja biološka svojstva u odnosu na karbociklična azo jedinjenja. Azo boje na bazi 2-piridona su heterociklična azo jedinjenja koja imaju izuzetna svojstva, kako u pogledu intenziteta i postojanosti boje, tako i u smislu biološke aktivnosti. Naime, u različitim studijama je pokazano da azo piridonske boje imaju dobru antimikrobnu, antioksidativnu i antikancerogenu aktivnost. Sa druge strane derivati 3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-ona koji se dobijaju u Biđinelijskoj reakciji predstavljaju veoma značajnu grupu heterocikličnih molekula koji ispoljavaju čitav spektar bioloških aktivnosti.

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je sinteza novih azo derivata dobijenih iz dva heterociklična jezgra – 3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-ona i 2-piridona. Nova azo jedinjenja se dobijaju u reakciji diazo-kuplovanja, gde je komponenta za diazotovanje derivat DHPM-a, dok kuplujuću komponentu čine različito supstituisani 2-piridoni. U okviru disertacije sintetisano je sedam novih heterocikličnih azo derivata, a njihova struktura, svojstva i potencijalna biološka aktivnost su detaljno proučavani.

Prvi deo disertacije se bavi sintezom polaznih heterocikličnih jedinjenja, koji se potom koriste za sintezu novih azo boja. Dobijanje derivata 2-piridona izvedeno je korišćenjem dva postupka. Prvi postupak podrazumeva konvencionalnu sintezu, polazeći iz različitih amida i dikarbonilnih jedinjenja, dok je drugi postupak sinteza u kontinualnom protočnom kapilarnom mikroreaktoru na sobnoj temperaturi. Konvencionalnim postupkom sinteze dobijen je osnovni 3-cijano-6-hidroksi-4-metil-2-piridon, a variranjem polaznih reaktanata sintetisano je deset 1-, 3-, 4- i 6- različito supstituisanih 2-piridona. Sinteza šest 1,6-supstituisanih-3-cijano-4-metil-2-piridona ispitana je u kontinualnom protočnom kapilarnom mikroreaktoru u cilju razvijanja novog efikasnijeg postupka sinteze, pod blažim reakcionim uslovima. Optimizacija reakcionih uslova je izvedena variranjem protoka ulaznih reaktanata, odnosno određivanjem optimalnog vremena zadržavanja u kapilarnom mikroreaktoru. Uzimajući u obzir prinos, temperaturu i vreme trajanja reakcije utvrđena je efikasnost kontinualnog sistema. Na kraju ovog dela istraživanja sedam 1-, 3- i 4- različito supstituisanih 6-hidroksi-2-piridona odabrano je za sintezu novih azo derivata. Drugi deo disertacije je usmeren na Biđinelijsku sintezu. Dobijanje Biđinelijskog proizvoda, pogodnog za reakciju diazo-kuplovanja sa piridonima, je predstavljalo najveći izazov u toku sinteze željenih azo derivata. Iako je do danas sintetisano mnogo različitih Biđinelijskih proizvoda, derivati sa amino-grupom u fenilnom jezgru nisu popularni za sintezu, jer se ne mogu direktno sintetisati u Biđinelijskoj reakciji. Pregledom literature pronađeni su postupci koji uglavnom podrazumevaju sintezu u dva koraka. Prvi korak je sinteza DHPM-a sa nitro-grupom u fenilnom jezgru, koji se potom redukuje do amino analoga. Redukcija u ovim sintezama uglavnom je podrazumevala katalitičko hidrogenovanje, za koje je teško obezbediti uslove i koje je rizično za izvođenje. Zato je bilo neophodno pronaći blaže uslove sinteze pri kojima se nitro-grupa DHPM-a može redukovati do amino-grupe. Nakon niza eksperimenata pronađeni su optimalni uslovi za sintezu i nitro i amino DHPM-a. Prvo je optimizovana sinteza etil-6-

-metil-4-(4-nitrofenil)-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilata u mikrotalasnom reaktoru, čime se znatno skraćuje vreme trajanja reakcije. Potom se izvodi redukcija nitro analoga u blagim reakcionim uslovima, koristeći elementarni cink i amonijum-hlorid, čime se dobija Biđinelijev adukt etil-4-(4-aminofenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat, u visokom stepenu čistoće i dobrom prinosu. Nakon sinteze dihidropirimidina i piridona, optimizovana je reakcija diazo-kuplovanja i sedam novih azo derivata dobijeno je u dobrim prinosima. Struktura sintetisanih azo jedinjenja potvrđena je eksperimentalnim (ATR-FTIR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C NMR}$) podacima i kvantno-hemijskim (DFT) proračunima. Čistoća jedinjenja je ustanovljena ESI-MS i elementalnom analizom. Termička stabilnost jedinjenja određena je TG/DTG i DTA tehnikom. Optimizovana geometrija, teorijski FT-IR, NMR i UV-Vis spektri, elektronska svojstva, mape elektrostatičkih molekulskih potencijala i kvantno-hemijski molekulski deskriptori izračunati su u okviru DFT analize. Fotofizička svojstva, tautomerija, uticaj interakcija rastvarača sa molekulima boja i uticaj promene pH medijuma proučavani su UV-Vis i fluorescentnom spektroskopijom. Ovde je važno naglasiti da su dobijeni podaci, o fluorescentnim svojstvima ispitivanih novih azo derivata, značajni jer se njima proširuju znanja o azo bojama, za koje se generalno smatra da nemaju fluorescentna svojstva. Nakon detaljne analize strukture i svojstava novih azo boja, ispitivana je njihova biološka aktivnost. Ispitivanjem *in vitro* antioksidativnih, antimikrobnih i antikancerogenih svojstava određena je aktivnost azo derivata i diskutovan je uticaj strukture na biološka svojstva. Analizom faza ćelijskog ciklusa, ćelija humane mijeloidne leukemije, rasvetljen je i mehanizam citotoksičnog delovanja najaktivnijeg azo derivata. *In silico* proračunima fizičko-hemijskih deskriptora i farmakokinetičkih parametara procenjena je oralna aktivnost i bioraspoloživost proučavanih azo derivata. Značajan doprinos ove disertacije predstavlja otkrivanje novih antikancerogenih azo derivata, pogotovo derivata koji imaju citotoksično dejstvo prema ćelijama humane mijeloidne leukemije, s obzirom na mali broj naučnih publikacija o aktivnosti azo derivata prema ovim malignim ćelijama.

1. Teorijski deo

Istraživanja koja su sprovedena tokom izrade ove doktorske disertacije usmerena su na sintezu, strukturu, svojstva i biološku aktivnost novih heterocikličnih azo derivata dihidropirimidinona i piridona. S tim u vezi ovaj deo doktorske disertacije daje teorijski i literaturni pregled sinteze i svojstava pomenutih molekula, sa posebnim osvrtom na njihovu biološku aktivnost.

1.1. Heterociklična jedinjenja azota

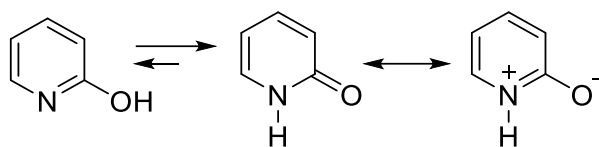
Heterociklični molekuli, koji sadrže azot u strukturi, se definišu kao klasa jedinjenja koja nastaje kada se metinska grupa ($-\text{CH}=\text{}$) benzena, odnosno metilenska grupa ($-\text{CH}_2-$) cikloheksana zameni atomom azota. Zamenom jednog atoma ugljenika u benzenovom prstenu dobija se piridin, dok se zamenom dva ugljenikova atoma dobijaju diazini piridazin (1,2-diazin), pirimidin (1,3-diazin) i pirazin (1,4-diazin) [1].

Heterociklična jedinjenja azota, ne samo da su široko rasprostranjena u prirodi, već su sastavni deo RNK i DNK molekula, što ih čini esencijalnim za funkcionisanje bioloških sistema. Poznato je da mnoštvo šestočlanih heterocikličnih jedinjenja kao što su: vitamin B3 (nikotinamid), vitamin B6 (piridoksin), nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (NADP+), piridoksal-fosfat (PLP) igraju važnu ulogu u metaboličkim procesima. Heterociklična jedinjenja azota se nalaze kako u prirodnim, tako i u sintetskim proizvodima, a naročito u lekovima koji ispoljavaju raznovrsna dejstva kao što su antitumorno, antiinflamatorno, antimikrobno, antioksidativno i druga, te predstavljaju ključnu strukturnu jedinicu u farmaceutskoj industriji. Podaci Agencije za hranu i lekove Sjedinjenih Američkih Država (engl. *U. S. Food and Drug Administration*) pokazuju da čak 60% lekova na tržištu ima heterocikličnu građu koja sadrži azot u strukturi. Važno je istaći da se piridin i njegovi derivati (piperidin, hinolin, izohinolin, piridon, diazini i triazini) najviše koriste u formulisanju lekova, usled čega spadaju u najrazvijenija heterociklična jedinjenja. Takođe, heterociklična jedinjenja azota nalaze primenu i u mnogim drugim oblastima kao što su poljoprivreda, industrija boja, materijala, senzora i polimera [1].

Iz ove klase jedinjenja izdvaja se 2-piridon – molekul izuzetnih bioloških svojstava. Derivati 2-piridona su veoma interesantni za farmaceutsku industriju, zbog relativno jednostavne sinteze i raznovrsnih terapijskih dejstava koje manifestuju. Do danas su razvijeni mnogi komercijalni lekovi koji se baziraju na ovoj strukturi, a među njima najpoznatiji Amrinon, Milrinon, Perampnel i Pirfenidion [1].

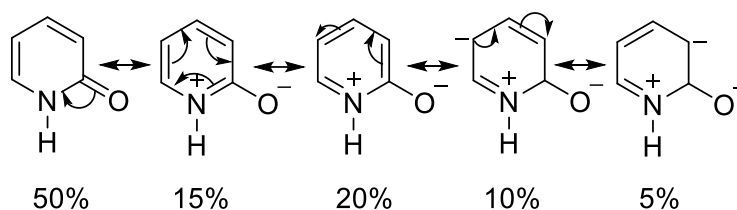
1.2. 2-Piridon: Struktura i svojstva

Derivat piridina, 2-piridon (2-hidroksipiridin, 2(1*H*)-piridinon, 2-piridinol, 1,2-dihidro-2-oksopiridin) je bezbojna kristalna supstanca, rastvorna u vodi. Molekul 2-piridona podleže tautomernoj ravnoteži pa tako mogu postojati dva oblika: 2-hidroksipiridin (enolni oblik) i 2-piridon (keto oblik). Enolni tautomerni oblik je i slaba baza, i slaba kiselina pa može postojati kao dipol-jon. Keto tautomerni oblik i dipol-jon su rezonancioni hibridi, te je 2-piridon dominantnija forma u odnosu na 2-hidroksipiridin (slika 1.1). Spektroskopske analize pokazuju da je keto tautomer dominantniji u čvrstom stanju i polarnim rastvaračima, dok je enolni oblik zastupljen u veoma razblaženim rastvorima, nepolarnim rastvaračima i u gasovitoj fazi [1].



Slika 1.1. Tautomerna ravnoteža 2-hidroksipiridina i 2-piridona

Strukturu 2-piridona detaljno je opisao Penfold (*Penfold*) na osnovu rendgenske strukturne analize [2]. Utvrđeno je da se između atoma azota jednog molekula i atoma kiseonika drugog stvara jaka intermolekulska vodonična veza, te se na taj način molekuli povezuju kroz čitavu strukturu, u beskonačan niz. Na osnovu izračunatih dužina veza i uglova ustanovljen je doprinos pet rezonancionih struktura (slika 1.2).



Slika 1.2. Rezonancijski hibridi 2-piridona

Sa slike 2 se može uočiti da kanonske strukture sa negativnom šaržom samo na kiseoniku imaju veći doprinos od onih sa negativnom šaržom i na ugljeniku, što ukazuje na veliku polarnost N–H...O veze. Takođe, ustanovljeno je da u rastvorima, molekuli 2-piridona, mogu formirati dimere sa dve vodonične veze, gde stepen dimerizacije zavisi od polarnosti rastvarača [2].

Struktura 2-piridona prisutna je u jedinjenjima prirodnog porekla, biološki aktivnim molekulima, farmaceutskim formulacijama, kao i u bojama, pigmentima, adhezivima i aditivima. Mnogi derivati 2-piridona ispoljavaju antibakterijsku, antivirusnu, antiinflamatornu, antihipertenzivnu, analgetičku, antikancerogenu i antioksidativnu aktivnost. Jezgro 2-piridona prisutno je u lekovima koji se koriste za kardiovaskularne bolesti, Alchajmerovu bolest i HIV virus [3-11]. Najnovije studije otkrivaju da pojedini derivati 2-piridona imaju potencijalno inhibitorno dejstvo prema koronavirusu SARS-CoV-2, te imaju moguću primenu u lečenju COVID-19 zarazne bolesti, koje je izazvala pandemiju u martu 2020. godine [12, 13].

Usled nemerljivog značaja 2-piridona i njegovih derivata, sintezi ovih jedinjenja se posvećuje posebna pažnja.

1.3. Sinteza 2-piridona

Jednostavnom pretragom baze *ScienceDirect* i korišćenjem ključnih reči „sinteza 2-piridona“, kao rezultat se dobija više od 6000 članaka, među kojima je preko 500 preglednih radova, oko 600 poglavlja u knjigama, i preko 380 objavljenih naučnih radova samo u 2020. i 2021. godini, na ovu temu. Ovi podaci pokazuju koliko je sinteza 2-piridona i njegovih derivata široko izučavana i još uvek aktuelna [14].

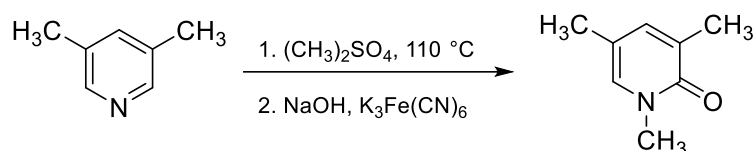
Prema literaturi, mnogobrojni postupci sinteze 2-piridonovog prstena mogu se podeliti na dva osnovna pristupa: i) sinteza iz drugih heterocikličnih jedinjenja i ii) sinteza

kondenzacijom acikličnih jedinjenja. Drugi pristup se zatim može podeliti prema tipu formiranja veze u toku ciklizacije, u zavisnosti da li se stvara C-C ili C-N veza [15].

1.3.1. Sinteza 2-piridona iz heterocikličnih jedinjenja

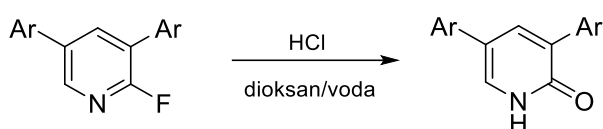
Sinteza 2-piridona često se izvodi polazeći iz piridina, odnosno njegovih derivata. Na ovaj način 2-piridonov prsten se može sintetisati oksidacijom piridina i njegovih soli, hidrolizom 2-halopiridina ili u reakciji 2-alkoksipiridina sa Luisovim (*Lewis*) kiselinama. Takođe, heterociklični molekuli kao što su 2-piranoni, oksazinoni i izoksazoli predstavljaju važne prekursore za sintezu 2-piridonovog prstena [15].

Klasične metode oksidacije, kao što su oksidacija piridina bakar- ili cink-sulfatom uglavnom se pokazuju kao neefikasne za sintezu 2-piridona, pre svega zbog niskih prinosa reakcija (oko 15%). Zbog toga su razvijene unapređene metode oksidacije. Naime, Fernando (*Fernando*) i saradnici su ispitivali oksidaciju piridina i piridinijumovih soli kalijumfericijanidom u baznoj sredini (slika 1.3). Ova metoda dala je dobre prinose (oko 60%), kao i regioselektivnost [16].



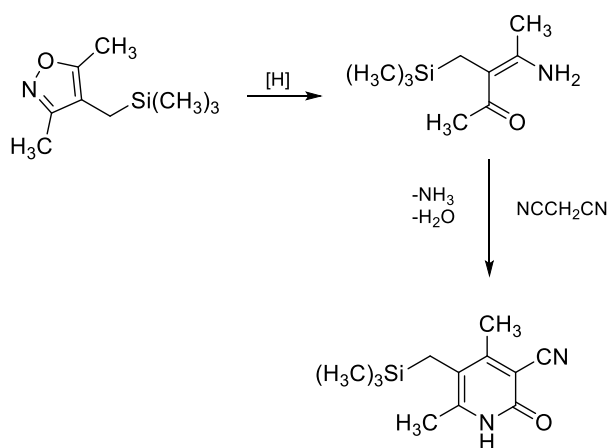
Slika 1.3. Sinteza 2-piridona oksidacijom piridina [16]

Sledeća metoda za sintezu derivata 2-piridona je hidroliza 2-halopiridina. Saterlend (*Sutherland*) i saradnici su ispitivali sintezu 2-piridona iz 2-fluorpiridina, u kiseloj sredini, u dioksanu i vodi. Ovaj postupak je veoma zastupljen jer daje izuzetno visoke prinose (oko 90%) 3,5-disupstituisanih-2-piridona (slika 1.4) [17].



Slika 1.4. Sinteza 2-piridona hidrolizom 2-halopiridina [17]

Međutim, i drugi heterociklični derivati su dobri prekursori za dobijanje 2-piridona. Primer je dat u radu Kalva (*Calvo*) i saradnika koji su ispitivali sintezu 2-piridona polazeći iz sililmetilizoksazola (slika 1.5). Ovo petočlano heterociklično jedinjenje je redukovano, uz otvaranje prstena, pri čemu nastaje silil- β -enaminoketon, koji u reakciji sa malonnitrilom daje 5-sililmetil-2-piridon u prinosu od oko 50% [18].

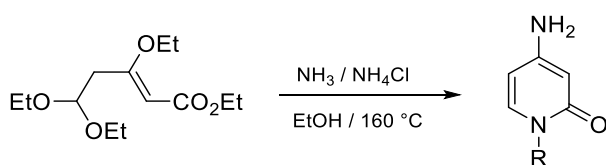


Slika 1.5. Sinteza 2-piridona iz sililmetilizoksazola [18]

1.3.2. Sinteza 2-piridona iz acikličnih jedinjenja

Sinteza 2-piridona iz acikličnih jedinjenja se izvodi korišćenjem dva osnovna pristupa, u zavisnosti da li se ciklizacija odvija putem formiranja C-C ili C-N veze. Zatvaranje prstena, stvaranjem C-C veze, najčešće podrazumeva aldolnu kondenzaciju jedinjenja koja sadrže amidnu grupu, kao što su amido-estri, amido-aldehidi, amido-ketoni ili imido-estri. Sa druge strane, ciklizacija nastajanjem C-N veze predstavlja jednu od najrazvijenijih metoda za sintezu derivata 2-piridona. Ona obuhvata reakcije kondenzacije 1,5-dikarbonilnih jedinjenja sa aminima ili amonijakom, ciklizacije cijano-ketona, kondenzacije nitrila i estarskih ili amidnih enolata, kao i kondenzacije (alkil-)cijanoacetamida ili cijanoacetata i 1,3-karbonilnih jedinjenja [15].

Jedan od klasičnih postupaka za sintezu 2-piridona putem formiranja C-N veze jeste kondenzacija 1,5-dikarbonilnih jedinjenja sa aminima ili amonijakom. Sinteza *N*-supstituisanih 2-piridona iz 1,5-dikarbonilnih jedinjenja prvo je ispitivana od strane Kuka (*Cook*) i saradnika, a kasnije je stekla veći uticaj, najviše zbog visokih prinosa (slika 1.6). Ovaj postupak i danas se često primenjuje [19,20].



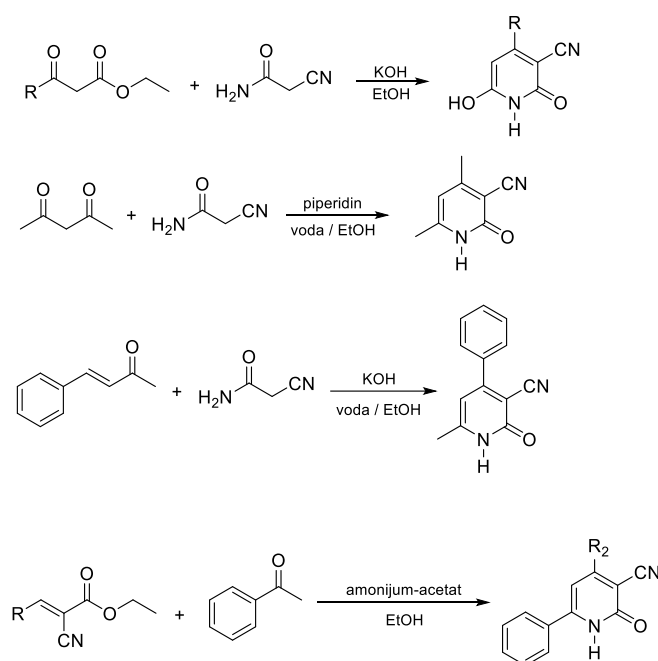
Slika 1.6. Sinteza 2-piridona kondenzacijom 1,5-dikarbonilnih jedinjenja sa amonijakom [20]

Reakcija kondenzacije (alkil-)cijanoacetamida ili cijanoacetata i 1,3-dikarbonilnih jedinjenja predstavlja jednu od najpopularnijih metoda za sintezu 4,6-disupstituisanih-3-cijano-2-piridona. Ovaj postupak sinteze stekao je popularnost zahvaljujući izuzetnim biološkim svojstvima i primeni 4,6-disupstituisanih-3-cijano-2-piridona. Dikarbonilne komponente koje se koriste za sintezu su β -ketoaldehidi, β -ketoestri, β -diketoni i njihovi derivati. Reakcija se uglavnom odvija u nekom alkoholnom rastvaraču (metanol, etanol), a kao katalizatori, tradicionalno se koriste natrijum-hidroksid, kalijum-hidroksid, natrijum-karbonat, kalijum-karbonat i amini (piperidin, dietilamin). Usled rasprostranjenosti ove metode, danas su razvijeni i drugi brojni postupci koji podrazumevaju upotrebu međufaznih katalizatora,

enzima i polimera. Takođe, pored klasične sinteze u balonu, danas se sve više koriste postupci koji uključuju sintezu mikrotalasnom tehnikom i metodu kontinualnog protoka u mikrorektoru, kao i njihovu kombinaciju [21-23].

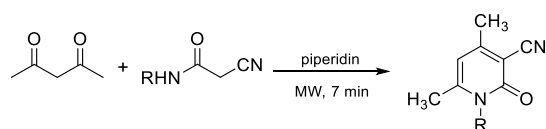
U farmaceutskoj industriji derivati 3-cijano-2-piridona su vredni krajnji proizvodi, kao i intermedijeri u sintezi složenijih jedinjenja. Među njima, derivati koji imaju kardiotoničnu, kardiovaskularnu i koronarnu aktivnost posebno su važni, jer su iz njihovih struktura proistekli neki komercijalni lekovi kao što su Milrinon i Amrinon [24].

U radu Alimarija (*Alimmari*) i saradnika objavljena je sinteza deset 4,6-disupstituisanih-3-cijano-2-piridona. U zavisnosti od polaznih reaktanata, primenjeni su različiti reakcioni uslovi, a derivati 2-piridona sintetisani su u dobrim prinosima (slika 1.7). 4-Supstituisani-6-hidroksi-3-cijano-2-piridoni dobijeni su u reakciji etil-acetoacetata, odnosno benzoil-acetoacetata i cijanoacetamida i kalijum-hidroksida, u etanolu. 4,6-Dimetil-3-cijano-2-piridon je sintetisan iz acetilacetona i cijanoacetamida u smeši voda/etanol, koristeći piperidin kao katalizator. 4-Metil-6-fenil-3-cijano-2-piridon dobijen je iz benzalacetona, cijanoacetamida i kalijum-hidroksida u smeši voda/etanol (1:1). Na kraju, 4,6-disupstituisani-3-cijano-2-piridoni dobijeni su u reakciji etil-2-cijano-3-supstituisanih-akrilata sa acetofenomom i amonijum-acetatom, koristeći etanol kao rastvarač [25].



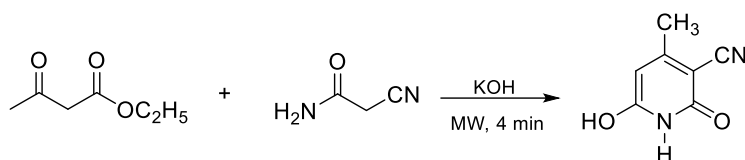
Slika 1.7. Primeri sinteze 4,6-disupstituisanih-3-cijano-2-piridona [25]

Sintezu *N*-supstituisanih 3-cijano-2-piridona, mikrotalasnom tehnikom, izučavali su Mijin (*Mijin*) i Marinković (*Marinković*) (slika 1.8). Polazeći iz alkil-cijanoacetamida, acetilacetona i piperidina, za samo sedam minuta, dobijeni su željeni proizvodi u visokom prinosu [21].



Slika 1.8. Sintaza 2-piridona mikrotalasnom tehnikom [21]

Sinteza 3-cijano-6-hidroksi-4-metil-2-piridona, polazeći iz cijanoacetamida, etil-acetoacetata i etilamina, primenom mikrotalasne tehnike, prvi put je objavljena 1994. godine. U poređenju sa klasičnom sintezom koja može da traje i do 16 sati, sa prinosom od 80%, mikrotalasnim zračenjem se za samo 5 minuta sintetiše proizvod u prinosu od 96%, što predstavlja izuzetno unapređenje sinteze. Kada se izvodi klasična sinteza ovog 2-piridona, u prisustvu kalijum-hidroksida, reakcija traje oko 8 sati, a prinos se kreće u granicama od 40% do 60%. Sinteza 3-cijano-6-hidroksi-4-metil-2-piridona iz etil-acetoacetata, cijanoacetamida i kalijum-hidroksida, u mikrotalasnoj pećnici, bez prisustva rastvarača dala je prinos od 60%, nakon samo 4 minuta zračenja (slika 1.9) [26].



Slika 1.9. Sinteza 3-cijano-6-hidroksi-4-metil-2-piridona mikrotalasnom tehnikom [26]

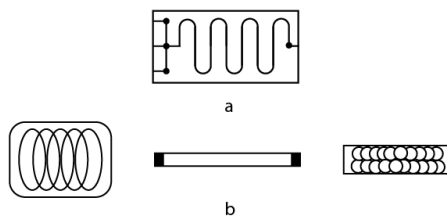
1.4. Sinteza metodom kontinualnog protoka

Sinteza organskih jedinjenja u laboratoriji se i danas najčešće izvodi na tradicionalan način, u čaši ili balonu, uz zagrevanje i mešanje, a nakon završetka reakcije proizvod je potrebno prečistiti. Iako vrlo zastupljen, konvencionalni postupak ima mnoštvo nepovoljnih odlika, kao što su veliki utrošci vode za hlađenje, hemikalija za prečišćavanje proizvoda, produženo vreme trajanja reakcije i ugrožena bezbednost istraživača na radu, kada rukuje sa opasnim reagensima [27]. U poslednjih nekoliko godina, sinteza metodom kontinualnog protoka (engl. *Continuous flow synthesis*) dobija sve veću pažnju, a naročito kada se radi o dobijanju farmakološki aktivnih jedinjenja, jer predstavlja odličnu alternativu klasičnim postupcima i prevazilazi njihova ograničenja [28-31].

Sinteza metodom kontinualnog protoka izvodi se u mikroreaktorima koji se definišu kao strukturirani kanali prečnika od 10 do 500 μm [32]. Visok odnos površine i zapremine u mikroreaktorima omogućava efikasan prenos toplote, a temperatura reakcione smeše se jednostavnije reguliše. Takođe, bolji prenos mase, bezbednija sinteza jedinjenja, izolacija proizvoda osetljivih na vazduh i vlagu, ponovljive sinteze i smanjenje opasnog otpada su ključne prednosti koje se ostvaruju korišćenjem mikroreaktora. Vreme zadržavanja reakcione smeše u mikroreaktoru se može jednostavno podešavati menjanjem protoka ulaznih reagenasa, što omogućava brze eksperimente, doprinosi efikasnosti procesa i skraćenju puta za prelazak na proizvodni nivo. Treba istaći da je upotreba mikroreaktora izuzetno pogodna za bezbedno izvođenje egzotermnih reakcija, jer se reakcije odigravaju u strogo kontrolisanim uslovima, u zatvorenom sistemu male zapremine. Iako se sinteza u kontinualnim sistemima uglavnom izvodi na sobnoj ili nižoj temperaturi, ekspanzija mikroreaktorske tehnologije doprinela je razvoju sistema u kojima se uspešno primenjuju visoke temperature i pritisak. Suočavanje sa generalno sporim reakcijama u organskoj sintezi znatno je unapređeno primenom mikroreaktora, usled efikasnijeg mešanja i bržih reakcija u kanalima malih zapremina [33,34].

Na slici 1.10 ilustrovani su različiti tipovi mikroreaktora. Čip mikroreaktori (slika 1.10, a) predstavljaju skup kanala urezanih u pločicu napravljenu od stakla, silikona ili nekog materijala (npr. polimera). Najčešće se koriste za sintezu u laboratorijskim uslovima i pogodni su za reakcije koje se odvijaju na nižim pritiscima. Kapilarni mikroreaktori (kapilarne cevčice

ili namotane (kružne) kapilare, slika 1.10, b) napravljeni od čelika ili polimera kao što su PEEK ili PTFE, pogodni su za sintezu u laboratorijskim uslovima, ali se mogu koristiti i u pilot postrojenjima, jer omogućavaju primenu visokog pritiska (do 450 bar) i temperature. Takođe, kapilarni mikroreaktori mogu sadržati pakovani sloj koji doprinosi intenzifikaciji procesa (slika 1.10, b).

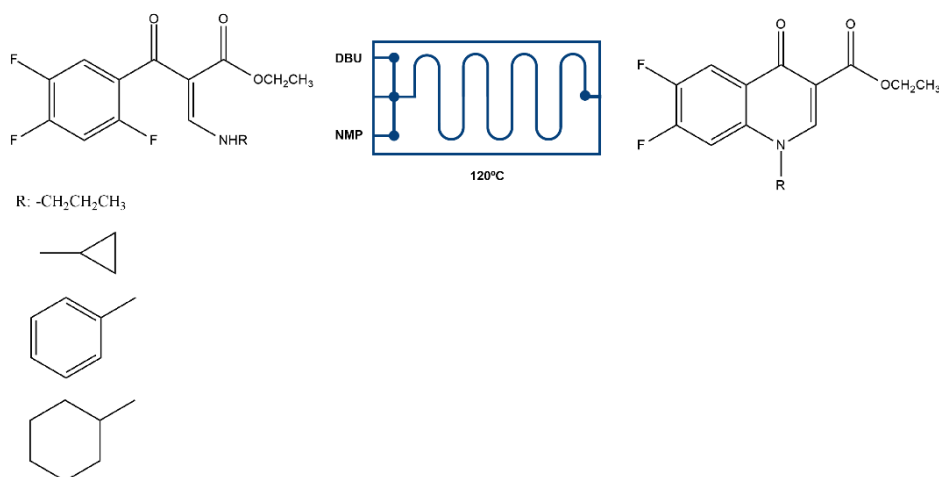


Slika 1.10. Čip (a) i različiti kapilarni (b) mikroreaktori [33]

Upotreba takozvanih mikro-/mezo-fluidnih kontinualnih protočnih reaktora čiji su kanali, odnosno kapilare prečnika $\geq 500 \mu\text{m}$ u sve većem je porastu iz godine u godinu. Takođe, sinteza mikrotalasnom tehnikom, kojom se obezbeđuje brzo zagrevanje, kratki eksperimenti i dobri prinosi, može da se kombinuje sa mikroreaktorima, što čini proces još efikasnijim. Još jedna atraktivna karakteristika mikroreaktorske tehnologije je lakoća uvećanja razmera procesa, bez potrebe za reoptimizacijom, jednostavnim povećanjem broja mikroreaktora u sistemu. Takođe, ovaj pristup sintezi olakšava razvijanje reakcija koje se zasnivaju na principima zelene hemije [27].

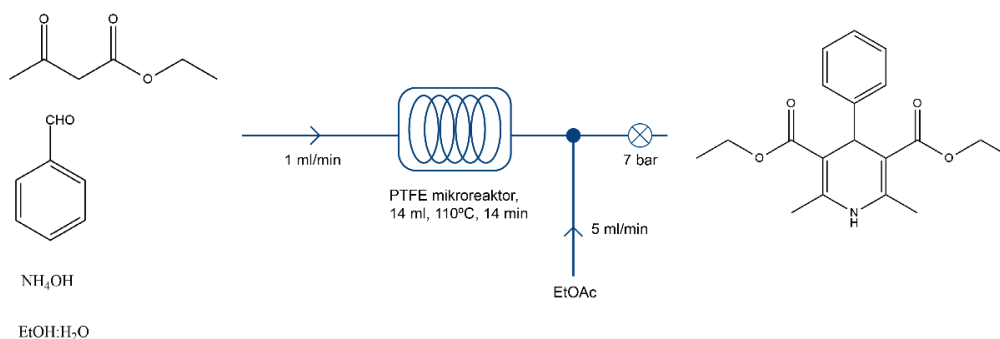
Sinteza u kontinualnim protočnim mikroreaktorima uspešno se primenjuje za dobijanje brojnih heterocikličnih jedinjenja koja ispoljavaju biološku aktivnost [35]. U nastavku su dati primeri koji ilustruju sintezu heterocikličnih jedinjenja ovom metodom.

Švalbe (*Schwalbe*) i saradnici su razvili postupak za dobijanje biblioteke fluorhinolona, koristeći mikroreaktorsku tehnologiju [36]. Antibiotik Ciprofloksacin, sintetisan na ovaj način, izolovan je u prinosu od 60% i čistoće preko 90%. Polazeći iz komercijalno dostupnih reagenasa, u okviru pet transformacija koje se odigravaju u mikroreaktorskom sistemu, dobijeni su analozi Ciprofloksacina. Na slici 1.11 prikazana je sinteza glavnih intermedijera u sintezi – estara fluorhinolona, koji su dobijeni polazeći iz estara akrilne kiseline, 1,8-diazabicikloundek-7-ena (DBU) i 1-metil-2-pirolidinona (NMP) u prinosu od oko 1 g/h.



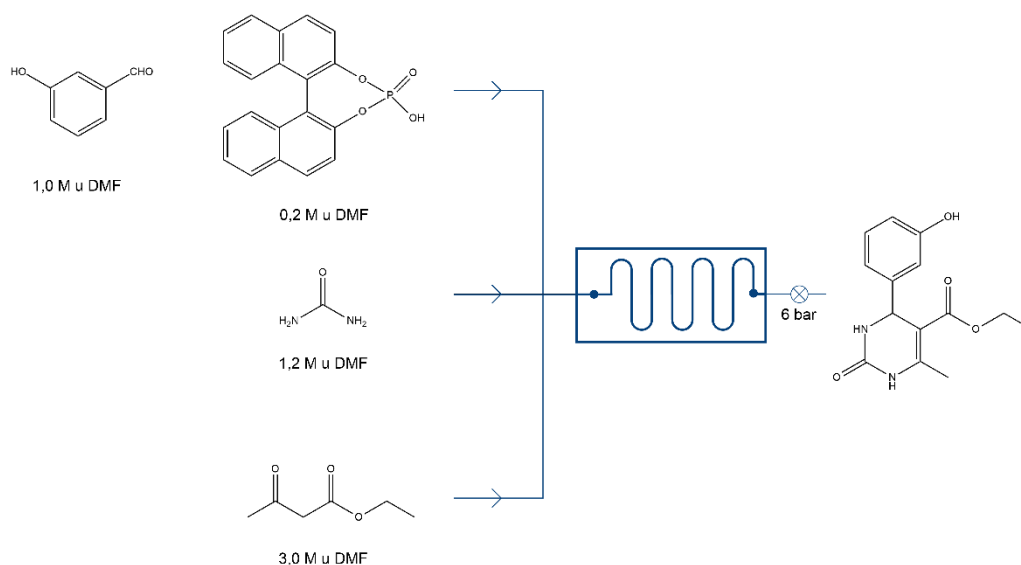
Slika 1.11. Primer sinteze derivata fluorohinolona mikoreaktorskom tehnologijom [36]

Hančova (Hantzsch) sinteza dihidropiridina, u kontinualnom protočnom reaktoru, ispitivana je u radu Lidbitera (*Leadbeater*) i saradnika [37]. Reakciona smeša koju čine benzaldehid, etil-acetoacetat, amonijum-hidroksid, voda i etanol (1:1), uvedena je pumpom u PTFE kružni protočni reaktor zapremine 14 ml. Na izlazu iz PTFE reaktora u sistem je uveden etil-acetat kako bi se sprečilo začepljenje reaktora usled stvaranja proizvoda. Reakcija je izvedena na temperaturi 110 °C, a pritisak na izlazu iz sistema bio je oko 7 bara. Sintetisani dihidropiridin dobijen je u prinosu od 53% (slika 1.12).



Slika 1.12. *Hančova* sinteza u PTFE protočnom kružnom reaktoru [37]

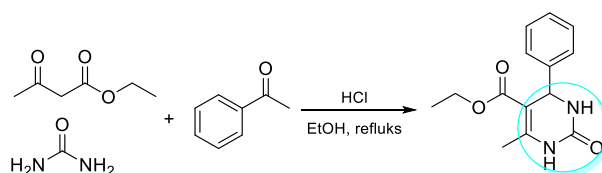
Još jedan primer sinteze u protočnim mikoreaktorima opisan je u radu Kosforda (*Cosford*) i saradnika [38]. U ovom radu razvijen je postupak za sintezu dihidropirimidinona koji se dobijaju u Biđinelijevoj reakciji. Sinteza je izvedena u mikoreaktoru zapremine 1000 μ l, na temperaturi 160 °C u toku 20 minuta. Biđinelijev proizvod izolovan je u prinosu od 64% (slika 1.13).



Slika 1.13. Sinteza dihidropirimidinona u mikroreaktoru [38]

1.5. Biđinelijeva reakcija

Višekomponentne reakcije podrazumevaju upotrebu tri ili više reaktanta, u jednom koraku, u cilju dobijanja finalnog proizvoda koji poseduje karakteristike svih polaznih reagenasa. Ovaj metod za dobijanje raznovrsnih heterocikličnih struktura, star više od sto godina, i danas je eminentan u organskoj sintezi. Prvobitni doprinos razvoju višekomponentnih reakcija pripisuje se Štrekeru (*Strecker*) koji je 1850. godine sintetisao α -aminocijanide, polazeći iz aldehida, natrijum-cijanida i amonijaka. Hidrolizom ovih derivata dobijaju se α -aminokiseline, te je ova reakcija poznata kao Štrekerova sinteza aminokiselina i smatra se prvom višekomponentnom reakcijom. Nakon toga, višekomponentna sinteza stiće popularnost pa tako nastaju Hančova (*Hantzsch*), Paserinijeva (*Passerini*) i Ugiveva (*Ugi*) reakcija. Godinu dana nakon otkrića Hančovog dihidropiridina, 1893. godine Pijetro Biđineli (*Pietro Biginelli*) objavljuje kiselo katalizovanu, trokomponentnu sintezu 3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-ona u jednom koraku. Kao polazne reaktante Biđineli je koristio benzaldehid, etil-acetoacetat i ureu, a reakcija se odvijala u etanolu, sa katalitičkom količinom hlorovodonične kiseline (slika 1.14). Ova reakcija postaje poznata kao Biđinelijeva reakcija i ima izuzetan značaj za sintezu DHPM derivata [39-42].



Slika 1.14. Biđinelijeva reakcija

Ipak, Biđinelijeva reakcija dobija punu pažnju tek osamdestih godina XX veka, kada se postepeno otkrivaju brojna svojstva DHPM proizvoda. Sve veće interesovanje za ovu sintezu pripisuje se, pre svega, farmakološkim svojstvima i terapijskom dejstvu derivata DHPM-a. Naime, DHPM-i ispoljavaju brojna biološka svojstva, među kojima su antivirusna, antikancerogena, antibakterijska, antiinflamatorna, antimalarijska, antituberkulozna,

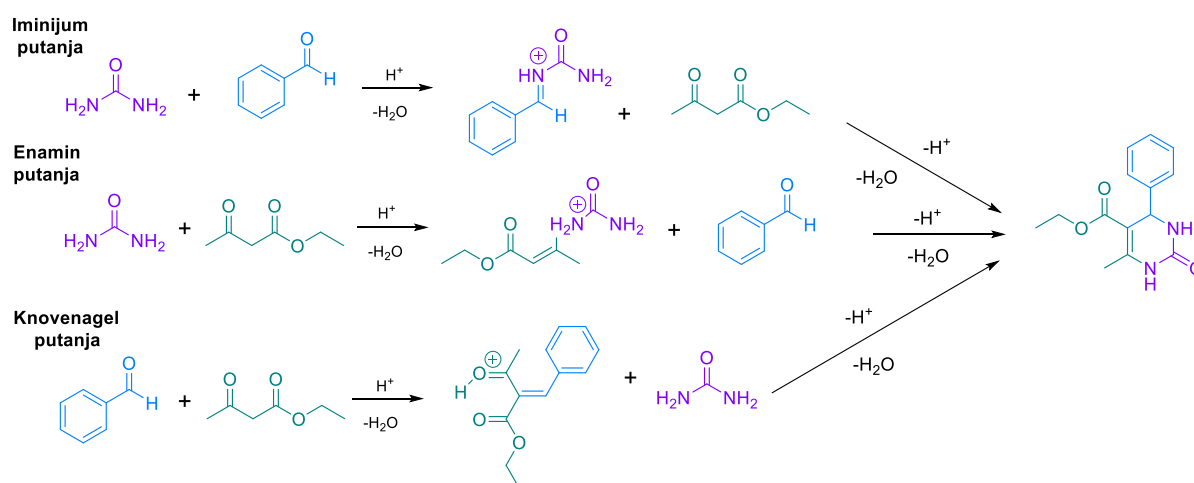
antidijabetska, antiepileptička aktivnost. Takođe, pojedini derivati DHPM-a se koriste kao blokatori kalcijumovih kanala, antihipertenzivni agensi, antagonisti i inhibitori [43-46].

U poslednjih nekoliko godina, Biđinelijeva reakcija se uspešno primenjuje za asimetričnu sintezu, zatim za razvijanje novih heterocikličnih jedinjenja sa optičkim svojstvima, u sintezi polimera, adheziva i boja [47-49].

Pored široke primene u različitim oblastima, značaj Biđinelijevih proizvoda ogleda se u jednostavnoj sintezi i prečišćavanju, dostupnosti polaznih reaktanata i mogućnosti variranja svih komponenata reakcije, čime se postiže visok stepen diverziteta među derivatima [43].

1.5.1. Mehanizam Biđinelijeve reakcije

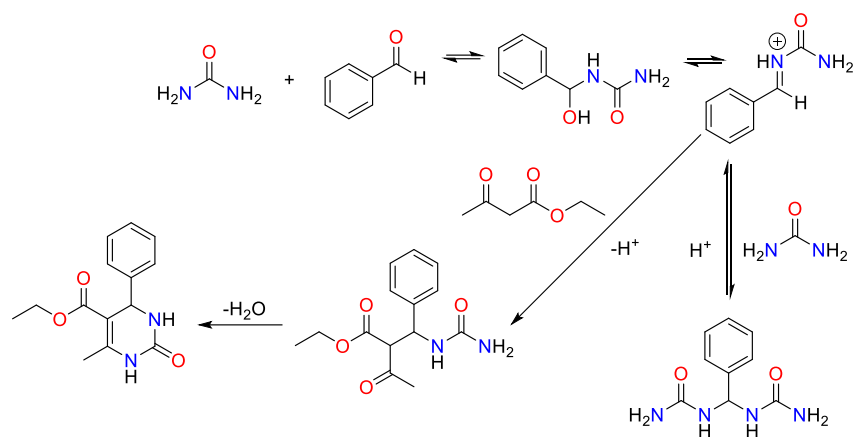
Mehanizam Biđinelijeve reakcije proučavan je u mnogim eksperimentalnim i teorijskim studijama. Uopšteno posmatrajući, reakcija se može odvijati preko tri različita intermedijera, odnosno tri mehanizma (slika 1.15). Prvi mehanizam nazvan je iminijum putanja i podrazumeva kondenzaciju aldehida i uree, dajući iminijum-intermedijer, koji u reakciji nukleofilne adicije sa β -ketoestrom formira DHPM. Drugi mehanizam se naziva enamino putanja i zasniva se na kondenzaciji uree i β -ketoestra dajući enamino intermedijer koji zatim reaguje sa aldehidom te nastaje DHPM. Treći mehanizam uključuje Knoevenagelovu (*Knoevanagel*) reakciju u kojoj se formira karbenijum-jon iz β -ketoestra i aldehida, a potom reaguje sa ureom dajući DHPM [43,50].



Slika 1.15. Tri predložena mehanizma Biđinelijeve reakcije [43]

Prve mehanističke studije Biđinelijeve reakcije pojavljuju se 1933. godine, kada su Folkers (*Folkers*) i Džonson (*Johnson*) pokušali da rasvetle nastajanje DHPM-a [51]. Oni su pretpostavili da reakcija može da se odigra preko različitih intermedijera, ali samo u reakciji kondenzacije bisureida sa etil-acetoacetatom dobijen je Biđinelijev adukt. Četrdeset godina nakon ove studije, Svit (*Sweet*) i Fiskis (*Fissekis*) predlažu mehanizam putem nastajanja karbenijum-jona, koji se dobija u Knoevenagelovoj reakciji, odnosno u kiselo-katalizovanoj aldolnoj kondenzaciji benzaldehida i β -ketoestra, a zatim da nastali karbenijum-jon reaguje sa ureom i nakon intramolekulske ciklokondenzacije daje DHPM [52]. Krajem devedesetih godina XX veka, Kape (*Kappe*) sprovodi mehanističku studiju, praćenu NMR spektroskopijom [53]. Prvo je praćena reakcija između benzaldehida i etil-acetoacetata u CD_3OH i katalitičkoj količini HCl. Ustanovljeno je da, na sobnoj temperaturi ne dolazi do aldolne kondenzacije, i da pod ovim uslovima nema reakcije između ova dva reagensa. Međutim, u reakciji između

benzaldehida i uree pod istim uslovima zapaženo je nastajanje bisureida (slika 1.16). Sa druge strane, ako se reakcija odvija u prisustvu sve tri komponente, dodatak etil-acetoacetata dovodi to nastajanja DHPM-a, bez prethodnog formiranja bisureida. Sumirano, rezultati ove studije sugerišu nastajanje DHPM derivata preko *N*-acilijum-jona, koji se dobija kiselo katalizovanom dehidracijom *N*-(1-hidroksibenzil)uree, a koji se formira u reakciji nukleofilne adicije uree na benzaldehid. *N*-acilijum-jon zatim reaguje sa etil-acetoacetatom, a nastali intermedijer nakon ciklizacije formira DHPM [53].



Slika 1.16. Mehanizam po Kapeu [53]

Mnoge teorijske studije urađene u XXI veku, takođe, ukazuju na nastajanje DHPM-a preko iminijum-intermedijera. Naime, ova putanja se pokazala kao najpovoljnija i sa strane kinetičkih i termodinamičkih parametara. Puripat (*Puripat*) i saradnici su 2015. godine objavili studiju mehanizma Biđinelijeve reakcije, koristeći uporedo dva proračuna: AFIR (engl. *Artificial forced induced reaction*) i DFT (engl. *Density functional theory*) [50]. Potvrđeno je da se dobijanje DHPM-a može dobiti putem sva tri pretpostavljena mehanizma (slika 15). U prvom mehanizmu (iminijum putanja), pokazano je da korak koji određuje brzinu reakcije jeste formiranje C-N veze u toku ciklizacije, sa energetsom barijerom od oko 21,5 kcal/mol. U drugom mehanizmu (enamin putanja), korak koji određuje brzinu reakcije takođe je ciklizacija, ali je u ovom slučaju energetska barijera viša za oko 10 kcal/mol, u odnosu na prvi mehanizam. U trećem pretpostavljenom mehanizmu (Knovenagelova putanja), korak koji određuje brzinu reakcije je nastajanje odgovarajućeg karbenijum-jona, a vrednost energetske barijere je za oko 6,5 kcal/mol veća u odnosu na prvi mehanizam. Prema tome, izvodi se zaključak da je sa strane energetskog bilansa, iminijum-mehanistički put najpovoljniji. Takođe, ova studija je pokazala da urea poseduje i ulogu katalizatora, tj. da stabilizuje iminijum-jon formiranjem vodoničnih veza i da ima ulogu u transferu protona, što je neophodno za odvijanje reakcije. Stoga se izvodi zaključak da je Biđinelijeva reakcija urea-katalizovana, višekomponentna reakcija, koja se odvija putem iminijum-mehanizma.

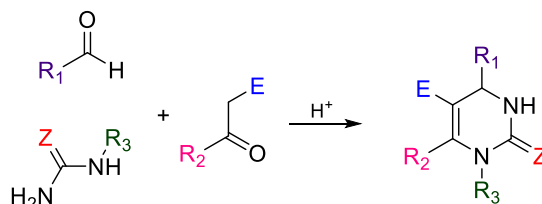
1.5.2. Sinteza Biđinelijevih proizvoda

Sinteza Biđinelijevih proizvoda beleži konstantnu ekspanziju, najviše zbog dostupnosti i raznolikosti polaznih reagenasa čijom kombinacijom je moguće dobiti bezbroj derivata DHPM-a. Biđinelijeva reakcija toleriše prisustvo brojnih funkcionalnih grupa (alifatične, aromatične, heterociklične grupe, halogeni elementi, metali) koje mogu biti prisutne u sve tri komponente – aldehidu, urei i dikarbonilnom jedinjenju. Međutim, nedostatak klasične sinteze DHPM-a je dugo vreme trajanja reakcije, praćeno konstantnim mešanjem i zagrevanjem, uz upotrebu jakih

kiselina, dok se proizvodi često izoluju u niskom prinosu. Ovaj problem je naročito prisutan ukoliko se reakcija odvija sa visoko funkcionalizovanim reaktantima. U cilju prevazilaženja ovih ograničenja do danas su razvijeni mnogi postupci sinteze DHPM-a koji omogućavaju veće prinose pod blažim reakcionim uslovima. Nove metodologije uključuju primenu različitih katalizatora kao što su: Luisove kiseline, organokatalizatori, biokatalizatori, nanokatalizatori, kao i postupaka koji se baziraju na principima zelene hemije. Tako su razvijene procedure za sintezu Biđinelijevih proizvoda koje preporučuju upotrebu jonskih tečnosti, heterogenih katalizatora, mikrotalasne tehnike, ultrazvučne tehnike, sinteze u kontinualnim sistemima i „solvent-free“ sinteze [43,54,55]. Sinteza Biđinelijevih proizvoda opisana je sledećim primerom.

U radu autora Kapea i Štadlera sintetisana je biblioteka od 48 DHPM derivata [56]. Jedinjenja su sintetisana u Biđinelijevoj reakciji, upotrebom automatizovanog mikrotalasnog reaktora, polazeći iz 17 karbonilnih jedinjenja, 25 aldehida i 8 urea/tiourea. Kombinacijom svih polaznih reaktanata bilo je moguće sintetisati 3400 DHPM proizvoda, a reprezentativni set od 48 analoga dobijen je automatskim dodavanjem reagenasa i zatim uzastopnim mikrotalasnim zračenjem svake viala. Korišćenje ovakvog automatizovanog mikrotalasnog reaktora daje mogućnost sinteze biblioteke ovog reda veličine u toku 12 časova, a proizvodi se dobijaju u visokom stepenu čistoće (preko 90%). Ovaj metod je naročito povoljan sa strane kombinatorijalne i medicinske hemije gde je brzina sinteze i čistoća proizvoda od izuzetne važnosti.

Na slici 1.17 prikazana je opšta reakcija gradivnih komponenata DHPM-a, korišćenih u *Kappe*-ovoj studiji (strukturne formule svih polaznih jedinjenja dostupne su u radu [56]). U cilju optimizacije reakcionih uslova ispitano je korišćenje različitih rastvarača, katalizatora, kao i uticaj različitih reakcionih vremena i temperature na prinos i čistoću finalnih proizvoda.



Slika 1.17. Opšta sinteza DHPM-a [56]

Sinteza DHPM-a je ispitana u etanolu i u smeši sirćetna kiselina/etanol (1:3), polazeći iz ekvimolarnih odnosa svih reaktanata. Ova smeša se pokazala kao veoma pogodna za sintezu, jer na povišenoj temperaturi rastvara sve ispitane reaktante i omogućava lako izolovanje DHPM-a. Što se tiče ispitivanja najpogodnijeg katalizatora, još ranije je ustanovljeno da se urea u prisustvu hlorovodonične kiseline, na povišenoj temperaturi, vrlo često razgrađuje što dovodi do izdvajanja amonijaka, a samim tim i stvaranja nepoželjnih sporednih proizvoda. Kako bi se ova pojava prevazišla korišćene su Luisove kiseline Yb(OTf)₃, InCl₃, FeCl₃, LaCl₃, za koje se pokazalo da su veoma efikasni katalizatori Biđinelijeve kondenzacije, pre svega jer imaju ključnu ulogu u stabilizaciji intermedijera *N*-aciliminijum-jona. Yb(OTf)₃ (iterbijum(III)-trifluorometansulfonat) se pokazao kao najefikasniji katalizator u smeši sirćetna kiselina/etanol. Takođe, ispitan je i uticaj temperature na ostvarene prinose, te je izveden zaključak da se na višim temperaturama stvaraju nusproizvodi, dok na nižim temperaturama ne dolazi do potpune konverzije reaktanata, te je optimalna temperatura za sintezu između 100 i 120 °C. Od ranije je poznato da tiourea, supstituisane uree/tiouree i supstituisani aromatični aldehidi slabije reaguju i generalno daju niže prinose DHPM-a. Najefikasniji katalizator u reakciji sa tiouream bio je LaCl₃, pri vremenu zagrevanja od 20 minuta. Za sintezu proizvoda sa

ureeom uglavnom je bilo potrebno između 10 i 15 minuta zagrevanja u mikrotalasnom reaktoru. Svi proizvodi sintetisani u ovoj studiji dobijeni su u prinosu od 21-92%, a čistoća je potvrđena NMR spektroskopijom [56].

1.6. Biđinelijevi proizvodi sa biološkim svojstvima

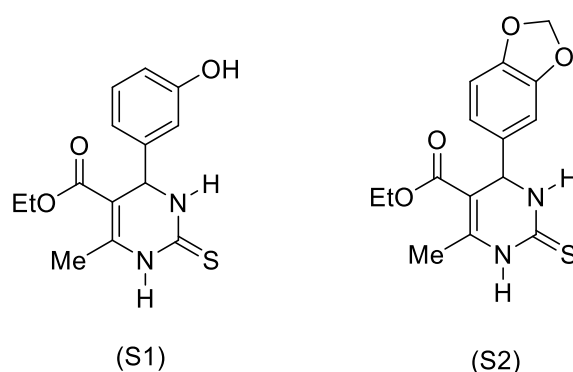
Na renome Biđinelijeve reakcije, kao jedne od najvažnijih za sintezu heterocikličnih molekula, najviše su uticala dva faktora: i) mogućnost korišćenja raznovrsnih polaznih reaktanata, čime se konstantno povećava raznolikost DHPM-a i ii) konformaciona fleksibilnost DHPM-a, odnosno sposobnost aril-grupe i estarskog fragmenta da slobodno rotiraju, čime se povećava mogućnost za uspostavljanje interakcija sa biološkim metama [57].

Derivati DHPM-a ispoljavaju mnoga biološka svojstva među kojima su antivirusna, antitumorska, antiinflamatorna, antibakterijska, antifungalna, antiepileptička i antimalarijska. U narednim odeljcima biće dati primeri nekih Biđinelijevih adukta koji imaju biološku aktivnost.

1.6.1. Antikancerogena aktivnost

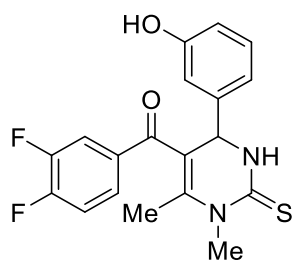
Monastrol (slika 1.18, struktura S1) je molekul koji se dobija u reakciji Biđinelijeve kondenzacije polazeći iz etil-acetoacetata, 3-hidroksibenzaldehida i tiouree [58]. Još 1999. godine Majer (*Mayer*) i saradnici su objavili studiju o antikancerogenim svojstvima monastrola i njegovom mehanizmu delovanja na ćelijsku deobu [58, 59]. Ustavnovljeno je da monastrol prekida mitozu, tako što inhibira motornu aktivnost kinezina Eg5, proteina koji je uključen u formiranje deobnog vretena u toku ćelijske deobe [59, 60]. Usled ovog otkrića, struktura monastrola je postala inspiracija za sintezu sličnih derivata sa potencijalnim antikancerogenim dejstvom.

U radu Rusovskog (*Russowsky*) [61] i saradnika sintetisano je 11 analoga monastrola, a jedinjenje dato strukturom S2 na slici 18, ispoljilo je veće citotoksično dejstvo, u poređenju sa monastrolom, i to prema malignim ćelijskim linijama UACC.62 (melanom), 786-0 (kancer bubrega), MCF-7 (kancer dojke), OVCAR03 (kancer ovarijuma) i HT-29 (kancer debelog creva).



Slika 1.18. Monastrol i derivat monastrola sa antikancerogenim svojstvima [61]

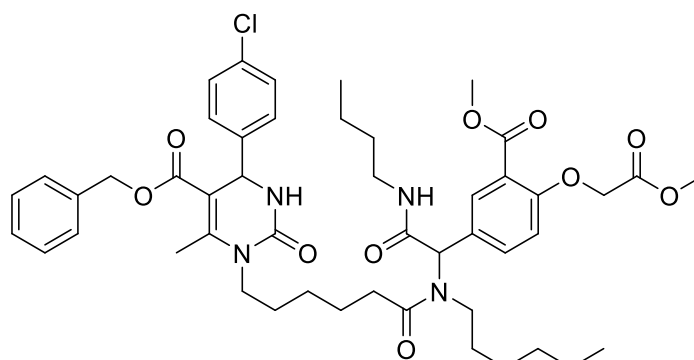
U cilju otkrivanja novih antikancerogenih agenasa, Kan (*Kaan*) i saradnici su u svom radu ispitivali inhibiciju Eg5 proteina različitim derivatima monastrola. Fluorastrol (slika 1.19) se pokazao kao bolji inhibitor, u odnosu na monastrol, usled prisustva atoma fluora koji uspostavljaju interakcije sa alosteričnim mestom enzima [62].



(S3)

Slika 1.19. Fluorastrol [62]

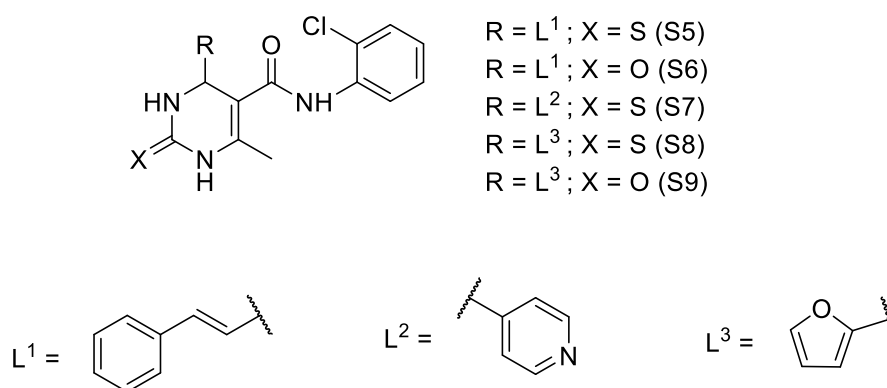
U radu Rajt (*Wright*) i saradnika [63] sintetisan je DHPM-peptoid (slika 1.20) koji inhibira proliferaciju ćelija karcinoma dojke. Ispitivani DHPM-peptoid uspostavlja interakciju sa Hsp 70 proteinom, koji ima pojačanu aktivnost i regulaciju u kancerogenim ćelijama (karcinom dojke, pluća, debelog creva, cerviksa). Studija pokazuje da DHPM-peptoid deluje direktno na Hsp 70, inhibirajući ćelijsku proliferaciju, čime se zaustavlja rast kancerogenih ćelija.



(S4)

Slika 1.20. DHPM-peptoid [63]

Kumar (*Kumar*) i saradnici [64,65] su se bavili sintezom nekih Bidinelijevih proizvoda supstituisanih cinamoil-, piridin-4-il- ili furan-2-il-grupama (slika 1.21), njihovom *in vitro* citotoksičnom aktivnošću prema MCF-7 malignim ćelijskim linijama (karcinom dojke), kao i komparativnom analizom pokazatelja molekulske sličnosti (engl. *Comparative Molecular Similarity Index Analysis*, CoMSIA), koja razmatra parametre koji utiču na vezivanje liganda za receptor (sterne i elektrostatičke karakteristike, hidrofobna svojstva, prisustvo donora i akceptora vodoničnih veza). Ispitivani derivati ispoljili su značajnu citotoksičnu aktivnost i sprečili rast kancerogenih ćelija za oko 70%.

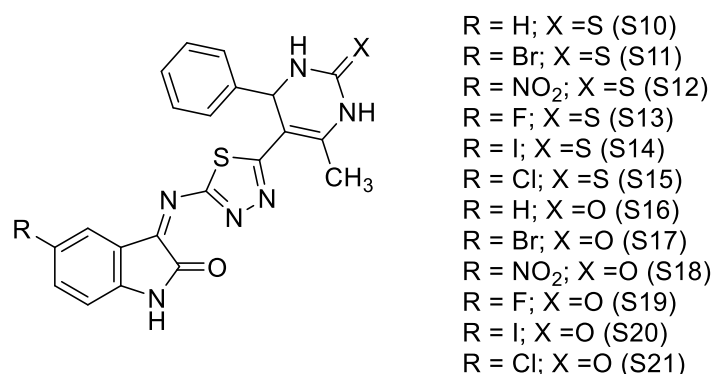


Slika 1.21. Derivati koji ispoljavaju citotoksičnu aktivnost prema ćelijama karcinoma dojke [64,65]

1.6.2. Antimikrobna aktivnost

Usled sve učestalije rezistencije mikroorganizama na postojeće lekove, fokus mnogih istraživanja je usmeren na sintezu novih jedinjenja sa antimikrobnim svojstvima. U procesu razvijanja lekova često se sintetišu hibridni molekuli koji u strukturi imaju različite farmakofore čija kombinacija može doprineti poboljšanoj aktivnosti [65].

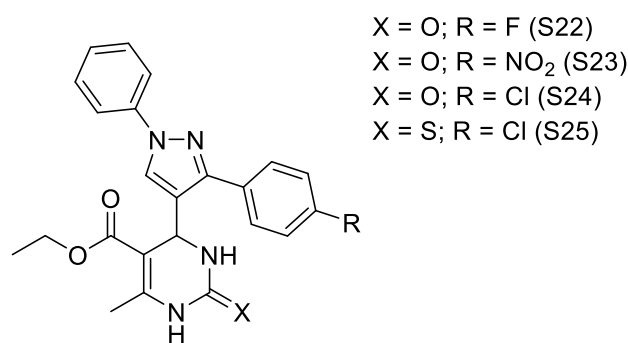
Inspirisani biološkim svojstvima DHPM-a, indola, tiadiazola i Šifovih (*Schiff*) baza, Akaja (*Akhaja*) i saradnici su u radu [66] prikazali sintezu molekula sa svim navedenim farmakoforama, i ispitana je njihova antituberkularna aktivnost prema soju *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, antibakterijska aktivnost prema humanim patogenima *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenus*, *Bacillus subtilis* i antifungalna aktivnost prema *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus clavatus* gljivicama. Među sintetisanim derivatima, jedinjenja S13 i S19 (slika 1.22), ispoljila su značajnu antimikrobnu aktivnost ka svim ispitivanim sojevima, dok je jedinjenje S13 pokazalo i dobru antituberkularnu aktivnost.



Slika 1.22. Derivati sa antimikrobnim svojstvima [66]

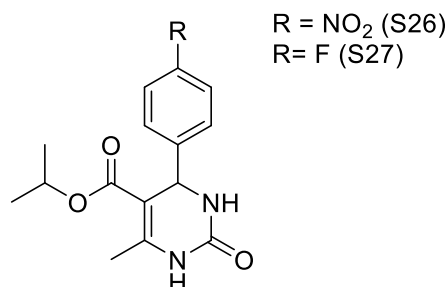
Bidinelijevi proizvodi sa 1,3-diarilpirazol supstuentom u položaju C4 (slika 1.23) takođe su pokazali izuzetna antituberkularna svojstva [67], dok su derivati supstituisani

fluorom i nitro-grupom pokazali i izuzetnu selektivnost u antimikrobnom dejstvu, u poređenju sa dejstvom prema normalnim VERO ćelijama (indeks selektivnosti > 500).



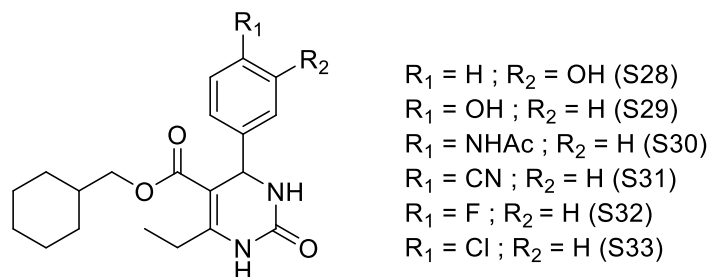
Slika 23. Derivati sa antituberkularnim svojstvima [67]

Antimikrobna aktivnost 4-aril-5-izopropoksikarbonil-6-metil-3,4-dihidropirimidinona, sintetisanih u radu Čitra (*Chitra*) i saradnika [68] ispitana je *in vitro*, prema sojevima *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* i *Staphylococcus aureus*. Derivati supstituisani fluorom i nitro-grupom u *para* položaju fenilnog jezgra (slika 1.24) ispoljili su veću antimikrobnu aktivnost, u poređenju sa ciprofloksacinom kao standardom.



Slika 1.24. Biđinelijevi proizvodi sa antimikrobnim svojstvima [68]

Kim (*Kim*) i saradnici su u radu [69] sintetisali tridesetčetiri derivata DHPMa i ispitali njihovu antivirusnu aktivnost prema virusu humane imunodeficijencije (HIV-1 virus). Derivati prikazani na slici 1.25 su pokazali odlična inhibitorna svojstva, i pri koncentraciji od samo 90 nM, uticali su na smanjenje replikacije HIV-1 u ćelijama od 50%. Sintetisani derivati ispoljili su bolju antivirusnu aktivnost u poređenju sa standardnim lekom nevirapinom.

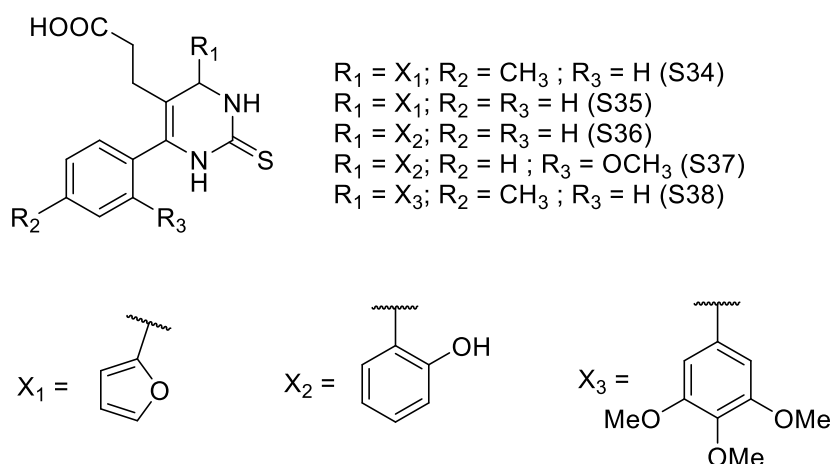


Slika 1.25. Biđinelijevi proizvodi sa anti-HIV aktivnošću [69]

1.6.3. Antiinflamatorna aktivnost

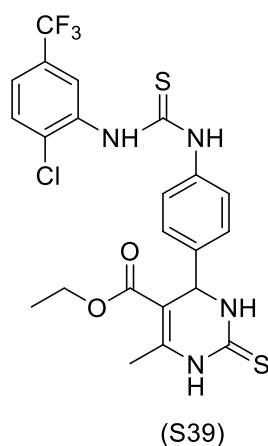
Inflamacioni procesi (bol, temperatura, crvenilo, otoci, gubitak funkcije) se pojavljaju u organizmu kao odgovor na povredu ili infekciju, sa ciljem otklanjanja štetnog agensa i započinjanja procesa ozdravljenja. Akutna inflamacija može izazvati trajna oštećenja tkiva i organa, te je sa stanovišta medicinske hemije razvijanje novih antiinflamatornih jedinjenja značajna oblast istraživanja. Antiinflamatorna aktivnost određenog molekula može se proceniti različitim *in vivo* i *in vitro* metodama. Najčešće korišćeni animalni model za ispitivanje antiinflamatornog potencijala je test indukovanog edema šapice pacova, dok se *in vitro* najčešće određuje inhibicija proinflamatornih citokina (faktor nekroze tumora α (TNF- α) i interleukin 6 (IL-6)), efekat na prostaglandin E2, hijaluronidazu, inducibilnu sintazu azot-monoksida (iNOS) i ciklooksigenazu-2 (COX-2) [70].

Proučavanje antiinflamatorne aktivnosti Biđinelijskih proizvoda tema je mnogih objavljenih radova [65, 71-74]. U radu Mokalea (*Mokale*) i saradnika [71] sintetisana je serija tiokso Biđinelijskih jedinjenja i ispitana je njihova antiinflamatorna aktivnost, koristeći metodu indukovanog edema šapice pacova. Derivati prikazani na slici 1.26 ispoljili su najveću inhibiciju edema i u poređenju sa diklofenakom, kao referentnim lekom, pokazali su se kao obećavajući kandidati za nove antiinflamatorne agense.



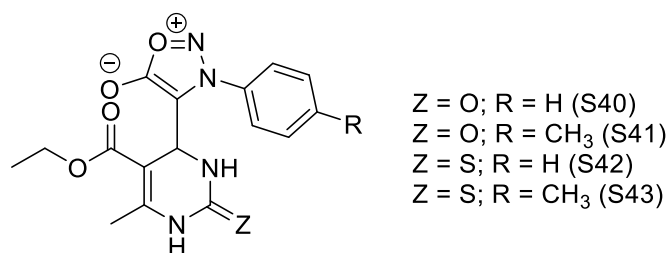
Slika 1.26. DHPM proizvodi sa antiinflamatornim svojstvima [71]

U radu Talea (*Tale*) i saradnika [72] sintetisano je dvadesettri tio-analoga DHPM-a i ispitana su njihova antiinflamatorna i antimikrobna svojstva. Antiinflamatorna aktivnost je određena u odnosu na dejstvo prema proinflamatornim citokinima: faktoru nekroze tumora α (TNF- α) i interleukinu 6 (IL-6), u THP-1 ćelijama akutne monocitne leukemije. U ćelijama tretiranim sa 10 μ M ispitivanog jedinjenja (slika 1.27) zapaženo je smanjeno lučenje TNF- α za 78% i IL-6 za 96%, u odnosu na iste netretirane ćelije. Takođe, u istim eksperimentalnim uslovima referentni lek deksametazon inhibirao je TNF- α za 71% i IL-6 za 84%, što ukazuje da je Biđinelijski adukt novi potencijalni antiinflamatorni lek.



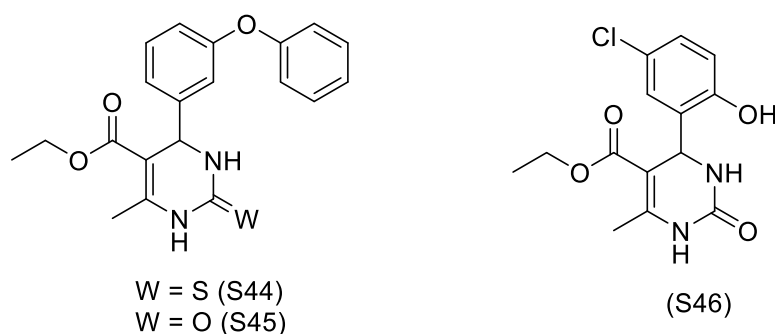
Slika 1.27. Biđinelijev adukt sa antiinflamatornim dejstvom [72]

Poznato je da hronična inflamacija može biti povezana sa povećanom aktivnošću enzima hijaluronidaza koje katalizuju degradaciju hijaluronske kiseline [70]. Giriš (*Gireesh*) i saradnici [73] sproveli su studiju molekuskog dokinga koristeći neke Biđinelijeve adukte u cilju identifikacije struktura koje potencijalno inhibiraju hijaluronidaze. Studija je pokazala da derivati prikazani na slici 1.28 imaju izuzetnu sposobnost inhibicije hijaluronidaze od 89-100%.



Slika 1.28. Derivati DHPM-a sa hijaluronidaza-inhibitorskim svojstvima [73]

U studiji [74] ispitivana je antineuroinflamatorna aktivnost DHPM-a u mikroglijalnim ćelijama. Aktivnost jedinjenja testirana je na osnovu sposobnosti da inhibiraju proizvodnju azot-monoksida u ćelijama, a derivati prikazani na slici 1.29 ispoljili su snažna inhibitorska svojstva. Takođe, jedinjenje dato strukturom S44 ispoljilo je inhibiciju i prema prostaglandinu E₂, inducibilnoj sintazi azot-monoksida (iNOS) i ciklooksigenazi-2 (COX-2).

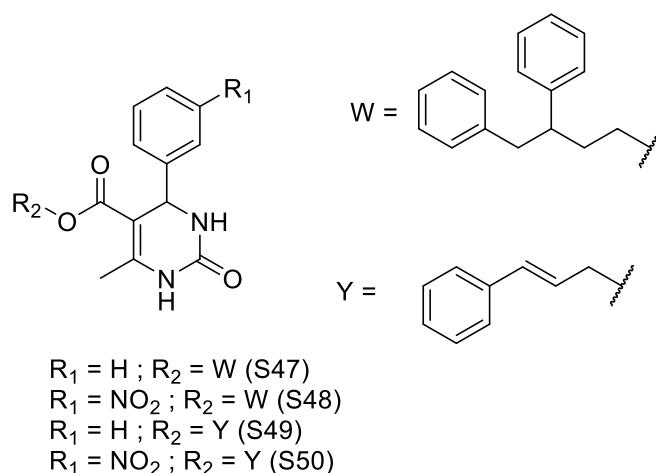


Slika 1.29. Jedinjenja sa antineuroinflamatornom aktivnošću [74]

1.6.4. Antioksidativna aktivnost

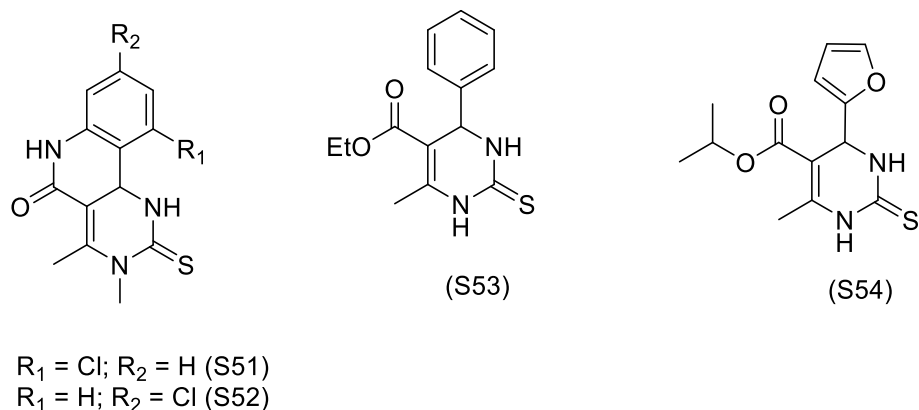
Slobodni radikali, odnosno reaktivne vrste, mogu se podeliti na osnovu biogenog elementa u strukturi, i to na: reaktivne vrste kiseonika (engl. *reactive oxygen species* – ROS), reaktivne vrste azota (engl. *reactive nitrogen species* – RNS) i reaktivne vrste sumpora (engl. *reactive sulfur species* – RSS). Slobodni radikali su poznati po svojoj izrazitoj reaktivnosti, te u biološkim sistemima mogu da reaguju sa svim molekulima stvarajući nove reakcione vrste [75]. Prekomerno nastajanje ROS-a i RNS-a može negativno uticati na fiziologiju ćelija, odnosno izazvati oksidativni stres, pri čemu se narušava redoks homeostaza, što može biti povezano sa razvijanjem nekih ozbiljnih bolesti, kao što su kancer, dijabetes, Parkinsonova i Alchajmerova bolest i kardiovaskularna oboljenja [76]. Antioksidanti imaju aktivnost nasuprot slobodnim radikalima, te svojim delovanjem sprečavaju negativne efekte koji mogu da nastanu kao posledica dejstva reaktivnih vrsta [76-78].

Stefani (*Stefani*) i saradnici [79] su među prvima proučavali antioksidativni potencijal DHPM-a, ispitivajući lipidnu peroksidaciju, indukovanu *in vitro* FeCl₂ i EDTA (etilen-diamin-tetra-sirćetna kiselina), u jetri albino Vistar pacova, kao i nivo oksidacije jetre, odnosno redukcije ROS-a, koji je određen spektrofluorimetrijski. Derivati 1 i 2 (slika 1.30) ispoljili su snažnu aktivnost protiv lipidne peroksidacije indukovane FeCl₂ i EDTA, pri koncentraciji od 200 μM. Derivati S47 i S49 pokazali su bolji potencijal za redukciju ROS-a od derivata S48 i S50.



Slika 1.30. Derivati DHPM-a sa antioksidativnim svojstvima [79]

Nakon ove studije, mnogi drugi naučnici su se bavili antioksidativnim svojstvima raznih Biđinelijevih proizvoda. Na slici 1.31 prikazani su neki derivati za koje je ustanovljeno da imaju antioksidativni potencijal [80-82].

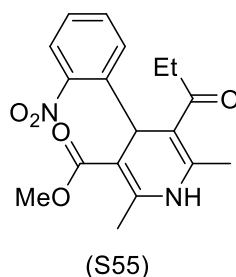


Slika 1.31. Biđinelijevi adukti sa antioksidativnim potencijalom [80-82]

1.6.5. Biđinelijevi proizvodi kao blokatori kalcijumovih kanala

Blokatori kalcijumovih (Ca^{2+}) kanala su jedna od najvažnijih grupa lekova za terapiju srčanih i kardiovaskularnih oboljenja. Njihovo dejstvo dovodi do relaksacije vaskularnih glatkih mišića i arterijskih krvnih sudova, kao i do dilatacije koronarnih krvnih sudova. Blokatori Ca^{2+} kanala se koriste u lečenju mnogih kardiovaskularnih oboljenja kao što su angina pektoris, srčana aritmija i hipertenzija [83].

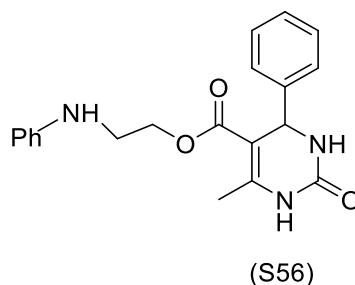
Godine 1975. u kliničku praksu se uvode 4-aril-1,4-dihidropiridini (DHP) – najizučavanija klasa organskih blokatora Ca^{2+} kanala, a među njima se izdvaja Nifedipin (slika 1.32) kao izuzetno efikasan vazodilatator. Nakon toga sintetisan je ogroman broj DHP analoga, a pojedini derivati kao što su Nikardipin, Amlodipin, Lerkanidipin i Klevudipin pojavljuju se na tržištu kao komercijalni lekovi [84,85].



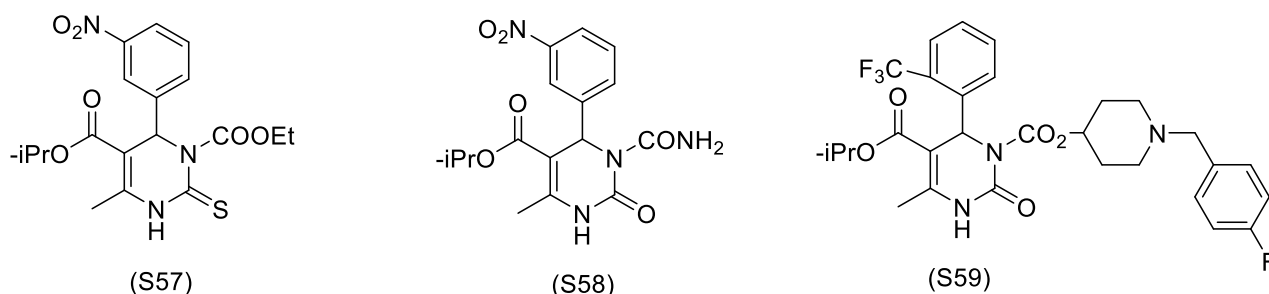
Slika 1.32. Struktura Nifedipina

Kanina (*Khanina*) i saradnici [86] su 1978. godine prvi objavili strukturu DHPM-a S56 (slika 1.33) koji ima hipotenzivna svojstva i srčano relaksacionu aktivnost. Kasnije, ispitivanjem raznih strukturnih modifikacija DHPM-a, uočeno je da derivati supstituisani estarskim grupama u položaju N3 (slika 1.34) pokazuju svojstva blokatora Ca^{2+} kanala slična svojstvima DHP-a [87-89]. Derivat tiouree dat strukturom S57 (slika 1.34) se pokazao kao naročito aktivan, ali kada je sprovedena studija u *in vivo* uslovima, ispostavilo se da ovo jedinjenje ima brz metabolizam i malu oralnu bioraspoloživost, koja ometa željeno antihipertenzivno dejstvo [87]. U cilju prevazilaženja ovog ograničenja, sintetisani su derivati S58 i S59 (slika 1.34), koji su se pokazali kao izuzetno aktivni u poređenju sa Nifedipinom. Takođe, daljim ispitivanjem je ustanovljeno da na antihipertenzivna svojstva S58 i S59, u poređenju sa S57, uticaj ima poboljšana oralna bioraspoloživost koja je posledica veće hemijske stabilnosti derivata uree u odnosu na derivat tiouree. Što se tiče veze između strukture i aktivnosti N3 supstituisanih derivata, zapaženo je

da na aktivnost utiču: i) *orto*- i *meta*- supstituenti na fenilnom jezgru u položaju C4; ii) alkil-grupa estarskog fragmenta u položaju C5; iii) priroda supstituenta u položaju N3. Još jedna interesantna karakteristika koja povezuje strukturu i antihipertenzivnu aktivnost je stereohemija DHPM derivata. Naime, pokazalo se da jedinjenja S58 i S59 pokazuju bolju aktivnost ukoliko je primenjen *R*-enantiomer, u poređenju sa *S*-enantiomerom [90].



Slika 1.33. Derivat DHPM-a sa hipotenzivnim svojstvima [86]



Slika 1.34. Derivati DHPM-a sa svojstvima blokatora Ca^{2+} kanala [87]

1.7. Azo boje

Azo boje se definišu kao jedinjenja koja u strukturi sadrže simetrične ili asimetrične, aromatične, heteroaromatične ili alifatične grupe, međusobno povezane azo vezom ($-\text{N}=\text{N}-$). Azo boje su najvažnija grupa sintetskih boja, koja ima nemerljiv značaj za industriju i posebnu pažnju u sektoru istraživanja i razvoja. Podaci svedoče da se godišnje proizvede oko 7×10^7 tona sintetskih boja, od čega azo boje zauzimaju 60–70% [91-93].

Interesovanje za sintezu azo jedinjenja je poraslo sedamdesetih godina XX veka, kada je u svetu nastala Naftna kriza, koja je doprinela naglom skoku cena petrohemijskih proizvoda, masovno korišćenih za proizvodnju boja. Tada se antrahinonske boje, koje imaju slabiju jačinu bojenja i ograničene mogućnosti sinteze, zbog veće isplativosti i boljih svojstava, zamenjuju azo bojama [94-96].

Renome azo jedinjenja se ogleda u brojnim karakteristikama kao što su: jednostavni postupci sinteze, dostupnost i raznolikost polaznih materijala, jak intenzitet boje i postojanost. Usled navedenih karakteristika, azo boje imaju primat u tekstilnoj i grafičkoj industriji. Koriste se za bojenje i prirodnih i sintetičkih vlakana, posebno su pogodne za bojenje najlona, celuloza-acetatnih i akrilnih vlakana, polimernih materijala, zatim u proizvodnji grafičkih boja i lakova, kao i u proizvodnji i bojenju papira. Sa razvojem novih tehnologija, razvijale su se i azo boje, te

ne izostaje njihova primena u nelinearnim optičkim materijalima, solarnim ćelijama, skladištenju optičkih podataka i bioimidžingu [91-96].

Azo jedinjenja se mogu sintetisati na različite načine, ali najzastupljeniji je klasični postupak, odnosno diazo-kuplovanje, koje podrazumeva dva uzastopna koraka: diazotovanje primarnog aromatičnog amina i zatim kuplovanje sa jakim nukleofilom [91-96]. Međutim, razvijene su i mnoge druge procedure kao što su redukcija aromatičnih nitro-derivata u baznoj sredini i redukcija nitrozo jedinjenja litijum-aluminijum hidridom [97,98].

U zavisnosti od prirode fragmenata koja su povezani azo vezom (aromatično jezgro, kondenzovani aromatični prsten, heterociklično jezgro) dobijaju se jedinjenja različitih boja i svojstava. U nastavku će biti više reči o azo bojama sa heterocikličnim prstenovima u strukturi, njihovoj sintezi, primeni i svojstvima.

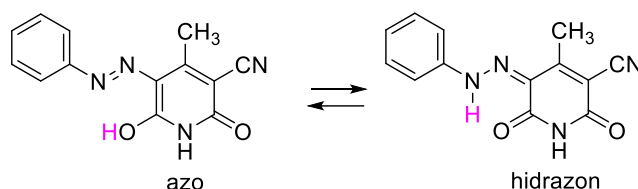
1.8. Heterociklične azo boje

U potrazi za novim bojama koje imaju unapređena svojstva, odnosno širok spektar boja, jak intenzitet i sjaj, dobre performance bojenja, kao i jednostavne postupke sinteze, izdvojile su se boje na bazi heterocikličnih prstenova. Naime, u ranim fazama istraživanja sintetskih boja, azo jedinjenja su uglavnom karakterisale žute nijanse, dok su antrahinonske boje bile crvene, plave i ljubičaste. U želji da se sintetišu boje koje će imati sjaj, postojanost i spektar boja kao antrahinonske boje, a jačinu boje i jeftinu proizvodnju kao azo boje, otkrivene su heterociklične azo boje. Zahvaljujući izvanrednim odlikama, ove boje su postale neprikosnovene u industriji bojenja i privukle su pažnju u mnogim drugim sferama kao što su farmacija i medicina [99].

U literaturi se može pronaći ogroman broj radova na temu sinteze, fizičko-hemijskih svojstava i biološke aktivnosti heterocikličnih azo boja. Kako je poznato da heterociklična jedinjenja imaju biološku aktivnost, azo boje sa heterocikličnom strukturom takođe mogu ispoljavati antimikrobna, antiviralna, antitumorna, antioksidativna, antiinflamatorna i druga svojstva, što je posebno interesantno sa stanovišta razvijanja novih jedinjenja sa farmakološkim potencijalom [100].

Heterociklične azo boje se mogu klasifikovati prema strukturi komponente za kuplovanje. U vezi sa tim razlikuju se boje na bazi pirazolona, iminopirazola, aminopiridina, aminopirimidina, hinolona, aminotiazola, i posebno značajna azo jedinjenja na bazi 2-piridona. Kao komponente za diazotovanje mogu se koristiti različiti derivati anilina, ili neka druga heterociklična jedinjenja sa amino grupom u strukturi, kao što su derivati tiofena, benzotiazola, izoksazola, pirazola, indola, indazola i drugi [91-96, 101].

Posebno interesantno svojstvo heterocikličnih azo boja jeste pojava azo-hidrazon tautomerije. Naime, azo jedinjenja koja u strukturi sadrže OH ili NHR grupe konjugovane sa azo-grupom mogu intramolekulski razmenjivati proton i tako postojati kao azo, odnosno kao hidrazon tautomerni oblik (slika 1.35) [102,103]. Sa stanovišta medicinske hemije definisanje strukture, odnosno tautomernog oblika je krucijalno, jer tautomeri imaju različita fizička svojstva i aktivnost. Studije pokazuju da su pojedini hidrazoni farmakološki izuzetno aktivna jedinjenja [104].

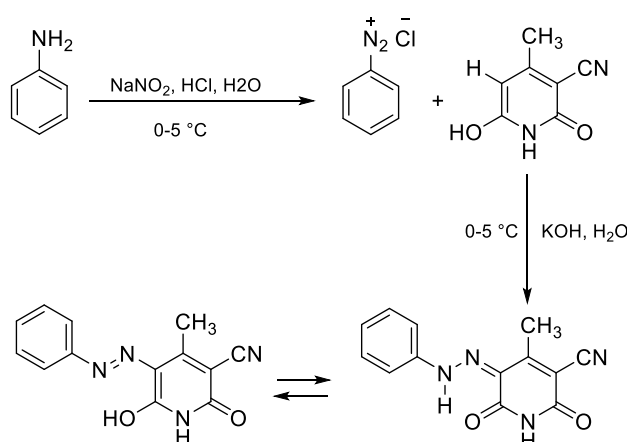


Slika 1.35. Azo-hidrazon tautomerija na primeru 3-cijano-5-fenilazo-6-hidroksi-4-metil-2-piridona

Azo piridonske boje su značajna klasa heterocikličnih boja, pre svega, zbog široke komercijalne upotrebe. Sintaza ovih boja počinje sedamdesetih godina XX veka, a već desetak godina nakon prve sinteze one ulaze u masovnu proizvodnju za potrebe tekstilne industrije. Naime, ova jedinjenja spadaju u kategoriju disperznih boja, veoma efikasnih za bojenje sintetskih vlakana (karakterišu ih visoki molarni ekstencioni koeficijenti i dobra postojanost na pranje), koje baš tih godina preuzimaju ulogu glavnih materijala u tekstilnoj industriji. Kasnije, azo piridonske boje kreću da se koriste i u grafičkoj industriji u ink-džet štampačima, kao i u LCD ekranima [105]. Sa druge strane, biološka aktivnost azo piridonskih boja postala je tema mnogih naučnih radova i studija u kojima su ispitana njihova razna biološka svojstva [100, 104-106].

1.8.1. Sintaza heterocikličnih azo boja

Osnovna reakcija za sintezu azo jedinjenja, pa tako i heterocikličnih azo jedinjenja je reakcija kuplovanja između diazo komponente i komponente za kuplovanje [91-96]. Uslov pri izboru komponente za kuplovanje jeste prisustvo vodonikovog atoma vezanog za ugljenikov atom aktiviranog heterocikličnog prstena, koji u reakciji elektrofilne aromatične supstitucije reaguje sa diazotovanim jedinjenjem. Najčešći postupak za sintezu piridonskih azo boja prikazan je na slici 1.36. Diazonijumova so se priprema polazeći iz odgovarajućeg primarnog amina (anilin, supstituisani anilin ili neki heterociklični amin) u prisustvu jake kiseline, kao što je hlorovodonična kiselina, i natrijum-nitrita, na niskoj temperaturi (0–5°C). Dobijeno diazo jedinjenje se potom kupluje sa 2-piridonom (0–5°C), dok se pH sredine održava oko pH 10, pri čemu nastaje željena azo boja. Izabrani 2-piridon može biti supstituisan u položajima: i) položaj 1 (alkil-, fenil-, supstituisani fenil-, hidroksialkil-, karboksialkil-); ii) položaj 3 (cijano-, amido-, piridinijum-); iii) položaj 4 (alkil-, fenil-, supstituisani fenil-, trifluormetil-); iv) položaj 6 (alkil-, fenil-, hidroksi-grupa) [105].

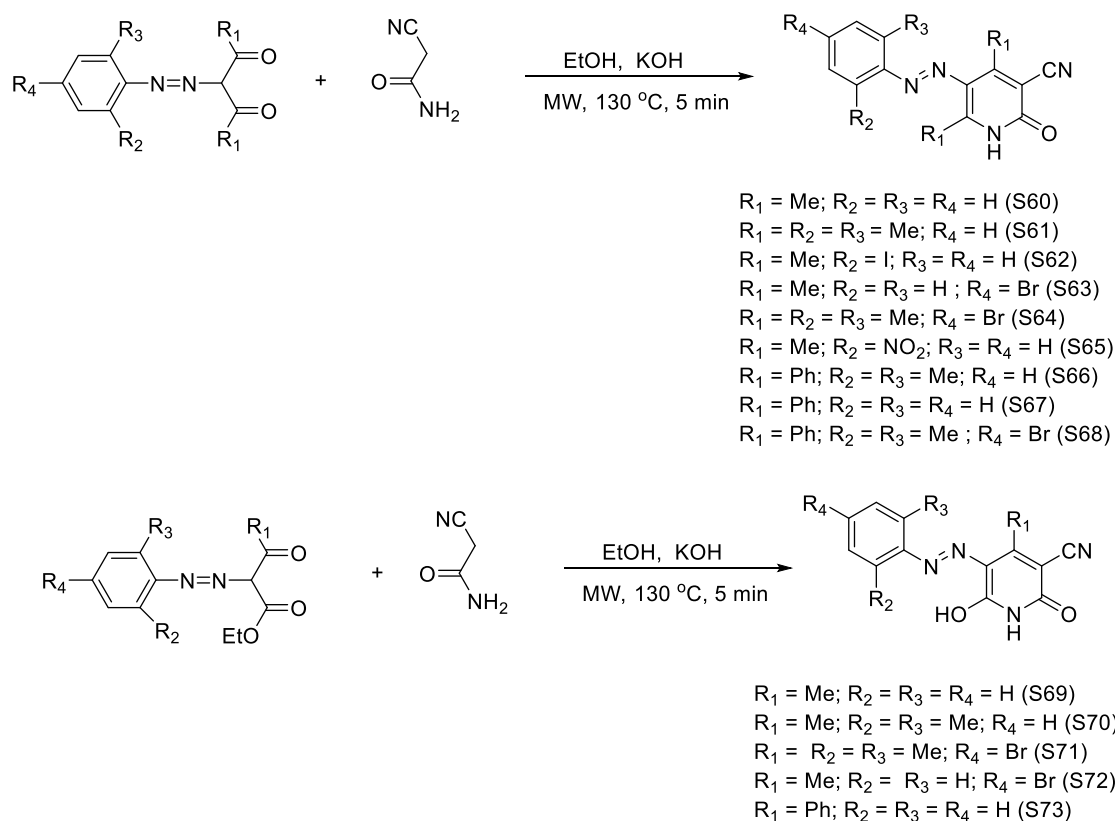


Slika 1.36. Reakcija diazo-kuplovanja na primeru sinteze 3-cijano-5-fenilazo-6-hidroksi-4-metil-2-piridona

Ovaj postupak je primenjen za dobijanje velikog broja različitih azo piridonskih boja [105-111]. Azo boje na bazi 2-piridona uglavnom pokrivaju opseg između žutih i narandžastih nijansi, ali modifikacijom reaktanata mogu se dobiti i crvene, bordo i ljubičaste boje [105].

U cilju pronalaženja efikasnijih postupaka, skraćivanja vremena reakcije i postizanja boljih prinosa razvijeni su postupci za sintezu azo jedinjenja mikrotalasnom tehnikom i metodom kontinualnog protoka u mikroreaktorima [112,113].

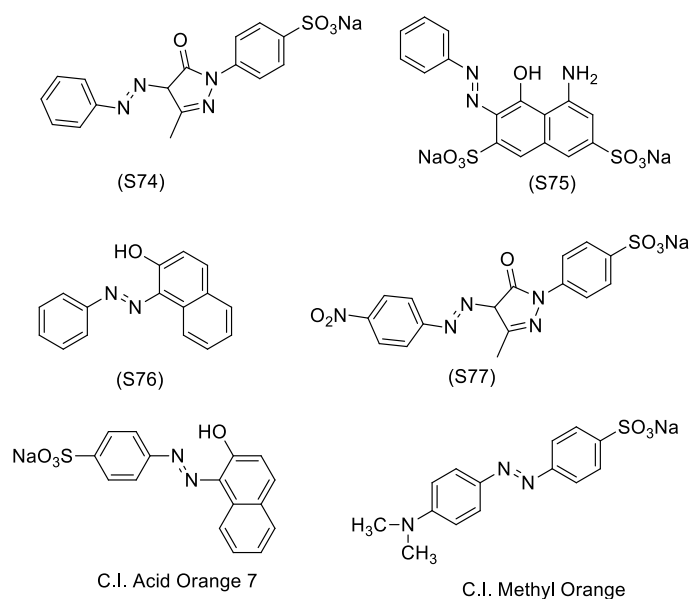
Mijin i saradnici su razvili postupak za sintezu arilazo piridonskih boja koristeći tehniku mikrotalasnog zračenja [112]. U ovom radu prikazana je sinteza četrnaest 5-arilazo-4,6-disupstituisanih-3-cijano-2-piridona (slika 1.37). Reakcija se odvija polazeći iz prethodno pripremljenog fenilazo dikarbonilnog jedinjenja i cijanoacetamida, u etanolu i u prisustvu kalijum-hidroksida, u toku 5 minuta u mikrotalasnom reaktoru. Isti postupak u klasičnim uslovima sinteze, daje dobre prinose, ali reakcija se odvija uz refluks oko 3 sata, što se korišćenjem mikrotalasne tehnike prevazilazi, jer se vreme trajanja reakcije drastično skraćuje. Takođe, zapaženo je da se veći prinosi azo jedinjenja ostvaruju korišćenjem diketona, kao dikarbonilne komponente (72–100%), dok ketoestri daju nešto niže prinose (47–93%) usled manje reaktivnosti.



Slika 1.37. Sinteza 5-arilazo-4,6-disupstituisanih-3-cijano-2-piridona u mikrotalasnom reaktoru [112]

U radu Vang (*Wang*) i saradnika ispitana je sinteza nekih heterocikličnih i karbocikličnih azo boja (slika 1.38) koristeći metodu kontinualnog protoka u mikroreaktoru [113]. Postupak je optimizovan na primeru reakcije diazo kuplovanja 1-(4-sulfofenil)-3-metil--5-pirazolona i anilina. Ustanovljeno je da su glavni faktori koji utiču na prinos proizvoda molarni odnos natrijum-nitrita i anilina u toku diazotovanja, temperatura i vreme zadržavanja u

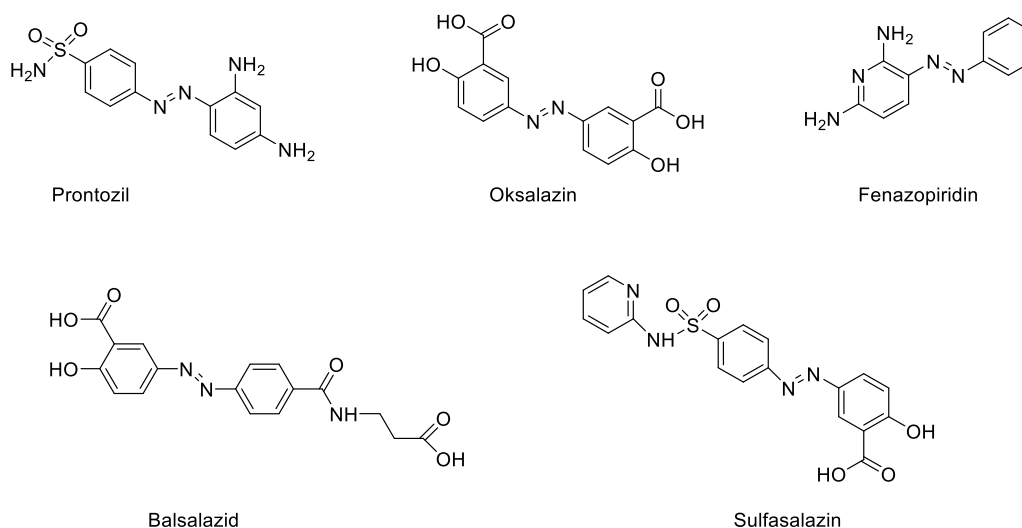
mikroreaktoru. Najveći prinosi (preko 90%) ostvareni su pri sledećim uslovima diazotovanja: molarni odnos natrijum-nitrita i anilina 1,06:1, protok 30ml/min, vreme zadržavanja 10 sekundi, temperatura 25 °C; i diazo-kuplovanja: protok 60 mL/min, vreme zadržavanja 8 sekundi, temperatura 21 °C, pH=10. U ovim uslovima sintetisane su četiri azo boje i dve komercijalne boje C.I. *Acid Orange 7* (15510) i C.I. *Methyl Orange* (13025) u prinosima od preko 90% (slika 1.38). Ovi rezultati pokazuju da kontinualna sinteza u mikroreaktorskom sistemu pruža izuzetne rezultate u pogledu prinosa proizvoda i reakcionog vremena u poređenju sa klasičnim postupkom dobijanja azo boja. Takođe, autori ističu da ovaj postupak ima značajan potencijal za primenu sinteze azo boja na industrijskom nivou.



Slika 1.38. Azo boje sintetisane metodom kontinualnog protoka u mikroreaktoru [113]

1.8.2. Biološka svojstva heterocikličnih azo derivata

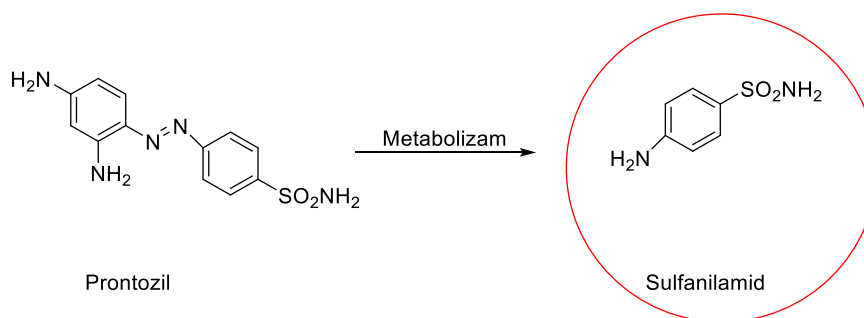
Potruga za novim i efikasnijim lekovima, u borbi protiv bolesti koje su posledica infekcija, rezistencije na postojeće lekove, inflamacije, mutacija, stresa i karcinoma, motivisala je naučnike da ispituju mnoga azo jedinjenja i njihova potencijalna lekovita svojstva. Ustanovljeno je da azo boje, a pogotovo one sa heterocikličnim fragmentima u strukturi, poseduju širok spektar bioloških aktivnosti, među kojima su antimikrobna, antikancerogena, antiinflamatorna, antioksidativna i druge (slika 1.39) [114-119]. Prema tome, u narednim odeljcima, dat je pregled nekih bioloških svojstava heterocikličnih i karbocikličnih azo boja.



Slika 1.39. Neki azo derivati sa ciljanim dejstvom

1.8.3. Antimikrobna svojstva

Godine 1939. Gerard Domag (*Gerhard Domagk*) je dobio Nobelovu nagradu za medicinu, otkrivši da azo jedinjenje, nazvano Prontosil (slika 1.40), ima potencijal za lečenje ozbiljnih bakterijskih infekcija. Kasnije se ispostavilo da je Prontosil prolek, tj. da se on u organizmu redukuje do sulfanilamida koji zapravo ispoljava izuzetnu antibakterijsku aktivnost. Otkriće Prontosila, doprinelo je razvijanju mnogih drugih derivata sulfonamida, koji su se masovno koristili za suzbijanje bakterijskih infekcija, pre nego što su otkriveni penicilin i drugi antibiotici [120].

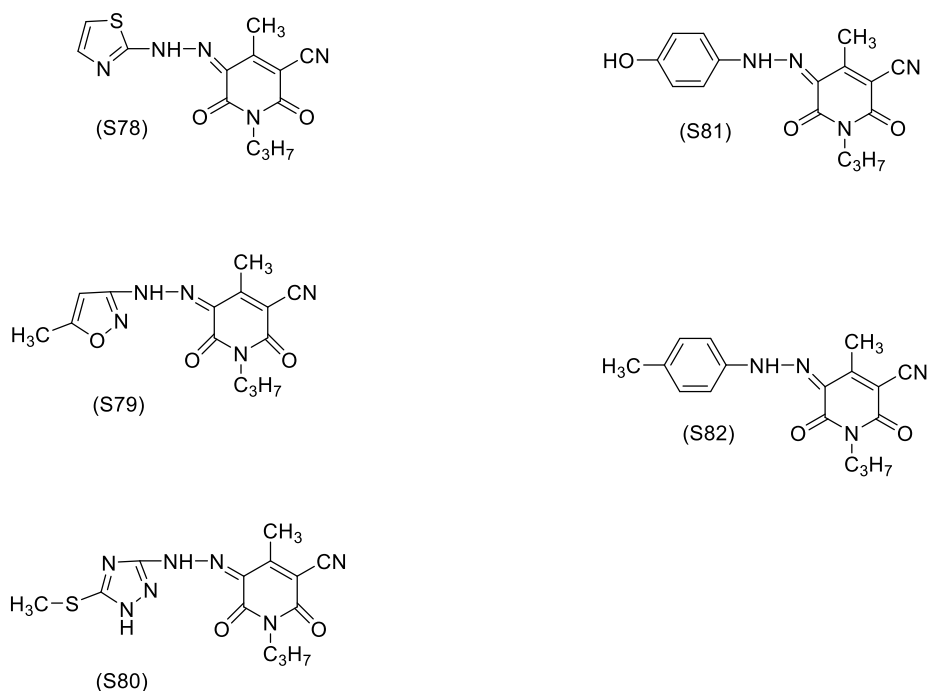


Slika 1.40. Degradacija Prontosila do sulfanilamida

Rezistencija bakterija i gljivica na postojeće antimikrobne agense predstavlja najveći problem u lečenju infekcija izazvanih ovim patogenima. Zato je razvijanje novih lekova kako značajno, tako i neophodno u borbi sa patogenim sojevima. Brojne studije ukazuju da heterociklične azo boje imaju dobra antibakterijska i antifungalna svojstva [115-121]. El-Borai (*El-Borai*) i saradnici [121] su ispitivali antibakterijska svojstva azo boja na bazi tiazola. Ustanovljeno je da pojedini derivati imaju izuzetna antibakterijska svojstva prema Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama. Jusefi (*Yousefi*) i saradnici [122] su objavili studiju, u kojoj su ispitivali antibakterijska svojstva azo boja iz tiazola, benzotiazola, benzimidazola i piridina, gde je pokazano da sintetisana jedinjenja imaju potencijal kao antibakterijski agensi.

Pojedina istraživanja otkrivaju da materijali, obojeni azo jedinjenjima sa antimikrobnim svojstvima, takođe, ispoljavaju antimikrobnu aktivnost. Mišra (*Mishra*) i saradnici [123] su sintetisali azo boje iz benzimidazola, benzoksazola i benzotiazola i proučavali njihovu antibakterijsku aktivnost, kao i antibakterijska svojstva poliestera obojenog sintetisanim jedinjenjima. Antibakterijska aktivnost je proučavana prema sojevima *Staphylococcus aureus* i *Klebsiellae pneumoniae*. Obojeni poliester ispoljio je izuzetna antibakterijska svojstva prema ispitivanim sojevima.

Aškar (*Ashkar*) i saradnici [124] su u radu ispitivali antimikrobna svojstva pet aril-, odnosno heteroaril-azo boja na bazi 3-cijano-6-hidroksi-4-metil-1-propil-2-piridona (slika 1.41). Ispitivane boje su dobijene u reakciji diazokuplovanja, a kao diazo komponenta za sintezu arilazo boja korišćeni su supstutuisani anilini, dok su za sintezu heteroarilazo boja korišćeni derivati tiazola, izoksazola i triazola. Antimikrobna aktivnost sintetisanih boja ispitana je prema Gram pozitivnim bakterijama: *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilus*, kao i prema sojevima Gram negativnih bakterija: *Escherichia coli*, *Klebsiellae pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa*. Ispitivana jedinjenja ispoljila su antimikrobna svojstva prema ispitivanim sojevima Gram pozitivnih bakterija.



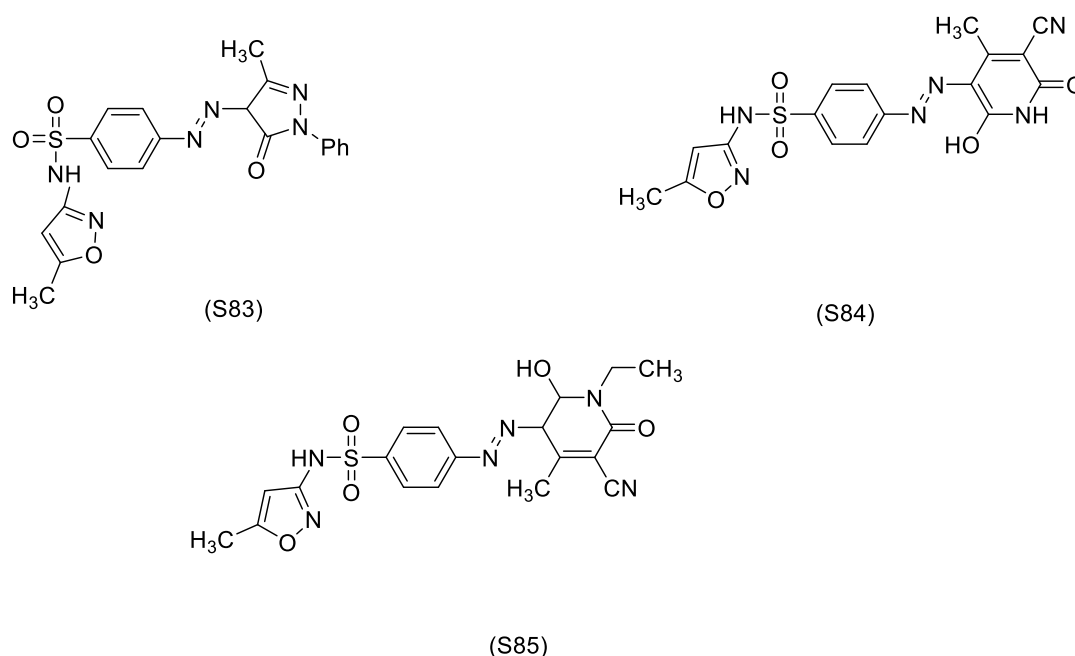
Slika 1.41. Boje na bazi 3-cijano-6-hidroksi-4-metil-1-propil-2-piridona sa antibakterijskim svojstvima [124]

Novije studije pokazuju da neke heterociklične azo boje imaju i dobra inhibitorna svojstva prema soju *Mycobacterium tuberculosis*, koji izaziva tuberkulozu, kao i antifungalnu aktivnost prema gljivicama *Aspergillus flavus* i *Candida albicans*. Takođe, treba spomenuti da pojedina azo jedinjenja imaju i svojstvo HIV inhibitora, koje se povezuje sa mogućim stvaranjem interakcija između azo molekula i proteaze, kao i reverzne transkriptaze virusa [125,126].

1.8.4. Antikancerogena svojstva

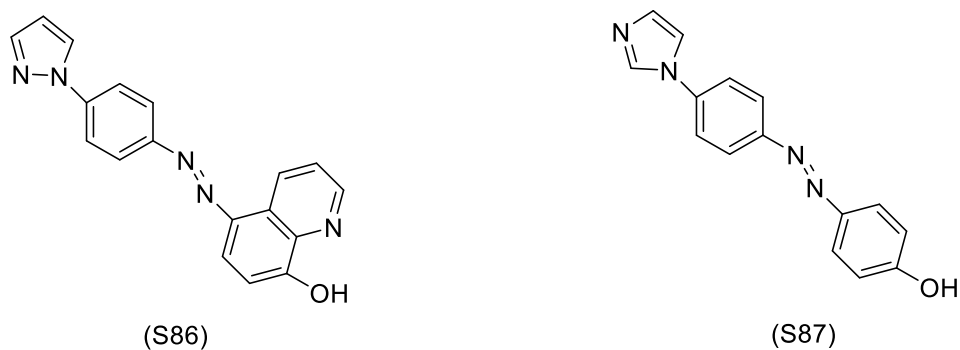
Karcinom je kompleksna bolest, koja je po učestalosti i smrtnosti na drugom mestu u svetu. Iako danas postoje brojne terapije za lečenje kancerogenih oboljenja, zbog njihovih ograničenja kao što su česti neželjeni efekti, visoka citotoksičnost, rezistencija na lek i slično, konstantno se radi na razvoju novih lekova sa poboljšanim delovanjem. Istraživanja pokazuju da se jedinjenja sa heterocikličnom strukturom generalno pokazuju kao obećavajuća hemoterapija za maligne bolesti [114].

U radu Milikarjuna (*Millikarjuna*) i saradnika [125] ispitana je citotoksična aktivnost tri azo boje, sintetisane polazeći iz sulfametoksazola i različitih heterocikala za kuplovanje – pirazolona i piridona (slika 1.42). Ispitivana jedinjenja ispoljila su dobra antikancerogena svojstva prema ćelijskoj liniji MCF 7 (karcinom dojke), u poređenju sa doksorubicinom kao standardnim lekom. Azo boja prikazana strukturom S83 (slika 1.42), na bazi pirazolona ispoljila je najveću inhibiciju prema testiranim ćelijama sa IC_{50} vrednošću od 11,07 $\mu\text{g/ml}$.



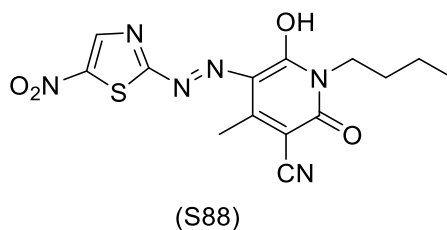
Slika 1.42. Azo boje na bazi pirazolona i piridona sa citotoksičnom aktivnošću prema karcinomu dojke [125]

U radu Gašemi (*Ghasemi*) i saradnika [126] sintetisana je serija od šesnaest azo boja. Diazonijumove soli iz derivata imidazola i pirazola kuplovane su sa fenolom, 2-naftolom, 8-hidroksihinolinom i *N,N*-dimetilanilinom dajući željena azo jedinjenja. U radu su ispitana *in vitro* antibakterijska i antikancerogena svojstva sintetisane serije. Antikancerogena aktivnost je ispitana prema karcinomu dojke. Najbolju antikancerogenu aktivnost ispoljili su derivati S86 ($IC_{50} = 25 \mu\text{g/ml}$) i S87 ($IC_{50} = 43,75 \mu\text{g/ml}$) prikazani na slici 1.43.



Slika 1.43. Heterociklične azo boje pirazola i imidazola sa antikancerogenom aktivnošću prema ćelijama karcinoma dojke [126]

U radu [127] ispitana je citotoksična aktivnost heterocikličnih azo jedinjenja na bazi 1-butil-3-cijano-6-hidroksi-4-metil-2-piridona. Sintetisana jedinjenja testirana su prema kancerogenim ćelijskim linijama MDA-MB-231 (adenokarcinom dojke) i HCT116 (karcinom debelog creva). Jedinjenje S88 ispoljilo je najveću antikancerogenu aktivnost prema ispitivanim ćelijskim linija sa IC_{50} vrednostima od 19,28 $\mu\text{g/ml}$ (HCT116) i 23,50 mg/ml (MDA-MB231).

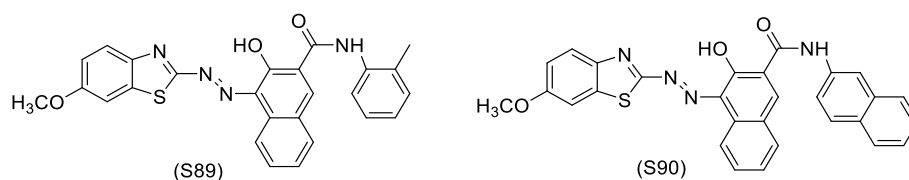


Slika 1.44. Azo boja sa antikancerogenim dejstvom prema ćelijama karcinoma dojke i karcinoma debelog creva [127]

1.8.5. Antioksidativna svojstva

Poznato je da slobodni radikali, ukoliko se nađu u ćelijskom prostoru, mogu stupiti u interakcije sa DNK ili proteinima, time narušiti njihovu funkciju i dovesti do neki ozbiljnih poremećaja koji mogu izazvati inflamacije, kancer i aterosklerozu. Zbog toga antioksidanti imaju značajnu ulogu u očuvanju zdravlja i sperećavanju ovih ozbiljnih bolesti [75-77]. Heterociklična azo jedinjenja usled prisustva $-\text{NH}$, $-\text{OH}$ i $-\text{SH}$ grupa se pokazuju kao dobri antioksidanti.

U radu [128], sintetisano je 11 heterocikličnih azo jedinjenja iz 2-amino-6-metoksibenzotiazola, 2-amino-6-metilbenzotazola, 2-amino-6-hlorbenzotiazola, 4-(4-nitrofenil)-1,3-tiazol-2-amina i derivata piridona i naftola, i ispitana su njihova farmakološka svojstva. Antioksidativna aktivnost jedinjenja S89 i S90, prikazanih na slici 1.45, ispitana je određivanjem inhibicije DPPH radikala, hidroksil- i nitritnih radikala, kao i sposobnošću heliranja jona gvožđa (Fe^{2+}) [129].



Slika 1.45. Heterociklične boje iz benzotiazola i naftola sa antioksidativnim potencijalom [128]

Što se tiče DPPH metode, antioksidativno dejstvo jedinjenja se ispoljava tako što slobodni radikali reaguju sa azo jedinjenjem pri čemu nastaje DPPH-H. Ova metoda je pokazala da jedinjenja S89 i S90 imaju dobar potencijal pri "hvatanju" DPPH slobodnih radikala, u poređenju sa askorbinskom kiselinom kao standardom.

Sledeća metoda za određivanje antioksidativnih svojstava u ovom radu [128] je bazirana na inhibiciji nitritnih jona. Usled razgradnje natrijum-nitroprusida, u vodenom rastvoru se oslobađa azot-monoksid, koji u reakciji sa kiseonikom daje nitritne jone. U ovoj reakciji kiseonik i ispitivana azo jedinjenja se ponašaju kompetitivno u reakciji sa NO molekulima, inhibirajući na taj način stvaranje nitritnih jona. Ispitivana jedinjenja su se pokazala kao dobri antioksidanti u poređenju sa standardom.

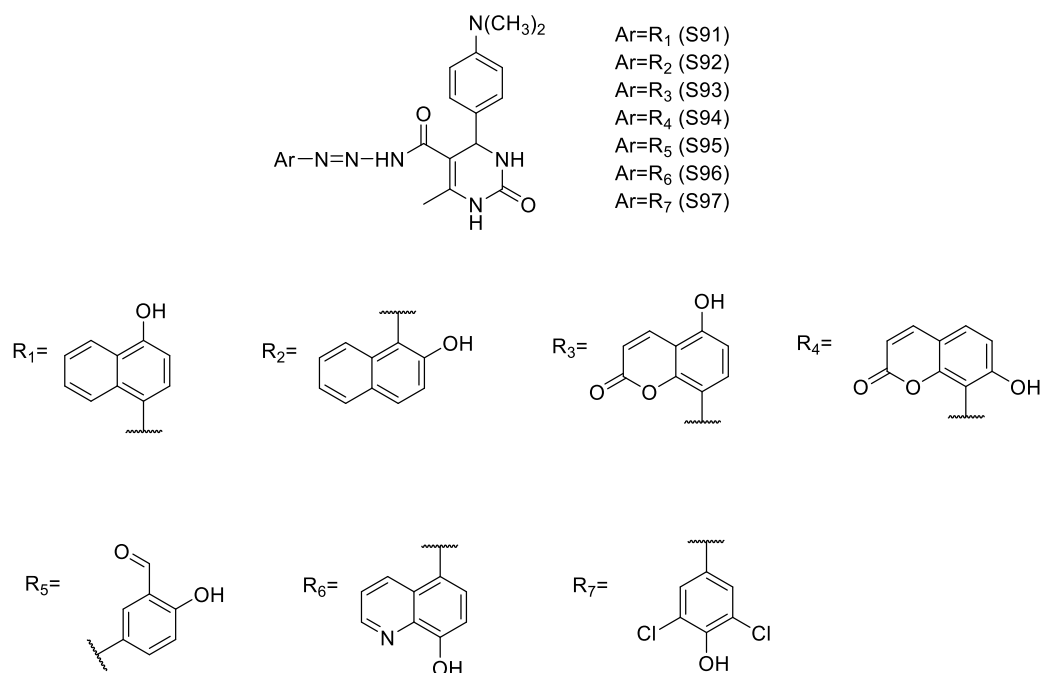
Hidroksil radikali predstavljaju najreaktivniju vrstu kiseonika i mogu znatno oštetiti tkiva tokom inflamacije. Stoga su "hvatači" hidroksil radikala značajni jer mogu sprečiti oštećenja tkiva. Inhibicija hidroksilnih radikala ispitana je korišćenjem metode oksidacije 2-deoksi-D-riboze. Ispitivana jedinjenja pokazala su umerenu aktivnost i pri inhibiciji hidroksilnih radikala.

Helatni agensi inhibiraju stvaranje slobodnih radikala, stabilizacijom prelaznih metala, odnosno uspostavljanjem veze sa jonima metala. Stoga je ispitana sposobnost azo jedinjenja S89 i S90 da grade kompleks sa Fe^{2+} jonima. Oba jedinjenja su pokazala dobra svojstva kao helatni agensi, a jedinjenje S89 je pokazalo bolju aktivnost u odnosu na S90.

1.8.6. Antiinflamatorna svojstva

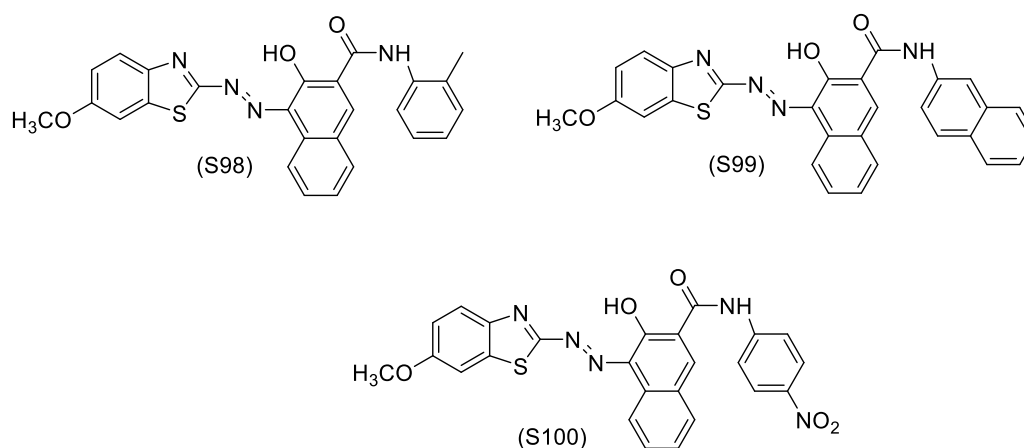
Nesteroidni antiinflamatorni lekovi kao što su aspirin, ibuprofen i diklofenak, često ispoljavaju neželjena dejstva koja dovode do pojave gastritisa [130]. Usled potrebe za novim antiinflamatornim agensima, sa smanjenim neželjenim efektima, sintetisana su mnoga jedinjenja, među kojima su se heterociklični molekuli pokazali kao izuzetni kandidati za buduće lekove [114,126].

U radu Šaik (*Shaikh*) i saradnika [131] sintetisana su azo jedinjenja iz derivata dihidropirimidinona i različitih komponenti za kuplovanje (1-naftol, 2-naftol, 5-hidroksikumarin, 7-hidroksikumarin, 2-hidroksibenzaldehid, 8-hidroksihinolin, 2,6-dihlorofenol), i ispitana su njihova antiinflamatorna svojstva. Antiinflamatorna aktivnost je ispitana *in vivo* na Vistar albino pacovima, koristeći metod edema šapice indukovan karagenanom. Jedinjenja su primenjena u dozi 30 mg/kg i dobijeni rezultati su upoređeni sa diklofenakom kao standardnim lekom. Ustanovljeno je da primenjena koncentracija jedinjenja, nakon 3 h, inhibira inflamaciju indukovanu karagenanom. Jedinjenja su ispoljila antiinflamatornu aktivnost u opsegu od 30,77–53,85%, dok je diklofenak pokazao aktivnost od 86,32%. Jedinjenja S92, S93 i S97 su se pokazala kao bolji kandidati u odnosu na S95 i S96 (slika 1.46).



Slika 1.46. Azo jedinjenja na bazi dihidropirimidinona sa antiinflamatornim svojstvima [131]

U radu Hariša (*Harisha*) i saradnika [128], ispitivana je *in vitro* antiinflamatorna aktivnost azo boja S98, S99 i S100 (slika 1.47), koristeći metodu inhibicije denaturacije BSA (engl. *Bovine serum albumin*). Dobijeni rezultati su upoređeni sa inhibitornim svojstvima aspirina, koji se primenjuje kao standardni lek. Ustanovljeno je da S98 i S100 ispoljavaju izuzetna antiinflamatorna svojstva, dok je jedinjenje S99 ispoljilo nešto slabiju aktivnost. Vrednosti inhibicije od 43, 45 i 49% za jedinjenje S98 i 30, 38 i 50% za jedinjenje S100 pri koncentracijama od 50, 100 i 200 mg/mL, upoređene su sa rezultatima dobijenim za aspirin i ustanovljeno je da ispitivani azo derivati imaju izuzetan potencijal za nove antiinflamatorne agense.

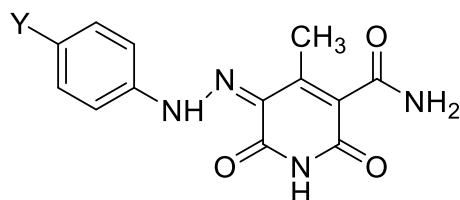


Slika 1.47. Potencijalni antiinflamatorni agensi [128]

1.9. Fotofizička svojstva heterocikličnih boja

Heterociklične boje nalaze primenu u fotohromnim polimernim sočivima, polimernim nanovlaknima, sensorima i solarnim ćelijama, upravo zahvaljujući njihovim dobrim fotofizičkim svojstvima. Fotofizička svojstva boja ispituju se njihovom sposobnošću da apsorbuju, kao i da emituju zračenje u UV-Vis delu elektromagnetnog spektra. Eksperimentalno, ova svojstva se analiziraju u rastvorima koristeći UV-Vis i fluorescentnu spektroskopiju. Prelazi koji se dobijaju u apsorpcionim spektrima predstavljaju prelaze između elektronskih energetske nivoa, odnosno prelaz iz najviše popunjene molekulske orbitale (HOMO) u najnižu nepopunjenu orbitalu (LUMO). Za određivanje energija HOMO i LUMO orbitala, i njihovu razliku u energijama (engl. *HOMO-LUMO gap*) koriste se kvantno-hemijski proračuni [132].

Fluorescencija, uopšteno govoreći, podrazumeva apsorpciju ultraljubičaste ili vidljive svetlosti i emisiju svetlosti na višim talasnim dužinama [132]. Prema tome, fluorescentne boje se definišu kao jedinjenja koja i apsorbuju i emituju svetlost u vidljivoj oblasti elektromagnetnog zračenja. Struktura fluorescentnih boja se uglavnom temelji na proširenim konjugovanim aromatičnim sistemima, koji najčešće sadrže više kondenzovanih prstenova. Još jedna važna karakteristika fluorescentnih boja je rigidnost strukture. Naime, kruti molekuli, sa manjom konformacionom fleksibilnošću imaju bolja fluorescentna svojstva. Ovde spadaju boje na bazi kumarina, naftalimida, fluoresceina, cijanina i druge. Za azo jedinjenja se uglavnom smatra da nisu fluorescentna, baš zbog fleksibilnosti strukture, odnosno mogućnosti rotacije oko $-N=N-$ veze [133,134]. Zbog toga su studije na temu fluorescencije azo jedinjenja retke, ali noviji radovi ukazuju da i ove boje mogu ispoljavati fluorescentna svojstva [110,134]. Na slici 1.48 je prikazana struktura nekih fluorescentnih azo boja iz 3-amido-6-hidroksi-4-metil-2-piridona [110].



Y = OH (S101), OCH₃ (S102), CH₃ (S103), H (S104),
Cl (S105), Br (S106), COOH (S107), CN (S107), NO₂ (S109)

Slika 1.48. Fluorescentne azo boje iz 3-amido-6-hidroksi-4-metil-2-piridona [110]

Fluorescentne boje se koriste kao biološke probe, odnosno supstance koje se vežu za molekul, ćeliju, tkivo ili mikroorganizam koji se potom detektuje fluorimetrijskom ili mikroskopskom tehnikom u cilju kvantitativnog određivanja veoma niskih koncentracija nekih supstanci u biološkom supstratu. Fluorescentne probe tako mogu da detektuju, identifikuju i kvantifikuju biomolekule kao što su antitela, proteini, lipidi, polisaharidi. Takođe se koriste i za sekvenciranje DNK, RNK, proteina i enzima, ispitivanje ćelijskih struktura, funkcija, kao i u dijagnostičke svrhe. Varijacije u emisiji vezane fluorescentne boje ukazuju na promene u konformaciji biomolekula, kao i na promene njihovog okruženja, što je veoma korisno u istraživanju biološke aktivnosti i mehanizama bioloških reakcija. Fluorescentne boje imaju

praktičnu primenu u uređajima kao što su optički hemijski senzori (za kiseonik, ugljen-dioksid, pH vrednost, jone metala), optički bio senzori (za enzime, ugljene hidrate, antitela, DNK) i optički termo senzori [133]. U skladu sa tim razvijanje novih azo jedinjenja sa dobrim fotofizičkim svojstvima predstavlja izazovnu i interesantnu oblast istraživanja.

2. Eksperimentalni deo

2.1. Materijali i metode

Hemikalije korišćene za sintezu:

- acetilaceton, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich
- etil-acetoacetat, $\geq 97\%$, Acros Organics
- cijanoacetamid, $\geq 98\%$, Fluka
- etil-cijanoacetat, $> 98\%$, Sigma-Aldrich
- etilamin, $> 97\%$, Fluka
- propilamin, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich
- etanolamin, $> 97\%$, Cewe
- anilin, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich
- etil-benzoilacetat, $\geq 95\%$, Sigma-Aldrich
- 2-hloroacetamid, $\geq 97\%$, Sigma-Aldrich
- piridin, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich
- etanol, $> 99,9\%$, Sigma-Aldrich
- metanol, $99,8\%$, Sigma-Aldrich
- kalijum-hidroksid, p.a., Centrohem
- natrijum-hidroksid, p.a., Centrohem
- hlorovodonična kiselina, p.a., Merck
- sumporna kiselina, p.a., Sigma-Aldrich
- p-nitrobenzalhid, $\geq 98,0\%$, Sigma-Aldrich
- urea, $\geq 98\%$, Fluka
- cink, $\geq 99,9\%$, Fluka
- amonijum-hlorid, p.a., Centrohem
- demineralizovana voda, Millipore-Waters Milli-Q

Rastvarači korišćeni za snimanje apsorpcionih i emisionih spektara:

- 1-butanol, $> 99,5\%$, Fluka
- 1-metil-2-pirolidinon, $\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich
- 1-propanol, $> 99,0\%$, Fluka
- 2-butanon, $\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich
- 2-pentanon, $\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich
- aceton, $> 99,96\%$, Acros
- acetonitril, $> 99,99\%$, J.T. Baker
- benzil-alkohol, $99,8\%$, Sigma-Aldrich
- cikloheksanon, $\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich
- dietil-etar, $> 99,0\%$, Sigma-Aldrich
- dihlormetan, $> 97,0\%$, Fluka
- *N,N*-dimetilacetamid, $> 99,0\%$, Sigma-Aldrich
- *N,N*-dimetilformamid, $> 99,9\%$, Riedel-de Haën
- dimetil-sulfoksid, $> 97,0\%$, Merck
- dioksan, $> 98,0\%$, Fluka
- etanol, $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich
- etil-acetat, $> 99,98\%$, Acros

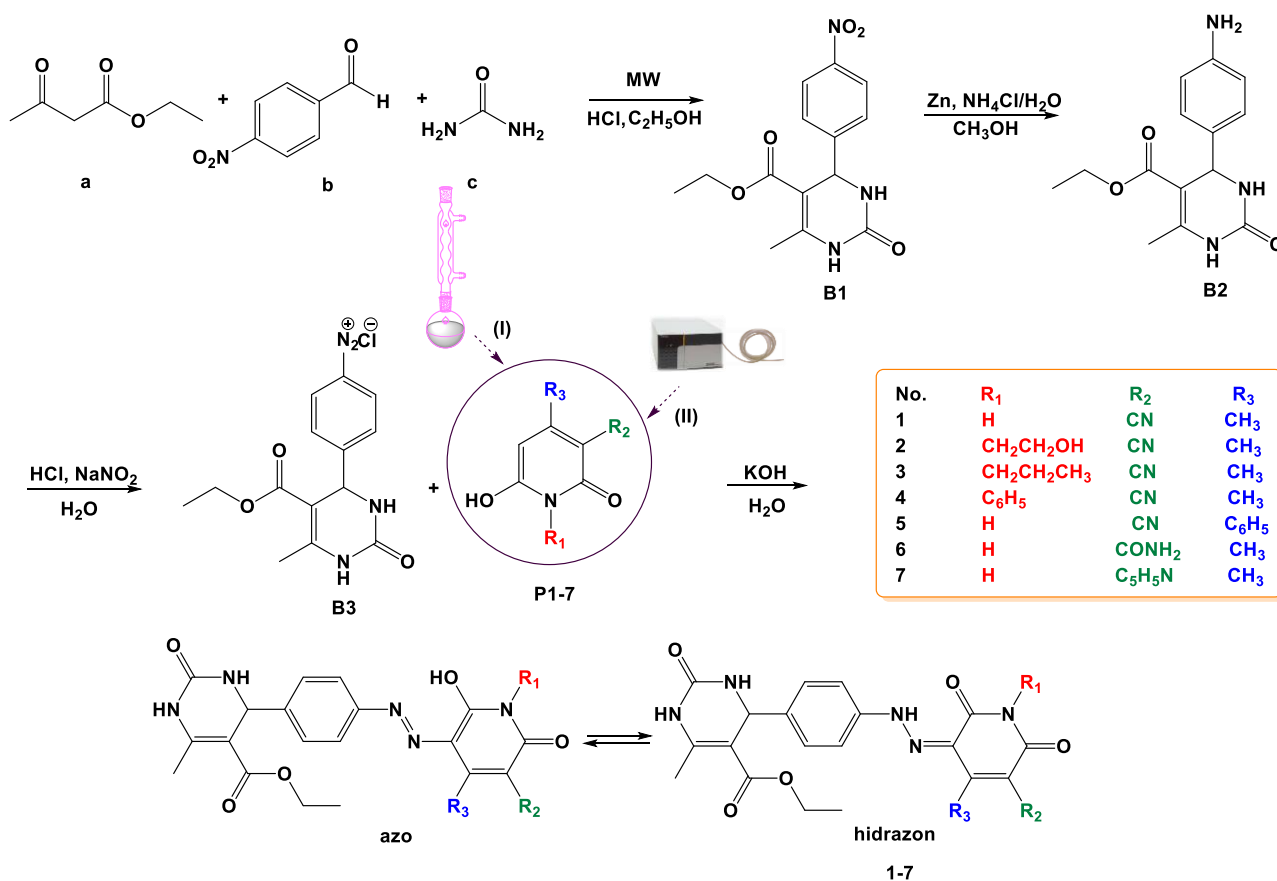
- etilen-glikol, > 99,0%, Sigma-Aldrich
- formamid, > 97,0%, Fluka
- hloroform, > 99,5%, Fluka
- izobutanol, ≥98,5%, Sigma-Aldrich
- metanol, > 99,99%, Acros
- metil-acetat, > 99,0%, Riedel-de Haën
- piridin, > 99,0%, Sigma-Aldrich
- sirćetna kiselina, ≥ 98,0%, Fluka
- *terc*-butanol, ≥ 99,5%, Sigma-Aldrich
- tetrahidrofuran, > 99,9%, Sigma-Aldrich

Sintetisana jedinjenja su okarakterisana je temperaturom topljenja, elementalnom analizom, ATR-FTIR, ¹H-NMR, ¹³C NMR, ESI-MS i UV-Vis spektrima. Temperature topljenja su određene pomoću Stuart SMP30 aparata. Elementalna analiza (CHN mikroanaliza) urađena je na Vario EL III elementalnom analizatoru. Infracrvena spektroskopija sa Furijevom transformacijom (FT-IR) urađena je na Nicolet™ iS™ 10 (Thermo Fisher Scientific) spektrometru tehnikom prigušene ukupne refleksije (ATR). ATR-FTIR spektri snimljeni su u opsegu talasnih brojeva od 500 do 4000 cm⁻¹. ¹H-NMR i ¹³C NMR spektri snimljeni su na Bruker Ascend 400 (400 Hz i 100 Hz) u DMSO-*d*₆ i CF₃COOD. Hemijska pomeranja (δ) izražena su u ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS) kao standard. Maseni spektrometar, kvadrupolni jonski trap LCQ Advantage (Thermo Fisher Scientific), korišćen je za dobijanje masenih spektara. Primenjena je jonizaciona tehnika elektrosprej jonizacija (ESI), a ispitivana jedinjenja analizirana su u pozitivnom i negativnom jonizacionom modu. UV-Vis apsorpcioni spektri snimljeni su na Shimadzu 1700 spektrofotometru, pri koncentraciji jedinjenja 4·10⁻⁵ mol/dm³. Emisioni spektri su snimljeni na Shimadzu RF-1501 PC spektrofluorimetru pri koncentraciji jedinjenja 4·10⁻⁵ mol/dm³. Termička stabilnost jedinjenja je ispitana TGA/DTG i DTA tehnikom, koristeći Setaram Setsys Evolution 1750 instrument.

2.2. Sinteza

Kako je predmet istraživanja ove disertacije sinteza novih heterocikličnih azo derivata sa potencijalnim biološkim svojstvima, u okviru rada su prvo sintetisani heterociklični molekuli čijim kuplovanjem se dobijaju željene azo boje. U prvom delu disertacije sintetisani su različiti 2-piridoni. Dobijanje 2-piridona izvedeno je na dva načina, putem konvencionalne sinteze, i metodom kontinualnog protoka u kapilarnom mikroreaktoru. U drugom delu disertacije sintetisani su Biđinelijevi proizvodi (DHPM). Sinteza željenih azo boja je izvedena klasičnom reakcijom diazokuplovanja, gde je drivat DHPM-a komponenta za diazotovanje, a kao kuplujuće komponente korišćeni su različiti 2-piridoni.

Reakcioni put za dobijanje novih azo jedinjenja prikazan je na slici 2.1. Prvi korak je Biđinelijeva reakcija u kojoj se dobija DHPM proizvod etil-6-metil-4-(4-nitrofenil)-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**B1**). U drugom koraku se vrši redukcija nitro-grupe **B1** do amino-grupe, pri čemu nastaje etil-4-(4-aminofenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**B2**). Diazotovanjem **B2** dobija se diazonijumova so **B3** koja u reakciji kuplovanja sa različitim 2-piridonima (**P1-7**) daje nove azo boje **1-7**. Sinteza derivata 2-piridona izvedena je na dva načina: konvencionalnim postupkom (I) i kontinualnim postupkom u mikroreaktoru (II).



Slika 2.1. Reakcioni put dobijanja azo jedinjenja 1-7

2.2.1. Sinteza 2-piridona

U okviru disertacije sintetisano je deset derivata 2-piridona, od kojih je sedam upotrebljeno za pripremu azo boja (**P1-7**). Sinteza je izvedena primenom dve metode: i) konvencionalne i ii) kontinualne. Konvencionalna sinteza je urađena prema literaturnim procedurama [25,136], dok je postupak sinteze u kontinualnom protočnom kapilarnom mikroreaktoru, za derivate **P1-3** i **P8-10**, ispitan u cilju razvijanja novog efikasnijeg postupka sinteze.

2.2.1.1. Konvencionalna sinteza 6-hidroksi-2-piridona

Odgovarajuće 1,3-dikarbonilno jedinjenje (0,06 mol), adekvatan amid (0,06 mol), kalijum-hidroksid (0,07 mol) i metanol (120 ml) se pomešaju u balonu opremljenim kondenzatorom. Reakciona smeša se meša i zagreva uz reflux. Vreme trajanja reakcije zavisi od polaznih reaktanata. Tako sinteza **P1-3** traje osam, **P4** i **P5** dvadeset, a sinteza **P7** tri sata [25]. Nakon što je reakcija završena nastali talog (**P1-5**) se filtrira, potom rastvori u toploj vodi i zakiseli koncentrovanom hlorovodoničnom kiselinom, pri čemu se odgovarajući piridon taloži. Dobijeni proizvod se zatim filtrira, ispira malom količinom vode i suši na vazduhu. **P6** se dobija u reakciji kisele hidrolize **P1** (0,0067 mol, 1 g) sa sumpornom kiselinom (10 ml). Reakciona smeša se zagreva 30 minuta u vodenom kupatilu na temperaturi od 95–100 °C, a nakon toga se izlije na 200 g usitnjenog leda. **P6** se izdvaja filtracijom u vidu belih kristala koji se potom suše na vazduhu. **P7** se po završetku reakcije filtrira i prekrystalize iz etanola [136]. Strukture **P1-7**, potvrđene su temperaturom topljenja, ATR-FTIR i ¹H NMR spektrima, koji su u skladu sa literaturnim podacima [25,108,124,136].

3-cijano-6-hidroksi-4-metil-2-piridon (P1). Bela praškasta supstanca; prinos 61%; t.t. 315–316 °C; ATR-FTIR (ν/cm^{-1}): 1620 (CO), 2223 (CN), 3214 (NH); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ/ppm): 2,23 (3H, s, CH₃), 5,61 (1H, s, C5-H).

3-cijano-1-(2-hidroksietil)-6-hidroksi-4-metil-2-piridon (P2). Bela praškasta supstanca; prinos 59%; t.t. 173–175 °C; ATR-FTIR (ν/cm^{-1}): 1663 (CO), 2223 (CN), 3425 (OH); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ/ppm): 2,20 (3H, s, CH₃), 3,51 (2H, t, $J = 6,4$ Hz, CH₂CH₂OH), 3,99 (2H, t, $J = 6,6$ Hz, CH₂CH₂OH), 5,58 (1H, s, C5-H).

3-cijano-6-hidroksi-4-metil-1-propil-2-piridon (P3). Bela praškasta supstanca; prinos 31%; t.t. 237–239 °C; ATR-FTIR (ν/cm^{-1}): 1660 (CO), 2210 (CN); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ/ppm): 0,98 (3H, t, $J = 7,4$ Hz, CH₂CH₂CH₃), 1,58 (2H, m, CH₂CH₂CH₃), 2,20 (3H, s, CH₃), 3,98 (2H, t, $J = 7,2$ Hz, CH₂CH₂CH₃), 5,58 (1H, s, C5-H).

3-cijano-1-fenil-6-hidroksi-4-metil-2-piridon (P4). Belo svetlo žuta praškasta supstanca; prinos 78%; t.t. 282–284 °C; ATR-FTIR (ν/cm^{-1}): 1659 (CO), 2219 (CN); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ/ppm): 1,89 (3H, s, CH₃), 6,09 (1H, s, C5-H), 7,26–7,28 (2H, m, Ph), 7,45–7,49 (1H, m, Ph), 7,50–7,54 (2H, m, Ph).

3-cijano-4-fenil-6-hidroksi-2-piridon (P5). Bela praškasta supstanca; prinos 85%; t.t. 282–283 °C; ATR-FTIR (ν/cm^{-1}): 1655 (CO), 2211 (CN), 3280 (NH); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ/ppm): 2,63 (3H, s, CH₃), 6,82 (1H, s, C5-H), 7,20–7,50 (5H, m, Ph), 12,72 (1H, s, NH).

3-amido-6-hidroksi-4-metil-2-piridon (P6). Bela praškasta supstanca; prinos 53%; t.t. 196–198 °C; ATR-FTIR (ν/cm^{-1}): 1623 (CO), 1670 (CO), 3482 (NH); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ/ppm): 2,38 (3H, s, CH₃), 5,52 (1H, s, C5-H).

6-hidroksi-4-metil-3-piridinijum-2-piridon (P7). Zlatna kristalna supstanca; prinos 78%; t.t. > 300°C; ATR-FTIR (ν/cm^{-1}): 1600 (CO), 3350 (N–H); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ/ppm): 1,78 (3H, s, CH₃), 4,90 (1H, s, 5-H), 8,08 (2H, t, $J = 6$ Hz, piridinijum), 8,52 (1H, t, $J = 6$ Hz, piridinijum), 8,87 (2H, d, $J = 8$ Hz, piridinijum), 9,81 (1H, s, N–H).

2.2.1.2. Konvencionalna sinteza 1-supstituisanih-3-cijano-4,6-dimetil-2-piridona

Acetilaceton (0,06 mol), odgovarajući cijanoacetamid (0,06 mol), natrijum-hidroksid (0,07 mol) i metanol (120 ml) se sipaju u balon opremljen kondenzatorom. Reakciona smeša se meša i zagreva uz refluks. Reakcija traje jedan sat (**P8**), odnosno četiri sata (**P9** i **P10**). Dobijeni piridoni se filtriraju, prekrystališu iz etanola i osuše na vazduhu [21].

3-cijano-4,6-dimetil-2-piridon (P8). Bela praškasta supstanca; prinos 60%; t.t. 285–286 °C; ATR-FTIR (ν/cm^{-1}): 1659 (CO), 2219 (CN), 3292 (NH); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ/ppm): 2,23 (3H, s, 6-CH₃), 2,30 (3H, s, 4-CH₃), 6,17 (1H, s, C5-H), 12,32 (1H, s, NH).

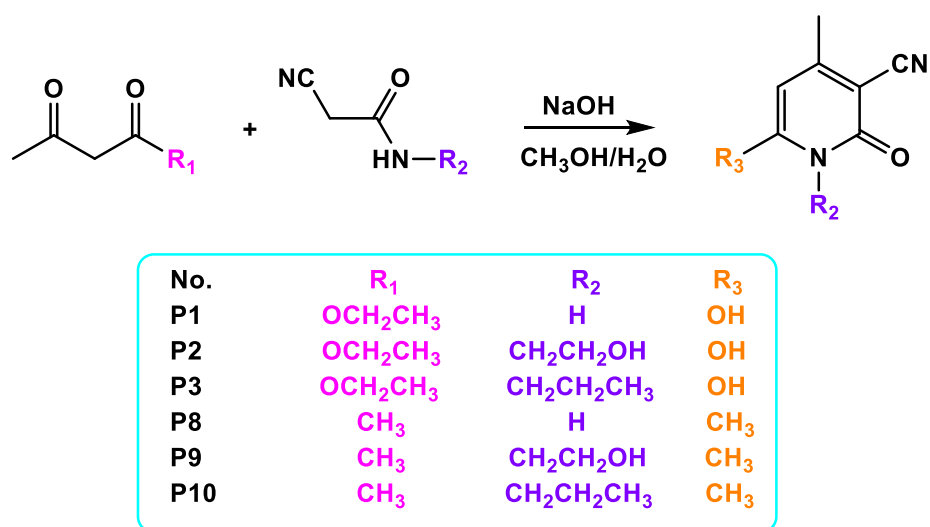
3-cijano-1-(2-hidroksietil)-4,6-dimetil-2-piridon (P9). Bela praškasta supstanca; prinos 60%; t.t. 140–142 °C; ATR-FTIR (ν/cm^{-1}): 1663 (CO), 2222 (CN); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ/ppm): 2,39 (3H, s, CH₃), 2,57 (3H, s, CH₃), 3,71 (2H, m, CH₂), 4,11 (2H, t, $J = 5,4$ Hz, CH₂), 5,04 (1H, m, OH), 6,37 (1H, s, C5-H).

3-cijano-4,6-dimetil-1-propil-2-piridon (P10). Bela praškasta supstanca; prinos 40%; t.t. 110–112 °C; ATR-FTIR (ν/cm^{-1}): 1646 (CO), 2216 (CN); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ/ppm):

0,98 (3H, t, $J = 7,4$ Hz, CH_3CH_2), 1,67 (2H, m, CH_3CH_2), 2,38 (3H, s, 4- CH_3), 2,53 (3H, s, 6- CH_3), 3,98 (2H, t, $J = 7,8$ Hz, CH_2), 6,38 (1H, s, C5-H).

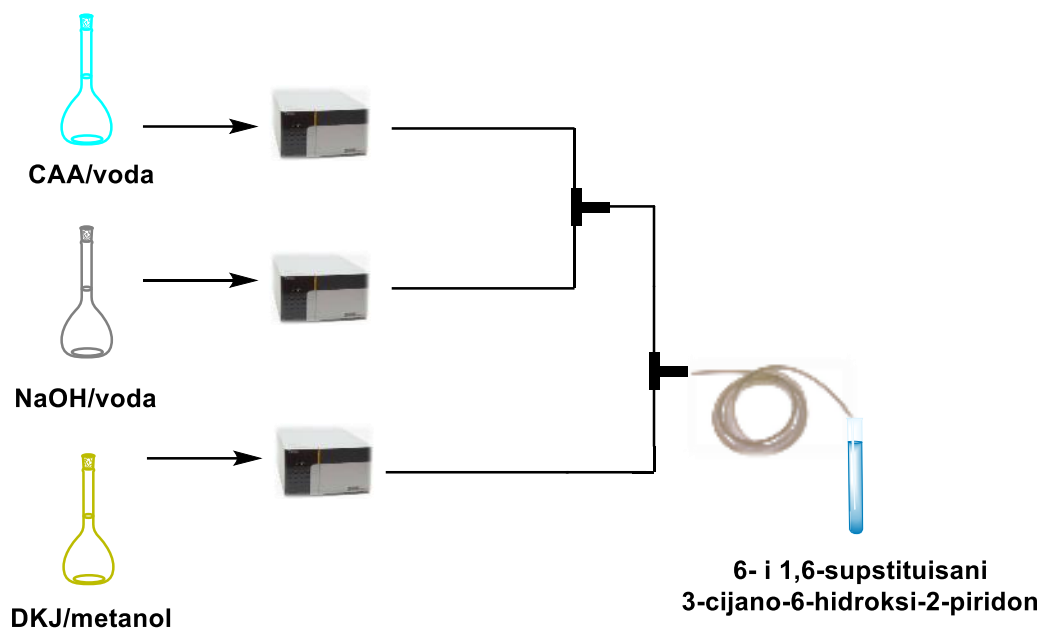
2.2.1.3. Sinteza 6- i 1,6-supstituisanih-3-cijano-4-metil-2-piridona metodom kontinualnog protoka u kapilarnom mikroreaktoru

Šest derivata 2-piridona (**P1–3** i **P8–10**) sintetisano je metodom kontinualnog protoka u kapilarnom mikroreaktoru, polazeći iz 1,3-dikarbonilnog jedinjenja (acetilacetona ili etil-acetoacetat), odgovarajućeg *N*-supstituisanog cijanoacetamida i natrijum-hidroksida u smeši metanol/voda (slika 2.2). Sintetisani derivati su strukturno okarakterisani i dobijeni podaci su u skladu sa podacima prikazanim u odeljcima 2.2.3.1 i 2.2.3.2.



Slika 2.2. Sinteza 6- i 1,6-supstituisanih 3-cijano-4-metil-2-piridona

Sistem za sintezu metodom kontinualnog protoka sačinjen je od tri pumpe (Shimadzu LC-20AD XR), dva T-miksera i PEEK (polietar-etar-keton) kapilarnog mikroreaktora (unutrašnji prečnik 0,5 mm, zapremina 5 ml, dužina 25 m) (slika 2.3). Prvi T-mikser povezuje izlaze A i B pumpe kojima se dovode vodeni rastvori odgovarajućeg cijanoacetamida (CAA/voda) i natrijum-hidroksida (NaOH/voda). Drugi mikser povezuje izlaz iz C pumpe, kojom se dovodi metanolni rastvor odgovarajućeg 1,3-dikarbonilnog jedinjenja (DKJ/metanol), izlaz iz prvog T-miksera i kapilarni mikroreaktor. Vreme zadržavanja reakcione smeše u mikroreaktoru kontrolisano je podešavanjem protoka ulaznih rastvora. Na izlazu iz mikroreaktora nalazi se prihvatna epruveta sa 1 ml koncentrovane hlorovodonične kiseline koja ima ulogu inhibitora reakcije kondenzacije. Svi eksperimenti su izvedeni na sobnoj temperaturi.



Slika 2.3. Sistem za sintezu metodom kontinualnog protoka

Urađena su dva seta eksperimenata. U prvom setu korišćeni su rastvori jednakih koncentracija 1,3-dikarbonilnog jedinjenja i odgovarajućeg cijanoacetamida. U drugom setu postupak je optimizovan za jedinjenja **P1** i **P8**, povećanjem koncentracije i molarnog odnosa 1,3-dikarbonilnog jedinjenja i odgovarajućeg cijanoacetamida.

Za prvi set eksperimenata pripremljeni su rastvori:

- ✓ 0,06 mol (6,008 g) acetilacetona u 100 ml metanola
- ✓ 0,06 mol (7,808 g) etil-acetoacetata u 100 ml metanola
- ✓ 0,06 mol odgovarajućeg cijanoacetamida u 100 ml vode
- ✓ 0,07 mol (2,800 g) natrijum-hidroksida u 100 ml vode

Za drugi set eksperimenata pripremljeni su rastvori:

- ✓ 0,10 mol (10,013 g) acetilacetona u 100 ml metanola
- ✓ 0,10 mol (13,014 g) etil-acetoacetata u 100 ml metanola
- ✓ 0,15 mol (12,612 g) cijanoacetamida u 100 ml vode
- ✓ 0,20 mol (8,000 g) natrijum-hidroksida u 100 ml vode

Protok ulaznih rastvora variran je u opsegu od 0,02 do 0,4 ml/min (prvi set) i od 0,1 do 0,4 ml/min (drugi set).

2.2.2. Biđinelijeva reakcija – Sintaza etil-6-metil-4-(4-nitrofenil)-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilata

Etil-acetoacetat (**a**) (4 mmol, 0,510 ml), 4-nitrobenzalhid (**b**) (4 mmol, 0,604 g) i urea (**c**) (4 mmol, 0,240 g) se rastvore u 10 ml etanola i doda se 4 kapi hlorovodonične kiseline. Reakciona smeša se zagreva u mikrotalasnom reaktoru (Anton Paar Monowave 300) do 120 °C u toku 30 minuta. Po završetku reakcije smeša se ostavi na temperaturi 4 °C 24 časa. DHPM proizvod, etil-6-metil-4-(4-nitrofenil)-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**B1**)

se izdvaja filtracijom na Bihnerovom levku, ispira etanolom, suši i potom prekrystalise iz etanola (slika 2.1). Hemijska struktura **B1** potvrđena je ATR-FTIR i NMR spektroskopijom i u skladu je sa literaturnim podacima [56]: bela praškasta supstanca; prinos 68%; t.t. 204–205 °C; ATR-FTIR (ν/cm^{-1}): 3225 (NH), 3111 (NH), 1720 (CO), 1636 (CO); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ/ppm): 1,10 (3H, t, $J = 7,2$ Hz, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 2,27 (3H, s, CH_3), 3,99 (2H, q, $J = 7,2$ Hz, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 5,27 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, C-H), 7,51 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,91 (1H, s, NH), 8,23 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, Ar-H), 9,38 (1H, s, NH); ^{13}C NMR (200 MHz, DMSO- d_6 , δ/ppm): 14,53 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 18,35 (CH_3), 54,13 (C-H), 59,87 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 98,62 (C-COOCH₂CH₃, DHPM), 124,33 (Ar), 128,13 (Ar), 147,18 (Ar), 149,88 (Ar), 152,21 (C-CH₃, DHPM), 152,46 (CO, DHPM), 165,22 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_3$).

2.2.3. Redukcija DHPM-a B1 – Sinteza etil-4-(4-aminofenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilata

B1 (2 mmol, 0,670 g) se rastvori u 40 ml metanola u koji se potom dodaje cink (20 mmol, 1,438 g) u porcijama, a zatim i vodeni rastvor amonijum-hlorida (4 mmol, 0,235 g u 4 ml vode). Reakcija se prati hromatografijom na tankom sloju (TLC). Reakciona smeša se meša uz refluks 5 časova [135]. Po završetku reakcije vrši se filtracija pod sniženim pritiskom. Filtrat se ostavi 24 sata na temperaturi 4 °C. Nastali proizvod, etil-4-(4-aminofenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**B2**) se zatim filtrira na Bihnerovom levku, ispere etanolom, osuši i prekrystalise iz etanola (slika 2.1). Dobijeni DHPM derivat detaljno je okarakterisan: bela sjajna praškasta supstanca; prinos 62%; t.t. 212–213 °C; ATR-FTIR (ν/cm^{-1}): 3531, 3383 (NH₂), 3211 (NH), 3104 (NH), 1681 (CO), 1635 (CO); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ/ppm): 1,11 (3H, t, $J = 7,2$ Hz, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 2,22 (3H, s, CH_3), 3,98 (2H, q, $J = 7,2$ Hz, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 4,97 (1H, s, C-H), 4,98 (2H, s, NH₂), 6,47 (2H, d, $J = 8$ Hz, Ar-H), 6,88 (2H, d, $J = 8$ Hz, Ar-H), 7,52 (1H, s, NH), 9,03 (1H, s, NH); ^{13}C NMR (200 MHz, DMSO- d_6 , δ/ppm): 14,59 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 18,17 (CH_3), 54,02 (C-H), 59,49 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 100,48 (C-COOCH₂CH₃, DHPM), 114,01 (Ar), 127,72 (Ar), 132,77 (Ar), 147,78 (Ar-NH₂), 148,30 (C-CH₃, DHPM), 152,70 (CO, DHPM), 165,99 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_3$); Izračunato za C₁₄H₁₇N₃O₃ (275,30) (%): C, 61,08; H, 6,22; N, 15,26; Izmereno (%): C, 61,18; H, 6,35; N, 15,37; ESI-MS m/z izračunato za C₁₄H₁₇N₃O₃ 275,13; Izmereno (pozitivni mod): 276,08 [M+H]⁺, 550,95 [2M+H]⁺, 572,92 [2M+Na]⁺.

2.2.4. Sinteza DHPM-azo piridonskih boja

B2 (1 mmol, 0,275 g) se rastvori u vodi (60 ml) i koncentrovanoj hlorovodoničnoj kiselini (3 ml) te ohladi do temperature od 0–5 °C. Natrijum-nitrit (1,1 mmol, 0,0759 g) se rastvori u hladnoj vodi (4 ml) i u kapima dodaje u rastvor **B2** u toku 15 minuta. Smeša se meša jedan sat pri čemu se dobija diazonijum-hlorid (**B3**). Odgovarajući piridon (**P1–7**, 1 mmol) se rastvori u vodenom rastvoru kalijum-hidroksida (1 mmol, 0,056 g u 5 ml vode) i ohladi se do temperature od 0–5 °C. **B3** se dodaje u kapima u rastvor piridona u toku 30 minuta uz intenzivno mešanje (slika 2.1). Smeša se potom meša 3 sata, a temperatura se održava u opsegu od 0–5 °C. Kada je reakcija završena dobijeno azo jedinjenje (**1–7**) se filtrira na Bihnerovom levku, ispira vodom, suši i potom prekrystalise iz etanola.

Etil-4-(4-((5-cijano-2-hidroksi-4-metil-6-okso-1,6-dihidropiridin-3-il) diazenil)fenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (1). Tamno narandžasta praškasta supstanca; prinos 73%; t.t. 249–250 °C; ATR-FTIR (ν/cm^{-1}): 3296 (NH), 3211 (NH), 2219 (CN), 1674 (CO), 1622 (CO), 1506 (NH); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ/ppm): 1,10 (3H, t, $J = 7$ Hz, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 2,26 (3H, s, CH_3 DHPM), 2,51 (3H, s, CH_3 Py), 3,99 (2H, q, $J = 7$ Hz, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 5,17 (1H, d, $J = 3,2$ Hz, C-H), 7,33 (2H, d, $J = 8,2$ Hz, Ar-H), 7,64 (2H, d, $J = 8,2$ Hz, Ar-H), 7,79 (1H, s, NH), 9,25 (1H, s, NH), 12,02 (1H, s, NH Py), 14,58 (1H, s, NH hidrazon); ^{13}C NMR (200 MHz, DMSO- d_6 ,

δ /ppm): 14,58 (COOCH₂CH₃), 16,92 (CH₃, Py), 18,27 (CH₃, DHPM), 54,04 (C-H, DHPM), 59,73 (COOCH₂CH₃), 99,38 (C-COOCH₂CH₃, DHPM), 101,09 (CN), 115,59 (C-CN), 117,95 (Ar), 124,04 (C=N, Py), 128,17 (Ar), 140,73 (Ar), 144,04 (Ar), 149,13 (C-CH₃, DHPM), 152,45 (CO, DHPM), 160,95 (Py), 161,32 (CO, Py), 161,97 (CO, Py), 165,72 (COOCH₂CH₃); Izračunato za C₂₁H₂₀N₆O₅ (436,42) (%): C, 57,79; H, 4,62; N, 19,26; Izmereno (%): C, 57,99; H, 4,92; N, 19,36; ESI-MS m/z izračunato za C₂₁H₂₀N₆O₅ 436,15; Izmereno (pozitivni mod): 435,22 [M-H]⁻; UV-Vis (EtOH) (λ_{\max} /nm (log ϵ /mol⁻¹dm³cm⁻¹)): 439,0 (4,55).

Etil-4-(4-((5-cijano-2-hidroksi-1-(2-hidroksietil)-4-metil-6-okso-1,6-dihidropiridin-3-il) diazenil)fenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (2). Narandžasta praškasta supstanca; prinos 71%; t.t. 195–196 °C; ATR-FTIR (ν /cm⁻¹): 3243 (NH), 2218 (CN), 1678 (CO), 1626 (CO), 1500 (NH); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ /ppm): 1,11 (3H, t, *J* = 6,8 Hz, COOCH₂CH₃), 2,27 (3H, s, CH₃ DHPM), 2,54 (3H, s, CH₃ Py), 3,56 (2H, t, *J* = 6 Hz, CH₂CH₂OH), 3,94–4,03 (4H, m, CH₂CH₂OH, COOCH₂CH₃), 5,18 (1H, d, *J* = 2,8 Hz, C-H), 7,35 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ar-H), 7,70 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ar-H), 7,77 (1H, d, *J* = 2 Hz, NH), 9,24 (1H, s, NH), 14,60 (1H, s, NH hidrazon); ¹³C NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ /ppm): 14,58 (COOCH₂CH₃), 16,77 (CH₃, Py), 18,27 (CH₃, DHPM), 41,92 (CH₂CH₂OH), 54,05 (C-H), 57,91 (CH₂CH₂OH), 59,72 (COOCH₂CH₃), 99,42 (C-COOCH₂CH₃), 100,88 (CN), 115,60 (C-CN), 118,16 (Ar), 123,51 (C=N, Py), 128,16 (Ar), 140,77 (Ar), 144,18 (Ar), 149,13 (C-CH₃, DHPM), 152,46 (CO, DHPM), 159,60 (Py), 160,66 (CO, Py), 161,18 (CO, Py), 165,73 (COOCH₂CH₃); Izračunato za C₂₃H₂₄N₆O₆ (480,47) (%): C, 57,49; H, 5,03; N, 17,4; Izmereno (%): C, 57,79; H, 5,15; N, 17,6; ESI-MS m/z izračunato za C₂₃H₂₄N₆O₆ 480,18; Izmereno (pozitivni mod): 503,12 [M+Na]⁺, 982,81 [2M+Na]⁺; Izmereno (negativni mod): 479,26 [M-H]⁻; UV-Vis (EtOH) (λ_{\max} /nm (log ϵ /mol⁻¹dm³cm⁻¹)): 440,0 (4,50).

Etil-4-(4-((5-cijano-2-hidroksi-4-metil-6-okso-1-propil-1,6-dihidropiridin-3-il) diazenil)fenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (3). Narandžasta praškasta supstanca; prinos 65%; t.t. 160–161 °C; ATR-FTIR (ν /cm⁻¹): 3593 (NH), 3507 (NH), 3220 (NH), 2233 (CN), 1709 (CO), 1677 (CO), 1621 (CO), 1514 (NH); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ /ppm): 0,89 (3H, t, *J* = 7,6 Hz, CH₂CH₂CH₃), 1,11 (3H, t, *J* = 6,8 Hz, COOCH₂CH₃), 1,58 (2H, m, CH₂CH₂CH₃), 2,27 (3H, s, CH₃ DHPM), 2,54 (3H, s, CH₃ Py), 3,82 (2H, t, *J* = 7,2 Hz, CH₂CH₂CH₃), 4,00 (2H, q, *J* = 7,2 Hz, COOCH₂CH₃), 5,18 (1H, d, *J* = 2,8 Hz, C-H), 7,34 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, Ar-H), 7,70 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, Ar-H), 7,77 (1H, s, NH), 9,23 (1H, s, NH), 14,62 (1H, s, NH hidrazon); ¹³C NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ /ppm): 11,71 (CH₂CH₂CH₃), 14,58 (COOCH₂CH₃), 16,79 (CH₃, Py), 18,27 (CH₃, DHPM), 20,96 (CH₂CH₂CH₃), 41,3 (CH₂CH₂CH₃), 54,06 (C-H), 59,72 (COOCH₂CH₃), 99,41 (C-COOCH₂CH₃), 100,78 (CN), 115,60 (C-CN), 118,17 (Ar), 123,48 (C=N, Py), 128,16 (Ar), 140,78 (Ar), 144,20 (Ar), 149,14 (C-CH₃, DHPM), 152,45 (CO, DHPM), 159,68 (Py), 160,57 (CO, Py), 161,04 (CO, Py), 165,73 (COOCH₂CH₃); Izračunato za C₂₄H₂₆N₆O₅ (478,50) (%): C, 60,24; H, 5,48; N, 17,56; Izmereno (%): C, 60,49; H, 5,63; N, 17,78; ESI-MS m/z izračunato za C₂₄H₂₆N₆O₅ 478,20; Izmereno (negativni mod): 477,18 [M-H]⁻; UV-Vis (EtOH) (λ_{\max} /nm (log ϵ /mol⁻¹dm³cm⁻¹)): 442,0 (4,52).

Etil-4-(4-((5-cijano-2-hidroksi-4-metil-6-okso-1-fenil-1,6-dihidropiridin-3-il) diazenil)fenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (4). Tamno narandžasta praškasta supstanca; prinos 70%; t.t. 243–244 °C; ATR-FTIR (ν /cm⁻¹): 3248 (NH), 2219 (CN), 1678 (CO), 1629 (CO), 1503 (NH), ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ /ppm): 1,11 (3H, t, *J* = 7,2 Hz, COOCH₂CH₃), 2,26 (3H, s, CH₃ DHPM), 2,62 (3H, s, CH₃ Py), 4,00 (2H, q, *J* = 6,8 Hz, COOCH₂CH₃), 5,17 (1H, d, *J* = 2,4 Hz, C-H), 7,28–7,34 (4H, m, Ar), 7,46–7,69 (5H, m, Ph), 7,76 (1H, s, NH), 9,23 (1H, s, NH), 14,49 (1H, s, NH hidrazon), ¹³C NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ /ppm): 14,58 (COOCH₂CH₃), 16,95 (CH₃, Py), 18,27 (CH₃, DHPM), 54,04 (C-H), 59,72 (COOCH₂CH₃), 99,40 (C-COOCH₂CH₃), 101,20 (CN), 115,58 (C-CN), 118,12 (Ar), 123,88 (C=N, Py), 128,16 (Ar), 129,10 (Ar), 129,32 (Ar), 129,43 (Ar, Ph), 134,59 (Ar, Ph), 140,79 (Ar), 144,19 (Ar), 149,14 (C-CH₃,

DHPM), 152,45 (CO, DHPM), 160,18 (Py), 160,65 (CO, Py), 161,11 (CO, Py), 165,73 (COOCH₂CH₃); Izračunato za C₂₇H₂₄N₆O₅ (512,52) (%): C, 63,27; H, 4,72; N, 16,40; Izmereno: C, 63,49; H, 4,95; N, 16,51; ESI-MS m/z izračunato za C₂₇H₂₄N₆O₅ 512,18; Izmereno (negativni mod): 511,18 [M-H]⁻; Izračunato (pozitivni mod): 513,17 [M+H]⁺; UV-Vis (EtOH) (λ_{max}/nm (log ε/mol⁻¹dm³cm⁻¹)): 443,0 (4,58).

Etil-4-(4-((5-cijano-2-hidroksi-6-okso-4-fenil-1,6-dihidropiridin-3-il) diazenil)fenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (5). Tamno narandžasta supstanca; prinos 61%; t.t. 275-276 °C; ATR-FTIR (ν/cm⁻¹): 3405 (NH), 3210 (NH), 2229 (CN), 1693 (CO), 1652 (CO), 1505 (NH), ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ppm): 1,07 (3H, t, *J* = 7,2 Hz, COOCH₂CH₃), 2,24 (3H, s, CH₃ DHPM), 3,97 (2H, q, *J* = 8 Hz, COOCH₂CH₃), 5,11 (1H, d, *J* = 3,2 Hz, C-H), 7,20-7,26 (4H, m, Ar-H), 7,51-7,59 (5H, m, Ph), 7,69 (1H, s, NH), 9,18 (1H, s, NH), 12,19 (1H, s, NH Py), 14,60 (1H, s, NH hidrazon), ¹³C NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ppm): 14,54 (COOCH₂CH₃), 18,29 (CH₃, DHPM), 54,04 (C-H), 59,68 (COOCH₂CH₃), 99,23 (C-COOCH₂CH₃), 100,64 (CN), 115,73 (C-CN), 117,65 (Ar), 124,05 (C=N, Py), 128,11 (Ar), 128,32 (Ar), 129,91 (Ar, Ph), 130,47 (Ar, Ph), 133,35 (Ar, Ph), 140,73 (Ar), 144,02 (Ar), 149,15 (C-CH₃, DHPM), 152,35 (CO, DHPM), 161,35 (Py), 161,46 (CO, Py), 162,16 (CO, Py), 165,69 (COOCH₂CH₃); Izračunato za C₂₆H₂₂N₆O₅ (498,49) (%): C, 62,64; H, 4,45; N, 16,86; Izmereno: C, 62,80; H, 4,66; N, 16,91; ESI-MS m/z izračunato za C₂₆H₂₂N₆O₅ 498,17; Izmereno (negativni mod): 497,19 [M-H]⁻; UV-Vis (EtOH) (λ_{max}/nm (log ε/mol⁻¹dm³cm⁻¹)): 442,5 (4,58).

Etil-4-(4-((5-karbamoil-2-hidroksi-4-metil-6-okso-1,6-dihidropiridin-3-il) diazenil)fenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (6). Narandžasta praškasta supstanca; prinos 61%; t.t. 201-203 °C, ATR-FTIR (ν/cm⁻¹): 3248 (NH), 1684 (CO), 1648 (CO), 1513 (NH); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ppm): 1,11 (3H, t, *J* = 7 Hz, COOCH₂CH₃), 2,22 (3H, s, CH₃ DHPM), 2,26 (3H, s, CH₃ DHPM), 3,99 (2H, q, *J* = 7 Hz, COOCH₂CH₃), 5,15 (1H, d, *J* = 2,4 Hz, C-H), 7,28 (2H, d, *J* = 8,2 Hz, Ar-H), 7,50-7,52 (3H, m, Ar-H i CONH₂), 7,69 (1H, s, CONH₂), 7,79 (1H, s, NH), 9,22 (1H, s, NH), 11,66 (1H, s, NH Py), 14,23 (1 H, s, NH hidrazon), ¹³C NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ppm): 14,59 (COOCH₂CH₃), 14,75 (CH₃, Py), 18,26 (CH₃, DHPM), 54,01 (C-H), 59,70 (COOCH₂CH₃), 99,57 (C-COOCH₂CH₃), 116,49 (C-CN), 116,69 (Ar), 126,23 (C=N, Py), 128,06 (Ar), 141,38 (Ar), 145,78 (Ar), 148,94 (C-CH₃, DHPM), 152,51 (CO, DHPM), 162,19 (Py), 162,22 (CO, Py), 162,42 (CO, Py), 165,76 (COOCH₂CH₃), 166,81 (CONH₂); Izračunato za C₂₁H₂₂N₆O₆ (454,44) (%): C, 55,50; H, 4,88; N, 18,49; Izmereno: C, 55,69; H, 4,92; N, 18,63; ESI-MS m/z izračunato za C₂₁H₂₂N₆O₆ 454,16; Izmereno (negativni mod): 453,19 [M-H]⁻; Izmereno (pozitivni mod): 454,99 [M+H]⁺, 477,11 [M+Na]⁺; UV-Vis (EtOH) (λ_{max}/nm (log ε/mol⁻¹dm³cm⁻¹)): 428,5 (4,60).

Etil-4-(4-((2-hidroksi-4-metil-6-okso-5-piridinijum-1,6-dihidropirimidin-3-il) diazenil)fenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (7). Crvena praškasta supstanca; prinos 61%; t.t. 230-232 °C; ATR-FTIR (ν/cm⁻¹): 3382 (NH), 3233 (NH), 1690 (CO), 1616 (CO); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ppm): 1,11 (3H, t, *J* = 7 Hz, COOCH₂CH₃), 2,14 (3H, s, CH₃ Py), 2,25 (3H, s, CH₃ DHPM), 3,99 (2H, q, *J* = 7 Hz, COOCH₂CH₃), 5,14 (1H, s, C-H), 7,24 (2H, d, *J* = 8 Hz, Ar-H), 7,46 (2H, d, *J* = 8 Hz, Ar-H), 7,74 (1H, s, NH), 8,23 (2H, t, *J* = 6,8 Hz, Piridinijum), 8,69 (1H, t, *J* = 7,6 Hz, Piridinijum), 9,06 (2H, d, *J* = 5,6 Hz, Piridinijum), 9,20 (1H, s, NH), 10,47 (1H, s, Py); ¹³C NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ppm): 14,59 (COOCH₂CH₃), 18,26 (CH₃, DHPM), 54,20 (C-H), 59,67 (COOCH₂CH₃), 99,78 (C-COOCH₂CH₃), 127,35 (Ar), 128,31 (C=N, Py), 148,71 (Ar, Piridinijum), 152,59 (CO, DHPM), 165,85 (CO, COOCH₂CH₃); ¹H NMR (400 MHz, CF₃COOD, δ/ppm): 1,34 (3H, t, *J* = 7 Hz, COOCH₂CH₃), 2,46 (3H, s, CH₃ Py), 4,32 (2H, q, *J* = 7 Hz, COOCH₂CH₃), 5,76 (1H, s, C-H), 7,65 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ar-H), 7,75 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, Ar-H), 8,38 (2H, d, *J* = 7 Hz, Piridinijum), 8,87-8,91 (3H, m, Piridinijum), 10,01 (1H, s, NH), 10,82 (1H, s, NH Py), 15,02 (1H, s, NH hidrazon); ¹³C NMR (200 MHz, CF₃COOD, δ/ppm): 14,46 (COOCH₂CH₃), 14,68 (CH₃, Py), 57,72

(C-H), 65,25 (COOCH₂CH₃), 104,58 (C-COOCH₂CH₃), 123,70 (C-CN), 128,32 (C=N, Py), 131,21 (Ar, Piridinijum), 131,53 (Ar, DHPM), 143,03 (Ar, DHPM), 145,69 (Ar, DHPM), 149,40 (Ar, Piridinijum), 150,94 (C-CH₃, DHPM), 155,64 (CO, DHPM), 163,04 (Py), 170,64 (CO, COOCH₂CH₃); Izračunato za C₂₅H₂₅N₆O₅ (489,50) (%): C, 61,34; H, 5,15; N, 17,17; Izmereno: C, 61,51; H, 5,58; N, 17,35; ESI-MS m/z izračunato za C₂₅H₂₅N₆O₅ 498,19; Izmereno (pozitivni mod) 489,29 [M⁺]; UV-Vis (EtOH) (λ_{\max} /nm (log ϵ /mol⁻¹dm³cm⁻¹)): 428,0 (4,60).

2.3. Termička analiza

Termička stabilnost jedinjenja **1-7** je ispitana TGA/DTG i DTA tehnikom, koristeći Setaram Setsys Evolution 1750 instrument. Uzorci su zagrevani od 30 do 800 °C brzinama $\beta = 2, 5, 5, 10$ and $20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ u atmosferi čistog argona (Ar) sa protokom $\varphi = 20 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Za termičku karakterizaciju su korišćene krive dobijene brzinom zagrevanja $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. Masa uzoraka korišćena za analizu je iznosila oko 5 mg [136].

2.4. Kvantno-hemijska proračuni

Kvantno-hemijski (DFT) proračuni izvedeni su pomoću programskog paketa Gaussian 09 [137] na B3LYP i M06-2X nivou sa 6-311++G(d,p) osnovnim setom orbitala. Geometrije proučavanih molekula **1-7** optimizovane su primenom B3LYP/6-311++G(d,p) metode. Sve strukture jedinjenja su optimizovane bez ikakvih ograničenja na geometrijama, a korišćeni su standardni kriterijumi konvergencije. Stabilnost optimizovanih geometrija je potvrđena računanjem frekvencija, i dobijene su realne vrednosti za sve frekvencije. Parametri optimizovane geometrije su upotrebljeni za proračune harmonijskih vibracionih frekvencija, izotropnih hemijskih pomeranja i elektronskih svojstava. Harmonijske vibracione frekvencije su izračunate B3LYP/6-311++G(d,p) metodom i skalirane faktorom 0,968 [138]. Proračuni hemijskih pomeranja u NMR spektrima, u DMSO-*d*₆, su izračunati pomoću GIAO (engl. *Gauge-Independent Atomic Orbital*) metode, na istom teorijskom nivou. ¹H i ¹³C izotropna hemijska pomeranja su navedena u odnosu na TMS. Uticaj rastvarača je simuliran pomoću solvacionog CPMC (engl. *Conductor Polarizable Continuum Model*) modela. Odstupanje između eksperimentalnih i izračunatih ¹H NMR hemijskih pomeranja vodonika u -NH grupama u DMSO-*d*₆, korigovano je dodavanjem tri molekula DMSO u položaje koji omogućavaju stvaranje vodoničnih veza sa ovim grupama. Energije graničnih molekulskih orbitala (FMO), HOMO-LUMO energetska razlika i mape elektrostatičkih molekulskih potencijala (MEP) izračunate su na B3LYP/6-311++G(d,p) nivou kako bi rasvetlile reaktivnost ispitivanih molekula. Teorijski UV-Vis apsorpcioni spektri su izračunati na CPCM/M06-2X/6-311++G(d,p) nivou i skalirani faktorom 1.15. Za vizuelnu prezentaciju vibracionih traka, molekulskih orbitala i UV-Vis spektara korišćen je Gauss View 5.0 grafički interfejs [139].

Kvantno-hemijski molekulski deskriptori: energija najviše popunjene molekulske orbitale (E_{HOMO}), energija najniže nepopunjene molekulske orbitale (E_{LUMO}), HOMO-LUMO razlika energija (E_{GAP}), energija jonizacije (I), afinitet elektrona (A), otpornost na transfer elektrona (η), polarizabilnost (σ , σ_o , S), elektronegativnost (χ), hemijski potencijal (CP), indeks elektrofilnosti (ω), indeks nukleofilnosti (N) i naelektrisanje (ΔN_{max}) izračunati su u vodi, kao rastvaraču, u cilju ispitivanja biološke (re)aktivnosti molekula. Vrednosti E_{HOMO} i E_{LUMO} su dobijene direktno iz DFT proračuna, dok su vrednosti drugih deskriptora izračunate pomoću jednačina iz literature datih u prilogu (1a-12a) [140].

2.5. Fotofizička svojstva

UV-Vis apsorpcioni spektri jedinjenja **1–7** su snimljeni na Shimadzu 1700 spektrofotometru, pri koncentraciji $4 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³, u 27 rastvarača različitih svojstava. Uticaj rastvarača na apsorpcione maksimume ispitan je LSER (engl. *Linear Solvation Energy Relationship*) analizom, koristeći *Catalán*-ov model [141-143]. Emisioni spektri su snimljeni na Shimadzu RF-1501 PC spektrofluorimetru pri koncentraciji jedinjenja $4 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ i izračunati su Stoksovi (*Stokes*) pomeraji u odnosu na apsorpcione spektre. Takođe, analiziran je uticaj promene pH rastvora na UV-Vis i fluorescentne spektre.

2.6. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti

Sposobnost novosintetisanih jedinjenja **1–7** da redukuju ABTS^{•+} radikal-katjon ispitana je ABTS metodom [144]. Rastvor ABTS^{•+} radikal-katjona je pripremljen mešanjem 7 mM ABTS rastvora (4,912 ml u fosfatnom puferu (PBS)) i 140 mM rastvora kalijum-persulfata (0,088 ml u vodi) i potom inkubiran u mraku 16 sati. Dobijeni rastvor se pre upotrebe razblaži metanolom do apsorbanca $0,700 \pm 0,02$. Nakon toga 20 μ l rastvora boje u metanolu (2 mM) se pomeša sa 2 ml ABTS^{•+} rastvora i neprestano meša u mraku 10 minuta. Intenzitet obezbojavanja rastvora prati se spektrofotometrijski na talasnoj dužini 734 nm. Svaki eksperiment urađen je u triplicatu. Procenat inhibicije ABTS^{•+} $I[\%]$ izračunat je prema jednačini:

$$I (\%) = (A_c - A_s) / A_c \times 100$$

gde je A_c apsorbanca kontrolnog uzorka (20 μ l metanola u 2 mL of ABTS^{•+} rastvora), a A_s apsorbanca ispitivanog uzorka. Askorbinska kiselina je korišćena kao standardni antioksidant.

Antioksidativna aktivnost jedinjenja **5, 6, i 7** dalje je ispitana određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije, tj. IC₅₀ vrednosti. Za ovaj eksperiment pripremljeni su rastvori različitih razblaženja (od 2 mM do 0,5 mM) ispitivanih boja i askorbinske kiseline, i određene su inhibitorne aktivnosti iz kojih su potom izračunate IC₅₀ vrednosti. Svi eksperimenti su urađeni u triplicatu, a dobijene IC₅₀ vrednosti predstavljene su kao srednja vrednost \pm standardna devijacija za svako merenje.

2.7. In vitro ispitivanje antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost jedinjenja **1–7** je ispitana standardnom mikrobiološkom *in vitro* metodom – metodom difuzije na agarnoj podlozi. Mikrobiološki test je sproveden na patogenim sojevima *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-pozitivna bakterija), *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram-negativna bakterija) i *Candida albicans* ATCC 24433 (oportunistička gljivica). Za pripremu agarne podloge korišćen je TSB (tripton soja bujon) i TSA (tripton soja agar). Hranljive podloge su razliveno na Petri (*Petri*) ploče i inkubirane u termostatu 24 sata na 30 °C. Nakon inkubacije u Petri ploče su postavljeni kalupi prečnika 8 mm i preko njih je prelivena mekana, tzv. TOP agarna podloga, inokulisana odgovarajućim patogenom (2×10^5 CFU/ml, 200 μ l patogena u 6 ml TOP agra). Nakon što TOP agar očvrstne, kalupi se uklone čime se formiraju bunarčići prečnika 8 mm [145]. U bunarčiće se redom unosi 100 μ l svakog uzorka koncentracije 125 μ g/ml jedinjenja **1–7** rastvorenih u DMSO. Nakon inkubacije 24 h na 37 °C izmerena je zona inhibicije u odnosu na kontrolni bunarčić u koji je unesen samo DMSO. Prečnik zone inhibicije, tj. zone smanjenog rasta određen je u milimetrima i osnovu obrazovanih prečnika procenjena je antimikrobna aktivnost ispitivanih jedinjenja.

2.8. *In vitro* ispitivanje citotoksične aktivnosti

In vitro citotoksična aktivnost jedinjenja **1–7** i **B2** ispitana je prema sledećim humanim malignim ćelijskim linijama: PC-3 (adenokarcinom prostate), A549 (karcinom pluća), K562 (hronična mijeloidna leukemija). Takođe, određena je i njihova citotoksičnost prema humanim normalnim fibroblastima pluća MRC-5, kako bi se odredila selektivnost u citotoksičnom dejstvu.

Pripremljeni su polazni rastvori jedinjenja u DMSO koncentracije 10 mg/ml, a nakon toga su razblaženi u hranljivom medijumu do odgovarajućih radnih koncentracija. PC-3, A549 i MRC-5 adherentne ćelijske linije su održavane u kulturi u vidu monosloja u kompletnom hranljivom medijumu, dok je K562 ćelijska linija održavana u kulturi u suspenziji. Kompletni hranljivi medijum predstavlja RPMI 1640, pH 7.2, u koji se dodaje 10% serum fetalnog govečeta (engl. FBS–*fetal bovine serum*), termički inaktivisan tokom 30 minuta na 56°C, L-glutamin (2 mM), streptomycin (100 µg/ml), penicilin (100 IU/ml) i HEPES (25 mM). Ćelijske kulture su gajene u inkubatoru na temperaturi od 37°C, u atmosferi vazduha obogaćenim 5% CO₂ i zasićenim vodenom parom. PC-3 (5000 ćelija/100 µl po sudiću), A549 (5000 ćelija/100 µl po sudiću), MRC-5 (5000 ćelija/100 µl po sudiću), su zasejane u sudiće mikrotitar ploča sa 96 sudića. Nakon inkubacije od 20 sati u odgovarajuće sudiće ploča dodato je po 50 µl rastvora ispitivanih jedinjenja (pet različitih finalnih koncentracija u opsegu od 12.5 µM do 200 µM). K562 ćelije (5000 ćelija/100 µl po sudiću) koje rastu u suspenziji su zasejane 2 sata pre dodavanja rastvora ispitivanih jedinjenja. U kontrolnim uzorcima ćelije su rasle samo u prisustvu hranljivog medijuma (dodato po 50 µl medijuma). Kao slepa proba korišćen je hranljivi medijum. Nakon dodavanja rastvora ispitivanih jedinjenja ćelije su inkubirane naredna 72 sata. Svaki eksperiment je izveden u triplikatu. Urađena su minimum tri do četiri nezavisna eksperimenta.

Preživljavanje ćelija određivano je MTT kolorimetrijskim testom, kojim se određuje ćelijsko preživljavanje na osnovu količine redukovanog kolorimetrijskog reagensa u metabolički aktivnim ćelijama. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolijumbromid) je žuta tetrazolijumska so koja se u živim, biohemijski aktivnim ćelijama redukuje do formazana, nerastvornog kristala ljubičaste boje. Dodavanjem deterdženta SDS-a dolazi do rastvaranja formazana i stvara se obojeni rastvor koji ima maksimum apsorbanca na 570 nm. Količina rastvorenog formazana direktno je proporcionalna broju živih ćelija. Postupak za određivanje preživljavanja ciljnih ćelija MTT kolorimetrijskom testom razvio je Mosman (*Mosmann*), a zatim su Ono (*Ohno*) i Abe (*Abe*) modifikovali proceduru [146,147]. Nakon inkubacije u svaki sudić dodato je po 10 µl MTT reagensa. Uzorci su inkubirani 4 sta na 37°C, a potom je u uzorke dodato po 100 µl 10% SDS-a. Ploče su inkubirane tokom noći, a zatim je narednog dana očitavana apsorbanca na talasnoj dužini od 570 nm na čitaču Multiskan EX Thermo LabSystems. Ćelijsko preživljavanje $S[\%]$ izračunato je prema jednačini:

$$S (\%) = (A_u - A_s) \times 100 / (A_k - A_s)$$

gde je A_u apsorbanca uzorka ćelija koje su rasle u prisustvu jedinjenja, A_k apsorbanca kontrolnog uzorka ćelija koje su rasle samo u prisustvu hranljivog medijuma, a A_s apsorbanca uzorka sa slepom probom. IC₅₀ vrednost (µM) predstavlja koncentraciju ispitivanog jedinjenja koja inhibira ćelijsko preživljavanje za 50%.

2.9. Analiza faza ćelijskog ciklusa

Dejstvo azo jedinjenja **5** na promenu u distribuciji ciljanih K562 ćelija u pojedinim fazama ćelijskog ciklusa ispitano je analizom na protočnom citometru [147]. K562 ćelije hronične mijeloidne leukemije su zasejane u ploče sa 6 sudića, a dva sata nakon toga ćelije su tretirane sa 2IC₅₀ koncentracijom jedinjenja **5**. Kontrolne K562 ćelije su gajene u hranljivom medijumu kako je prethodno opisano. Nakon 24 sata inkubacije u hranljivom medijumu kontrolne ćelije i ćelije izložene dejstvu jedinjenja **5** su prikupljene, isprane PBS-om i fiksirane sa 70% ledenog etanola prema standardnom protokolu [148]. Ovako pripremljene ćelije se čuvaju nedelju dana na temperaturi -20°C. Nakon fiksacije, etanol se ukloni, a ćelije se još jednom ispiraju u PBS-u. Uzorci se zatim inkubiraju 30 minuta na 37°C u prisustvu 100 µl rastvora RNaze A (koncentracije 1 mg/ml). Na kraju, nakon tretmana RNazom A, u uzorak se dodaje 100 µl rastvora propidijum-jodida koncentracije 400 µg/ml, a obojena suspenzija ćelija, prethodno promućkana na vorteksu, se potom analizira. Analiza ćelijskog ciklusa i DNK sadržaja urađena je na protočnom citometru (Becton Dickinson FAC-Scan flow cytometer, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), a DNK histogram je analiziran korišćenjem CellQuestR softvera, za minimum 10000 ćelija po uzorku.

2.10. *In silico* analiza fizičko-hemijskih i ADME parametara

Fizičko-hemijski parametri i farmakokinetička svojstva (ADME) za ispitivane molekule **1-7** i **7a**, određeni su *in silico* pomoću SwissADME [149] i Vega 22 verzija 2.4 programa [150]. Strukturne formule jedinjenja nacrtane su u programu ChemDraw Ultra 12.0 i zatim su konvertovane u SMILES formu koja je potom insertovana u SwissADME kako bi se izračunali odgovarajući parametri. Fizičko-hemijski deskriptori određeni su u Vega 22 programu na osnovu prethodno optimizovanih geometrija metodom B3LYP/6-311++G(d,p).

3. Rezultati i diskusija

Rezultati ove doktorske disertacije su podeljeni u dva segmenta. Prvi segment se odnosi na sintezu derivata 3-cijano-2-piridona metodom kontinualnog protoka, u kapilarnom mikroreaktoru (MR), na sobnoj temperaturi, u cilju razvijanja novog efikasnijeg postupka sinteze. Drugi segment disertacije je usmeren na sintezu Biđinelijevih proizvoda i heterocikličnih azo jedinjenja koja se dobijaju u reakciji diazo-kuplovanja, gde je diazo komponenta derivat 3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-ona, a različiti 2-piridoni se koriste kao komponente za kuplovanje. Sintetisana serija predstavlja nove heterociklične azo boja o kojima ranije nije bilo literaturnih podataka. Struktura novosintetisanih azo jedinjenja je detaljno analizirana eksperimentalnim i teorijskim podacima, a zatim su ispitana i njihova biološka svojstva. Biološka aktivnost je određena eksperimentalnim i *in silico* testovima.

3.1. Sinteza 6- i 1,6-supstituisanih-3-cijano-4-metil-2-piridona metodom kontinualnog protoka u kapilarnom mikroreaktoru

U prvom setu eksperimenata, u kontinualnom protočnom mikroreaktorskom sistemu, sintetisano je šest derivata 2-piridona: **P1-3** (3-cijano-6-hidroksi-4-metil-1-supstituisani-2-piridoni) i **P8-10** (3-cijano-4,6-dimetil-1-supstituisani-2-piridoni). Čistoća i hemijska struktura sintetisanih jedinjenja potvrđena je spektralnim podacima datim u odeljcima 2.2.3.1 i 2.2.3.2. Izabrani 2-piridoni su sintetisani polazeći iz odgovarajućih rastvora 1,3-dikarbonilnog jedinjenja i *N*-supstituisanog cijanoacetamida, koristeći ekvimnolarnu koncentraciju rastvora (0,6 mol/dm³). Rastvor NaOH (0,7 mol/dm³) je korišćen kao katalizator i sinteza je izvedena na sobnoj temperaturi kako je opisano u odeljku 2.2.3.3. i ilustrovana slikama 2.2 i 2.3. U cilju optimizacije reakcionih uslova, protoci ulaznih komponenata su varirani u opsegu od 0,02 do 0,1 ml/min. Uporedo je urađena i sinteza primenom konvencionalne procedure opisane u poglavljima 2.2.3.1. i 2.2.3.2. i dobijeni prinosi su upoređeni i prikazani u Tabeli 3.1.

Na osnovu podataka iz tabele 3.1 uočava se da je sinteza 2-piridona ispitana polazeći iz jednakih protoka ulaznih rastvora ($F(\text{DKJ})=F(\text{CAA})=F(\text{NaOH})$) i da je početni ukupni protok reakcione smeše iznosio 0,06 ml/min (vreme zadržavanja u MR je 81,7 min), u slučaju svih ispitanih derivata, osim kod **P8** gde početni ukupni protok reakcione smeše iznosi 0,3 ml/min (vreme zadržavanja u MR je 16,3 min). Naime, protoci niži od 0,3 ml/min izazivali su začepljenje u MR, koje je posledica brze reakcije između primenjenih reaktanata i nastajanja proizvoda **P8**, koji se usled dugog vremena zadržavanja nagomilava u kapilarnom MR i dovodi do začepjenja. Nakon toga, optimizacija je izvedena skraćivanjem vremena zadržavanja u MR odnosno, povećanjem protoka reakcione smeše. Generalno, povećanje protoka dovodi do smanjenja prinosa reakcije, ali u slučaju derivata **P8**, povećanje protoka sa 0,3 na 0,6 ml/min utiče i na povećanje prinosa reakcije. Rezultati dobijeni za derivate **P9** i **P10**, pokazuju da *N*-supstituisani amidi sporije reaguju u odnosu na nesupstituisani cijanoacetamid i da daju niže prinose, uz duže vreme zadržavanja u MR u odnosu na **P8**. U radu [21] je pokazano da se primenom mikrotalasne tehnike *N*-supstituisani 3-cijano-4,6-dimetil-2-piridoni dobijaju za oko 7 minuta u dobrom prinosu, pa se može izvesti zaključak da je taj metod sinteze prikladnija alternativa konvencionalnom postupku, od metode kontinualne sinteze. Sa druge strane sinteza 6-hidroksi-2-piridona (**P1-3**) ukazuje da su diketoni značajno reaktivniji u reakciji kondenzacije sa cijanoacetamidima, u odnosu na ketoestre, što se ogleda kroz niske ostvarene prinose derivata **P1-3** u MR [112].

Tabela 3.1. Optimizacija protoka u prvom setu eksperimenata. Poređenje dobijenih prinosa primenom kontinualnog i konvencionalnog postupka sinteze.

Jedinjenje	Sinteza metodom kontinualnog protoka					Konvencionalna sinteza		
	F (DK) ^(a) [ml/min] $c=0,6$ mol/dm ³	F (CAA) ^(b) [ml/min] $c=0,6$ mol/dm ³	F (NaOH) ^(c) [ml/min] $c=0,7$ mol/dm ³	F_t ^(d) [ml/min]	t ^(e) [min]	Y ^(f) [%]	t ^(g) [min]	Y ^(h) [%]
P1	0,02	0,02	0,02	0,06	81,7	22		
P1	0,03	0,03	0,03	0,09	54,4	10	480	61
P2	0,02	0,02	0,02	0,06	81,7	6	480	59
P3	0,02	0,02	0,02	0,06	81,7	2	480	31
P8	0,10	0,10	0,10	0,30	16,3	50		
P8	0,20	0,20	0,20	0,60	8,20	59		
P8	0,30	0,30	0,30	0,90	5,40	42	60	60
P8	0,40	0,40	0,40	1,20	4,10	42		
P9	0,02	0,02	0,02	0,06	81,7	30		
P9	0,03	0,03	0,03	0,09	54,4	30	240	60
P10	0,02	0,02	0,02	0,06	81,7	25		
P10	0,03	0,03	0,03	0,09	54,4	20	240	40

^(a)Protok rastvora 1,3-dikarbonilnog jedinjenja u metanolu; ^(b)Protok rastvora *N*-supstituisanog cijanoacetamida u vodi; ^(c)Protok rastvora NaOH u vodi; ^(d)Ukupni protok reakcione smeše; ^(e)Vreme zadržavanja u mikroreaktoru; ^(f)Prinos ostvaren u kontinualnom protočnom sistemu; ^(g)Vreme trajanja reakcije primenom konvencionalne sinteze; ^(h)Prinos ostvaren primenom konvencionalne sinteze.

U poređenju sa konvencionalnim postupkom (prinos 60% za 60 min), sinteza derivata **P8** u MR se pokazala kao efikasna, jer je za 8 minuta sintetisan proizvod u istom prinosu. Stoga je metod sinteze u kontinualnom protočnom sistemu dalje optimizovan za **P8**. Uzimajući u obzir značaj derivata **P1** i njegove široke rasprostranjenosti u strukturi raznih piridonskih azo boja [105,106,112] sprovedena je i njegovala dalja optimizacija sinteze u MR.

U drugom setu eksperimenata, koncentracija polaznih rastvora za sintezu jedinjenja **P1** i **P8** je povećana i molarni odnos reaktanata acetalacetona/acetsirćetni estara, cijanoacetamid i natrijum-hidroksid je promenjen na 1:1,5:2 (Tabela 3.2). Priprema rastvora i postavka sistema je opisana u odeljku 2.2.3.3. Poređenjem rezultata ostvarenih u prvom i drugom setu eksperimenata, može se videti da povećanje koncentracije i molarnih odnosa rastvora korišćenih za sintezu jedinjenja **P1** znatno utiče na povećanje prinosa reakcije. Variranjem protoka reakcione smeše od 0,3 do 1,2 ml/min, ustanovljeno je da je optimalan protok za sintezu **P1** pri ovim uslovima, 0,6 ml/min pri čemu se za 8 minuta postiže prinos od 60%. Ovaj metod pokazuje značajno unapređenje u odnosu na konvencionalni postupak sinteze gde se za 8 sati sintetiše proizvod u sličnom prinosu. Što se tiče rezultata dobijenih za jedinjenje **P8**, ustanovljeno je da promena koncentracije i odnosa reaktanata u ovom slučaju ne utiče značajno na prinos proizvoda, s obzirom da su dobijeni slični prinosi kao u prvom setu eksperimenata. Prikazani rezultati pokazuju da postupak sinteze u kontinualnom protočnom mikroreaktorskom sistemu, na sobnoj temperaturi, predstavlja efikasnu metodu za sintezu piridona **P1** i **P8**.

Tabela 3.2. Optimizacija protoka u drugom setu eksperimenata za sintezu derivata **P1** i **P8**

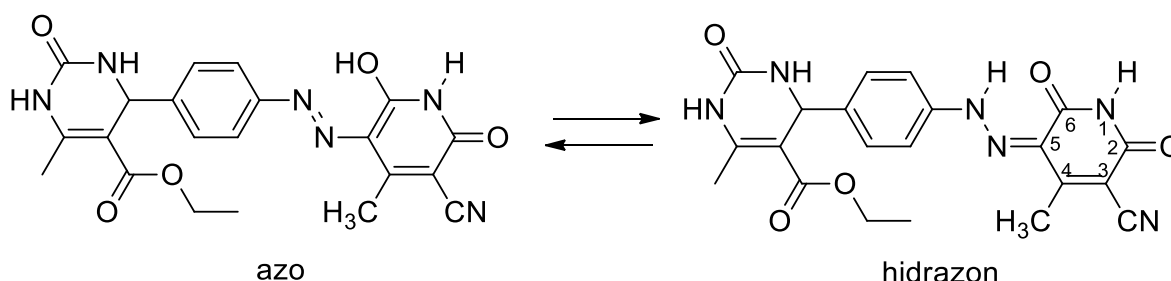
F (acetilaceton/etil-acetoacetat) ^(a) [ml/min] $c=1,0 \text{ mol/dm}^3$	F (cijanoacetamid) ^(b) [ml/min] $c=1,5 \text{ mol/dm}^3$	F (NaOH) ^(c) [ml/min] $c=2,0 \text{ mol/dm}^3$	F_T ^(d) [ml/min]	t ^(e) [min]	Y (P1/P8) ^(f) [%]
0,1	0,1	0,1	0,3	16,3	59/60
0,2	0,2	0,2	0,6	8,2	59/61
0,3	0,3	0,3	0,9	5,4	52/61
0,4	0,4	0,4	1,2	4,1	45/59

^(a)Protok rastvora acetilaceton/etil-acetoacetata u metanolu; ^(b)Protok rastvora cijanoacetamida u vodi; ^(c)Protok rastvora natrijum-hidroksida u vodi; ^(d)Ukupni protok reakcione smeše; ^(e)Vreme zadržavanja u mikroreaktoru; ^(f)Prinos **P1** i **P8**.

3.2. Sinteza DHPM-azo piridonskih boja

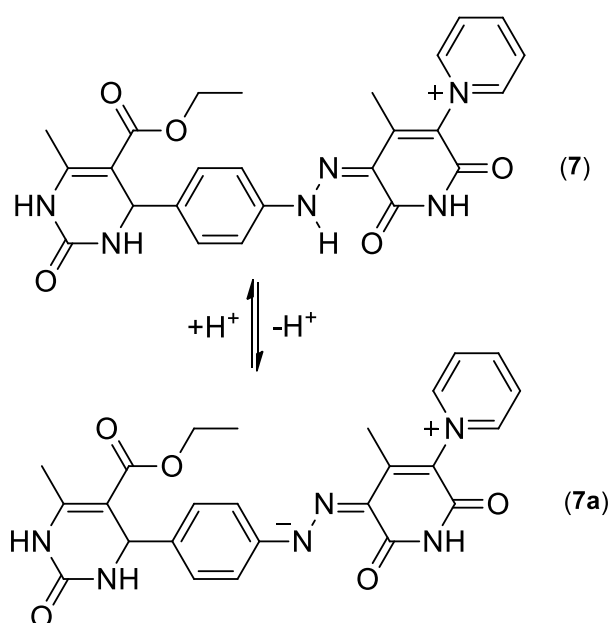
Nakon ispitivanja sinteze 2-piridona u kontinualnom protočnom MR, usledila su dalja istraživanja sinteze Biđinelijevih proizvoda i novih azo boja baziranim na ovim heterocikličnim molekulima.

Azo boje **1–7** sintetisane su u reakciji diazo-kuplovanja, polazeći iz diazonijumove soli **B3**, nastale diazotovanjem Biđinelijevog adukta **B2**, i odgovarajućih 6-hidroksi-2-piridona **P1–7** (slika 2.1). Detaljnije, **B2** je sintetisan u dva koraka. Naime, koristeći Biđinelijevu reakciju i mikrotalasnu tehniku, prvo je sintetisan prekursor diazo komponente, derivat DHPM-a sa nitro-grupom u fenilnom jezgru, označen kao **B1**. Ovaj DHPM je izolovan u dobrom prinosu i zatim je izvršena njegova redukcija, odnosno redukcija nitro- do amino-grupe, kako bi se dobio Biđinelijev adukt pogodan za diazotovanje. Redukcija **B1** je izvršena pod blagim reakcionim uslovima, koristeći amonijum-hlorid i cink, što predstavlja unapređenje u odnosu na većinu literaturnih postupaka, koji u ovom slučaju preporučuju hidrogenovanje, za koje je potrebno obezbediti rigorozne uslove. Tako je **B2** sintetisan u dobrom prinosu i njegova strukturna karakterizacija je data u odeljku 2.2.2. Zatim su sintetisani piridoni **P1–7**, okarakterisani u odeljku 2.2.3.1., koji su potom kuplovani sa **B3** pri čemu se dobijaju nove heterociklične azo boje **1–7**. Dobijena azo jedinjenja su izolovana u dobrom prinosu i njihova struktura je potvrđena ATR-FTIR, ¹H NMR, ¹³C NMR, ESI-MS, UV-Vis spektrima i elementalnom analizom. Kako sintetisana azo jedinjenja sadrže hidroksi-grupu konjugovanu sa azo-grupom, omogućen je intramolekulski transfer protona i time mogućnost za formiranje azo i hidrazon tautomernih oblika [102,103] (slika 3.1).

Slika 3.1. Azo-hidrazon tautomerija boje **1**

ATR-FTIR i NMR spektri boja **1–6** ukazuju na postojanje hidrazon tautomernog oblika u čvrstom stanju, kao i u DMSO-*d*₆ rastvoru. Što se tiče ATR-FTIR spektara, hidrazonski oblik je potvrđen trakama na 1709–1616 cm⁻¹ koje potiču od vibracija istezanja karbonilnih grupa, zatim trakama na 3210–3296 cm⁻¹ koje potiču od vibracija istezanja N–H hidrazon grupe hidrazona, kao i intenzivnim trakama u oblasti od 1514–1503 cm⁻¹, koje se pripisuju zajedničkim C=N vibracijama istezanja i N–H vibracijama savijanja u ravni hidrazonskog oblika. ¹H NMR spektri boja **1–6**, snimljeni u DMSO-*d*₆ rastvoru, nedvosmisleno ukazuju na prisustvo hidrazon tautomera. Signali koji se nalaze u opsegu 14,23–14,62 ppm pripisani su protonu N–H grupe hidrazona. ¹³C NMR spektri potvrđuju prisustvo hidrazonkog oblika, koje se ogleda kroz hemijsko pomeranje dva karbonilna C-atoma, piridonovog prstena, u opsegu od 160,65–162,22 ppm (C6, slika 3.1) i 161,11–164,20 ppm (C2, slika 3.1).

Kod boje **7** je uočena malo drugačija struktura, kako u čvrstom stanju, tako i u rastvoru DMSO-*d*₆. Naime, ATR-FTIR spektri, kao NMR spektri snimljeni u DMSO-*d*₆, ukazuju na deprotonovani oblik hidrazon tautomera (slika 3.2, struktura **7a**).



Slika 3.2. Ravnoteža između hidrazona **7** i dipol-jona **7a**

Kako se reakcija diazo-kuplovanja odvija u alkalnoj sredini, boja **7** se može lako deprotonovati u toku sinteze pri čemu nastaje dipol-jon **7a**. Naime, na ATR-FTIR spektru je uočeno odsustvo trake na oko 1500 cm⁻¹, koja se pripisuje N–H vibracijama savijanja u ravni hidrazona. ¹H NMR spektar ne sadrži signal karakterističan za proton N–H grupe hidrazona, dok ¹³C NMR spektar ima signal na 128,31 ppm pripisan hemijskom pomeranju C-atoma iz C5=N. Ipak, struktura hidrazonskog oblika je potvrđena snimanjem NMR spektara jedinjenja **7** u CF₃COOD rastvoru. Na ¹H NMR spektru je uočen signal niskog intenziteta na 15,03 ppm koji odgovara protonu N–H grupe hidrazona, a signal na 128,32 ppm, u ¹³C NMR spektru, koji odgovara hemijskom pomeranju C-atoma iz C5=N fragmenta, potvrđuje strukturu hidrazonskog tautomernog oblika. ESI-MS analiza dokazala je čistoću ispitivanih jedinjenja, pokazujući pikove molekulskih jona na *m/z* vrednostima koje odgovaraju molarnoj masi ispitivanih boja. UV-Vis apsorpcioni spektri jedinjenja **1–7** snimljeni u etanolu, pokazuju da je u ovom rastvaraču dominantan hidrazonski tautomerni oblik, a apsorpcioni maksimumi jedinjenja se pojavljuju u opsegu od 428–446 nm [108, 151].

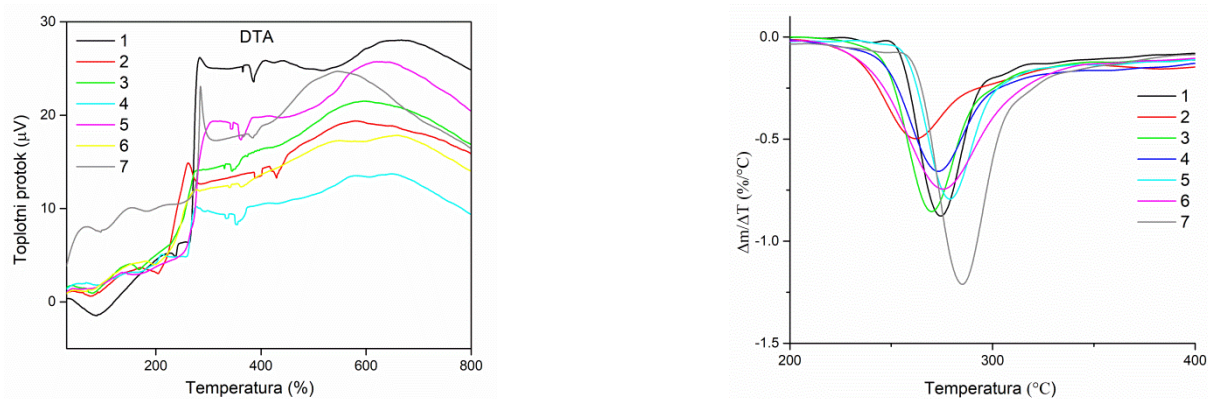
3.3. Termička analiza

U cilju definisanja termičke stabilnosti sintetisanih boja **1–7** urađena je TG i DTA analiza. Podaci dobijeni termičkom analizom prikazani su u tabeli 3.3, DTA krive i DTG maksimumi svih jedinjenja prikazani su na slici 3.3. Termička degradacija boja ilustrovana je TG/DTG krivama jedinjenja **2** i **4** na slici 3.4.

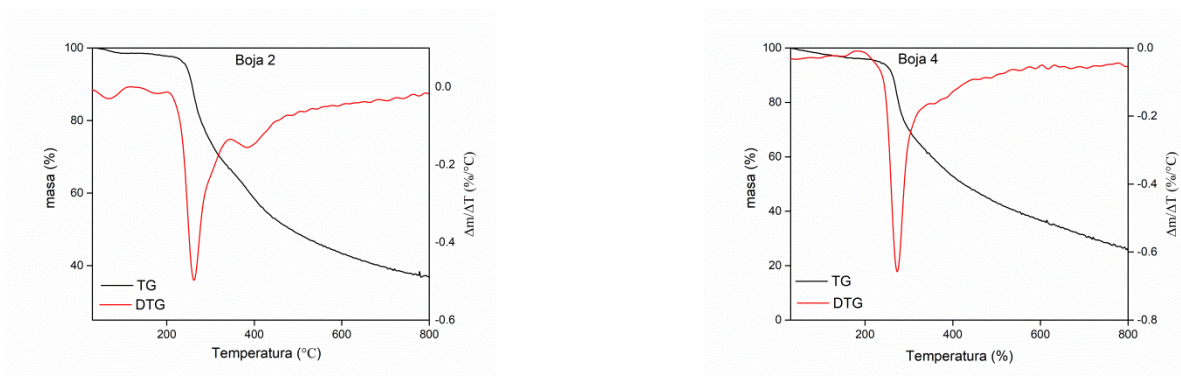
Tabela 3.3. Rezultati termičke analize ispitivanih jedinjenja **1–7**

Boja	Interval temperature degradacije (°C)	DTG pik (°C)	Gubitak mase (%)	Ukupan gubitak mase (%)	DTA pik (°C)	
					Endo	Egzo
1	40,0-170,0	109,0	4,2	59,5	88,9	/
	220,0-390,0	274,2	38,8		/	280,3
2	31,0-114,0	85,7	1,6	63,3	76,2	/
	141,0-205,0	178,4	2,2		204,0	/
	205,0-346,0	261,5	33,4		/	261,6
	346,0-460,0	385,0	48,2		393	/
3	30,0-103,0	68,6	2,5	72,0	77,7	/
	209,0-382,0	269,8	43,8		/	273,0
4	144,0-460,0	272,5	53,5	83,8	/	272,8
5	150,0-471,0	278,7	46,7	78,5	/	304,0
6	28,0-112,0	66,0	1,8	80,0	70,8	/
	200,0-470,0	275,6	59,5		/	274,1
7	174,0-470,0	285,4	59,0	69,0	/	285,5

Na osnovu TG/DTG i DTA podataka može se zaključiti da degradacija jedinjenja **1, 2, 3** i **6** počinje u intervalu od 70-100 °C, što se pripisuje gubitku vezane vode ili zaostalog rastvarača [136]. Takođe ova jedinjenja se termički degradiraju u više koraka, u odnosu na jedinjenja **4, 5** i **7** čija degradacija počinje na višim temperaturama i odvija se samo u jednom koraku. DTG maksimumi analiziranih jedinjenja se kreću u intervalu od 270 do 285 °C, gde jedinjenja **2** ima izražen pik i na temperaturi 385,0 °C, koji se može pripisati sposobnosti ovog derivata da usled prisustva $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ grupe u piridonovom prstenu gradi jake vodonične veze i zbog toga ima sporiju termičku degradaciju. Jedinjenje **7** ima maksimum DTG krive na najvišoj temperaturi (285,4°C), zbog strukture dipol-jona, koja utiče na povećanu termičku stabilnost molekula. Sprovedena termička analiza pokazuje da ispitivane boje stabilne, bez promene u strukturi, do temperature 250 °C, što ukazuje da imaju dobra termička svojstva i da se mogu koristiti za bojenje u visoko-temperaturnim procesima [136].



Slika 3.3. DTA krive i DTG maksimumi boja 1-7

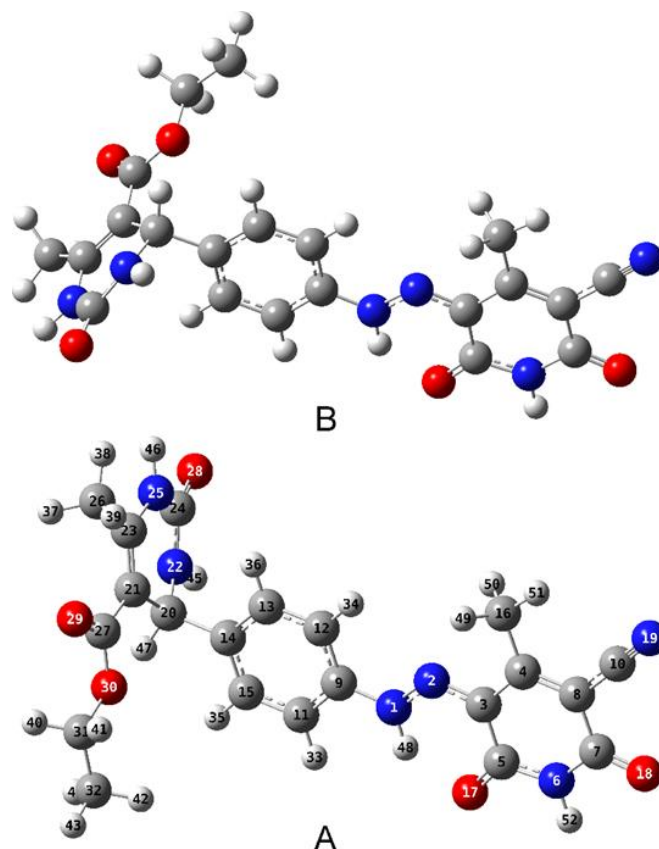


Slika 3.4. TG/DTG krive jedinjenja 2 i 4

3.4. Kvantno-hemijski proračuni

3.4.1. Konformaciona analiza

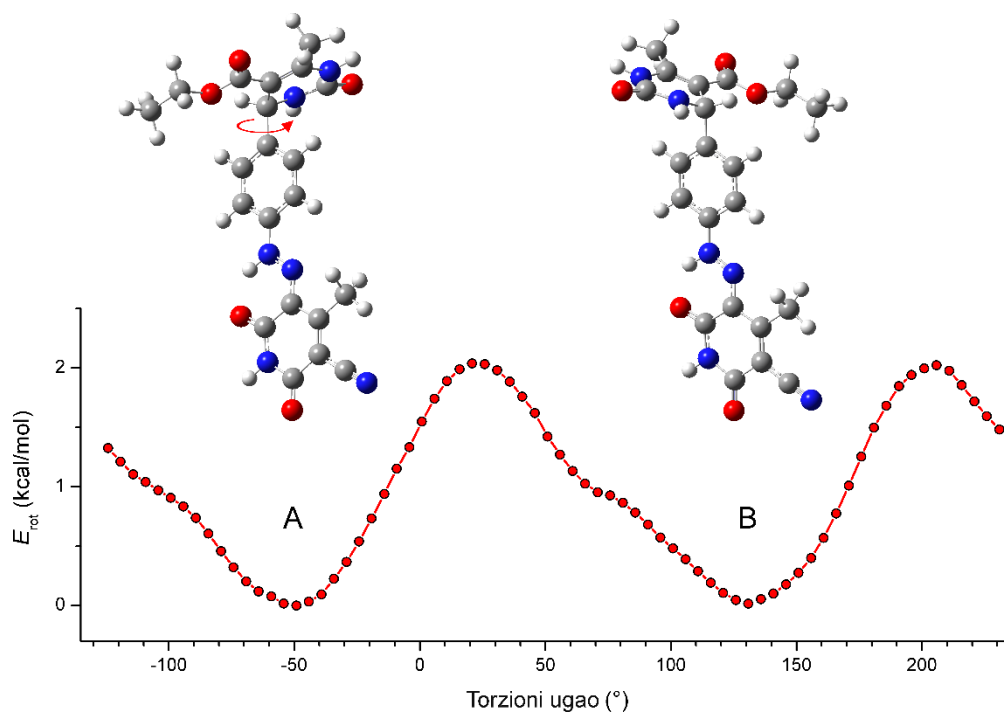
Struktura ispitivanih azo jedinjenja **1–7** potvrđena je konformacionom analizom. Izračunate energije mogućih tautomernih oblika ukazuju da je najstabilniji oblik ispitivanih azo boja **1–6** hidrazon tautomer, a boje **7** deprotonovani hidrazonski oblik, odnosno dipol-jon. Optimizovana geometrija najstabilnijih konformera boje **1**, dobijena pomoću B3LYP metode, prikazana je na slici 3.5.



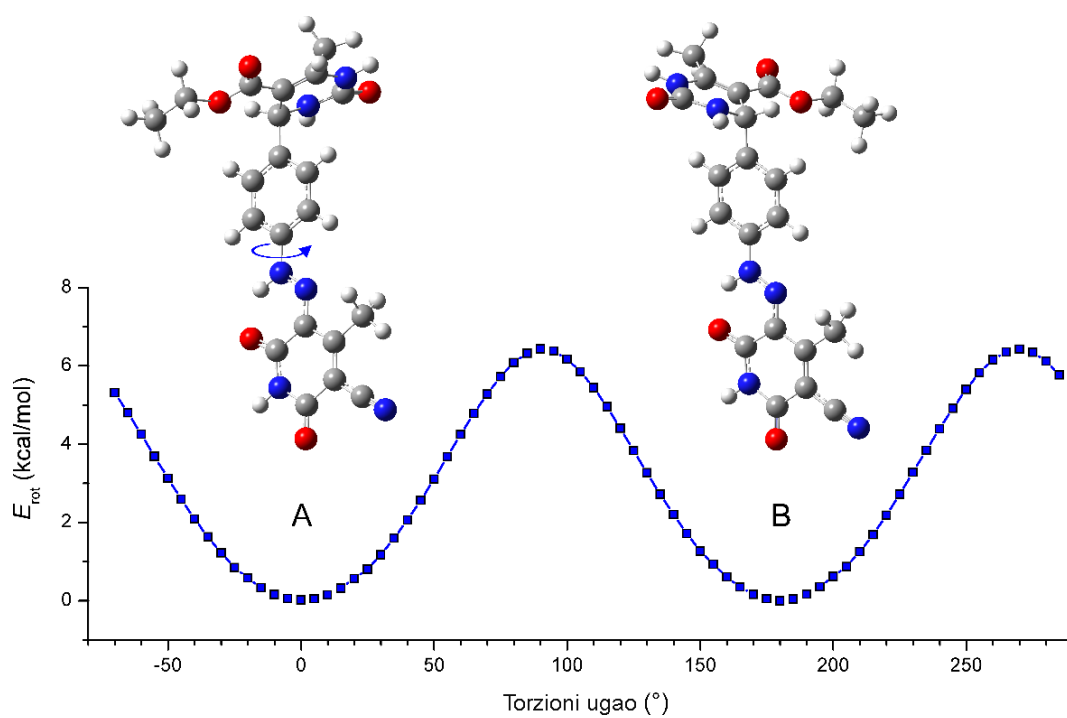
Slika 3.5. Optimizovane geometrije najstabilnijih konformera boje **1** dobijene B3LYP metodom

Na slici 3.5 može videti da je fenilazo piridonski deo molekula planaran, odnosno u ravni, dok je DHPM deo normalan na tu ravan, sprečavajući delokalizaciju elektrona između ta dva dela molekula. Najveća konformaciona razlika u molekulu potiče od rotacije DHPM grupe oko C14–C20 veze. Proračun metodom B3LYP/6-31+G(d) u gasovitoj fazi pokazuje da je energetska barijera za ovu rotaciju oko 2,0 kcal/mol, a kao posledica te rotacije se dobijaju konformeri sa približno istim energijama (slika 3.6 pod a).

Isti proces se može primeniti na rotaciju oko veze C9–N1 pri čemu se dobija se znatno veća energija rotacije, oko 6 kcal/mol (slika 3.6 pod b), što je u skladu sa literaturnim podacima dobijenim za istu vezu u sličnim fenilazo piridonskim bojama [111].



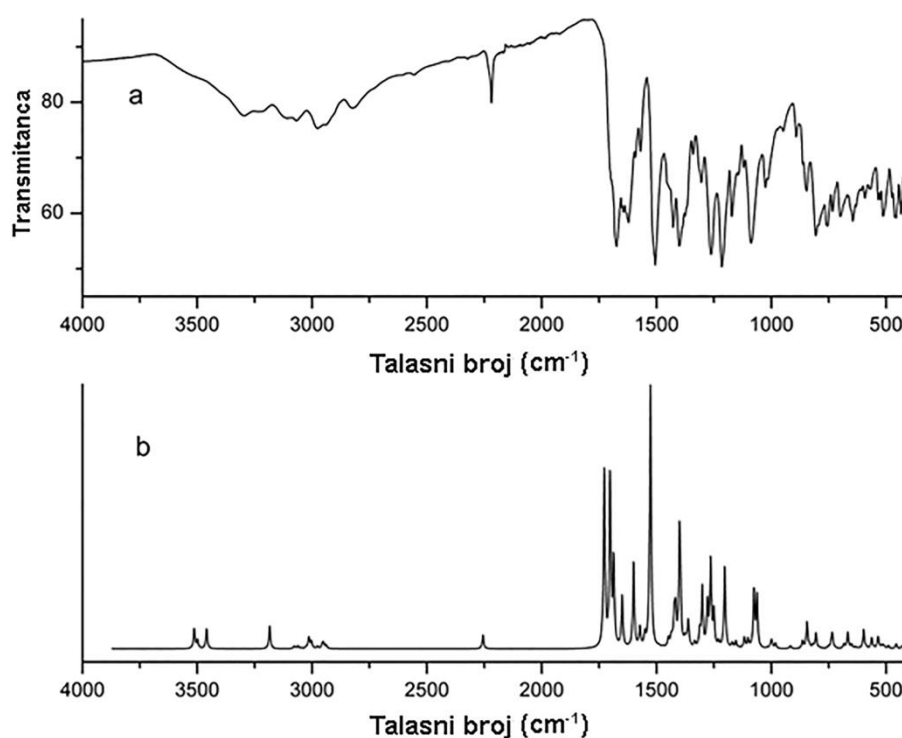
Slika 3.6. a) Energija rotacije oko C14-C20 veze boje 1



Slika 3.6. b) Energija rotacije oko veze C9-N1 boje 1

3.4.2. Vibraciona analiza

Struktura ispitivanih azo jedinjenja **1–7** dalje je proučavana analizom eksperimentalnih i izračunatih IR spektara. Kao što je prethodno pokazano u konformacionoj analizi, najstabilniji oblik proučavanih azo boja je hidrazonski oblik, te su vibracione frekvencije hidrazon tautomera izračunate B3LYP/6-311++G(d,p) metodom. Karakteristične izračunate frekvencije su zatim upoređene sa eksperimentalnim vrednostima. Na slici 3.7 prikazani su eksperimentalni i izračunati IR spektri boje **1**. Izračunate i eksperimentalne vibracione frekvencije za jedinjenje **1** su date u tabeli 3.4, a numeracija boje **1** je prikazana na slici 3.5. Dobra korelacija izračunatih i eksperimentalnih podataka potvrdila je strukturu hidrazonskog oblika u čvrstom stanju.



Slika 3.7. Eksperimentalni (a) i izračunati (b) IR spektri azo boje **1**

Dve široke trake na 3430 i 3450 cm^{-1} u eksperimentalnom spektru pripisane simetričnim i asimetričnim vibracijama istezanja dve N22–H45 i N25–H46 grupe DHPM prstena u skladu su sa izračunatim vrednostima 3498 i 3514 cm^{-1} (mod 150 i 149 u Tabeli 3.4). Za potvrdu hidrazonskog oblika boje **1** najvažnije su dve trake: traka na 3211 cm^{-1} koja odgovara vibracijama istezanja N1–H48 grupe hidrazona i traka na 3296 cm^{-1} koja odgovara vibracijama istezanja N6–H52 grupe piridona. Ove vibracije su u korelaciji sa teorijskim vrednostima 3185 i 3460 cm^{-1} (B3LYP mod broj 147 i 148), kao i sa literaturnim podacima. Trake pozicionirane na 2977 i 3114 cm^{-1} , u eksperimentalnom FT-IR spektru, pripisane su aromatičnim asimetričnim i simetričnim C–H vibracijama istezanja. Vibracije savijanja u ravni N1–H48 i N6–H52 prisutne na 1390 cm^{-1} odgovaraju izračunatim frekvencijama na 1401 cm^{-1} . Vibracije savijanja izvan ravni koje se u eksperimentalnom spektru nalaze na 646 i 847 cm^{-1} odgovaraju vezama N6–H52 i N1–H48. Traka karakteristična za vibracije istezanja CN grupe, koja se u eksperimentalnom spektru nalazi na 2219 cm^{-1} u korelaciji je sa izračunatom vrednošću 2255 cm^{-1} . Vibracije savijanja polarnih karbonilnih grupa C5=O17 i C7=O18

piridonovog prstena i C24=O28 DHPM jezgra nalaze se na 1622, 1674 i 1700 cm^{-1} , i u korelaciji su sa izračunatim vibracijama 1649, 1703 i 1728 cm^{-1} (B3LYP mod broj 126, 128 i 129). Traka na 1640 cm^{-1} odgovara vibracijama istezanja C27=O29 etoksikarbonil-grupe i poklapa se sa izračunatom vrednošću na 1687 cm^{-1} . Traka koja se pojavljuje na 699 cm^{-1} , u FT-IR spektru, potiče od vibracija savijanja u ravni C5=O17 i C7=O18 grupa piridona, a odgovara joj izračunata vrednost od 683 cm^{-1} . Postojanje traka u eksperimentalnom FT-IR spektru koje potiču od vibracija istezanja i savijanja karbonilnih grupa, kao i njihova dobra korelacija sa izračunatim vrednostima potvrđuju strukturu hidrazon tautomera boje **1**. Dodatna potvrda hidrazonske strukture su vibracije istezanja N1–N2 i C3=N2 grupa koje se pojavljuju na FT-IR spektru kao intenzivne oštre trake na 1450 i 1506 cm^{-1} . Te trake su u korelaciji sa trakom koja se pojavljuje na 1527 cm^{-1} , u izračunatom spektru, a potiče od vibracija istezanja N1–N2 i C4=C8, kao i sa izračunatim vibracijama istezanja C3=N2 grupe i vibracijama savijanja u ravni N1–H48 na 1551 cm^{-1} (mod broj 121 i 122). Vibracije savijanja izvan ravni četiri N–H grupe nalaze se u oblasti niskih frekvencija na 592–847 u eksperimentalnom i na 598–844 cm^{-1} u teorijskom spektru. Na osnovu analiziranih podataka potvrđena je struktura hidrazon tautomernog oblika boje **1**.

Tabela 3.4. Eksperimentalni IR talasni brojevi i frekvencije izračunate B3LYP/6-311++G(d,p) metodom za hidrazon tautomer azo boje **1** [harmonijske frekvencije (cm^{-1}), IR_{int} (K mmol^{-1})]

Mod br.	IR eksp. (cm^{-1})	Neskalirani B3LYP	Skalirani B3LYP	IR_{int}^a	Oznaka vibracije
150	3450	3630	3514	86,75	$\nu\text{N25-H46}$
149	3430	3614	3498	37,90	$\nu\text{N22-H45}$
148	3296	3574	3460	87,46	$\nu\text{N6-H52}$
147	3211	3290	3185	99,00	$\nu\text{N1-H48}$
144	3114	3178	3076	7,45	$\nu_{\text{sym}}\text{CH}$
143	2977	3147	3046	12,10	$\nu_{\text{asym}}\text{CH}$
130	2219	2330	2255	59,50	νCN
129	1700	1785	1728	773,79	$\nu\text{C24=O28}$
128	1674	1759	1703	744,80	$\nu\text{C7=O18}$
127	1640	1743	1687	363,33	$\nu\text{C27=O29}$
126	1622	1704	1649	233,25	$\nu\text{C5=O17}$
123	1570	1624	1572	184,80	$\nu\text{C=C} + \beta\text{N1-H48}$
122	1506	1602	1551	1163,83	$\nu\text{C3=N2} + \beta\text{N1-H48}$
121	1450	1577	1527	51,96	$\nu\text{C4=C8} + \nu\text{N1-N2}$
117	1428	1496	1448	36,56	$\beta\text{N25-H46}$
112	1401	1470	1423	119,30	$\beta\text{N22-H45} + \beta\text{CH}$
109	1390	1447	1401	449,00	$\beta\text{N1-H48} + \beta\text{N6-H52}$
68	847	872	844	66,15	$\gamma\text{N1-H48}$
55	699	706	683	19,44	$\beta\text{C5=O17} + \beta\text{C7=O18}$
54	646	689	667	71,40	$\gamma\text{N6-H52}$
50	592	618	598	83,00	$\gamma\text{N22-H45} + \gamma\text{N25-H46}$

^a IR_{int} – IR intenzitet (K mmol^{-1}); ν – istezanje; ν_{sym} simetrično istezanje; ν_{asym} – asimetrično istezanje; β – savijanje u ravni; γ – savijanje izvan ravni.

3.4.3. NMR analiza

Struktura azo boja **1–7** proučavana je NMR spektralnom analizom. Na osnovu optimizovane geometrije boje **1**, dobijene B3LYP/6-311++G(d,p) metodom, proračuni hemijskih pomeranja u NMR spektrima, u DMSO-*d*₆, su izračunati pomoću GIAO metode, na istom teorijskom nivou. Izračunata i eksperimentalna ¹H i ¹³C NMR hemijska pomeranja prikazana su u tabeli 3.5, a snimljeni ¹H i ¹³C NMR spektri boje **1** u DMSO-*d*₆ dati su u prilogu (slike A1 i A2). ¹H i ¹³C izotropna hemijska pomeranja su navedena u odnosu na TMS. Uticaj rastvarača je simuliran pomoću solvatacionog CPMC modela. Numeracija atoma prikazana je na slici 3.5.

Tabela 3.5. Eksperimentalna i izračunata ¹H i ¹³C NMR hemijska pomeranja za boju **1** [hemijsko pomeranje (ppm)]

Br.	Kalk.	Eksp.	Br.	Kalk.	Eksp.
48-H	14,74	14,58	4-C	175,46	165,72
52-H	13,03	12,02	27-C	173,56	161,97
46-H	10,74	9,25	7-C	168,86	161,32
45-H	9,34	7,79	5-C	167,46	160,95
34-H	8,23	7,64	23-C	163,42	152,45
36-H	7,69	7,33	24-C	158,25	149,13
35-H	7,68	7,33	14-C	153,91	144,04
33-H	7,49	7,64	9-C	149,08	140,73
47-H	5,38	5,17	13-C	137,05	128,17
40-H	4,00	3,99	15-C	136,82	128,17
41-H	3,77	3,99	3-C	130,84	124,04
50-H	2,68	2,51	11-C	127,08	115,59
49-H	2,63	2,51	10-C	123,81	117,95
39-H	2,61	2,26	12-C	123,11	115,59
37-H	2,46	2,26	21-C	104,60	101,09
51-H	2,45	2,51	8-C	104,34	99,38
38-H	2,27	2,26	31-C	66,56	59,73
44-H	1,37	1,1	20-C	62,08	54,04
43-H	1,15	1,1	26-C	24,01	18,27
42-H	1,14	1,1	16-C	21,58	16,92
			32-C	15,55	14,58

U eksperimentalnom ¹H NMR spektru, hemijska pomeranja vodonika etil-grupe nalaze se na 1,1 i 3,99 ppm. Signali dve metil-grupe, DHPM i piridonovog prstena, nalaze se u ¹H NMR spektru na 2,26 i 2,51 ppm. Navedena hemijska pomeranja su u dobroj korelaciji sa izračunatim vrednostima u oblasti 1,14–4,0 ppm. Eksperimentalno dobijeni signali u oblasti 7,33–7,64 ppm koji potiču od aromatičnih vodonikovih atoma slažu se sa izračunatim pomeranjima u oblasti 7,49–8,23 ppm. Eksperimentalno dobijeni signali vodonika H45 i H46 –N–H grupa DHPM-a, na 7,79 i 9,25 ppm, u korelaciji su sa izračunatim vrednostima na 9,34 i 10,74 ppm. Najznačajniji signali koji potvrđuju hidrazonski oblik boje **1** su signali vodonika H52 i H48, na 12,02 i 14,58 ppm, koji pripadaju N–H grupama piridona i hidrazona. Izračunate vrednosti ovih signala na 13,03 i 14,74 ppm, su u dobroj korelaciji sa eksperimentalnim vrednostima. Signali u

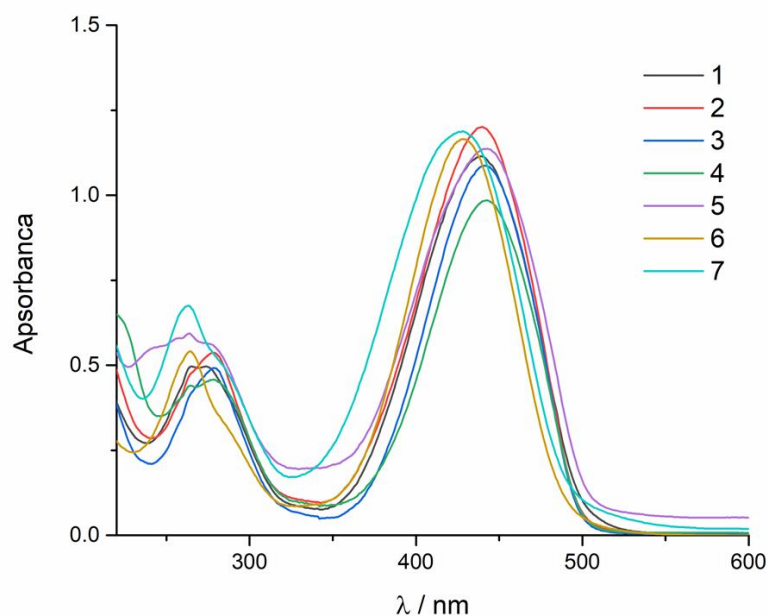
eksperimentalnom ^{13}C NMR spektru boje **1**, C atoma C5 i C7, karbonilnih grupa u piridonovom prstenu, na 160,95 i 161,32 ppm, slažu se sa signalima u izračunatom spektru na 167,46 i 168,86 ppm. Signal na 124,04 ppm dobijen u eksperimentalnom spektru, pripisan ugljeniku C3=N2 veze poklapa se sa izračunatom vrednošću od 130,84 ppm. Opisani rezultati pokazuju da su eksperimentalno dobijeni signali u dobroj korelaciji sa izračunatim hemijskim pomeranjima i potvrđuju strukturu hidrazon tautomernog oblika boje **1**.

3.5. Fotofizička svojstva

Fotofizička svojstva (apsorpcija i emisija zračenja) boja u određenom rastvaraču zavise kako od karakteristika rastvarača tako i od strukture molekula, odnosno interakcija koje se uspostavljaju između njih. UV-Vis i fluorescentna spektralna analiza molekula se koriste za ispitivanje strukture, odnosno tautomerije molekula boja u rastvorima, kao i za definisanje interakcija koje se uspostavljaju između boje i rastvarača. Uspostavljene interakcije utiču na intenzitet i oblik apsorpcionih i emisionih spektara, kao i na položaj apsorpcionih maksimuma. Promene u položaju, obliku i intenzitetu optičkih spektara daju informacije o nespecifičnim i specifičnim interakcijama između molekula rastvarača i boje [109,110]. U nastavku su detaljno analizirana fotofizička svojstva sintetisanih jedinjenja.

3.5.1. UV-Vis spektralna analiza u etanolu

UV-Vis apsorpcioni spektri boja **1–7** snimljeni su u etanolu i prikazani na slici 3.8. Dominantna apsorpciona traka koja se pojavljuje u opsegu od 350 do 550 nm, kod svih analiziranih jedinjenja, odgovara $\pi-\pi^*$ prelazu hidrazon tautomernog oblika [108-111].

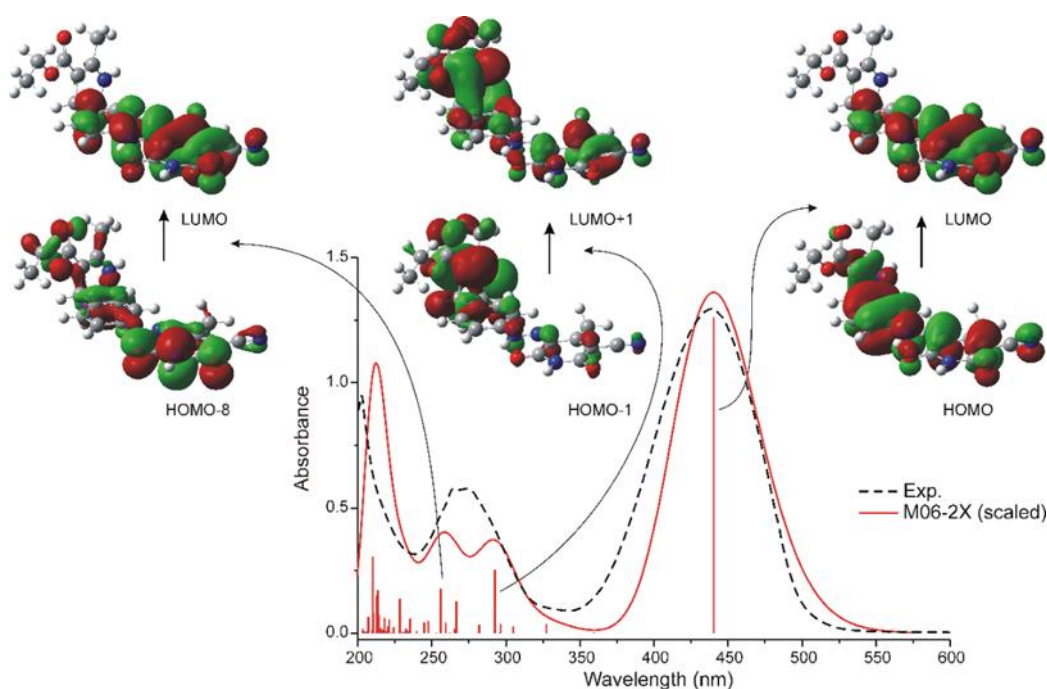


Slika 3.8. UV-Vis apsorpcioni maksimumi u etanolu

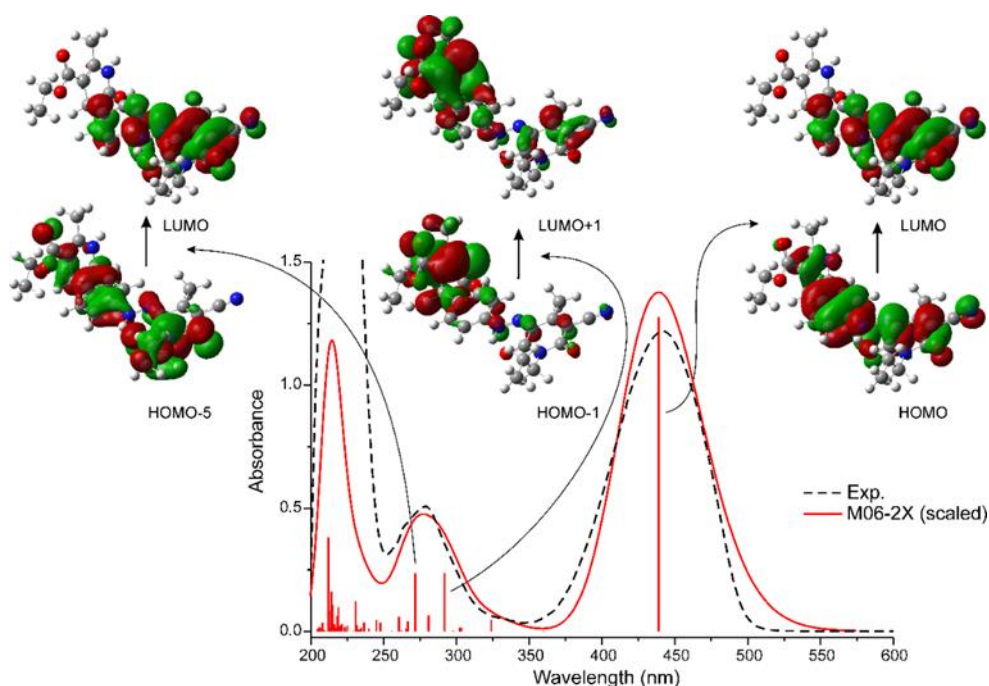
Posmatrajući apsorpcione maksimume jedinjenja **1–7** može se primetiti da različiti supstituenti u položaju 1 piridonovog prstena boja **1–4**, nemaju značajan uticaj na položaj apsorpcionih maksimuma koji se nalaze u opsegu od 439-441 nm. Kod jedinjenja **5** ($\lambda_{\text{max}} = 446$ nm), supstituisanog u položaju 4 fenil-grupom, pojavljuje se blagi batohromni pomeraj

apsorpcionog maksimuma, u odnosu na jedinjenje **1**. Jedinjenje **6** ($\lambda_{\max} = 428,5$ nm) supstituisano amido-grupom u položaju 3, i jedinjenje **7** ($\lambda_{\max} = 428$ nm) supstituisano piridinijum-grupom u položaju 3, pokazuju hipsokromni pomeraj apsorpcionih maksimuma u etanolu u odnosu na referentno jedinjenje **1**. U slučaju jedinjenja **6** to se može pripisati slabijim elektron-akceptorskim svojstvima amido-grupe u odnosu na cijano-grupu, a u slučaju jedinjenja **7** može se pretpostaviti da narušavanje planarnosti molekula, dovodi do hipsokromnog pomeranja apsorpcionog maksimuma. Zapaženo ponašanje molekula boja u etanolu je u skladu sa podacima objavljenim za arilazo piridonske boje [108-111,151].

Teorijski UV-Vis apsorpcioni spektri izračunati su u etanolu za jedinjenja **1** i **3** na CPCM/M06-2X/6-311++G(d,p) nivou i skalirani faktorom 1,15. Na slikama 3.9 i 3.10 prikazani su eksperimentalni i teorijski UV-Vis spektri hidrazon tautomernog oblika jedinjenja **1** i **3**, sa odgovarajućim elektronskim prelazima, koji ilustruju ponašanje ispitivane serije boja u etanolu.



Slika 3.9. Eksperimentalni i teorijski UV spektar za hidrazonski oblik jedinjenja **1** u etanolu izračunat na CPCM/M06-2X/6-311++G(d,p) nivou skaliran faktorom 1,15



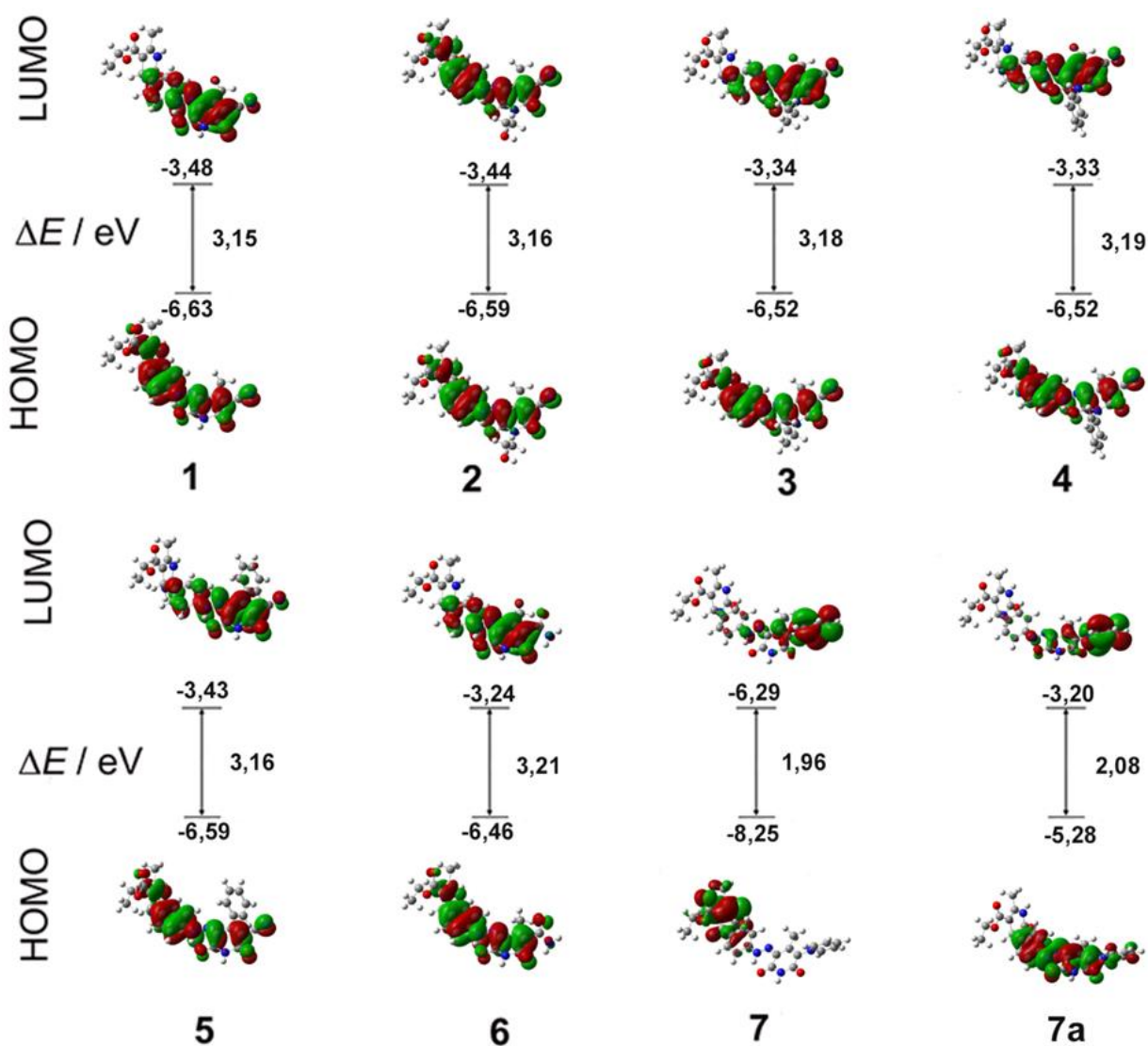
Slika 3.10. Eksperimentalni i teorijski UV spektar za hidrazonski oblik jedinjenja **3** u etanolu izračunat na CPCM/M06-2X/6-311++G(d,p) nivou skaliran faktorom 1,15

Na slikama 3.9 i 3.10 se uočava dobro slaganje eksperimentalnih i izračunatih teorijskih spektara. Zajednička karakteristika analiziranih spektara je da imaju dva pika, u opsegu od 250–550 nm. Pik na višoj talasnoj dužini, na oko 440 nm odgovara prelazu iz HOMO u LUMO orbitalu. Pik koji se javlja na nižoj talasnoj dužini (oko 270 nm) predstavlja kombinaciju prelaza HOMO-1→LUMO+1 i HOMO-8→LUMO za jedinjenje **1**, i HOMO-5→LUMO za jedinjenje **3**.

Na slici 3.11 date su grafičke prezenetacije HOMO i LUMO orbitala i izračunate vrednosti energija E_{HOMO} , E_{LUMO} i ΔE (razlika energija HOMO i LUMO), u vakuumu, za hidrazonski oblik jedinjenja **1–7**, kao i za molekul **7a**, koji predstavlja deprotonovani hidrazonski oblik (dipoljon). Takođe, vrednosti energija molekulskih orbitala izračunate su u etanolu i prikazane u tabeli 3.6. Poređenjem vrednosti energija dobijenih u vakuumu i etanolu može se zaključiti da kod molekula **1–6** gotovo nema razlike u energijama, dok se kod jedinjenja **7** i **7a** uočava povećanje vrednosti ΔE u etanolu, u odnosu na vakuum. Najveća vrednost razlike energija HOMO i LUMO uočava se kod molekula **6** i **7** što je u skladu sa ekperimentalnim podacima, gde su njihovi apsorpcioni maksimumi hipsohromno pomereni u odnosu na ostale derivate.

Tabela 3.6. Vrednosti energija graničnih molekulskih orbitala izračunatih u etanolu

Molekul boje	Etanol		
	E_{HOMO}	E_{LUMO}	ΔE
1	-6,42	-3,28	3,14
2	-6,39	-3,23	3,16
3	-6,36	-3,20	3,17
4	-6,39	-3,23	3,16
5	-6,44	-3,32	3,13
6	-6,32	-3,13	3,19
7	-6,52	-3,34	3,18
7a	-5,57	-2,78	2,79

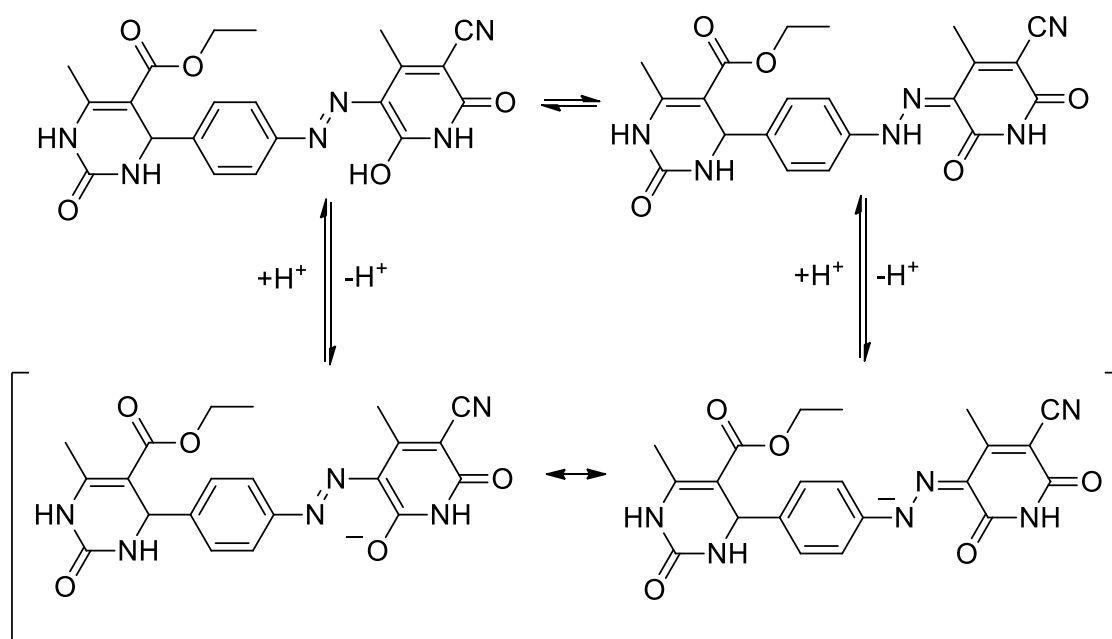


Slika 3.11. Molekulske orbitale i HOMO-LUMO razlike energija za hidrazonski oblik 1-7 i 7a u vakuumu

Na slici 3.11 se vidi da su HOMO i LUMO orbitale molekula **1–6** i **7a** distribuirane preko planarnog dela molekula, i da DHPM prsen nema značajni udeo u transferu naelektrisanja. HOMO orbitala je uglavnom locirana na fenilnom jezgru, dok je LUMO orbitala distribuirana preko piridonovog jezgra. Usled toga jasno je da se transfer naelektrisanja dešava sa fenilnog jezgra ka piridonovom prstenu. Hidrazonski fragment je deo i HOMO i LUMO molekulskih orbitala te aktivno učestvuje u prenosu naelektrisanja. Izgled HOMO i LUMO orbitala potvrđuje da supstituent u položaju 1, piridonovog prstena, ne utiče na transfer neelektrisanja. Kod strukture **7** se uočava da je HOMO orbitala raspoređena preko DHPM prstena, dok je LUMO orbitala distribuirana na piridonov prsten. Kako je ekperimentalno pokazano da se jedinjenje **7** nalazi kao dipol-jon i u rastvorima i u čvrstom stanju, može se zaključiti da se kod svih ispitivanih jedinjenja značajna pomeranja elektronske gustine dešavaju između orbitala koje se prostiru u istoj ravni, odnosno između fenilnog prstena, hidrazon fragmenta i piridonovog prstena.

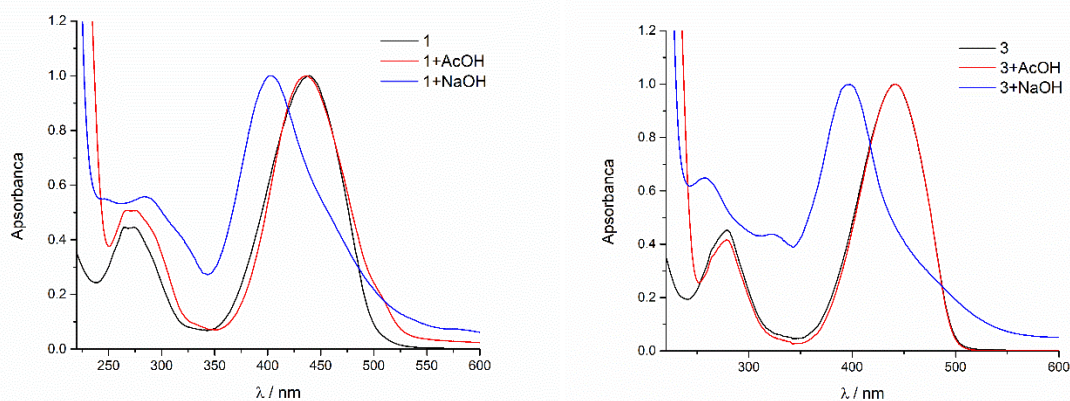
3.5.2. Uticaj promene pH rastvora na UV-Vis apsorpcione spektre

Prethodna istraživanja arilazo piridonskih boja su pokazala da se promenom pH vrednosti rastvora boja uspostavlja kiselo-bazna ravnoteža u rastvoru, između molekula boje i odgovarajućeg anjona (slika 3.12). Hidrazon tautomerni oblik je dominantan na nižim pH vrednostima, dok je anjonski oblik favorizovan u alkalnoj sredini [108,109,110].



Slika 3.12. Kiselo-bazna ravnoteža prikazana na primeru boje **1**

Rastvori boja **1–7**, u etanolu, tretirani su sirćetnom kiselinom i natrijum-hidroksidom, u cilju ispitivanja kiselo-bazne ravnoteže. Na slici 3.13 prikazani su optimizovani UV-Vis apsorpcioni spektri jedinjenja **1** i **3** koji ilustruju ponašanje boja u rastvorima različite pH vrednosti.

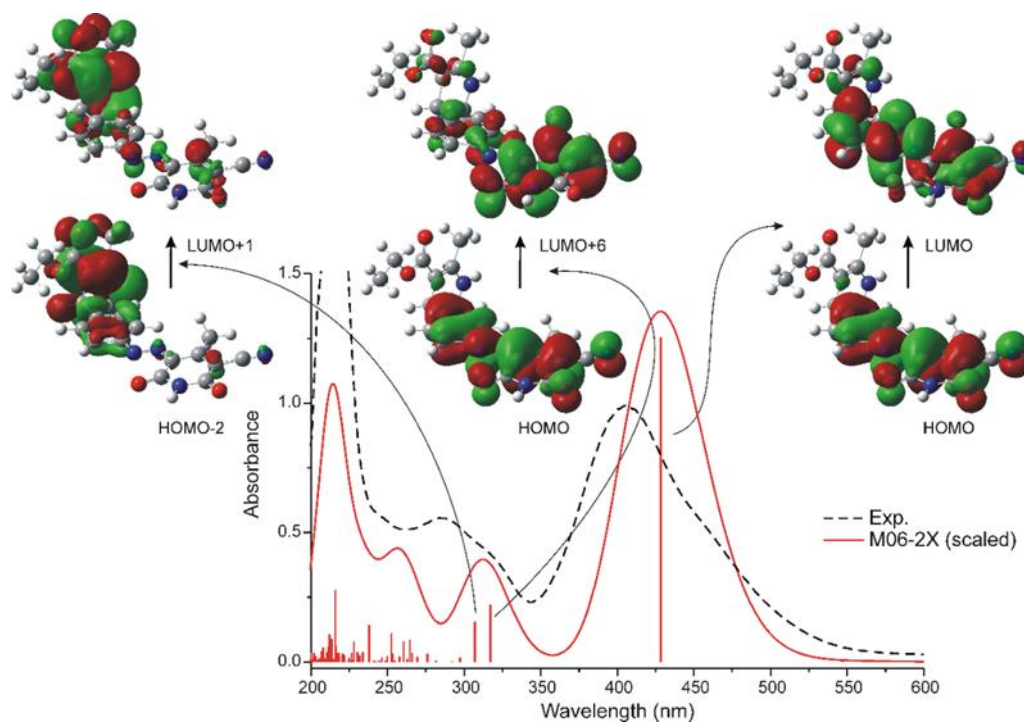


Slika 3.13. Optimizovani UV-Vis apsorpcioni spektri jedinjenja **1** i **3** u etanolu, uz dodatak sirćetne kiseline i natrijum-hidroksida

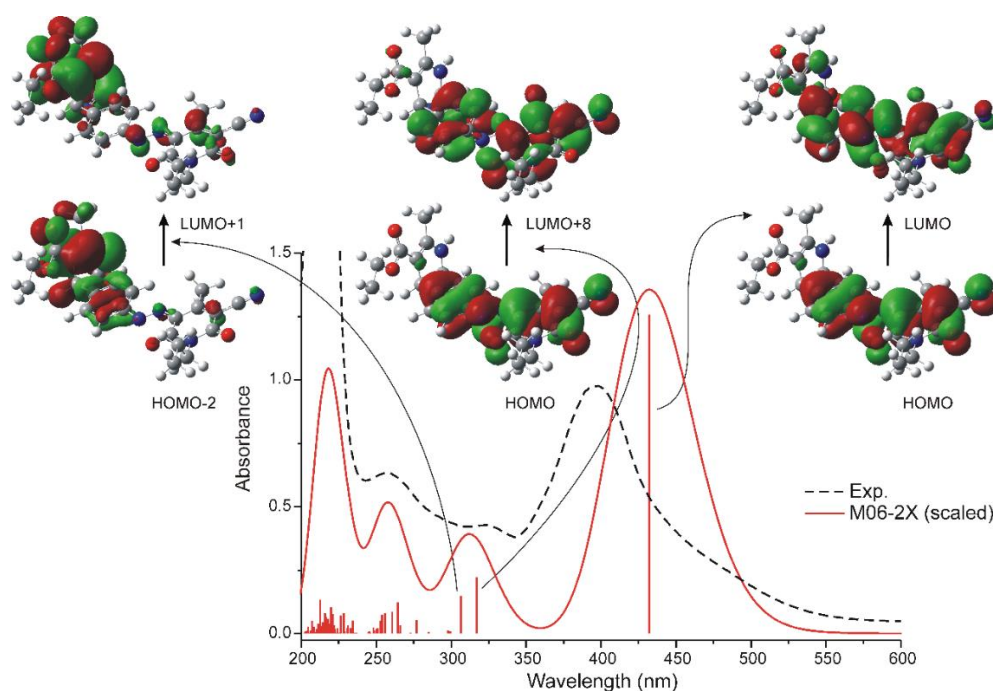
Na slici 3.13 se jasno vidi da dodatak kiseline u rastvor ne utiče na položaj apsorpcionih maksimuma **1** i **3**, što potvrđuje da se boje u etanolu, kao i u etanolu sa dodatkom kiseline nalaze u hidrazonskom obliku. Sa druge strane dodatak NaOH utiče na hipsohromno pomeranje apsorpcionih maksimuma što ukazuje da se anjonski oblik jedinjenja pojavljuje na nižim talasnim dužinama [103,109,111,151].

Teorijski UV-Vis apsorpcioni spektri su izračunati na CPCM/M06-2X/6-311++G(d,p) nivou i skalirani faktorom 1,15, za najstabilnije anjone jedinjenja **1** i **3**. Na slikama 3.14 i 3.15 prikazani su eksperimentalni i teorijski UV-Vis spektri anjonskih oblika **1** i **3**, sa odgovarajućim elektronskim prelazima, koji ilustruju ponašanje ispitivanih boja u alkalnom rastvoru etanola.

Sa slika 3.14 i 3.15 se uočava dobro slaganje eksperimentalnih i izračunatih spektara, s tim što izračunati spektri daju malo više vrednosti u poređenju sa eksperimentalnim. Na spektrima se uočavaju dva pika koja potiču od anjonskih oblika, jedan nižeg intenziteta i drugi koji je dominantan. Pik na nižoj talasnoj dužini, u opsegu od 250 do 350 nm, predstavlja kombinaciju prelaza HOMO→LUMO+6 i HOMO-2→LUMO+1 za jedinjenje **1**, i HOMO→LUMO+8 i HOMO-2→LUMO+1 za jedinjenje **3**. Apsorpcioni maksimumi anjonskog oblika, koji se pojavljuju u opsegu od 350 do 550 nm, predstavljaju prelaz iz HOMO u LUMO orbitalu ispitivanih jedinjenja. Izračunati apsorpcioni maksimum anjonskog oblika pojavljuje se na nižoj talasnoj dužini, u odnosu na izračunati apsorpcioni maksimum hidrazonskog oblika što je u skladu sa ekperimentalnim podacima. Ovo potvrđuje da povećanje pH rastvora dovodi do hipsohromnih pomeraja u apsorpcionim spektrima.



Slika 3.14. Eksperimentalni i teorijski UV spektar za najstabilniji anjon jedinjenja **1** u etanolu izračunat na CPCM/M06-2X/6-311++G(d,p) nivou skaliran faktorom 1,15

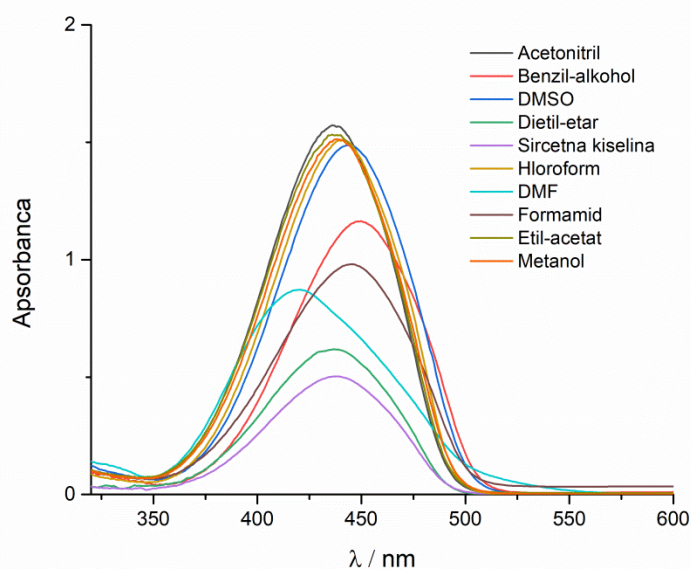


Slika 3.15. Eksperimentalni i teorijski UV spektar za najstabilniji anjon jedinjenja **3** u etanolu izračunat na CPCM/M06-2X/6-311++G(d,p) nivou skaliran faktorom 1,15

3.5.3. Uticaj rastvarača na UV-Vis apsorpcione spektre

UV-Vis apsorpcioni spektri sintetisanih jedinjenja **1–7** su analizirani u 27 rastvarača različitih svojstava. U tabeli 3.7 prikazani su odgovarajući apsorpcioni maksimumi i na slici 3.16 ilustrovani su spektri jedinjenja **3** u deset reprezentativnih rastvarača. U izrazito nepolarnim rastvaračima (kao što su heksan, pentan, toluen itd) UV-Vis spektri nisu mogli da budu snimljeni zbog veoma slabe rastvorljivosti jedinjenja. U nepolarnim i umereno polarnim rastvaračima kao što su dietil-etar, hloroform, dihlormetan i metil-acetat dolazi do blagog hipsohromnog pomeraja spektara svih jedinjenja, u odnosu na polarne rastvarače kao što su alkoholi i DMSO. U jako polarnim rastvaračima, benzil-alkoholu i formamidu dolazi do najznačajnijeg batohromnog pomeranja apsorpcionih maksimuma ispitivanih jedinjenja. Spektri snimljeni u DMF-u ispoljili su najznačajnija hipsohromna pomeranja apsorpcionih maksimuma, svih jedinjenja, u odnosu na etanol. Apсорpcioni maksimumi u DMF-u kreću se od 416-426 nm, što je oko 20 nm niže u odnosu na maksimume dobijene u etanolu. Ovo ponašanje jedinjenja može se objasniti baznim svojstvima DMF-a, čime se favorizuje anjonski oblik jedinjenja u rastvoru, koji apsorbuje na nižim talasnim dužinama, u odnosu na hidrazonski oblik, što je prethodno pokazano analizom kiselo-bazne ravnoteže u etanolu. Slično ponašanje u slučaju jedinjenja **5** i **7** primećeno je i u drugim rastvaračima sa baznim svojstvima kao što su DMA, formamid, 1-metil-2-pirolidinon i piridin. U cilju određivanja apsorpcionih maksimuma hidrazonskog oblika jedinjenja **1–7** u pomenutim rastvorima, spektri su snimljeni uz dodatak sirćetne kiseline u rastvore, i dobijeni su apsorpcioni maksimumi za hidrazonski oblik jedinjenja (Tabela 3.7).

Kao što je prethodno diskutovano u odeljku o UV-Vis analizi u etanolu, tako se i ovde može uočiti isti trend ponašanja jedinjenja u različitim rastvaračima. Naime, kod jedinjenja **1–4** zapažaju se apsorpcioni maksimumi na sličnim talasnim dužinama, što znači da različiti supstituenti u položaju 1 ne utiču na položaj apsorpcionih maksimuma. Kod jedinjenja **5**, fenil-grupa piridona doprinosi batohromnim pomeranjima, a kod jedinjenja **6** i **7**, amido-grupa (**6**) i piridinijum-grupa (**7**) doprinose hipsohromnim pomeranjima apsorpcionih maksimuma u svim rastvaračima, u odnosu na boju **1**.



Slika 3.16. Apсорpcioni maksimumi boje **3** u različitim rastvaračima

Tabela 3.7. ApSORPCIONI maksimumi i odgovarajući ekstinkcioni koeficijenti jedinjenja 1–7 u različitim rastvaračima

Rastvarač		1	2	3	4	5	6	7
Aceton	λ_{\max}^a	435,0	436,5	437,5	438,0	441,5	424,0	423,5
	ϵ^b	33240	38127	28900	30620	28300	23960	3933
Acetonitril	λ_{\max}^a	436,5	437,0	436,0	439,0	442,0	423,5	426,5
	ϵ^b	25850	31782	31460	34854	20371	30380	9120
Benzil-alkohol	λ_{\max}^a	449,5	450,0	449,5	451,5	455,5	438,5	443,5
	ϵ^b	32217	23980	29100	29178	23950	30363	30054
1-Butanol	λ_{\max}^a	438,0	440,5	442,5	442,0	446,5	429,5	428,5
	ϵ^b	15733	28800	27822	24686	21000	21033	2633
Cikloheksanon	λ_{\max}^a	439,5	439,5	440,5	439,5	446,2	429,0	434,0
	ϵ^b	8600	20270	20480	10120	20300	22440	8933
Dihlormetan	λ_{\max}^a	442,0	442,0	441,0	441,5	445,0	434,5	441,5
	ϵ^b	5000	24400	23000	20600	20500	19250	1667
Dioksan	λ_{\max}^a	438,4	438,6	438,8	439,0	442,8	430,8	0,0
	ϵ^b	14550	13800	19750	12600	9075	5175	0
DMSO	λ_{\max}^a	442,0	443,0	443,0	444,0	447,0	427,0	431,0
	ϵ^b	28600	31280	29760	33360	23300	33220	20143
Etanol	λ_{\max}^a	439,0	440,0	440,0	441,0	446,0	428,5	428,0
	ϵ^b	34560	24020	27340	30100	28950	29150	29725
Etil-acetat	λ_{\max}^a	437,0	436,5	435,5	438,0	441,0	426,5	439,5
	ϵ^b	8825	27929	28029	26450	22033	27520	4000
Etilen-glikol	λ_{\max}^a	444,0	444,2	444,4	444,8	449,6	433,2	436,8
	ϵ^b	3998	24325	9400	4220	13200	12650	3220
Metanol	λ_{\max}^a	438,0	439,0	438,0	439,0	443,5	434,4	430,0
	ϵ^b	25387	27200	25729	26175	25750	29328	25683
Dietil-etar	λ_{\max}^a	434,6	438,2	436,8	439,4	438,8	426,4	0,0
	ϵ^b	1925	7125	15450	1400	1325	10375	0
THF	λ_{\max}^a	438,2	439,0	442,2	440,6	443,0	429,2	429,2
	ϵ^b	25625	31875	23400	23157	23075	25600	2425

Sirćetna kiselina	λ_{\max}^a	442,8	437,8	438,6	439,6	447,0	434,6	436,2
	ε^b	17567	20900	20120	23100	21000	24067	28450
2-Pentanon	λ_{\max}^a	433,0	438,0	438,5	439,0	442,5	424,5	432,5
	ε^b	6067	25312	27328	22800	19466	17100	2750
Metil-acetat	λ_{\max}^a	431,2	437,2	437,0	437,2	438,2	424,4	423,8
	ε^b	6467	32450	28900	29050	25150	19120	3050
Hloroform	λ_{\max}^a	442,0	442,0	440,6	441,6	447,2	436,2	0,0
	ε^b	5000	12675	23555	22175	19250	7300	0
2-Butanon	λ_{\max}^a	438,0	437,0	439,5	439,0	442,5	426,0	431,5
	ε^b	28080	31271	27886	25800	20750	26600	5175
terc-Butanol	λ_{\max}^a	444,0	441,0	442,0	441,5	447,0	428,5	425,0
	ε^b	3700	26950	29755	14050	22200	22375	5400
Izobutanol	λ_{\max}^a	438,2	441,0	440,0	442,4	445,4	428,0	434,6
	ε^b	1550	26800	21681	16833	23840	14760	10900
1-Propanol	λ_{\max}^a	439,5	441,0	442,0	441	446	427,5	433,5
	ε^b	7500	36150	41225	29700	47000	31375	21600
1-Metil-2-pirolidinon	λ_{\max}^a	442,0	443,0	442,8	442,4	447,0	427,8	418,2/ 432,2*
	ε^b	26175	29540	23600	26000	18560	18320	17650/18830*
DMF	λ_{\max}^a	424,4/443,2*	425,8/442,2*	420,8/441,6*	417,8/442,4*	421,8/445,4*	425,8/425,8*	416,6/433,6*
	ε^b	25200/31025*	26350/32725*	22700/29650*	19525/23650*	26225/30125*	30750/30750*	24200/28700*
DMA	λ_{\max}^a	440,5	439	441	441,5	446	423,5	416/430,5*
	ε^b	25875	21275	37575	26600	21600	29625	25475/28950*
Formamid	λ_{\max}^a	444,4	445,4	445,6	443,2	413,6/450,6*	434,6	439
	ε^b	22725	35075	24500	21825	25800/36800*	20500	20800
Piridin	λ_{\max}^a	445,4	445,6	446,6	447,6	448,2	431,6	418,4/438,8*
	ε^b	31800	35600	30720	30875	31290	30644	25400/28100*

^aIzraženo u nm; ^bizraženo u $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; *apsorpcioni maksimum dobijen dodatkom sirćetne kiseline u odgovarajući rastvarač.

Uticaj specifičnih i nespecifičnih interakcija rastvarača sa molekulima boja na položaje apsorpcionih maksimuma analiziran je linearnim korelacijama solvatohromnih energija, pomoću Katalanovog modela [141-143]. Ovaj model predstavlja jedan od prvih koncepata koji razmatra odvojeno nespecifične i specifične interakcije rastvarača kroz po dve nezavisne empirijske skale polarnosti. Primenjeno na UV-Vis apsorpcione frekvencije *Catalán*-ova jednačina sledi:

$$\nu_{\max} = \nu_0 + cSP + dSdP + bSB + aSA \quad (1)$$

gde je *SP* polarizabilnost, *SdP* polarnost rastvarača, *SA* kiselost i *SB* baznost rastvarača. Nezavisni koeficijenti *c*, *d*, *b* i *a* označavaju individualne doprinose odgovarajućeg parametra rastvarača u celokupnom solvatohromizmu. Koeficijent ν_0 označava apsorpcionu frekvenciju u referentom rastvaraču. Katalanovi parametri rastvarača korišćeni za korelacije preuzeti su iz literaturnih izvora [141-143].

Rezultati regresione analize jedinjenja **1-7** u **27** rastvarača sumirani su u tabeli 3.8 dok su procentualni udeli solvatohromnih parametara prikazani u tabeli 3.9. Korelacioni koeficijenti dobijeni regresionom analizom su oko 95% što ukazuje na validnost primenjenog modela.

Tabela 3.8. Rezultati LSER analize dobijeni Katalanovom jednačinom

Boja	$\nu_0 \cdot 10^{-3}$ (cm^{-1})	$c \cdot 10^{-3}$ (cm^{-1})	$d \cdot 10^{-3}$ (cm^{-1})	$b \cdot 10^{-3}$ (cm^{-1})	$a \cdot 10^{-3}$ (cm^{-1})	R ^a	sd ^b	F ^c	n ^d
1	24,256 (±0,125)	-2,038 (±0,172)	/ ^e / ^e	/ ^e / ^e	-0,283 (±0,058)	0,949	0,062	82	21
2	23,918 (±0,109)	-1,915 (±0,157)	0,300 (±0,081)	/ ^e / ^e	-0,482 (±0,060)	0,956	0,054	64	22
3	24,449 (±0,141)	-2,189 (±0,176)	/ ^e / ^e	-0,292 (±0,075)	-0,204 (±0,050)	0,954	0,058	61	22
4	24,458 (±0,153)	-2,453 (±0,202)	0,198 (±0,095)	-0,322 (±0,072)	-0,294 (±0,057)	0,957	0,058	43	21
5	23,974 (±0,136)	-1,960 (±0,187)	/ ^e / ^e	/ ^e / ^e	-0,517 (±0,068)	0,948	0,066	84	22
6	24,248 (±0,154)	-1,974 (±0,196)	0,535 (±0,082)	0,329 (±0,089)	-0,580 (±0,058)	0,959	0,067	55	24
7	24,602 (±0,265)	-3,064 (±0,322)	0,701 (±0,153)	0,592 (±0,145)	-0,544 (±0,099)	0,951	0,108	35	20

^aKorelacioni koeficijent; ^bStandardna devijacija; ^cFišerov test; ^dBroj rastvarača uključenih u korelaciju.
^eZanemarljiva vrednost sa visokom standardnom devijacijom.

Tabela 3.9. Procentualni udeli solvatohromnih parametara dobijeni Katalanovom jednačinom

Boja	<i>SP</i> (%)	<i>SdP</i> (%)	<i>SB</i> (%)	<i>SA</i> (%)
1	87,8	0	0	12,2
2	71,0	11,1	0	17,9
3	81,5	0	10,9	7,6
4	75,1	6,0	9,9	9,0
5	79,1	0	0	20,9
6	57,8	15,6	9,6	17,0
7	62,5	14,3	12,1	11,1

Na osnovu tabele 3.8 zaključuje se da najdominantniji efekat na sovatohromizam jedinjenja ima polarizabilnost rastvarača što se ogleda kroz visoku negativnu vrednost koeficijenta c . Naime, negativna vrednost ovog koeficijenta ukazuje da povećanje polarizabilnosti rastvarača utiče na batohromno pomeranje apsorpcionih maksimuma. Najviša apsolutna vrednost koeficijenta c prisutna je kod jedinjenja **7** zbog njegove jonske strukture. Nezavisni koeficijent d je zanemarljiv kod molekula **1**, **3** i **5** dok kod ostalih ima pozitivnu vrednost što ukazuje na hipsohromno pomeranje povećanjem polarnosti rastvarača. Koeficijent a kod svih jedinjenja ima negativnu vrednost što označava da povećanjem kiselosti rastvarača dolazi do batohromnih pomeranja apsorpcionih spektara. Uticaj baznosti rastvarača na položaj apsorpcionih maksimuma je zanemarljiv kod jedinjenja **1**, **2** i **5**, dok kod jedinjenja **3** i **4** povećanjem baznosti rastvarača dolazi do batohromnog pomeranja spektara ($b < 0$). Sa druge strane kod jedinjenja **6** i **7** povećanjem baznosti dolazi do hipsohromnog pomeraja apsorpcionih maksimuma ($b > 0$).

Iz tabele 3.9 se vidi da najveći uticaj na pomeranje apsorpcionih maksimuma svih jedinjenja ima polarizabilnost rastvarača. U slučaju jedinjenja **1–5** kiselost rastvarača ima umeren uticaj, dok baznost i polarnost rastvarača imaju znatno manji uticaj. Kod jedinjenja **6** i **7** polarnost rastvarača značajnije utiče na pomeranje apsorpcionih maksimuma u odnosu na taj uticaj kod jedinjenja **1–5**, dok baznost i kiselost imaju sličan uticaj.

Sumirano, jedinjenja **1–5**, supstituisana u položaju 3 piridonovog prstena –CN grupom se slično ponašaju u rastvaračima, dok se jedinjenja **6** (3-amido) i **7** (3-piridinijum) međusobno slično ponašaju u različitim rastvaračima, odnosno različito od jedinjenja **1–5**, što je u skladu sa eksperimentalnim podacima. Takođe, ovo je još jedna potvrda da supstituent u položaju 3 ima najveći uticaj na ponašanje jedinjenja u rastvorima.

Odlična linearna zavisnost izračunatih talasnih brojeva od eksperimentalnih vrednosti je data sledećom jednačinom:

$$v_{izr} = 0,968 v_{eksp} + 0,736 \quad (R = 0,968, n = 152) \quad (2)$$

3.5.4. Fluorescentna spektralna analiza

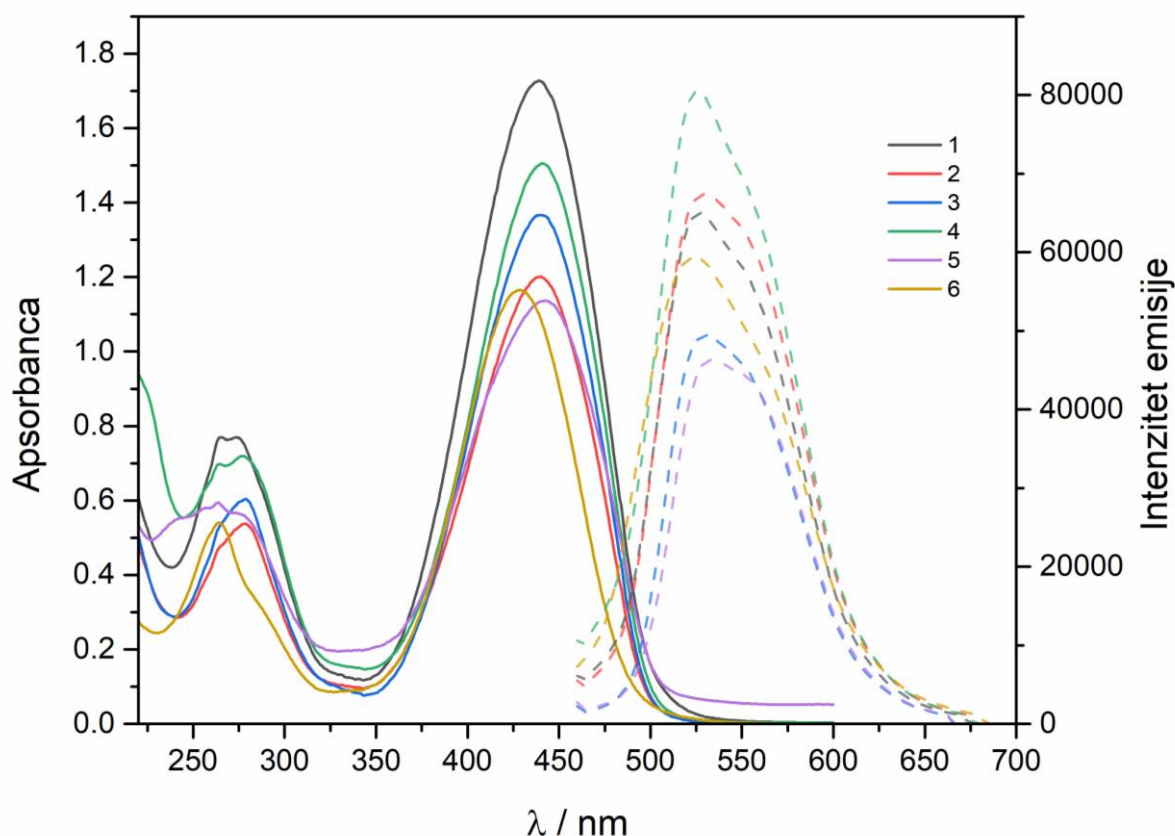
Iako literaturni podaci ukazuju da azo boje nemaju izraženu sposobnost emisije svetlosti, novija istraživanja pokazuju da heterociklučne azo boje sa 2-piridonovim prstenom u strukturi ispoljavaju fluorescentna svojstva [108,110]. Otkrivanje novih fluorescentnih azo boja je značajno zbog njihove potencijalne primene u biološkim istraživanjima (fluorescentne probe, bioimidžing, DNK analiza fluorescentnim kvenčingom).

U cilju ispitivanja fluorescencije boja **1–6**, pripremljeni su rastvori jedinjenja u pet rastvarača i snimljeni su njihovi emisioni spektri. Emisioni spektri su snimljeni tako što je prvo određen apsorpcioni maksimum jedinjenja u UV-Vis apsorpcionim spektrima, kako bi se odredila talasna dužina ekscitacije. Zatim su snimljeni emisioni spektri rastvarača, a potom i pripremljenih rastvora **1–6**, na talasnoj dužini ekscitacije. Jedinjenje **7** zbog svoje generalno slabe rastvorljivosti nije ispitivano u ovoj analizi. U tabeli 3.10 prikazane su vrednosti apsorpcionih maksimuma, emisionih maksimuma kao i izračunate vrednosti Stoksovih pomeraja, koje predstavljaju razliku maksimuma talasne dužine emisije i apsorpcije. Na slici 3.17 ilustrovani su apsorpcioni i emisioni spektri jedinjenja **1–6** u etanolu. Emisioni spektri svih jedinjenja kao i emisioni spektri odgovarajućih rastvarača, dati su u prilogu (slika A3-A6).

Tabela 3.10. Fotofizička svojstva hidrazonskog oblika jedinjenja **1–6** u odabranim rastvaračima

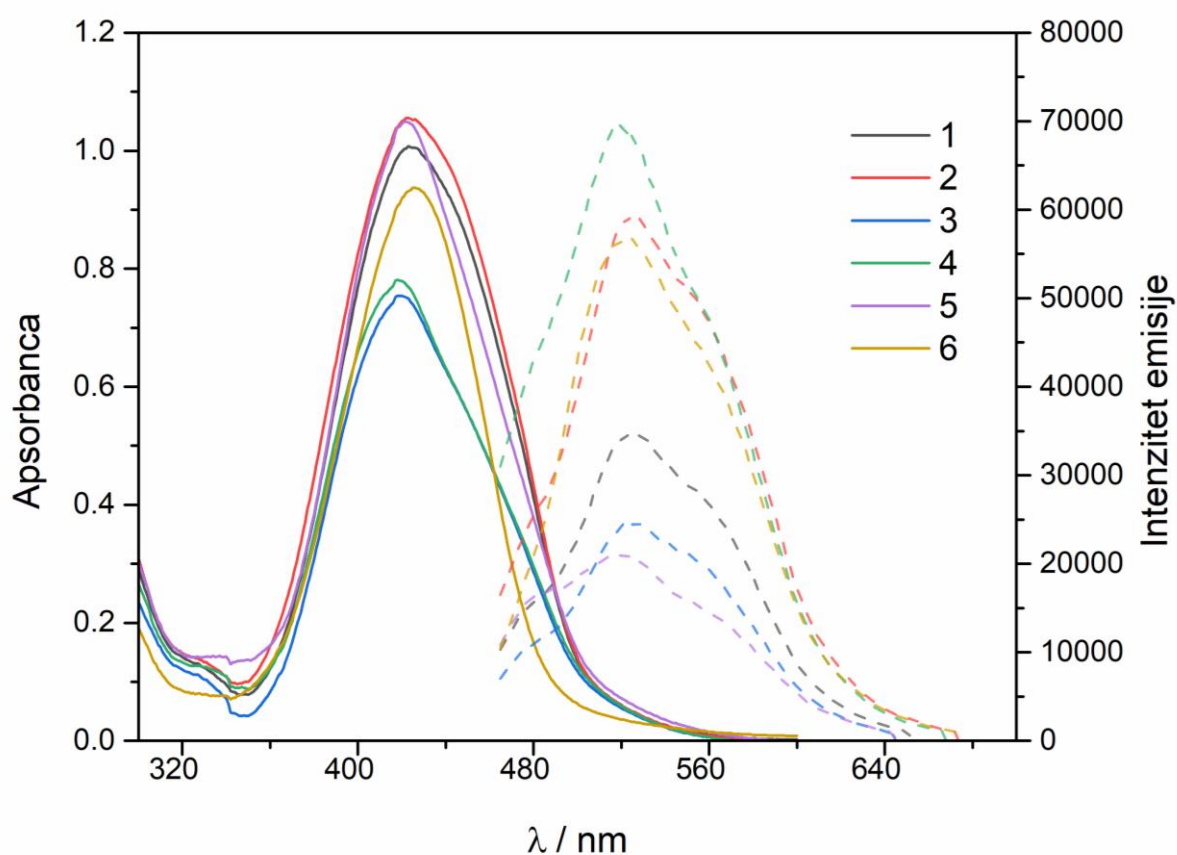
Rastvarač		1	2	3	4	5	6
Acetonitril	λ_{abs}	436	437	436	439	442	423
	λ_{em}	526	527	527	527	528	519
	$\Delta\lambda$	90	90	91	88	86	96
DMF	λ_{abs}	443	442	442	442	445	426
	λ_{em}	523	523	523	518	523	516
	$\Delta\lambda$	80	81	81	76	78	90
DMSO	λ_{abs}	442	443	443	444	447	427
	λ_{em}	530	530	530	527	531	522
	$\Delta\lambda$	88	87	87	83	84	95
Etanol	λ_{abs}	439	440	440	441	446	428
	λ_{em}	526	528	527	525	529	522
	$\Delta\lambda$	87	88	87	84	83	94
Hloroform	λ_{abs}	442	442	441	442	447	436
	λ_{em}	534	524	524	522	533	518
	$\Delta\lambda$	92	82	83	80	86	82

λ_{abs} – apsorpcioni maksimum; λ_{em} – emisioni maksimum; $\Delta\lambda$ – Stoksov pomeraj.

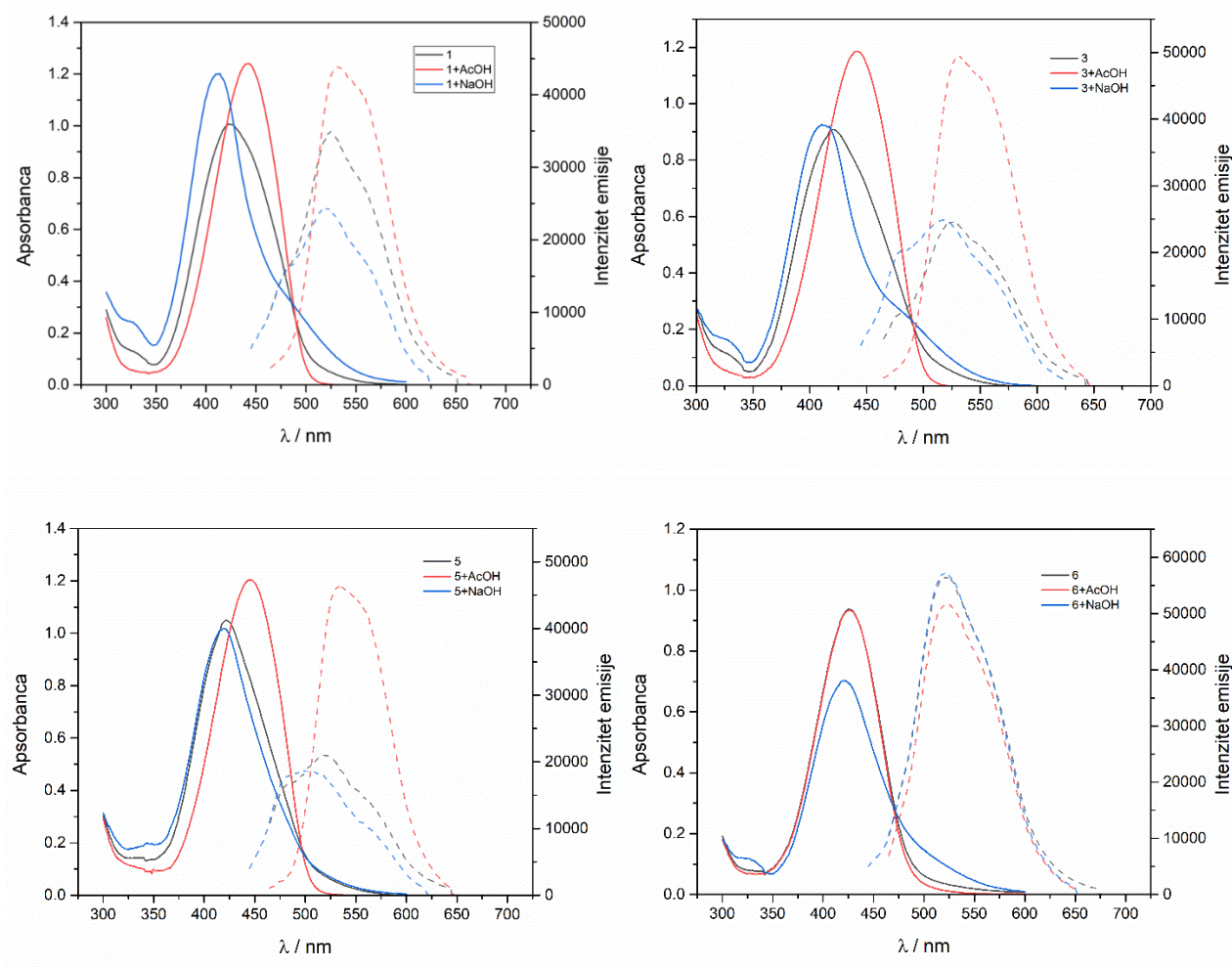
Slika 3.17. ApSORPCIONI I EMISIONI SPEKTRI **1–6** U ETANOLU

Na osnovu podataka prikazanih u tabeli 3.10 i optičkih spektara prikazanih na slici 3.17 uočava se da ispitivana jedinjenja imaju fluorescentna svojstva, a odgovarajući Stoksovi pomeraji se nalaze u opsegu od 76 do 96 nm. Takođe, kao što je prethodno diskutovano u UV-Vis spektralnoj analizi, supstituenti u položaju 1 piridonovog jezgra nemaju uticaja na položaj

emisionih maksimuma, dok amido-grupa u položaju 3 dovodi do hipsohromnog pomeranja kako apsorpcionih tako i emisionih spektara. Što se tiče uticaja rastvarača na emisione spektre boja, zapažen je sličan trend kao kod apsorpcionih spektara. Najveći uticaj rastvarača na emisione spektre zapažen je u DMF-u. Na slici 3.18 prikazani su apsorpcioni i emisioni spektri jedinjenja u DMF-u, i jasno se vidi da emisioni spektri imaju drugačiji oblik od spektara snimljenih u etanolu. Naime, kod svih snimljenih jedinjenja se uočava blago rame na spektrima u opsegu od 450 do 500 nm koje se može pripisati emisiji anjonskog oblika jedinjenja **1–6**, koji je favorizovan u DMF-u, u odnosu na druge rastvarače u kojima je dominantno zastupljen hidrazonski oblik. U cilju određivanja položaja apsorpcionih i emisionih maksimuma hidrazonskog i anjonskog oblika u DMF-u, u rastvore jedinjenja su dodavani sirćetna kiselina i NaOH. Na slici 3.19 prikazani su optički spektri jedinjenja **1, 3, 5 i 6** koji prikazuju ponašanje boja u datim uslovima.



Slika 3.18. Apsorpcioni i emisioni spektri jedinjenja **1–6** u DMF-u



Slika 3.19. Apsorpcioni i emisijski spektri jedinjenja **1**, **3**, **5** i **6** u DMF-u, DMF-u sa dodatkom sirćetne kiseline, DMF-u sa dodatkom NaOH

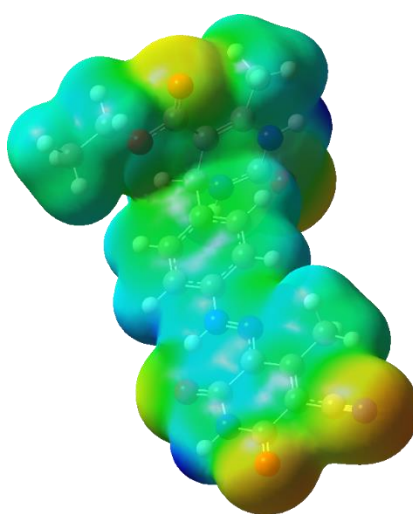
Prvo što se može zapaziti na slici 3.19 jeste da se jedinjenja **1**, **3** i **5** ponašaju slično dok se jedinjenje **6** ponaša drugačije od njih, u datim uslovima analize. Posmatrajući apsorpcione spektre boja **1**, **3** i **5** uočava se veća razlika u položaju maksimuma anjonskog (DMF+NaOH) i hidrazonskog oblika (DMF+AcOH) od oko 30 nm, dok je kod jedinjenja **6** ova razlika manja (oko 10 nm) i može ukazivati na manji udeo anjonskog oblika jedinjenja **6** u DMF-u.

Što se tiče emisijskih spektara, uočava se da dodatak kiseline u rastvor jedinjenja **1**, **3** i **5** favorizuje hidrazonski oblik čiji se maksimum emisije nalazi u oblasti od 518–523 nm. Sa druge strane, dodatak NaOH dovodi do povećanja intenziteta ramena u emisijskim spektrima, u opsegu od 450–500 nm, favorizujući anjonski oblik boja **1**, **3** i **5**. U slučaju boje **6**, dodatak sirćetne kiseline ne utiče na položaj emisijskog maksimuma, što se poklapa sa snimljenim apsorpcionim spektrima, i ukazuje da je kod jedinjenja **6** u DMF-u dominantan hidrazonski oblik, sa maksimumom intenziteta emisije na 516 nm. Dodatak NaOH nema značajan uticaj na emisijski spektar boje **6**, a prisustvo anjonskog oblika se identifikuje blagim ramenom na datom spektru. Sumirano, dodatak NaOH u rastvore DMF-a favorizuje anjonski oblik, čiji i apsorpcioni i emisijski spektri ispoljavaju hipsokromni pomerač u slučaju svih ispitanih jedinjenja.

Rezultati dobijeni analizom fotofizičkih svojstava ispitivanih jedinjenja ukazuju da je u rastvaračima dominantan hidrazonski oblik jedinjenja, dok se anjonski oblik pojavljuje u jako polarnim baznim rastvaračima. Najznačajniji uticaj rastvarača na ispitivana jedinjenja ima polarizabilnost, a najveći uticaj na položaj apsorpcionih maksimuma ima supstituent u položaju 3 piridonovog jezgra. Ispitivane boje **1–6** pokazuju fluorescentna svojstva što proširuje znanja o fluorescentnim azo bojama.

3.5.5. Analiza MEP mapa

Reaktivnost molekula **1–7** ispitana je pomoću MEP (molekularni elektrostatički potencijal) mapa dobijenih na osnovu B3LYP/6-311++G(d,p) optimizovanih geometrija, koje vizualizuju raspodelu elektronske gustine u molekulu. Na slici 3.20 prikazana je MEP mapa molekula **1**.



Slika 3.20. MEP mapa molekula **1** na B3LYP/6-311++G(d,p) optimizovanoj geometriji

Regije obojene crvenom ili narandžastom bojom predstavljaju mesta u molekulu najveće elektronske gustine, žuta boja označava slabo negativna mesta, zelena neutralna, svetlo plava slabo pozitivna, a tamno plava jako pozitivna mesta, odnosno mesta najmanje elektronske gustine [152]. Sa slike 3.20 se zaključuje da je najveća elektronska gustina u molekulu **1** skoncentrisana oko atoma kiseonika karbonilnih grupa piridona i cijano grupe, te su to moguća mesta za elektrofilni napad. Tamno plave regije u molekulu **1** nalaze se oko vodonikovih atoma –NH grupa DHPM prstena, tako da su to moguća mesta za nukleofilni napad. Slike MEP mapa molekula **2–7** i **7a** date su u prilogu (slika A7).

3.5.6. Analiza kvantno-hemijskih deskriptora

U procesu dizajniranja novih lekova, kvantno-hemijski proračuni mogu mnogo pomoći u proceni (re)aktivnosti molekula [153]. U ovakvim studijama izračunavaju se kvantno-hemijski molekularni deskriptori, koji se mogu korelisati sa potencijalnom biološkom aktivnošću posmatranog jedinjenja. Za ispitivane azo boje **1–7** izračunati su sledeći deskriptori: energija najviše popunjene molekulske orbitale (E_{HOMO}), energija najniže nepopunjene molekulske orbitale (E_{LUMO}), HOMO-LUMO razlika energija (E_{GAP}), energija jonizacije (I), afinitet elektrona (A), otpornost na transfer elektrona (η), polarizabilnost (σ , σ_o , S), elektronegativnost (χ),

hemijski potencijal (CP), indeks elektrofilnosti (ω), indeks nukleofilnosti (N) i naelektrisanje (ΔN_{max}). Izračunate vrednosti su dobijene u vodi (Prilog, tabela A1) i diskutovana je reaktivnost molekula u odnosu na svaki deskriptor.

Kvantno-hemijski deskriptori imaju različit uticaj na reaktivnost molekula [140,153]. Detaljnije, ako je E_{HOMO} vrednost visoka, molekul može lako da otpušta elektrone i tako uspostavlja interakciju sa ciljanim aktivnim mestom. Usled toga biološka aktivnost molekula raste sa porastom E_{HOMO} . Sa druge strane ukoliko je energija E_{LUMO} niska, molekul može lako da prima elektrone, te zbog toga biološka aktivnost raste sa opadanjem vrednosti E_{LUMO} . Velika vrednost HOMO-LUMO razlike energija ukazuje na nisku reaktivnost molekula [153,154]. Naime, molekuli sa nižim vrednostima E_{GAP} su reaktivniji jer se lakše polarizuju od molekula sa visokim E_{GAP} vrednostima [155]. Manja HOMO-LUMO razlika energija ne samo da je povezana sa većom aktivnošću molekula već može biti i u korelaciji sa boljim inhibitornim svojstvima [156]. Otpornost na transfer elektrona (engl. *chemical hardness*), η , se definiše kao otpor atoma prema prenosu naelektrisanja, odnosno deformacijama molekula [157]. Polarizabilnost (engl. *absolute softness* (σ), *optical softness* (σ_o) i *global softness* (S)) se opisuje kao kapacitet atoma ili grupe atoma da prime elektrone [158]. Otpornost na transfer elektrona i polarizabilnost su deskriptori koji se koriste za objašnjavanje stabilnosti molekula. Kako je η prema definiciji polovina vrednosti HOMO-LUMO razlike energija, tako se molekul smatra „tvrđim“ ukoliko je ta vrednost veća, i obrnuto „mekim“ ukoliko je vrednost manja [155]. Stoga reaktivnija jedinjenja imaju veće vrednosti σ , σ_o i S , a niže vrednosti η . Indeks elektrofilnosti, ω , i indeks nukleofilnosti, N , poredе sposobnost molekula da bude elektron-akceptor, odnosno elektron-donor. Sa povećanjem N i smanjenjem ω raste biološka aktivnost molekula [155]. Male vrednosti energije jonizacije, I , i veće vrednosti afiniteta prema elektronu, A , ukazuju na visoku reaktivnost atoma i molekula [159]. Hemijski potencijal, CP , se definiše kao srednja vrednost E_{HOMO} i E_{LUMO} , pa jedinjenja sa većim vrednostima hemijskog potencijala ispoljavaju veću aktivnost. Elektronegativnost je negativna vrednost hemijskog potencijala i označava se sa χ . Generalno, molekuli sa nižim vrednostima elektronegativnosti imaju veću tendenciju da otpuštaju elektrone i usled toga ispoljavaju višu aktivnost u poređenju sa molekulima koji imaju veće vrednosti χ [155]. Na kraju ΔN_{max} opisuje kapacitet naelektrisanja molekula [160], a biološka aktivnost raste sa većim vrednostima ΔN_{max} .

Izračunate vrednosti kvantno-hemijskih deskriptora molekula **1-7**, kao i **7a**, prikazane su u tabeli A1, date u Prilogu. Potencijalna biološka aktivnost ispitivanih jedinjenja u odnosu na dobijene vrednosti kvantno-hemijskih deskriptora data je u tabeli 3.11.

Rezultati prikazani u tabeli 3.11 pokazuju da ne postoji jedinstven redosled biološke aktivnosti u odnosu na izračunate deskriptore, ali da molekuli **7a** i **5** ipak pokazuju veću reaktivnost u odnosu na ostale molekule. Ovo je posledica strukture ova dva molekula, jer molekul **7a** ima najvišu E_{HOMO} vrednost, dok molekul boje **5** ima najnižu E_{LUMO} vrednost energije. Takođe, oba molekula **7a** i **5** imaju najnižu HOMO-LUMO razliku energija, te su u smislu ovog deskriptora, reaktivniji u odnosu na ostale ispitivane molekule. Što se tiče ostalih parametara **7a** ima najveću reaktivnost u korelaciji sa deskriptorima I , A , η , σ , σ_o , S , CP , ω , N i ΔN_{max} , dok molekul **5** pokazuje dobru reaktivnost u odnosu na deskriptor elektronegativnosti. Važno je naglasiti da vrednosti kvantno-hemijskih deskriptora pokazuju samo tendenciju biološke aktivnosti koja može biti promenjena u odnosu na određeni biološki sistem [153,155].

Tabela 3.11. Rangiranje biološke aktivnosti ispitivanih jedinjenja prema vrednostima izračunatih kvantno-hemijskih deskriptora

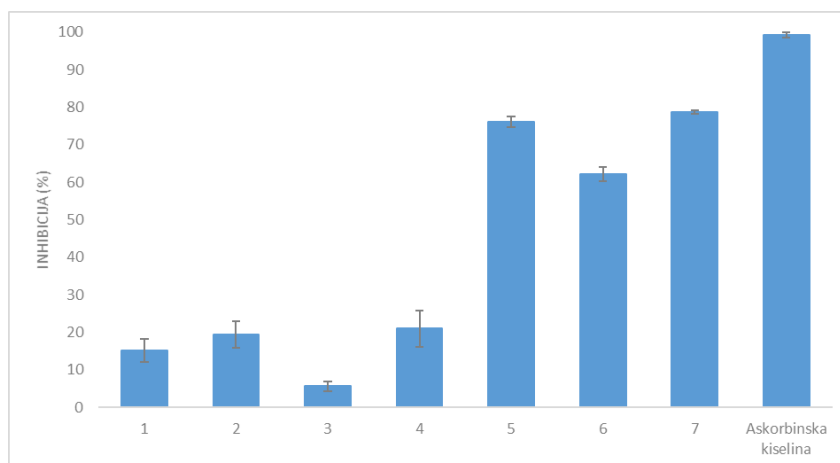
	Biološka aktivnost
Prema E_{HOMO}	7a > 6 > 3 > 2 > 4 > 1 > 5 > 7
Prema E_{LUMO}	5 > 7 > 1 > 4 > 2 > 3 > 6 > 7a
Prema E_{GAP}	7a > 5 > 1 > 4 = 2 > 3 > 6 = 7
Prema I	7a > 6 > 3 > 2 > 4 > 1 > 5 > 7
Prema A	7a > 6 > 3 > 2 > 4 > 7 > 1 > 5
Prema η	7a > 5 > 1 > 4 > 2 > 3 > 7 > 6
Prema σ, σ_o, S	7a > 5 > 1 > 2 > 4 > 3 > 6 > 7
Prema χ	5 > 7 > 1 > 4 > 2 > 3 > 6 > 7a
Prema CP	7a > 6 > 3 > 2 > 4 > 1 > 7 > 5
Prema $\omega, N, \Delta N_{max}$	7a > 6 > 3 > 2 > 4 > 7 > 1 > 5

3.6. Studija biološke aktivnosti

Biološka aktivnost sintetisanih jedinjenja **1–7** ispitana je eksperimentalnim *in vitro* metodama. Analizirana su antioksidativna, antimikrobna i antikancerogena aktivnost. Na kraju, u okviru, *in silico* testova, procenjeni su fizičko-hemijski i farmakokinetički parametri ispitivanih molekula.

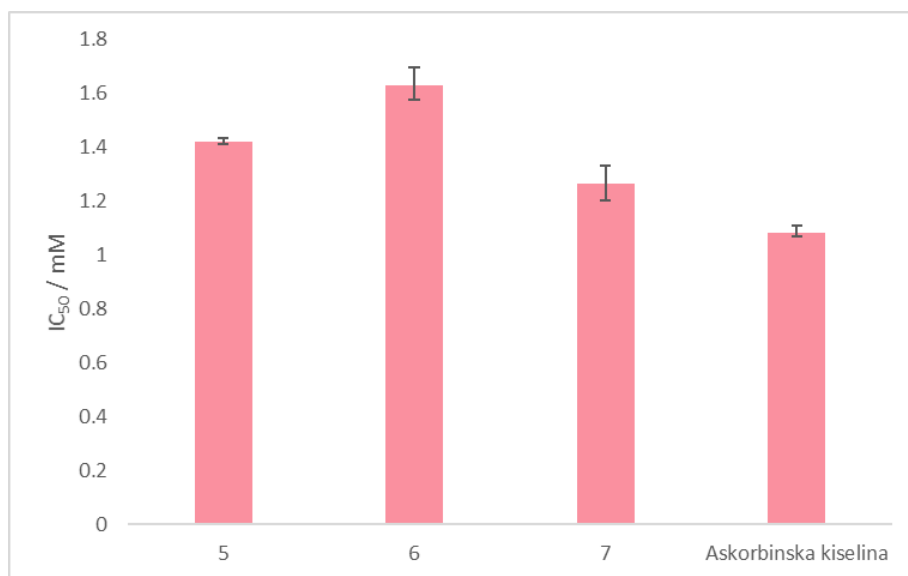
3.6.1. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativna svojstva ispitivanih jedinjenja **1–7** određena su korišćenjem ABTS testa prema proceduri opisanoj u odeljku 2.6. Antioksidativna aktivnost jedinjenja procenjena je u odnosu na antioksidativna svojstva askorbinske kiseline (slika 3.21, pod a). Dobijeni rezultati pokazuju da testirana jedinjenja imaju različita antioksidativna svojstva, odnosno da različiti supstituenti u piridonovom prstenu sintetisanih boja, različito utiču na njihovu antioksidativnu aktivnost. Tako 3-piridinijum (**7**) i 4-fenil (**5**) supstituisane boje pokazuju odličnu (78,7% i 76,1%), a 3-amido supstituisana boja (**6**) dobru (62,2%) aktivnost pri "hvatanju" (engl. *scavenging*) ABTS^{•+} radikal-katjona. Sa druge strane 3-cijano derivati, supstituisani u položaju 1-piridonovog prstena (**2–4**) su, kao i nesupstituisana boja (**1**) pokazali slaba antioksidativna svojstva.



Slika 3.21. a) Antioksidativna svojstva ispitanih jedinjenja

Zbog toga je dalje ispitivanje urađeno za boje **5**, **6** i **7**, određivanjem njihove IC_{50} vrednosti, odnosno koncentracije koja inhibira 50% ABTS radikala u rastvoru (slika 3.21, pod b). Generalno, visoke IC_{50} vrednosti ukazuju na nisku aktivnost. Prema tome redosled aktivnosti boja je **7** > **5** > **6**. Gde jedinjenje **7** pokazuje najbolju inhibiciju ABTS radikala ($IC_{50} = 1,3$ mM) u poređenju sa askorbinskom kiselinom ($IC_{50} = 1,1$ mM).



Slika 3.21. b) IC_{50} vrednosti dobijene za ispitana jedinjenja

3.6.2. Antimikrobna aktivnost

U cilju ispitivanja antimikrobnog dejstva jedinjenja **1–7** sproveden je test antimikrobne aktivnosti metodom difuzije na agarnoj podlozi kako je opisano u poglavlju 2.7. Antimikrobna svojstva su ispitana prema patogenim sojevima *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitivna bakterija), *Escherichia coli* (Gram-negativna bakterija) i *Candida albicans* (oportunistička gljivica). U tabeli 3.12 su prikazani dobijeni rezultati, odnosno izmerene zone inhibicije u odnosu na kontrolni uzorak. Prečnik zone smanjenog rasta, odnosno inhibicije određen je u milimetrima i na osnovu obrazovanih prečnika ustanovljena je antimikrobna aktivnost jedinjenja.

Tabela 3.12. Antimikrobna aktivnost boja **1–7**

Jedinjenje ^a	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
prečnik zone inhibicije [mm]			
1	-	-	-
2	-	-	-
3	11	-	-
4	-	-	-
5	-	-	10
6	-	-	-
7	-	-	-
Kontrola^b	-	-	-

^amasa jedinjenja po bunarčiću je 12,5 µg; ^bkontrolni bunarčić u koji je unešen samo DMSO.

Rezultati u Tabeli 3.12 pokazuju da su ispitani patogeni bakterijski sojevi rezistentni na dejstvo jedinjenja u primenjenim koncentracijama, osim u slučaju jedinjenja **3** koje ispoljava blagu antimikrobnu aktivnost prema soju *S. aureus*. Soj patogene gljivice *C. albicans* blago je osetljiv na dejstvo jedinjenja **5**, dok je na dejstvo drugih jedinjenja rezistentan.

3.6.3. Citotoksična aktivnost

Citotoksična aktivnost jedinjenja **1–7** i Bidinelijevog adukta **B2** ispitana je prema humanim malignim ćelijskim linijama, kao i prema humanim normalnim fibroblastima pluća primenom MTT metode, kako je opisano u poglavlju 2.8. Kao standardni lek u testu je korišćen cisplatin. Dobijene IC₅₀ vrednosti, koje predstavljaju koncentraciju jedinjenja koja inhibira ćelijsko preživljavanje za 50%, prikazane su u tabeli 3.13.

Tabela 3.13. Rezultati analize citotoksične aktivnosti jedinjenja **1–7** i **B2**

	PC-3 ^b	A549 ^b	K562 ^b	MRC-5 ^b
	IC ₅₀ ^a (µM) ± SD			
1	182,12±1,75	>200	191,50±12,02	179,64±11,05
2	174,60±1,12	>200	144,80±0,55	≈200
3	147,89±5,24	>200	41,75±1,54	42,49±1,70
4	194,41±9,18	>200	193,32±6,66	194,56±9,43
5	48,98±1,59	85,16±6,03	24,97±0,05	91,11±5,33
6	163,21±0,97	197,82±3,09	55,40±3,56	23,60±1,15
7	181,31±9,35	191,14±12,54	133,45±4,99	176,26±3,70
B2	169,53±5,34	>200	149,10±9,53	153,66±7,26
CDDP^c	12,29 ± 1,60	12,74 ± 1,26	5,90±0,59	5,74±0,48

^aCitotoksičnost izražena kroz IC₅₀ vrednost za svaku ćelijsku liniju – koncentracija jedinjenja koja smanjuje preživljavanje tretiranih ćelija za 50%, u odnosu na uzorak netretiranih ćelija; ^bTestirane ćelijske linije PC-3 (humani adenokarcinom prostate), A549 (karcinom pluća), K562 (hronična mijeloidna leukemija), MRC-5 (humani normalni fibroblasti pluća). ^cCisplatin – standardni referentni lek.

Rezultati ispitivanja citotoksičnosti jedinjenja prema humanim malignim ćelijskim linijama su pokazali da sva testirana jedinjenja ispoljavaju koncentraciono-zavisnu citotoksičnu aktivnost. IC₅₀ vrednosti jedinjenja prema PC-3 ćelijama adenokarcinoma prostate bile su u opsegu od 48,98 µM do 194,41 µM. PC-3 ćelije su bile najosetljivije na citotoksično dejstvo jedinjenja **5** (IC₅₀ vrednost od 48,98 µM). U slučaju citotoksičnog dejstva jedinjenja prema K562 ćelijama hronične mijeloidne leukemije, dobijene IC₅₀ vrednosti kretale su se u opsegu od 24,97 µM do 193,32 µM. Najviši intenzitet citotoksičnog dejstva prema K562 ćelijama su pokazala dva jedinjenja: jedinjenje **5** (IC₅₀ vrednost od 24,97 µM) i jedinjenje **3** (IC₅₀ vrednost od 41,75 µM). Testirana jedinjenja su ispoljila slabiji intenzitet citotoksičnog dejstva prema A549 ćelijama adenokarcinoma pluća u odnosu na intenzitet dejstva prema PC-3 i K562 malignim ćelijama. A549 ćelije su bile najosetljivije na citotoksično dejstvo jedinjenja **5** (IC₅₀ vrednost od 85,16 µM).

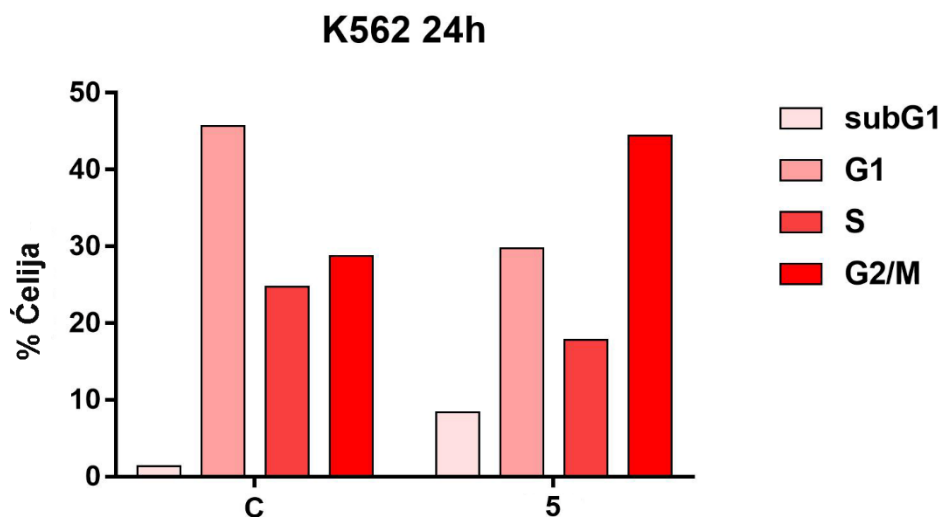
Sva ispitivana jedinjenja ispoljila su citotoksičnost i prema humanim normalnim fibroblastima pluća MRC-5, pri čemu su dobijene IC₅₀ vrednosti bile u opsegu od 26,60 µM do 194,56 µM. Sve tri testirane maligne ćelijske linije su bile najosetljivije na citotoksično dejstvo jedinjenja **5**. Jedinjenje **5** je pokazalo i selektivnost u citotoksičnom dejstvu prema K562 i PC-3 malignim ćelijskim linijama, u odnosu na citotoksično dejstvo prema humanim normalnim fibroblastima pluća MRC-5.

Takođe, u Tabeli 3.13 se može videti da Biđinelijev adukt **B2** ispoljava nisku citotoksičnost prema svim ispitanim malignim ćelijskim linijama kao i prema normalnim ćelijama. Prema tome dobijeni rezultati ukazuju da citotoksična aktivnost ispitivanih boja zavisi od strukture piridona. Dalje, zapaženo je da fenil-grupa, u položaju C4 piridonovog prstena, u strukturi boje **5** značajno doprinosi citotoksičnoj aktivnosti prema svim ispitanim malignim ćelijskim linijama. Stoga obećavajuće antikancerogeno dejstvo jedinjenja **5** predstavlja dobru polaznu tačku za dalju strukturnu optimizaciju heterocikličnih azo molekula. Kako bi se rasvetlio mehanizam citotoksičnog dejstva jedinjenja **5** urađena je analiza faza ćelijskog ciklusa K562 ćelija koje su tretirane ovim derivatom.

3.6.4. Analiza faza ćelijskog ciklusa

Ćelijski ciklus (ciklus mitotičke ćelijske deobe) predstavlja uređeni niz uzastopnih faza koje se događaju tokom ćelijske deobe [161]. U ovom procesu DNK materijal ćelije se duplira i vrši se njegova distribucija u novonastale ćerke ćelije. Ćelijski ciklus se sastoji iz G1 (postmitotička interfaza), S (faza sinteze DNK), G2 (postsintetička interfaza) i M (mitoza) faza. Replikacija DNK se odvija u S fazi, dok se u M fazi replicirana DNK distribuira u nove ćelije. Između M i S faze je G1 faza, gde se sintetišu proteini, ugljeni hidrati i lipidi neophodni za ćelijski rast. Između S i M faze je G2 faza koja kratko traje i u njoj se sintetišu proteini neophodni za mitozu. Ćelije u G1 fazi imaju normalan sadržaj DNK, dok u G2 fazi imaju duplirani sadržaj DNK. G1 i G2 faze kontrolišu tok ćelijske deobe i glavne kontrolne tačke ćelijskog ciklusa su na prelazu G1 u S fazu i G2 u M fazu. Kod malignih ćelija dolazi do poremećaja u ćelijskoj deobi i kontrolnim tačkama ćelijskog ciklusa, kao i do odsustva ćelijske smrti. Ćelije mogu u različitim fazama ćelijskog ciklusa imati različitu osetljivost na dejstvo citotoksičnog leka. Zbog toga je važno ispitati mehanizam citotoksičnog dejstva potencijalnog leka na faze ćelijskog ciklusa [162].

Kako bi se rasvetlilo citotoksično dejstvo jedinjenja **5** ispitan je njegov efekat na faze ćelijskog ciklusa K562 ćelija humane mijeloide leukemije. K562 ćelije tretirane su sa koncentracijom $2IC_{50}$ jedinjenja **5** u toku 24 sata. Na slici 3.22 prikazana je distribucija faza ćelijskog ciklusa nakon 24 sata. Rezultati pokazuju da nakon 24 časa dolazi do povećanja procenta ciljanih K562 ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa u odnosu na procenat kontrolnog uzorka K562 ćelija u subG1 fazi. Ovo povećanje praćeno je procentualnim povećanjem ciljanih K562 ćelija u G2/M fazi. Populacija ćelija u subG1 fazi predstavlja mrtve ćelije sa smanjenim sadržajem DNK, što znači da procentualni porast ćelija u ovoj fazi ćelijskog ciklusa ukazuje na sposobnost jedinjenja **5** da indukuje apoptozu u tretiranim ćelijama. Zaustavljanje ćelijskog ciklusa u G2/M fazi moglo bi biti posledica inhibicije ćelija da uđu u fazu mitoze u kontrolnoj tački G2/M ili inhibicije ćelijskoj preživljavanja zaustavljanjem mitoze. Ove promene ćelijskog ciklusa praćene su smanjenjem procenta K562 ćelija u G1 i S fazi. Smanjenja populacija ćelija K562 u ovim fazama može biti uzrokovana citotoksičnim dejstvom jedinjenja **5** koje izaziva povećanu osetljivost ćelija tokom tih faza ćelijskog ciklusa [161,162]. Ova analiza pokazuje da ispitivano jedinjenje **5** dovodi do apoptotskih promena u distribuciji ćelijskog ciklusa i značajnog nagomilavanja ćelija u subG1 fazi.



Slika 3.22. Efekat jedinjenja 5 na distribuciju ćelijskog ciklusa K562 ćelija

3.6.5. *In silico* analiza fizičko-hemijskih i ADME parametara

In silico modeli za predviđanje fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih parametara imaju značajnu ulogu u otkrivanju i razvoju novih jedinjenja sa terapeutskim svojstvima. U procesu dizajniranja farmakološki aktivnih jedinjenja posebno je značajna procena njihovih fizičko-hemijskih i ADME (oralna apsorpcija, distribucija, metanolizam, ekskrecija) parametara [163].

In silico analiza molekula **1–7**, kao i strukture **7a** urađena je pomoću SwissADME i Vega 22 verzija 2.4 programa kako je opisano u odeljku 2.10 eksperimentalnog dela.

Fizičko-hemijski parametri molekula evaluirani su u skladu sa empirijskim pravilom broja 5 po Lipinskom (engl. *Lipinski's rule of 5 – Ro5*) [52]. Prema ovom pravilu oralno aktivno jedinjenje treba da zadovoljava sledeće kriterijume: i) molekulska masa je manja od 500; ii) broj donora vodonične veze nije veći od 5 (N–H i O–H grupe); iii) broj akceptora vodonične veze je najviše 10 (akceptori su svi N i O atomi); iv) lipofilnost (logaritamska vrednost particionog koeficijenta oktanol/voda – logP) je manja od 5. Ukoliko jedinjenje ne ispunjava 2 ili više navedenih kriterijuma pretpostavlja se da ima slabu oralnu apsorpciju, odnosno da nije oralno aktivno [164]. Dobijene vrednosti fizičko-hemijskih parametara molekula **1–7** i **7a** prikazane su u tabeli 3.14.

Table 3.14. Fizičko-hemijski deskriptori izračunati pomoću SwissADME alata

Molekul	HBD ^a	HBA ^b	M logP ^c	MW ^d	Ro5 ^e	%ABS ^g	Rot. veze ^g
1	4	7	0,37	436,42	Da	53,19	6
2	4	8	0,05	480,47	Da	49,24	8
3	3	7	1,01	478,50	Da	56,22	8
4	3	7	1,68	512,52	Ne	56,22	7
5	4	7	1,21	498,49	Da	53,19	7
6	5	7	0,02	454,44	Da	46,53	7
7	4	6	1,08	489,50	Da	60,05	7
7a	3	7	1,08	488,50	Da	64,21	7

^aBroj donora vodonične veze; ^bBroj akceptora vodonične veze; ^cLogaritamska vrednost particionog koeficijenta P; ^dMolekulska masa; ^ePravilo broja 5; ^fBroj rotirajućih veza.

Na osnovu podataka prikazanih u tabeli 3.14, sva ispitana jedinjenja, izuzev jedinjenja **4** ispunjavaju kriterijume za oralno aktivna jedinjenja. Jedinjenje **4** ne ispunjava dva kriterijuma "pravila broja 5", odnosno molekulska masa jedinjenja je veća od 500 i ukupan broj N i O atoma je veći od 10, te se smatra oralno neaktivnim prema navedenim kriterijumima. Procenat oralne apsorpcije ispitivanih jedinjenja izračunat je prema jednačini iz literature [163]. Dobijene vrednosti se kreću od 46,53–64,21% što ukazuje da sintetisana jedinjenja imaju odgovarajuću propustljivost kroz ćelijske membrane i dobru bioraspoloživost. Takođe, parameter koji je značajan za predikciju farmakološke aktivnosti je broj rotirajućih veza u molekulu. Ukoliko je taj broj veći od 10, molekul ima veliku konformacionu fleksibilnost što može otežavati vezivanje za biološki aktivno mesto [165]. Broj rotirajućih veza kod ispitivanih molekula se kreće u opsegu od 6 do 8 što potvrđuje da molekuli imaju odgovarajuću fleksibilnost.

Farmakokinetički parametri, kao što su propustljivost kroz krvno-moždanu barijeru (engl. *blood brain barrier, BBB*), sposobnost jedinjenja da bude P-gp (P-glikoprotein, glikoprotein permeabilnosti) supstrat i CYP (citohrom enzimi) inhibitor, dobijeni u SwissADME proračunu (Prilog, tabela A2). Ispitana jedinjenja nemaju sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru čime se sperečava dejstvo na centralni nervni sistem [163]. P-gp ima ključnu ulogu u transportu i izlučivanju supstrata kroz celularne membrane, i zajedno sa CYP enzimima učestvuje u procesima ekskrecije [163]. Sva ispitana jedinjenja pokazala su svojstvo da budu P-gp supstrat, osim jedinjenja **7**. Ispitana jedinjenja **3** i **4** pokazala su svojstva inhibitora CYP2C9 enzima, dok ostali derivati ne ispoljavaju inhibitornu aktivnost prema ovoj grupi enzima.

Sa strane medicinske hemije, analizirani su strukturne smetnje PAINS (engl. *pan assay interference structures*) i sintetska pristupačnost molekulima. PAINS rezultati se odnose na jedinjenja koja greškom daju pozitivne rezultate u farmakološkim studijama. Naime, ako molekuli u strukturi imaju funkcionalne grupe koje se mogu vezati za brojna aktivna mesta u biološkom sistemu, pri čemu se ne vezuju specifično za jedno ciljano mesto, onda se smatra da nemaju odgovarajuću biološku aktivnost [166]. U ovoj studiji samo je boja **7** ispoljila mogućnost strukturnih smetnji. Rezultati koji proračunavaju sintetsku pristupačnost molekulima pokazali su da se ocene za jedinjenja **1–7** kreću od 4,66 do 5,02 (na skali od 1 do 10) ukazujući na njihovu relativno pristupačno sintetisanje.

Kako SwissADME alat koristi 2D molekulske strukture za izračunavanje fizičko-hemijskih parametara, urađen je i proračun pomoću Vega 22 programa koji koristi 3D molekulske strukture optimizovanih geometrija za definisanje pomenutih parametara. Izračunati su sledeći fizičko-hemijski deskriptori: lipofilnost (logaritamska vrednost particionog koeficijenta po Broto-u, lipol i logaritamska vrednost virtuelnog particionog koeficijenta), polarna i nepolarna površina molekula, molekulska rotacioni radijus, zapremina molekula i molekulska ovalnost (odnos stvarne i minimalne površine molekula). Vrednosti ovih parametara za molekule **1–7** i **7a** date su u Prilogu u tabeli A3. Imajući u vidu da lipofilnost molekula značajno utiče na farmakodinamička svojstva jedinjenja, odnosno na njegovu apsorpciju, distribuciju, metabolizam i ekskreciju može se zaključiti da svi ispitani molekuli zadovoljavaju osnovno svojstvo za oralno aktivna jedinjenja, a to je $\log P < 5$ [167]. Zbog toga se ispitivani molekuli mogu kandidovati za razvoj potencijalnih novih lekova.

Zaključak

U ovoj doktorskoj disertaciji sintetisana je nova serija azo boja na bazi 3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-ona i različito supstituisanih 2-piridona. Sinteza pojedinih derivata 3-cijano-2-piridona ispitana je metodom kontinualnog protoka u kapilarnom mikroreaktoru. Amino analog DHPM-a, upotrebljen za dobijanje novih azo derivata sintetisan je pod blagim reakcionim uslovima, redukcijom nitro DHPM-a koji se dobija u Biđinelijevoj reakciji. Nove azo boje su sintetisane u reakciji diazo-kuplovanja polazeći iz amino derivata dihidropirimidiona, kao komponente za diazotovanje i različito supstituisanih 2-piridona, kao kuplujuće komponente. Struktura novosintetisanih azo derivata, kao i azo hidrazon-tautomerija detaljno su analizirani eksperimentalnim podacima i teorijskim proračunima. Biološka aktivnost azo jedinjenja je određena eksperimentalnim *in vitro* i *in silico* testovima.

Na osnovu dobijenih rezultata, izvedeni su sledeći zaključci:

- Sinteza metodom kontinualnog protoka u kapilarnom mikroreaktoru, na sobnoj temperaturi je efikasna za dobijanje 3-cijano-6-hidroksi-4-metil-2-piridona i 3-cijano-4,6-dimetil-2-piridona, koji su izolovani u visokom stepenu čistoće i dobrom prinosu nakon 8 minuta.
- Redukcijom nitro Biđinelijevog adukta, amonijum-hloridom i cinkom, omogućena je jednostavna sinteza amino analoga DHPM-a, pogodnog za diazotovanje.
- Kuplovanjem različitih 2-piridona sa diazotovanim DHPM-om dobijeno je sedam novih heterocikličnih azo boja.
- ATR-FTIR i NMR spektralna analiza boja **1–6** potvrđuje postojanje hidrazon tautomernog oblika u čvrstom stanju, kao i u rastvoru DMSO-*d*₆.
- ATR-FTIR i NMR podaci jedinjenja **7** ukazuju na postojanje deprotonovanog hidrazonskog oblika (dipol-jona – **7a**) u čvrstom stanju, kao i u rastvoru DMSO-*d*₆, a prisustvo hidrazon tautomera je zabeleženo snimanjem NMR spektara u deuterisanoj trifluorsirćetnoj kiselini.
- Termička analiza pokazala je da su ispitivane boje stabilne i bez promene u strukturi do 250 °C, što ukazuje na njihova odlična termička svojstva.
- Izračunate energije mogućih tautomernih oblika, u okviru konformacione analize, potvrđuju da je najstabilniji oblik ispitivanih azo boja **1–6** hidrazon tautomer, a boje **7** deprotonovani hidrazonski oblik, odnosno dipol-jon **7a**.
- Dobra korelacija izračunatih FT-IR i NMR spektara sa eksperimentalnim podacima potvrdila je strukturu hidrazon tautomernog oblika.
- UV-Vis spektralna analiza u etanolu je pokazala da dominantna apsorpciona traka, kod svih analiziranih jedinjenja, odgovara $\pi-\pi^*$ prelazu hidrazon tautomernog oblika, odnosno prelazu iz HOMO u LUMO orbitalu.
- Analizom graničnih molekulskih orbitala je ustanovljeno da su HOMO i LUMO orbitale molekula **1–6** i **7a** distribuirane preko planarnog dela molekula, i da DHPM prsten nema značajni udeo u transferu naelektrisanja. Značajna pomeranja elektronske gustine dešavaju se između orbitala koje se prostiru u istoj ravni, odnosno između fenilnog prstena, hidrazon fragmenta i piridonovog prstena.
- Uticaj promene pH vrednosti na UV-Vis apsorpcione spektre boja ispitan je dodavanjem kiseline, odnosno natrijum-hidroksida u rastvore boja i etanola. Dodatak kiseline ne utiče na položaj apsorpcionih maksimuma UV-Vis spektara, što potvrđuje prisustvo hidrazon tautomernog oblika. Sa druge strane dodatak NaOH utiče na hipsokromno pomeranje apsorpcionih maksimuma ukazujući da se anjonski oblik jedinjenja pojavljuje na nižim talasnim dužinama, što je potvrđeno i DFT proračunom.

- Ispitivanjem uticaja različitih supstituenata u piridonovom prstenu na položaj UV-Vis apsorpcionih maksimuma, u etanolu, ustanovljeno je da kod jedinjenja **1–4** različiti supstituenti u položaju 1 ne utiču na položaj apsorpcionih maksimuma. Kod jedinjenja **5**, fenilna grupa u položaju 4 piridonovog jezgra doprinosi batohromnim pomeranjima, a kod jedinjenja **6 i 7**, amido-grupa (**6**) i piridinijum-grupa (**7**) doprinose hipsohromnim pomeranjima apsorpcionih maksimuma, u odnosu na jedinjenje **1**.
- Uticaj specifičnih i nespecifičnih interakcija rastvarača sa molekulima boja na položaje apsorpcionih maksimuma analiziran je linearnim korelacijama solvatohromnih energija, pomoću Katalanovog modela. Dobijeni rezultati regresione analize pokazuju da najdominantniji efekat na solvatohromizam jedinjenja ima polarizabilnost rastvarača. Najznačajniji efekat na poziciju apsorpcionih maksimuma u svim analiziranim rastvaračima ima supstituent u položaju 3 piridonovog prstena.
- Analizom emisionih spektara boja **1–6**, u pet različitih rastvarača, pokazano je da sve analizirane boje imaju fluorescentna svojstva i da je u proučavanim rastvorima dominantan hidrazonski oblik jedinjenja.
- UV-Vis i fluorescentna analiza u DMF-u pokazuju da je u ovom rastvaraču dominantan anjonski oblik jedinjenja, koji dovodi do hipsohromnih pomeraja apsorpcionih i emisionih traka svih ispitanih jedinjenja.
- Proračunom kvantno-hemijskih molekularskih deskriptora pokazano je da molekuli boja **5 i 7a** pokazuju najveći potencijal za biološku aktivnost.
- Antioksidativna svojstva jedinjenja su ispitana ABTS testom, a dobijeni rezultati su pokazali da jedinjenja **7 i 5** imaju odličnu (78,7% i 76,1%), a jedinjenje **6** dobru (62,2%) sposobnost inhibicije ABTS^{•+} radikal-katjona. Određivanjem koncentracije koja inhibira 50% ABTS^{•+} radikal-katjona u rastvoru, ustanovljen je redosled antioksidativne aktivnosti boja: **7 > 5 > 6**.
- Rezultati antimikrobnog testa pokazali su da su ispitani patogeni bakterijski sojevi uglavnom rezistentni na dejstvo primenjenih jedinjenja, osim što je jedinjenje **3** pokazalo blagu inhibiciju prema soju *S. aureus*. Slično, aktivnost je utvrđena i prema soju patogene gljivice *C. albicans*, gde je samo jedinjenje **5** pokazalo blagu antimikrobnu aktivnost.
- Proučavanje antikancerogenih svojstava ispitivanih jedinjenja **1–7 i B2** sprovedeno je na humanim malignim ćelijskim linijama: PC-3 (adenokarcinom prostate), A549 (karcinom pluća), K562 (hronična mijeloidna leukemija), koristeći MTT test. Citotoksičnost novih azo derivata određena je i prema humanim normalnim fibroblastima pluća MRC-5, u cilju određivanja selektivnosti u citotoksičnom delovanju. Dobijeni rezultati su pokazali da sva testirana jedinjenja ispoljavaju koncentraciono-zavisnu citotoksičnu aktivnost. PC-3 ćelije su bile najosetljivije na citotoksično dejstvo jedinjenja **5** (IC₅₀ vrednost od 48,98 μM). Najviši intenzitet citotoksičnog dejstva prema K562 ćelijama su pokazala dva jedinjenja: jedinjenje **5** (IC₅₀ vrednost od 24,97 μM) i jedinjenje **3** (IC₅₀ vrednost od 41,75 μM). Testirana jedinjenja su ispoljila slabiji intenzitet citotoksičnog dejstva prema A549 ćelijama adenokarcinoma pluća u odnosu na intenzitet dejstva prema PC-3 i K562 malignim ćelijama. A549 ćelije su bile najosetljivije na citotoksično dejstvo jedinjenja **5** (IC₅₀ vrednost od 85,16 μM). Jedinjenje **5** je pokazalo i selektivnost u citotoksičnom dejstvu prema K562 i PC-3 malignim ćelijskim linijama, u odnosu na citotoksično dejstvo prema humanim normalnim fibroblastima pluća MRC-5.
- Biđinelijev adukt **B2** je ispoljio nisku citotoksičnost prema svim ispitanim malignim ćelijskim linijama kao i prema normalnim ćelijama. Stoga dobijeni rezultati ukazuju da citotoksična aktivnost ispitivanih boja zavisi od strukture piridona.
- Jedinjenje **5** je ispoljilo najznačajnije citotoksično dejstvo prema K562 ćelijama humane mijeloidne leukemije, te je u cilju rasvetljenja mehanizma njegovog citotoksičnog

delovanja ispitan efekat ovog derivata na na faze ćelijskog ciklusa K562 ćelija. Ova analiza je ukazala na sposobnost azo derivata **5** da indukuje apoptozu u tretiranim ćelijama, što dovodi do značajnog nagomilavanja ćelija u subG1 fazi.

- Pomoću *in silico* metoda izračunati su fizičko-hemijski deskriptori, koji su korelisani sa empirijskim kriterijumom za oralno aktivna jedinjenja. Sva ispitana jedinjenja, izuzev jedinjenja **4** ispunila su kriterijume za oralno aktivna jedinjenja. Na osnovu izračunatih vrednosti oralne apsorpcije predviđa se da sintetisana jedinjenja imaju odgovarajuću propustljivost kroz ćelijske membrane i dobru bioraspoloživost. Rezultati dobijeni analizom farmakokinetičkih parametara ukazuju da analizirani molekuli nemaju sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru, čime se sperčava dejstvo na centralni nervni sistem. Zbog svega navedenog proučavani azo derivati mogu biti kandidati za razvoj potencijalnih novih lekova.

Literatura

1. Ji Ram V, Sethi A, Nath M, Pratap R. The Chemistry of Heterocycles, Chemistry of Six-to-Eight-Membered N, O, S, P and Se Heterocycles. Chapter 2 - Six-Membered Heterocycles. Elsevier, 2019, p. 3–391.
2. Penfold BR. The electron distribution in crystalline α -pyridone. *Acta Crystallogr* 1953;6:591–600.
3. Li Q, Mitscher LA, Shen LL. The 2-pyridone antibacterial agents: bacterial topoisomerase inhibitors. *Med Res Rev* 2000;20:231–93.
4. Fujita Y, Oguri H, Oikawa H. Biosynthetic studies on the antibiotics PF1140: a novel pathway for a 2-pyridone framework. *Tetrahedron Lett* 2005;46:5885–8.
5. Fassihi A, Abedi D, Saghaie L, Sabet R, Fazeli H, Bostaki G, et al. Synthesis, antimicrobial evaluation and QSAR study of some 3-hydroxypyridine-4-one and 3-hydroxypyran-4-one derivatives. *Eur J Med Chem* 2009;44:2145–57.
6. Semple G, Andersson B-M, Chhajlani V, Georgsson J, Johansson MJ, Rosenquist Å, et al. Synthesis and Biological activity of kappa opioid receptor agonists. Part 2: Preparation of 3-aryl-2-pyridone analogues generated by solution- and solid-phase parallel synthesis methods. *Bioorg Med Chem Lett* 2003;13:1141–5.
7. Parreira RLT, Abrahão O, Galembeck SE. Conformational preferences of non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Tetrahedron* 2001;57:3243–53.
8. Dragovich PS, Prins TJ, Zhou R, Brown EL, Maldonado FC, Fuhrman SA, et al. Structure-Based Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Irreversible Human Rhinovirus 3C Protease Inhibitors. 6. Structure–Activity Studies of Orally Bioavailable, 2-Pyridone-Containing Peptidomimetics. *J Med Chem* 2002;45:1607–23.
9. Hasvold LA, Wang W, Gwaltney Stephen L., Rockway TW, Nelson LTJ, Mantei RA, et al. Pyridone-Containing farnesyltransferase inhibitors: synthesis and biological evaluation. *Bioorg Med Chem Lett* 2003;13:4001–5.
10. Mijin DZ, Baghbanzadeh M, Reidlinger C, Oliver Kappe C. The microwave-assisted synthesis of 5-aryloxy-4,6-disubstituted-3-cyano-2-pyridone dyes. *Dyes Pigments* 2010;85:73–8.
11. Li L-N, Wang L, Cheng Y-N, Cao Z-Q, Zhang X-K, Guo X-L. Discovery and Characterization of 4-Hydroxy-2-pyridone Derivative Sambutoxin as a Potent and Promising Anticancer Drug Candidate: Activity and Molecular Mechanism. *Mol Pharm* 2018;15:4898–911.
12. Forrestall KL, Burley DE, Cash MK, Pottie IR, Darvesh S. 2-Pyridone natural products as inhibitors of SARS-CoV-2 main protease. *Chem Biol Interact* 2021;335:109348.
13. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> (pristupljeno u maju 2021.)
14. <https://www.sciencedirect.com/search?q=2-pyridone%20synthesis> (pristupljeno u maju 2021.)
15. Torres M, Gil S, Parra M. New Synthetic Methods to 2-Pyridone Rings. *Curr Org Chem* 2005;9:1757–79.
16. Fernando SRL, Maharroof USM, Deshayes KD, Kinstle TH, Ogawa MY. A Negative Activation Energy for Luminescence Decay: Specific Solvation Effects on the Emission Properties of Bis(2,2'-bipyridine)(3,5-dicarboxy-2,2'-bipyridine)ruthenium(II) Chloride. *J Am Chem Soc* 1996;118:5783–90.
17. Sutherland A, Gallagher T. Versatile Synthesis of 3,5-Disubstituted 2-Fluoropyridines and 2-Pyridones. *J Org Chem* 2003;68:3352–5.

18. Calvo LA, González-Nogal AM, González-Ortega A, Sañudo MC. Synthesis of silylated β -enaminones and applications to the synthesis of silyl heterocycles. *Tetrahedron Lett* 2001;42:8981–4.
19. Dan Cook P, Day RT, Robins RK. An improved synthesis of 3-deazaeytosine, 3-deazauracil, 3-deazacytidine, and 3-deazauridine. *J Heterocycl Chem* 1977;14:1295–8.
20. Kozikowski AP, Reddy ER, Miller CP. A simplified route to a key intermediate in the synthesis of the Chinese nootropic agent huperzine A. *J Chem Soc Perkin Trans 1* 1990:195–7.
21. Mijin D, Marinković A. Synthesis of *N*-Substituted 4,6-Dimethyl-3-cyano-2-pyridones Under Microwave Irradiation. *Synth Commun* 2006;36:193–8.
22. Nalage S V, Nikum AP, Kalyankar MB, Patil VS, Patil UD, Desale KR, et al. One-Pot Four Component Synthesis of 4,6-Disubstituted 3-Cyano-2-Pyridones in Polyethylene Glycol. *Lett Org Chem* 2010:3–8.
23. Rong L, Han H, Jiang H, Shi D, Tu S. One-Pot Synthesis of 4,6-Diaryl-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carbonitriles via Three-Component Cyclocondensation under Solvent-Free Conditions. *Synth Commun* 2008;38:217–24.
24. Mirković JM, Mijin DŽ, Petrović SD. Milrinon svojstva i sinteza. *Hem ind* 2013;67:17–25.
25. Alimmari ASA, Božić BĐ, Marinković AD, Mijin DŽ, Ušćumlić GS. Solvent and Structural Effects on the UV–Vis Absorption Spectra of Some 4,6-Disubstituted-3-Cyano-2-Pyridones. *J Solution Chem* 2012;41:1825–35.
26. D. Mijin, Marković J, Brković D, Marinković A. Microwave assisted synthesis of 2-pyridone and 2-pyridone based compounds. *Hem Ind* 2014;68:1–14.
27. Porta R, Benaglia M, Puglisi A. Flow Chemistry: Recent Developments in the Synthesis of Pharmaceutical Products. *Org Process Res Dev* 2016;20:2–25.
28. Malet-Sanz L, Susanne F. Continuous Flow Synthesis. A Pharma Perspective. *J Med Chem* 2012;55:4062–98.
29. Poehlauer P, Colberg J, Fisher E, Jansen M, Johnson MD, Koenig SG, et al. Pharmaceutical Roundtable Study Demonstrates the Value of Continuous Manufacturing in the Design of Greener Processes. *Org Process Res Dev* 2013;17:1472–8.
30. Jiménez-González C, Poehlauer P, Broxterman QB, Yang B-S, am Ende D, Baird J, et al. Key Green Engineering Research Areas for Sustainable Manufacturing: A Perspective from Pharmaceutical and Fine Chemicals Manufacturers. *Org Process Res Dev* 2011;15:900–11.
31. Baxendale IR, Braatz RD, Hodnett BK, Jensen KF, Johnson MD, Sharratt P, et al. Achieving Continuous Manufacturing: Technologies and Approaches for Synthesis, Workup, and Isolation of Drug Substance. May 20–21, 2014 Continuous Manufacturing Symposium. *J Pharm Sci* 2015;104:781–91.
32. Glasnov TN, Kappe CO. Continuous-flow syntheses of heterocycles. *J Heterocycl Chem* 2011;48:11–30.
33. Wirth T. *Microreactors in Organic Synthesis and Catalysis*. Wiley-VCH: Weinheim, 2008.
34. Hessel V, Schouten JC, Renken A, Wang Y, Yoshida JI, *Handbook of Micro Reactors*. Wiley-VCH: Weinheim, 2009.
35. Sharma UK, Van der Eycken EV. *Flow Chemistry for the Synthesis of Heterocycles*. Springer: Cham, 2018.
36. Schwalbe T, Kadzimirsz D, Jas G. Synthesis of a Library of Ciprofloxacin Analogues By Means of Sequential Organic Synthesis in Microreactors. *QSAR Comb Sci* 2005;24:758–68.
37. Leadbeater NE, Devine WG. Probing the energy efficiency of microwave heating and continuous-flow conventional heating as tools for organic chemistry. *Arkivoc* 2011;5:127–43.

38. Pagano N, Herath A, Cosford NDP. An automated process for a sequential heterocycle/multicomponent reaction: multistep continuous flow synthesis of 5-(thiazol-2-yl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones. *J Flow Chem* 2011;1:28–31.
39. Dömling A, Wang W, Wang K. Chemistry and Biology Of Multicomponent Reactions. *Chem Rev* 2012;112:3083–135.
40. Rotstein BH, Zaretsky S, Rai V, Yudin AK. Small Heterocycles in Multicomponent Reactions. *Chem Rev* 2014;114:8323–59.
41. Oliver Kappe C. 100 years of the biginelli dihydropyrimidine synthesis. *Tetrahedron* 1993;49:6937–63.
42. Gong L-Z, Chen X-H, Xu X-Y. Asymmetric Organocatalytic Biginelli Reactions: A New Approach To Quickly Access Optically Active 3,4-Dihydropyrimidin-2-(1H)-ones. *Chem – A Eur J* 2007;13:8920–6.
43. Nagarajaiah H, Mukhopadhyay A, Moorthy JN. Biginelli reaction: an overview. *Tetrahedron Lett* 2016;57:5135–49.
44. Barrow JC, Nantermet PG, Selnick HG, Glass KL, Rittle KE, Gilbert KF, et al. In Vitro and in Vivo Evaluation of Dihydropyrimidinone C-5 Amides as Potent and Selective α 1A Receptor Antagonists for the Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia. *J Med Chem* 2000;43:2703–18.
45. Crespo A, El Maatougui A, Biagini P, Azuaje J, Coelho A, Brea J, et al. Discovery of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-ones As a Novel Class of Potent and Selective A2B Adenosine Receptor Antagonists. *ACS Med Chem Lett* 2013;4:1031–6.
46. Terracciano S, Lauro G, Strocchia M, Fischer K, Werz O, Riccio R, et al. Structural Insights for the Optimization of Dihydropyrimidin-2(1H)-one Based mPGES-1 Inhibitors. *ACS Med Chem Lett* 2015;6:187–91.
47. Patil SR, Choudhary AS, Patil VS *et al.* Synthesis, optical properties, dyeing study of dihydropyrimidones (DHPMs) skeleton: Green and regioselectivity of novel Biginelli scaffold from Lawsone. *Fibers Polym* 2015;16:2349–58.
48. Boukis AC, Llevot A, Meier MAR. High Glass Transition Temperature Renewable Polymers via Biginelli Multicomponent Polymerization. *Macromol Rapid Commun* 2016;37:643–9.
49. Zhao Y, Yu Y, Zhang Y, Wang X, Yang B, Zhang Y, et al. From drug to adhesive: a new application of poly(dihydropyrimidin-2(1H)-one)s via the Biginelli polycondensation. *Polym Chem* 2015;6:4940–5.
50. Puripat M, Ramozzi R, Hatanaka M, Parasuk W, Parasuk V, Morokuma K. The Biginelli Reaction Is a Urea-Catalyzed Organocatalytic Multicomponent Reaction. *J Org Chem* 2015;80:6959–67.
51. Folkers K, Johnson TB. Researches on Pyrimidines. CXXXVI. The Mechanism of Formation of Tetrahydropyrimidines by the Biginelli Reaction¹. *J Am Chem Soc* 1933;55:3784–91.
52. Sweet F, Fissekis JD. Synthesis of 3,4-dihydro-2(1H)-pyrimidinones and the mechanism of the Biginelli reaction. *J Am Chem Soc* 1973;95:8741–9.
53. Kappe CO. A Reexamination of the Mechanism of the Biginelli Dihydropyrimidine Synthesis. Support for an *N*-Acyliiminium Ion Intermediate¹. *J Org Chem* 1997;62:7201–4.
54. Suresh S, Jagir S. Past, present and future of the Biginelli reaction: a critical perspective. *ARKIVOC: Online Journal of Organic Chemistry* 2012:66–13.
55. Panda SS, Khanna P, Khanna L. Biginelli Reaction: A Green Perspective. *Curr Org Chem* 2012;16:507–20.
56. Stadler A, Kappe CO. Automated Library Generation Using Sequential Microwave-Assisted Chemistry. Application toward the Biginelli Multicomponent Condensation. *J Comb Chem* 2001;3:624–30.

57. Kappe CO, Shishkin O V, Uray G, Verdino P. X-Ray Structure, Conformational Analysis, Enantioseparation, and Determination of Absolute Configuration of the Mitotic Kinesin Eg5 Inhibitor Monastrol. *Tetrahedron* 2000;56:1859–62.
58. Kappe CO, Shishkin O V, Uray G, Verdino P. X-Ray Structure, Conformational Analysis, Enantioseparation, and Determination of Absolute Configuration of the Mitotic Kinesin Eg5 Inhibitor Monastrol. *Tetrahedron* 2000;56:1859–62.
59. Mayer TU, Kapoor TM, Haggarty SJ, King RW, Schreiber SL, Mitchison TJ. Small Molecule Inhibitor of Mitotic Spindle Bipolarity Identified in a Phenotype-Based Screen. *Science* 1999;286:971–4.
60. Prokopcová H, Dallinger D, Uray G, Kaan HYK, Ulaganathan V, Kozielski F, et al. Structure–Activity Relationships and Molecular Docking of Novel Dihydropyrimidine-Based Mitotic Eg5 Inhibitors. *ChemMedChem* 2010;5:1760–9.
61. Russowsky D, Canto RFS, Sanches SAA, D’Oca MGM, de Fátima Â, Pilli RA, et al. Synthesis and differential antiproliferative activity of Biginelli compounds against cancer cell lines: Monastrol, oxo-monastrol and oxygenated analogues. *Bioorg Chem* 2006;34:173–82.
62. Kaan HYK, Ulaganathan V, Rath O, Prokopcová H, Dallinger D, Kappe CO, et al. Structural Basis for Inhibition of Eg5 by Dihydropyrimidines: Stereoselectivity of Antimitotic Inhibitors Enastron, Dimethylenastron and Fluorastrol. *J Med Chem* 2010;53:5676–83.
63. Wright CM, Chovatiya RJ, Jameson NE, Turner DM, Zhu G, Werner S, et al. Pyrimidinone-peptoid hybrid molecules with distinct effects on molecular chaperone function and cell proliferation. *Bioorg Med Chem* 2008;16:3291–301.
64. Prashantha Kumar BR, Sankar G, Nasir Baig RB, Chandrashekar S. Novel Biginelli dihydropyrimidines with potential anticancer activity: A parallel synthesis and CoMSIA study. *Eur J Med Chem* 2009;44:4192–8.
65. de Fátima Â, Braga TC, Neto L da S, Terra BS, Oliveira BGF, da Silva DL, et al. A mini-review on Biginelli adducts with notable pharmacological properties. *J Adv Res* 2015;6:363–73.
66. Akhaja TN, Raval JP. 1,3-dihydro-2H-indol-2-ones derivatives: Design, Synthesis, in vitro antibacterial, antifungal and antitubercular study. *Eur J Med Chem* 2011;46:5573–9.
67. Trivedi AR, Bhuva VR, Dholariya BH, Dodiya DK, Kataria VB, Shah VH. Novel dihydropyrimidines as a potential new class of antitubercular agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2010; 20:6100–2.
68. Chitra S, Devanathan D, Pandiarajan K. Synthesis and in vitro microbiological evaluation of novel 4-aryl-5-isopropoxycarbonyl-6-methyl-3,4-dihydropyrimidinones *Eur J Med Chem* 2010;45:367–71.
69. Kim J, Park C, Ok T, So W, Jo M, Seo M, et al. Discovery of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones with inhibitory activity against HIV-1 replication. *Bioorg Med Chem Lett* 2012;22:2119–24.
70. Azab A, Nassar A, Azab AN. Anti-Inflammatory Activity of Natural Products. *Molecules* 2016;21.
71. Mokale SN, Shinde SS, Elgire RD, Sangshetti JN, Shinde DB. Synthesis and anti-inflammatory activity of some 3-(4,6-disubstituted-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl) propanoic acid derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 2010;20:4424–6.
72. Tale RH, Rodge AH, Hatnapure GD, Keche AP, Patil KM, Pawar RP. The synthesis, anti-inflammatory and antimicrobial activity evaluation of novel thioanalogs of 3,4-dihydrothiopyrimidin-2(1H)-one derivatives of N-aryl urea. *Med Chem Res* 2012;21:4252–60.

73. Gireesh T, Kamble RR, Kattimani PP, Dorababu A, Manikantha M, Hoskeri JH. Synthesis of Sydnone Substituted Biginelli Derivatives as Hyaluronidase Inhibitors. *Arch Pharm (Weinheim)* 2013;346:645–53.
74. Donthabhakthuni S, Chari Murugulla A, Chari Murugulla P, SunYeou K. Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2-ones (DHPMs) Using Highly Efficient Recyclable Silica Supported Rhodium Chloride as Heterogeneous Catalyst and their Anti-Neuroinflammatory Activity. *Lett Drug Des Discov* 2012;9:962–6.
75. Carochi M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol* 2013;51:15–25.
76. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem* 2015;97:55–74.
77. López-Alarcón C, Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta* 2013;763:1–10.
78. da Silva DL, Reis FS, Muniz DR, Ruiz ALTG, de Carvalho JE, Sabino AA, et al. Free radical scavenging and antiproliferative properties of Biginelli adducts. *Bioorg Med Chem* 2012;20:2645–50.
79. Stefani HA, Oliveira CB, Almeida RB, Pereira CMP, Braga RC, Cella R, et al. Dihydropyrimidin-(2H)-ones obtained by ultrasound irradiation: a new class of potential antioxidant agents. *Eur J Med Chem* 2006;41:513–8.
80. de Vasconcelos A, Oliveira PS, Ritter M, Freitag RA, Romano RL, Quina FH, et al. Antioxidant capacity and environmentally friendly synthesis of dihydropyrimidin-(2H)-ones promoted by naturally occurring organic acids. *J Biochem Mol Toxicol* 2012;26:155–61.
81. Mansouri M, Movahedian A, Rostami M, Fassihi A. Synthesis and antioxidant evaluation of 4-(furan-2-yl)-6-methyl-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate esters. *Res Pharm Sci* 2012;7:257–64.
82. Gangwar N, Kasana VK. 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-one derivatives: Organocatalysed microwave assisted synthesis and evaluation of their antioxidant activity. *Med Chem Res* 2012;21:4506–11.
83. Triggle DJ. Pharmacology of calcium channel antagonists. In: Morad M, Ebashi S, Trautwein W, Kurachi Y. (eds). *Molecular Physiology and Pharmacology of Cardiac Ion Channels and Transporters. Developments in Cardiovascular Medicine*. 1996;182. Springer, Dordrecht.
84. Bossert F, Vater W. 1,4-Dihydropyridines—a basis for developing new drugs. *Med Res Rev* 1989;9:291–324.
85. Fátima Â de, Terra BS, Silva Neto L da, Braga TC. Chapter 12 - Organocatalyzed Biginelli Reactions: A Greener Chemical Approach for the Synthesis of Biologically Active 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-ones/-thiones. In: Brahmachari GBT-GSA for BRH, editor., Boston: Elsevier; 2015, p. 317–37.
86. Khanina EL, Siliniece G, Ozols J, Duburs G, Kimenis A, Synthesis and pharmacological studies of some 1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylic acid derivatives, *Khim Farm Zh* 1978;12:72-4.
87. Atwal KS, Rovnyak GC, Kimball SD, Floyd DM, Moreland S, Swanson BN, et al. Dihydropyrimidine calcium channel blockers. II. 3-Substituted-4-aryl-1,4-dihydro-6-methyl-5-pyrimidinecarboxylic acid esters as potent mimics of dihydropyridines. *J Med Chem* 1990;33:2629–35.
88. Atwal KS, Swanson BN, Unger SE, Floyd DM, Moreland S, Hedberg A, et al. Dihydropyrimidine calcium channel blockers. 3. 3-Carbamoyl-4-aryl-1,2,3,4-tetrahydro-6-methyl-5-pyrimidinecarboxylic acid esters as orally effective antihypertensive agents. *J Med Chem* 1991;34:806–11.

89. Atwal KS, Swanson BN, Unger SE, Floyd DM, Moreland S, Hedberg A, et al. Dihydropyrimidine calcium channel blockers. 3. 3-Carbamoyl-4-aryl-1,2,3,4-tetrahydro-6-methyl-5-pyrimidinecarboxylic acid esters as orally effective antihypertensive agents. *J Med Chem* 1991;34:806–11.
90. Rovnyak GC, Atwal KS, Hedberg A, Kimball SD, Moreland S, Gougoutas JZ, et al. Dihydropyrimidine calcium channel blockers. 4. Basic 3-substituted-4-aryl-1,4-dihydropyrimidine-5-carboxylic acid esters. Potent antihypertensive agents. *J Med Chem* 1992;35:3254–63.
91. Zollinger H. *Color chemistry: synthesis, properties and application of organic dyes and pigments*. Weinheim: Wiley-VCH; 2003.
92. Benkhaya S, M'rabet S, El Harfi A. Classifications, properties, recent synthesis and applications of azo dyes. *Heliyon* 2020;6:e03271.
93. Benkhaya S, M'rabet S, El Harfi A. A review on classifications, recent synthesis and applications of textile dyes. *Inorg Chem Commun* 2020;115:107891.
94. Gürses A., Açıkyıldız M., Güneş K., Gürses M.S. Classification of Dye and Pigments. In: *Dyes and Pigments*. Springer Briefs in Molecular Science. Springer, Cham, 2016.
95. Gürses A., Açıkyıldız M., Güneş K., Gürses M.S. Dyes and Pigments: Their Structure and Properties. In: *Dyes and Pigments*. SpringerBriefs in Molecular Science. Springer, Cham, 2016.
96. Gürses A., Açıkyıldız M., Güneş K., Gürses M.S. Dyeing and Dyeing Technology. In: *Dyes and Pigments*. SpringerBriefs in Molecular Science. Springer, Cham, 2016.
97. Zhao R, Tan C, Xie Y, Gao C, Liu H, Jiang Y. One step synthesis of azo compounds from nitroaromatics and anilines. *Tetrahedron Lett* 2011;52:3805–9.
98. Leriche G, Budin G, Brino L, Wagner A. Optimization of the Azobenzene Scaffold for Reductive Cleavage by Dithionite; Development of an Azobenzene Cleavable Linker for Proteomic Applications. *European J Org Chem* 2010;2010:4360–4. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ejoc.201000546>.
99. Khattab TA, Rehan M. A review on synthesis of nitrogen-containing heterocyclic dyes for textile fibers - Part 1: five and six-membered heterocycles. *Egypt J Chem* 2018;61:897–937.
100. Sahoo J, Paidasetty SK. Medicinal interest of AZO-based organic compounds: A review. *Asian J Pharm Clin Res* 2016;9:33–9.
101. Schwander HR. Heterocyclic azo coupling components. *Dyes Pigments* 1982;3:133–60.
102. Peng Q, Li M, Gao K, Cheng L. Hydrazone-azo tautomerism of pyridone azo dyes: Part II: Relationship between structure and pH values. *Dyes Pigments* 1991;15:263–74.
103. Peng Q, Li M, Gao K, Cheng L. Hydrazone-azo tautomerism of pyridone azo dyes: Part III—effect of dye structure and solvents on the dissociation of pyridone azo dyes. *Dyes Pigments* 1992;18:271–86.
104. Katritzky AR, Hall CD, El-Gendy BE-DM, Draghici B. Tautomerism in drug discovery. *J Comput Aid Mol Des* 2010;24:475–84.
105. Mijin DŽ, Ušćumlić GS, Valentić NV, Marinković AD. Synthesis of azo pyridone dyes. *Hemjska industrija* 2011;65:517–32.
106. Mijin D, Božić Nedeljković BB, Božić B, Kovrlija I, Ladarević J, Ušćumlić G. Synthesis, solvatochromism, and biological activity of novel azo dyes bearing 2-pyridone and benzimidazole moieties. *Turk J Chem* 2018;42:896–907.
107. Mirković J, Rogan J, Poleti D, Vitnik V, Vitnik Ž, Ušćumlić G, et al. On the structures of 5-(4-, 3- and 2-methoxyphenylazo)-3-cyano-1-ethyl-6-hydroxy-4-methyl-2-pyridone: An experimental and theoretical study. *Dyes Pigments* 2014;104:160–8.
108. Mirković JM, Božić BĐ, Mutavdžić DR, Ušćumlić GS, Mijin DŽ. Solvent and structural effects on the spectral shifts of 5-(substituted phenylazo)-3-cyano-6-hydroxy-1-(2-hydroxyethyl)-4-methyl-2-pyridones. *Chem Phys Lett* 2014;615:62–8.

109. Lađarević J, Božić B, Matović L, Nedeljković BB, Mijin D. Role of the bifurcated intramolecular hydrogen bond on the physico-chemical profile of the novel azo pyridone dyes. *Dyes Pigments* 2019;162:562–72.
110. Porobić SJ, Božić BĐ, Dramićanin MD, Vitnik V, Vitnik Ž, Marinović-Cincović M, et al. Absorption and fluorescence spectral properties of azo dyes based on 3-amido-6-hydroxy-4-methyl-2-pyridone: Solvent and substituent effects. *Dyes Pigments* 2020;175:108139.
111. Mijin D, Božić B, Lađarević J, Matović L, Ušćumlić G, Vitnik V, et al. Solvatochromism and quantum mechanical investigation of disazo pyridone dye. *Color Technol* 2018;134:478–90.
112. Mijin DZ, Baghbanzadeh M, Reidlinger C, Oliver Kappe C. The microwave-assisted synthesis of 5-arylaazo-4,6-disubstituted-3-cyano-2-pyridone dyes. *Dyes Pigments* 2010;85:73–8.
113. Wang F, Huang J, Xu J. Continuous-flow synthesis of azo dyes in a microreactor system. *Chem Eng Process - Process Intensif* 2018;127:43–9.
114. Martins P, Jesus J, Santos S, et al. Heterocyclic Anticancer Compounds: Recent Advances and the Paradigm Shift towards the Use of Nanomedicine's Tool Box. *Molecules* 2015;20:16852-91.
115. Mishra VR, Ghanavatkar CW, Qureshi SI. Design, synthesis, antimicrobial activity and computational studies of novel azo linked substituted benzimidazole, benzoxazole and benzothiazole derivatives. *Comput Biol Chem* 2019;78:330-337.
116. Ayare NN, Ramugade SH, Sekar N. Photostable coumarin containing azo dyes with multifunctional property. *Dyes Pigments* 2019;163:692–699.
117. Maliyappa MR, Keshavayya J, Mallikarjuna NM, Krishna PM, Shivakumara N, Sandeep T, Sailaja K, Azeezulla M. Synthesis, characterization, pharmacological and computational studies of 4, 5, 6, 7-tetrahydro-1, 3-benzothiazole incorporated azo dyes. *J Mol Struct* 2019;1179:630–641.
118. Mohammadi A, Khalili B, Tahavor M, Novel push – pull heterocyclic azo disperse dyes containing piperazine moiety: synthesis, spectral properties, antioxidant activity and dyeing performance on polyester fibers, *Spectrochim. Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 2015;150:799–805.
119. Mohammadi A, Novel triazene dyes based on N-phenylpiperazine: synthesis, antibacterial activity and solvatochromic properties, *J Mol Liq* 2014;193:69–73.
120. Wainwright M. Dyes in the development of drugs and pharmaceuticals. *Dyes Pigments* 2008;76:582–9.
121. El-Borai MA, Rizk HF, Ibrahim SA. Dyeing, color fastness and antimicrobial properties of some mono and disazo disperse dyes derived from thiazole moiety. *Fibers Polym* 2013;14:2061–2068.
122. Yousefi H, Yahyazadeh A, Rufchahi EOM, Rassa M. Synthesis, spectral properties, biological activity and application of new 4-(benzyloxy)phenol derived azo dyes for polyester fiber dyeing. *J Mol Liq* 2013;180:51–8.
123. Mishra VR, Ghanavatkar CW, Sekar N. UV protective heterocyclic disperse azo dyes: Spectral properties, dyeing, potent antibacterial activity on dyed fabric and comparative computational study. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 2019;223:117353.
124. Ashkar SM, El-Asasery MA, Touma MM, Elnagdi MH. Synthesis of Some Novel Biologically Active Disperse Dyes Derived from 4-Methyl-2,6-dioxo-1-propyl-1,2,5,6-tetrahydro-pyridine-3-carbonitrile as Coupling Component and Their Colour Assessment on Polyester Fabrics. *Mol* 2012;17.
125. Mallikarjuna NM, Keshavayya J. Synthesis, spectroscopic characterization and pharmacological studies on novel sulfamethaxazole based azo dyes. *J King Saud Univ - Sci* 2020;32:251–9.

126. Ghasemi Z, Azizi S, Salehi R, Kafil HS. Synthesis of azo dyes possessing N-heterocycles and evaluation of their anticancer and antibacterial properties. *Monatshefte Für Chemie - Chem Mon* 2018;149:149–57.
127. Kumar V, Keshavayya J, Matada MN, Srinivasa SM, Rangappa S. Synthesis, Characterization and Biological Potency of Butyl-Pyridone Based Azo Dyes. *ChemistrySelect* 2020;5:5460–4.
128. Harisha S, Keshavayya J, Prasanna SM, Joy Hoskeri H. Synthesis, characterization, pharmacological evaluation and molecular docking studies of benzothiazole azo derivatives. *J Mol Struct* 2020;1218:128477.
129. Karadag A, Ozelik B, Saner S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Anal Methods* 2009;2:41–60.
130. Shahidi F, Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. *J Funct Foods* 2015;18:757–81.
131. Shaikh A, Meshram JS. Design, synthesis and pharmacological assay of novel azo derivatives of dihydropyrimidinones. *Cogent Chem* 2015;1.
132. Elgemeie GH, Mohamed RA. Microwave synthesis of fluorescent and luminescent dyes (1990–2017). *J Mol Struct* 2018;1173:707–42.
133. Christie RM. 17 - Fluorescent dyes. In: Clark MBT-H of T and ID, editor. *Woodhead Publ. Ser. Text.*, vol. 1, Woodhead Publishing; 2011, p. 562–87.
134. Yoshino J, Furuta A, Kambe T, Itoi H, Kano N, Kawashima T, et al. Intensely Fluorescent Azobenzenes: Synthesis, Crystal Structures, Effects of Substituents, and Application to Fluorescent Vital Stain. *Chem – A Eur J* 2010;16:5026–35.
135. Matović L, Tasić N, Trišović N, Lađarević J, Vitnik V, Vitnik Ž, et al. On the azo dyes derived from benzoic and cinnamic acids used as photosensitizers in dye-sensitized solar cells. *Turkish J Chem* 2019;43:1183–203.
136. Porobić SJ, Krstić AD, Jovanović DJ, Lađarević JM, Katnić ĐB, Mijin DŽ, et al. Synthesis and thermal properties of arylazo pyridone dyes. *Dyes Pigments* 2019;170:107602.
137. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, et al. *Gaussian 09, Revision D.01*. Wallingford CT: Gaussian, Inc.; 2009.
138. Andersson MP, Uvdal P. New Scale Factors for Harmonic Vibrational Frequencies Using the B3LYP Density Functional Method with the Triple- ζ Basis Set 6-311+G(d,p). *J Phys Chem A* 2005;109:2937–2941.
139. Dennington R, Keith T, Millam J, *GaussView, Version 5.0.9*. Shawnee Mission, KS: Semichem Inc.; 2009.
140. Sayin K, Üngördü A. Investigations of structural, spectral and electronic properties of enrofloxacin and boron complexes via quantum chemical calculation and molecular docking. *Spectrochim Acta A* 2019;220:117102.
141. Catalán J, Díaz C. Extending the Solvent Acidity Scale to Highly Acidic Organic Solvents: The Unique Photophysical Behaviour of 3,6-Diethyltetrazine. *European J Org Chem* 1999;1999:885–91.
142. Catalán J, Hopf H. Empirical Treatment of the Inductive and Dispersive Components of Solute–Solvent Interactions: The Solvent Polarizability (SP) Scale. *European J Org Chem* 2004;2004:4694–702.
143. Catalán J. Toward a Generalized Treatment of the Solvent Effect Based on Four Empirical Scales: Dipolarity (SdP, a New Scale), Polarizability (SP), Acidity (SA), and Basicity (SB) of the Medium. *J Phys Chem B* 2009;113:5951–60.
144. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med* 1999;26:1231–7.
145. Aničić N, Dimitrijević S, Ristić M, Petrović SS, Petrović SD. Antimicrobial activity of essential oil of *Melissa officinalis L., Lamiaceae*. *Hemijska industrija*. 2005;59:243–247.

146. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63; Ohno M, Abe T. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *J Immunol Methods*. 1991;145(1-2):199-203.
147. Matić ZI. *In vitro* ispitivanje antitumorske aktivnosti ekstrakata endemične biljne vrste *Helichrysum zivojinii* Černjavski et Soška. Doktorska disertacija. Beograd, 2013.
148. Ormerod MG, Flow cytometry. A practical approach. Oxford University Press, 2000.
149. A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness, www.swissadme.ch; Swiss Institute of Bioinformatics 2019.
150. Pedretti A, Villa L, Vistoli G. VEGA – An open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming. *J Comput Aid Mol Des* 2004;18:167-173.
151. Mirković J, Božić B, Vitnik V, Vitnik Ž, Rogan J, Poleti D, et al. Structural, spectroscopic and computational study of 5-(substituted phenylazo)-3-cyano-1-ethyl-6-hydroxy-4-methyl-2-pyridones. *Color Technol* 2017;134:33-43.
152. D. Bhattacharjee D, T.K. Devi TK, R. Dabrowski R, A. Bhattacharjee A. Polarizability order parameters and DFT calculations in the nematic phase of two bent-core liquid crystals and their correlation *J Mol Liq* 2018;271;239-252.
153. Erkan S. Activity of the rocuronium molecule and its derivatives: A theoretical calculation. *J Mol Struct* 2019;1189:257-64.
154. Cornil J, Beljonne D, Calbert JP, Bredas JL. Interchain interactions in organic p-conjugated materials: impact on electronic structure, optical response, and charge transport *Adv Mater* 2001;13;1053-1067.
155. Kökbudak Z, Saracoglu M, Akkoç S, Çimen Z, Yilmazer MI, Kandemirli F. Synthesis, cytotoxic activity and quantum chemical calculations of new 7-thioxopyrazolo[1,5-f]pyrimidin-2-one derivatives. *J Mol Struct* 2020;1202:127261.
156. Musa AY, Kadhum AAH, Mohamad AB, Rahoma AAB, Mesmari H. Electrochemical and quantum chemical calculations on 4,4-dimethyloxazolidine-2-thione as inhibitor for mild steel corrosion in hydrochloric acid. *J Mol Struct* 2010;969:233-7.
157. A. Rauk. *Orbital Interaction Theory of Organic Chemistry*. Second ed. Wiley & Sons: New York 2001.
158. Kaya S, Kaya C, Guo L, Kandemirli F, Tüzün B, Uğurlu İ, et al. Quantum chemical and molecular dynamics simulation studies on inhibition performances of some thiazole and thiadiazole derivatives against corrosion of iron. *J Mol Liq* 2016;219:497-504.
159. Obot IB, Obi-Egbedi NO, Eseola AO, Anticorrosion potential of 2-Mesityl-1Himidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline on mild steel in sulfuric acid solution: experimental and theoretical study *Ind Eng Chem Res* 2011;50;2098-2110.
160. Sayin K, Kariper SE, Taştan M, Sayin TA, Karakaş D. Investigations of structural, spectral, electronic and biological properties of N-heterocyclic carbene Ag(I) and Pd(II) complexes. *J Mol Struct* 2019;1176:478-87.
161. Mukherjee S, Mitra I, Reddy V, Fouzder C, Mukherjee S, Ghosh S, et al. Effect of Pt(II) complexes on cancer and normal cells compared to clinically used anticancer drugs: cell cycle analysis, apoptosis and DNA/BSA binding study. *J Mol Liq* 2017;247:126-40.
162. Keleş T, Barut B, Özel A, Biyiklioglu Z. Synthesis of water soluble silicon phthalocyanine, naphthalocyanine bearing pyridine groups and investigation of their DNA interaction, topoisomerase inhibition, cytotoxic effects and cell cycle arrest properties. *Dyes Pigments* 2019;164:372-83.
163. Ismail MMF, Farrag AM, Harras MF, Ibrahim MH, Mehany ABM. Apoptosis: A target for anticancer therapy with novel cyanopyridines. *Bioorg Chem* 2020;94:103481.

164. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliver Rev* 1997;23:3–25.
165. Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J Med Chem* 2002;45:2615–23.
166. Jonathan BB, Georgina AH. New Substructure Filters for Removal of Pan Assay Interference Compounds (PAINS) from Screening Libraries and for Their Exclusion in Bioassays. *J Med Chem* 2010;53:2719–40.
167. Leeson PD, Springthorpe B. The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:881–90.

Prilog A

Jednačine korišćene za računanje kvantno-hemijskih molekulskih deskriptora:

$$I = -E_{\text{HOMO}} \quad (1a)$$

$$A = -E_{\text{LUMO}} \quad (2a)$$

$$E_{\text{GAP}} = E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}} \quad (3a)$$

$$\eta = \frac{I - A}{2} = \frac{E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}}{2} \quad (4a)$$

$$\sigma = \frac{1}{\eta} \quad (5a)$$

$$\sigma_0 = \frac{1}{E_{\text{GAP}}} \quad (6a)$$

$$\chi = \frac{|I + A|}{2} = \frac{|-E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}|}{2} \quad (7a)$$

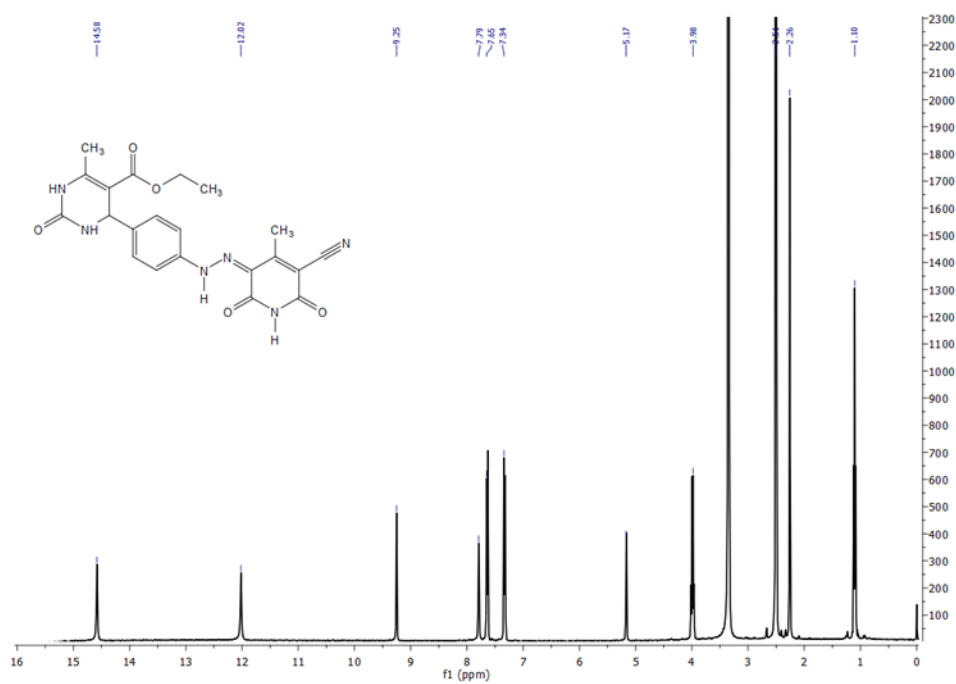
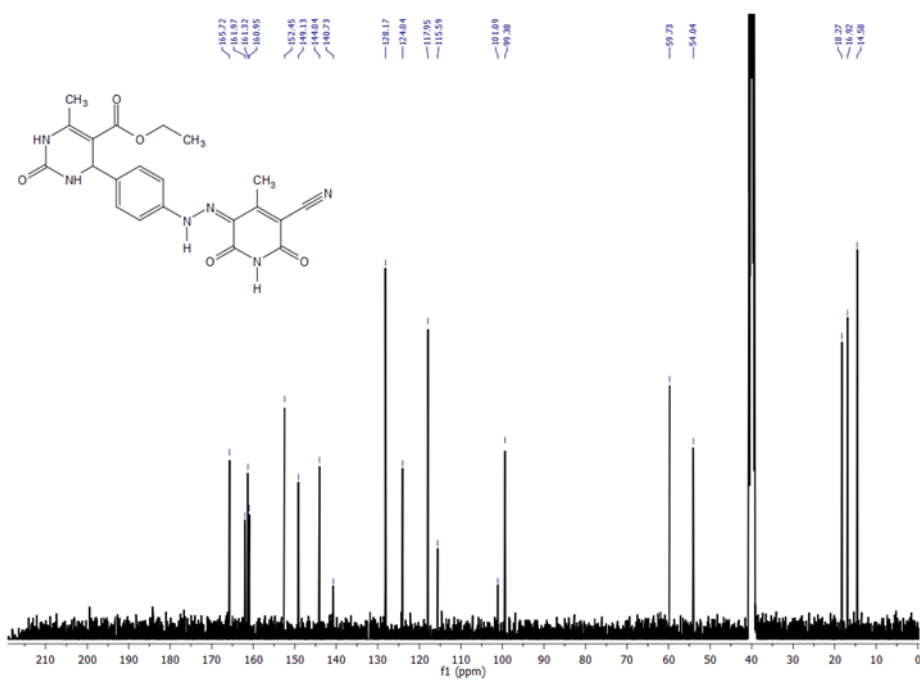
$$CP = -\chi \quad (8a)$$

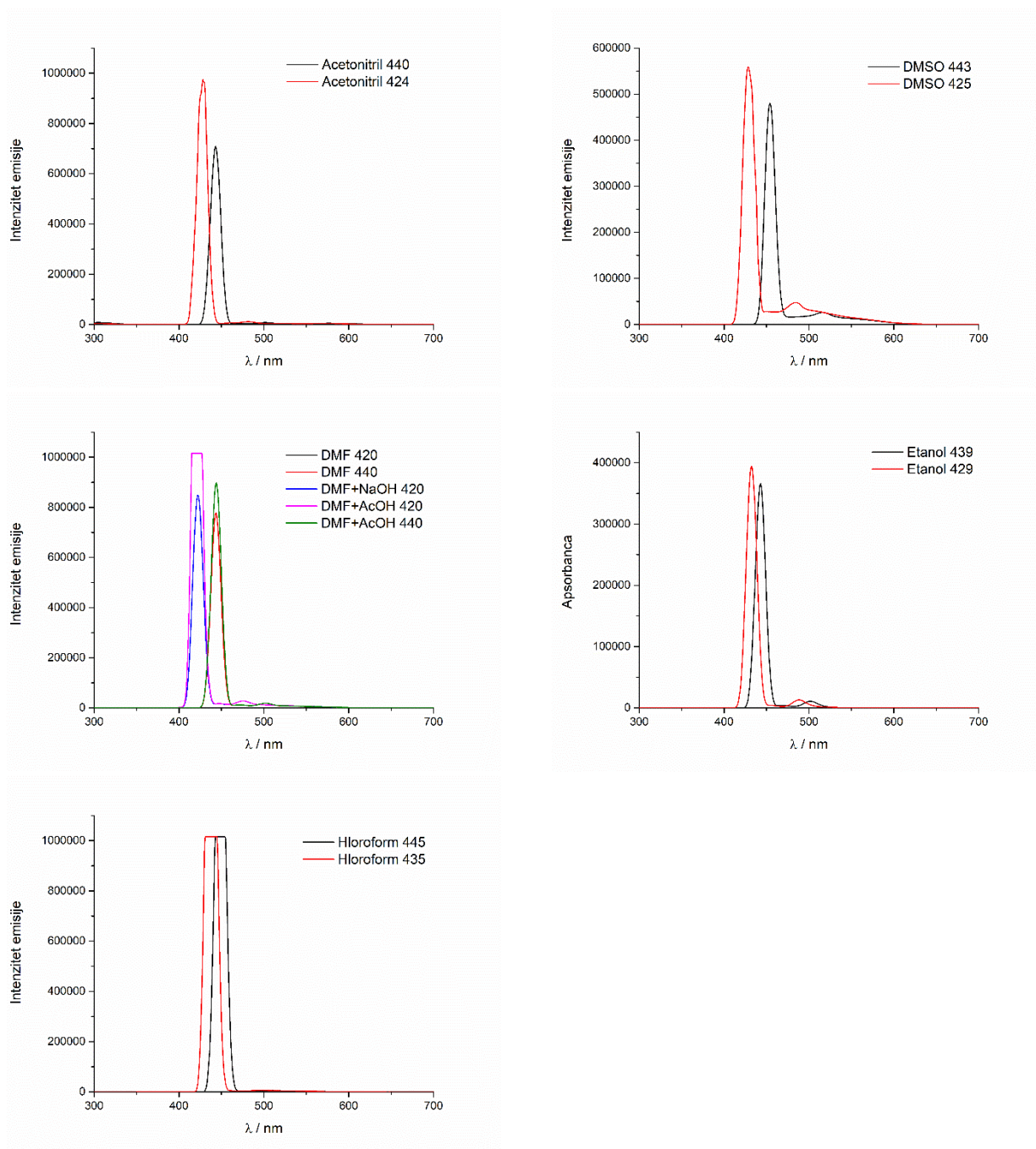
$$\Delta N_{\text{Max}} = -\frac{CP}{\eta} \quad (9a)$$

$$\omega = \frac{CP^2}{2\eta} \quad (10a)$$

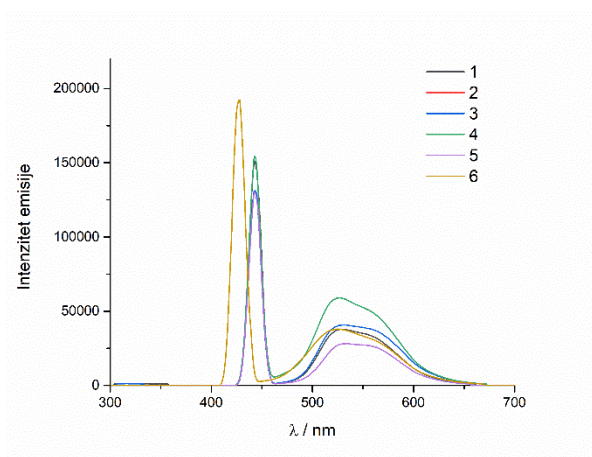
$$N = \frac{1}{\omega} \quad (11a)$$

$$S = \frac{1}{2\eta} \quad (12a)$$

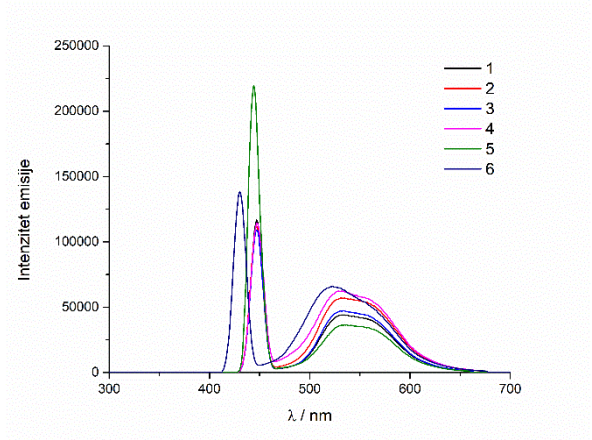
Slika A1. ¹H NMR spektar boje **1** u DMSO-*d*₆Slika A2. ¹³C NMR spektar boje **1** u DMSO-*d*₆



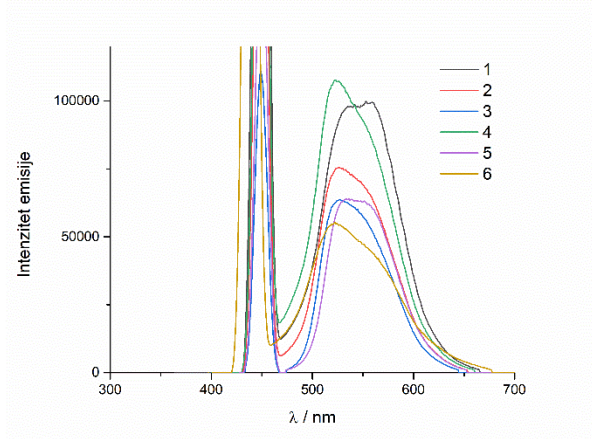
Slika A3. Intenzitet emisije rastvarača na talasnoj dužini ekscitacije



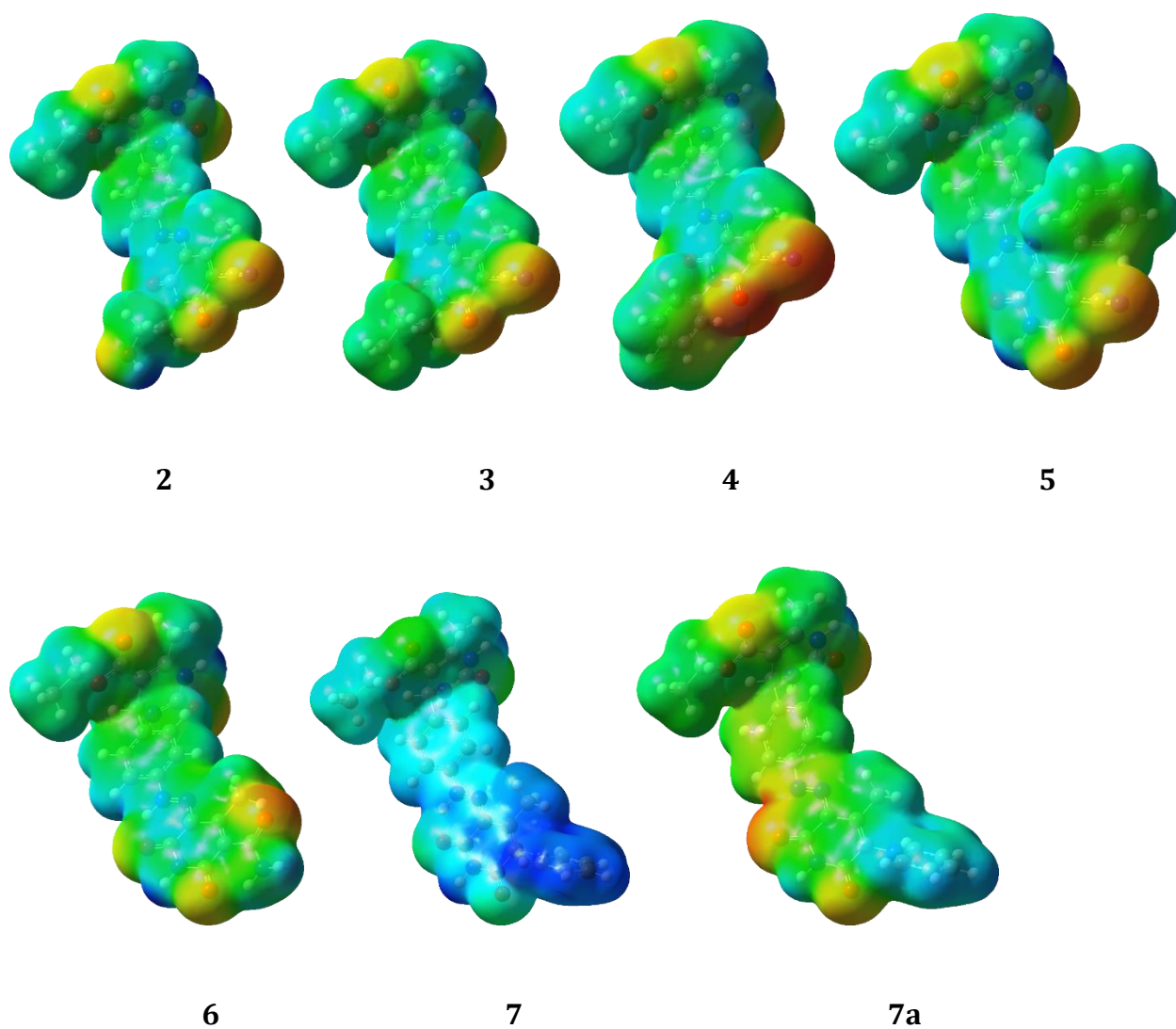
Slika A4. Emisioni spektri boja u acetonitrilu



Slika A5. Emisioni spektri boja u DMSO



Slika A6. Emisioni spektri boja u hloroformu



Slika A7. MEP mape molekula 2-7 i 7a prikazane na B3LYP/6-311++G(d,p) optimizovanim geometrijama

Tabela A1. Kvantno-hemijski deskriptori proučavanih molekula izračunati u vodi

Boja	HOMO ^a	LUMO ^a	Gap ^a	<i>I</i> ^a	<i>A</i> ^a	η ^a	σ ^b	σ_o ^b	χ ^a	<i>CP</i> ^a	ΔN	ω ^a	<i>N</i> ^b	<i>S</i> ^b
1	-6,42	-3,27	3,15	6,419	3,271	1,574	0,635	0,318	4,845	-4,845	3,078	7,458	0,134	0,318
2	-6,38	-3,22	3,16	6,382	3,223	1,580	0,633	0,317	4,803	-4,803	3,040	7,301	0,137	0,317
3	-6,36	-3,19	3,17	6,359	3,193	1,583	0,632	0,316	4,776	-4,776	3,017	7,204	0,139	0,316
4	-6,39	-3,23	3,16	6,387	3,228	1,580	0,633	0,317	4,807	-4,807	3,043	7,315	0,137	0,317
5	-6,44	-3,31	3,12	6,435	3,310	1,562	0,640	0,320	4,873	-4,873	3,119	7,599	0,132	0,320
6	-6,32	-3,12	3,19	6,319	3,124	1,597	0,626	0,313	4,722	-4,722	2,956	6,978	0,143	0,313
7	-6,46	-3,27	3,19	6,460	3,267	1,597	0,626	0,313	4,863	-4,863	3,046	7,406	0,135	0,313
7a	-5,59	-2,75	2,84	5,589	2,753	1,418	0,705	0,353	4,171	-4,171	2,941	6,133	0,163	0,353

^a izraženo u eV; ^b izraženo u eV⁻¹

Tabela A2. Farmakokinetički parametri dobijeni pomoću SwissADME

Molekul	Permeabilnost kroz KMB	P-gp supstrat	Rezultat bioraspodivnosti	PAINS	Pristupačnost sinteze	CYP1A2 inhibitor	CYP2C19 inhibitor	CYP2C9 inhibitor	CYP2D6 inhibitor	CYP3A4 inhibitor
1	Ne	Da	0,55	0	4,66	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
2	Ne	Da	0,55	0	4,94	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
3	Ne	Da	0,55	0	5,02	Ne	Ne	Da	Ne	Ne
4	Ne	Da	0,17	0	5,01	Ne	Ne	Da	Ne	Ne
5	Ne	Da	0,55	0	4,95	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
6	Ne	Da	0,55	0	4,71	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
7	Ne	Ne	0,55	1	4,93	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
7a	Ne	Da	0,55	0	4,89	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne

Tabela A3. Fizičko-hemijski deskriptori izračunati pomoću Vega 22 programa

	Molekulska masa	Rot. radijus	Površina molekula (1,40)	Polarna površina	Nepolarna površina	Zapremina	Ovalnost	log P (Broto)	Lipol (Broto)	Virt. logP
1	436,421	5,1494	698,9	280,9	418,0	369,7	1,7870	-2,898	2,1033	-0,4366
2	480,473	5,3967	760,7	271,8	488,9	412,8	1,8393	-3,374	2,0714	-0,6397
3	478,500	5,4209	793,2	237,6	555,6	423,6	1,8675	-1,764	1,1855	0,8206
4	512,517	5,6100	825,0	232,2	592,8	440,3	1,8827	-1,712	1,2904	0,8777

5	498,490	5,1720	790,3	283,3	507,0	425,4	1,8629	-1,875	1,6439	0,6922
6	454,436	5,2784	717,9	315,5	402,5	381,7	1,8112	-3,705	2,7036	-0,8259
7	489,503	5,6282	783,7	225,7	558,0	424,3	1,8722	-0,379	1,2044	1,6687
7a	488,495	5,5869	787,5	233,7	553,8	423,5	1,8634	-0,244	1,2161	1,7374

Biografija autora

Julijana Tadić je rođena 9. aprila 1991. godine u Beogradu, gde je završila Osnovnu školu i Zemunsku gimnaziju. Osnovne i master akademske studije završila je na Tehnološko-metalurškom fakultetu (TMF), Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Biohemijско-inženjerstvo i biotehnologija. Doktorske studije je upisala 2015/2016. godine na TMF-u, na studijskom programu Hemija. U toku 2015/2016. godine boravila je na stručnoj praksi u Nemačkoj, na Institutu za polimerne materijale i inženjerstvo sintetskih materijala Tehničkog univerziteta u Klaustalu. Od februara 2017. godine zaposlena je u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu. U zvanje istraživač saradnik izabrana je 28.05.2020. godine. U periodu od 2017–2019. godine bila je angažovana na projektu tehnološkog razvoja TR 34009, pod nazivom: „Razvoj tehnoloških procesa za tretman otpadnih voda energetskih postrojenja primenom čistije proizvodnje“, u okviru kog se bavila sintezom biološki aktivnih molekula u protočnim kontinualnim mikroreaktorima. Kao član Komisije za promociju Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu aktivno učestvuje u projektima promocije nauke i TMF-a. Angažovana je u radu sa studentima, a do sad je učestvovala u izradi nekoliko Završnih i Master radova. Rezultati dosadašnjeg naučno-istraživačkog rada Julijane Tadić pismeno i usmeno su prezentovani kroz radove (jedan – M21a i jedan – M23), saopštenja (četnaest – M33, dva – M34, jedan – M64) i patentne prijave (jedan – M87, dva – M92, jedan – M94). Član je Srpskog hemijskog društva. Govori engleski jezik, a služi se ruskim i nemačkim jezikom. Od septembra 2021. godine zaposlena je u Laboratoriji za radijacionu hemiju i fiziku „Gama“, Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Univerzitet u Beogradu, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju.

Rad u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (M21a)

1. Julijana D. Tadić, Jelena M. Lađarević, Željko J. Vitnik, Vesna D. Vitnik, Tatjana P. Stanojković, Ivana Z. Matić, Dušan Ž. Mijin, Novel azo pyridone dyes based on dihydropyrimidinone skeleton: Synthesis, DFT study and anticancer activity, *Dyes and Pigments* 187 (2021) 109123, 10.1016/j.dyepig.2020.109123. (IF₂₀₁₉ = 4,613, ISSN: 0143-7208).

Rad u međunarodnom časopisu (M23)

1. Julijana D. Tadić, Marina A. Mihajlović, Mića B. Jovanović, Dušan Ž. Mijin, Continuous flow synthesis of some 6- and 1,6-substituted 3-cyano-4-methyl-2-pyridones, *Journal of the Serbian Chemical Society* 84 (2019) 531–538, 10.2298/JSC180703092T. (ISSN: 0352-5139, IF₂₀₁₉ = 1,097).

Saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u celini (M33)

1. Julijana Tadić, Jelena Lađarević, Luka Matović, Aleksandra Mašulović, Dušan Mijin, Sinteza i solvatohromna svojstva novih azo-azometinskih boja, 33. Međunarodni kongres o procesnoj industriji Procesing '20, Zbornik radova, str. 47-52, ISBN 978-86-85535-05-5, Beograd 10. septembar 2020.

2. Aleksandra Mašulović, Julijana Tadić, Luka Matović, Jelena Lađarević, Aleksandra Ivanovska, Mirjana Kostić, Dušan Mijin, Poboljšanje procesa bojenja iz perspektive arilazo piridonskih boja, 33. Međunarodni kongres o procesnoj industriji Procesing '20, Zbornik radova, str. 53-58, ISBN 978-86-85535-05-5, Beograd 10. septembar 2020.

3. Ana Dajić, Milica Svetozarević, Julijana Tadić, Marina Mihajlović, Mića Jovanović, Obezbojavanje industrijskih otpadnih voda – pregled dostupnih metoda iz ugla čistije proizvodnje, 33. Kongres o procesnoj industriji Procesing '20, Zbornik radova, str. 81-85, ISBN 978-86-85535-05-5, Beograd 10. septembar 2020.
4. Julijana Tadić, Marija Nešović, Aleksandra Mašulović, Luka Matović, Jelena Lađarević, Dušan Mijin, Ispitivanje solvatohromnih i hemosenzornih svojstva nove azo-azometinske boje na bazi 4-(1*H*-benzoimidazol-2-il)anilina, 32. Kongres o procesnoj industriji Procesing '19, Zbornik radova, str. 47-52, ISBN 978-86-81505-94-6, Beograd 30-31. maj 2019.
5. Aleksandra Mašulović, Julijana Tadić, Luka Matović, Jelena Lađarević, Nataša Valentić, Dušan Mijin, Sinteza i karakterizacija boja na bazi piridinijum piridona, 32. Kongres o procesnoj industriji Procesing '19, Zbornik radova, str. 59-62, ISBN 978-86-81505-94-6, Beograd 30-31. maj 2019.
6. Luka Matović, Julijana Tadić, Aleksandra Mašulović, Nemanja Trišović, Jelena Lađarević, Dušan Mijin, Uticaj strukture azo boja na fotonaponske karakteristike solarnih ćelija aktiviranih bojom, 32. Kongres o procesnoj industriji Procesing '19, Zbornik radova, str. 219-224, ISBN 978-86-81505-94-6, Beograd 30-31. maj 2019.
7. Milica Svetozarević, Julijana Tadić, Marina Mihajlović, Mića Jovanović, Dušan Mijin, Enzyme extraction from plant waste materials: implementation in decolorizing of industrial effluents, 32. Kongres o procesnoj industriji Procesing '19, Zbornik radova, str. 253-256, ISBN 978-86-81505-94-6, Beograd 30-31. maj 2019.
8. Milica Svetozarević, Julijana Tadić, Marina Mihajlović, Ana Dajić, Mića Jovanović, Advantages of Microreactor Technology over Conventional Methods in Enzymatic Wastewater Treatment – Environmental Application of Enzymes, Environmental impact of illegal construction, poor planning and design IMPEDE 2019, Conference Proceedings, pp. 89-97, ISBN: 978-86-901238-0-3, Belgrade 10-11th October 2019.
9. Julijana Tadić, Milica Svetozarević, Ana Dajić, Marina Mihajlović, Mića Jovanović, Dušan Mijin, Development of Green Chemical Process: The Reaction of Condensation in a Continuous Flow Microreactor, Environmental impact of illegal construction, poor planning and design IMPEDE 2019, Conference Proceedings, pp. 129-133, ISBN: 978-86-901238-0-3, Belgrade 10-11th October 2019.
10. Ana Dajić, Marina Mihajlović, Milica Svetozarević, Julijana Tadić, Mića Jovanović, Are the Tube Microreactors Future of Wastewater Treatment?, Environmental impact of illegal construction, poor planning and design IMPEDE 2019, Conference Proceedings, pp. 107-112, ISBN: 978-86-901238-0-3, Belgrade 10-11th October 2019.
11. Julijana Tadić, Marina Mihajlović, Mića Jovanović, Technical Aspects Analysis of Final Waste Treatment and Disposal in Belgrade, Serbia, Environmental impact of illegal construction, poor planning and design IMPEDE 2019, Conference Proceedings, pp. 121-128, ISBN: 978-86-901238-0-3, Belgrade 10-11th October 2019.
12. Julijana Tadić, Petra Pavlović, Marina Mihajlović, Dušan Mijin, Mića Jovanović, Ispitivanje novog postupka sinteze *Schiff*-ove baze u mikroreaktorskom sistemu, 31. Kongres o procesnoj industriji Procesing '18, Zbornik radova, str 23-26, ISBN 978-86-81505-86-1, Bajina Bašta 6–8. jun 2018. <https://doi.org.10.240/ptk.018.31.1.23>.

13. Julijana Tadić, Ana Dajić, Luka Matović, Jovan Jovanović, Marina Mihajlović, Dušan Mijin, Mića Jovanović, Moderan pristup organskoj sintezi upotrebom mikroreaktorskih sistema, 30. Kongres o procesnoj industriji Procesing '17, str. 51-56, ISBN 978-86-81505-83-0, Beograd 1-2. jun 2017.

14. Luka Matović, Aleksandra Mašulović, Julijana Tadić, Jelena Lađarević, Bojan Božić, Branimir Grgur, Maja Radetić, Dušan Mijin, Primena azo boja u izradi fotonaponskih sistema, 30. Kongres o procesnoj industriji Procesing '17, 2017, str. 69-74, ISBN 978-86-81505-83-0, Beograd 1-2. jun 2017.

Saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u izvodu (M34)

1. Maja D. Markovic, Sanja I. Seslija, Julijana D. Tadic, Pavle M. Spasojevic, Hydrogels based on poly(methacrylic acid) and nanocellulose with potential application in dental treatments, VII International Congress, Engineering, Environment and Materials in Process Industry EEM 2021, Book of Abstracts, pp. 218, ISBN: 978-99955-81-38-1, Jahorina, March 17-19th 2021, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina.

2. Julijana Tadić, Jelena Lađaravić, Tatjana Stanojković, Ivana Matić, Dušan Mijin, *In vitro* anticancer activity study on some azo pyridone dyes derived from DHPM scaffold, VII International Congress, Engineering, Environment and Materials in Process Industry EEM 2021, Book of Abstracts, pp. 243, ISBN: 978-99955-81-38-1, Jahorina, March 17-19th 2021, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64)

1. Aleksandra D. Mašulović, Luka Matović, Jelena Lađarević, Julijana Tadić, Miloš Janjuš, Dušan Mijin, Sinteza i spektroskopska analiza 5-(2,4-disupstituisanih fenilazo)-3-cijano-6-hidroksi-4-metil-2-piridona, 56. Savetovanje SHD, Book of abstracts, str. 97, ISBN 978-86-7132-073-3, Niš 7-8. jun 2019.

Prijava domaćeg patenta (M87)

1. Maja Marković, Julijana Tadić, Sanja Šešlija, Dušan Mijin, Vesna Panić, Pavle Spasojević, Rada Pjanović, Vukašin Ugrinović, Sistem na bazi poli(metakrilne kiseline) i kazeina za kontrolisano otpuštanje heterocikličnog azo jedinjenja sa potencijalnom primenom u tretmanu malignog oboljenja belih krvnih ćelija, patentna prijava broj: P-2020/1206.

Registrovani patenti na nacionalnom nivou (M92)

1. Julijana Tadić, Dušan Mijin, Marina Mihajlović, Mića Jovanović, Novi postupak sinteze 3-cijano-6-hidroksi-4-metil-2-piridona, Registar patenata zavoda za intelektualnu svojinu broj 61008, P 2018/570.

2. Dušan Mijin, Julijana Tadić, Suzana Karać, Jelena Lađarević, Luka Matović, Registar patenata zavoda za intelektualnu svojinu broj 60334, P 2018/1114.

Objavljen patent na nacionalnom nivou (M94)

1. Dušan Mijin, Julijana Tadić, Tatjana Stanojković, Ivana Matić, Jelena Lađarević, Aleksandra Mašulović, Ivana Gazikalović, Nova biološki aktivna azo jedinjenja na bazi 4-(4-aminofenil)-5-etoksikarbonil-6-metil-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-ona i različitih 2-piridona, P-2021/456 (P-2019/1500), objavljeno u Glasniku intelektualne svojine 2021/5, 2021/5388, ISSN 2217-9143.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora _____

Broj indeksa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, _____

Potpis autora

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora _____

Broj indeksa _____

Studijski program _____

Naslov rada

Mentor _____

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, _____

Potpis autora

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

U Beogradu, _____

Potpis autora

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.

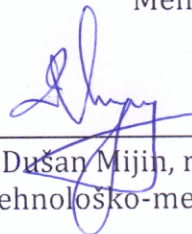
Ocena izveštaja o proveru originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije „Sinteza, struktura i svojstva novih potencijalno biološki aktivnih azo derivata 2(1*H*)-pirimidinona“ od 21.06.2021. godine, autora Julijane Tadić, konstatujem da utvrđeno podudaranje teksta iznosi 18%. Ovaj stepen podudarnosti posledica je upotrebe stručnih termina, naziva metoda, hemikalija i njihovih skraćenica, opisa standardnih eksperimentalnih procedura i metoda i objašnjenja pojmova koji se nalaze u tezi. Najveći procenat podudarnosti se odnosi na prethodno publikovane rezultate doktorandovih istraživanja, koji su proistekli iz njegove disertacije, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika.

Na osnovu svega iznetog, a u skladu sa članom 8. stav 2. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu, izjavljujem da izveštaj ukazuje na originalnost doktorske disertacije Julijane Tadić, te se propisani postupak pripreme za njenu odbranu može nastaviti.

U Beogradu, 29.06.2021. godine

Mentor



Dr Dušan Mijin, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet