

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Јовица Б. Бранковић

СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И ИСПИТИВАЊЕ АНТИОКСИДАТИВНИХ И БИОЛОШКИХ ОСОБИНА РАЗЛИЧИТО ФУНКЦИОНАЛИЗОВАНИХ ХИДРАЗОНА И ПИРАЗОЛОНА

докторска дисертација

Крагујевац, 2025



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF SCIENCE

Jovica B. Branković

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION, AND EXAMINATION OF ANTIOXIDANT AND BIOLOGICAL FEATURES OF DIFFERENTLY FUNCTIONALIZED HYDRAZONES AND PYRAZOLONES

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2025

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор						
Име и презиме: Јовица Бранковић						
Датум и место рођења: 24.01.1994. Јагодина, Србија						
Садашње запослење: Асистент у Институту за хемију Природно-математичког						
факултета Универзитета у Крагујевцу						
Докторска дисертација						
Наслов: Синтеза, карактеризација и испитивање антиоксидативних и						
биолошких особина различито функционализованих хидразона и						
пиразолона						
Број страница: 216						
Број слика: 105						
Број библиографских података: 349						
Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет,						
Универзитет у Крагујевцу						
Научна област (УДК): Хемија-Органска хемија (547)						
Ментор: Проф. др Владимир Петровић, ванредни професор, Институт за хемију,						
Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу						
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске						
дисертације:						
Број одлуке: IV-01-754/3, датум: 12.10.2022.						

Захвалница

Ова докторска дисертација рађена је у Институту за хемију Природноматематичког факултета Универзитета у Крагујевцу, под менторством ванредног професора и изванредног човека др Владимира П. Петровића. Захвалност коју осећам није могуће одмерити речима, као ни магнитуду савета, подршке, посвећености, поштовања, поверења и разумевања коју ми је професор Владимир указао током свих ових година. Крајем 2019. године одабрао сам ментора, не слутећи да сам тиме стекао правог пријатеља за сва времена. Драги професоре, хвала!

Ниједан успех, поготово у науци, није резултат искључиво једне особе, већ хармонизованог тима и позитивне радне атмосфере. Огромну захвалност дугујем професорки др Зорици Петровић, вишој научној сарадници др Душици Симијоновић и доценткињи др Весни Матејић. Част ми је и понос што сам своје прве научне кораке начинио уз вас, при чему вам неизмерно захваљујем на свим стручним саветима приликом експерименталног рада и писања ове дисертације.

Чињеница је да је период мојих докторских студија обележио низ различитих друштвених дешавања. Рад на дисертацији започео сам у време пандемијске кризе, а недуго затим уследили су и ратови у Европи и на Блиском истоку, који нажалост још увек трају. Писање дисертације започињем у периоду неистина, подела и страдања, а довршавам у време борбе за правду и орвеловских репресија. Последње делове дисертације пишем са парадоксално оптимистичном захвалношћу према тешком времену које на суров начин открива истину, како о целокупном друштву, тако и о нама самима.

Захвалан сам својој породици, пријатељима, колегама и добрим људима на љубави, вери, разумевању и подршци да истрајем у својим циљевима.

За најлепше и највредније ствари у мом животу заслужна је моја супруга Милена, којој сам бескрајно захвалан на љубави, подршци и разумевању које ми несебично пружа у сваком тренутку!

Захвалан сам и онима који су ме на другачији начин оснажили и мотивисали да савладам и усвојим све досадашње лекције. Захвалан сам Богу, што је уредио да корачам таквим путем, који је, испоставља се, по мене најбољи.

"Ако кантар не ваља, ти буди исправан"

Јовица

Апстракт

Напредак хемијских наука у савременом добу допринео је решавању бројних практичних и егзистенцијалних питања, нарочито у области медицине и фармације. Ипак, савремени изазови у области јавног здравља истичу неопходност континуираних истраживања, како у дизајну нових, тако и побољшавању постојећих лекова. Међу разноврсним хемијским ентитетима, хидразонски и пиразолонски структурни мотиви уживају посебан статус у медицинској хемији, о чему сведочи мноштво научних радова, прегледних чланака и одобрених лекова.

У оквиру ове докторске дисертације, успешно је синтетисано и окарактерисано седамдесет и четири хидразонска и пиразолонска деривата, који су даље подвргнути испитивању различитих биолошких активности. Теоријским и експерименталним методама испитан је њихов антиоксидативни потенцијал, при чему је установљено да педесет и четири деривата поседује антирадикалска својства. Испитивањем цитотоксичних ефеката идентификовано је двадесет и шест хидразона који индукују смањење вијабилности ћелија, при чему поједини испољавају селективно дејство према ћелијама рака. Анализом редокс параметара констатовано је да хидразони највероватније испољавају цитотоксичност нарушавањем ћелијске редокс равнотеже. Испитивањем антибактеријских својстава новосинтетисаних хидразона утврђено је да већина деривата испољава значајну активност према одабраним бактеријским сојевима. Теоријским испитивањем интеракција пиразолона са одабраним протеинима вируса SARS-CoV-2 идентификовани су повољни модалитети и афинитети везивања појединих деривата, што указује на њихов антивирални потенцијал. Теоријским испитивањем ADMET профила констатовано је да тестирана једињења генерално испуњавају већину критеријума којима се процењује перспективност, безбедност и ефикасност њихове потенцијалне примене.

Кључне речи: *N*-ацилхидразони, пиразолони, DFT, антиоксидативна активност, цитотоксичност, антибактеријска активност, молекулски докинг, SARS-CoV-2, ADMET анализа

Abstract

The advancement of chemical science in the modern era has played a significant role in addressing numerous practical and existential issues, particularly in medicine and pharmacy. However, current public health challenges underline the ongoing need for continuous research in the design of new drugs and enhancement of existing ones. Among diverse chemical entities, hydrazone and pyrazolone structural motifs hold a privileged status in medicinal chemistry, which is supported by numerous scientific papers, review articles, and approved drugs.

In this doctoral dissertation, seventy-four hydrazone and pyrazolone derivatives were successfully synthesized, characterized, and screened for various biological activities. The antioxidant potential was assessed using theoretical and experimental methods, which revealed fifty-four compounds with antiradical properties. Cytotoxicity investigations identified twenty-six hydrazones that induce a decrease in cell viability, where some of them exhibited selectivity towards cancer cells. Analysis of redox parameters suggested that hydrazones presumably exhibit cytotoxicity by disrupting the cellular redox balance. Additionally, antibacterial investigations on the newly synthesized hydrazones revealed that most derivatives exhibit significant activity against selected bacterial strains. Theoretical studies regarding the interaction of pyrazolones with selected SARS-CoV-2 virus protein targets highlighted favorable binding modes and binding affinities of several derivatives, indicating their antiviral potential. Finally, theoretical analysis of ADMET profile revealed that the tested compounds generally fulfil most of the criteria that define the prospect, safety, and efficacy of their potential use.

Keywords: *N*-acylhydrazones, pyrazolones, DFT, antioxidant activity, cytotoxicity, antibacterial activity, molecular docking, SARS-CoV-2, ADMET analysis

САДРЖАЈ

1.	ОПШТИ	ДЕО	1		
•	1.1. Хид	1. Хидразони			
	1.1.1.	Емил Фишер – "случајни" зачетник историје хидразона	2		
	1.1.2.	Биодоступност хидразонских једињења	3		
1.1.3. 1.1.4.		Структурне и хемијске особине хидразона	4		
		Синтеза хидразона	7		
1.1.5.		Хемијске трансформације хидразонских деривата	12		
	1.1.6.	Биоактивна својства хидразонских деривата	15		
•	1.2. Пир	разолони	18		
	1.2.1.	Првосинтетисани пиразол(он) – антипирин	18		
	1.2.2.	Пиразолска једињења у природи	18		
	1.2.3.	Структура и карактеристике пиразолона	19		
	1.2.4.	Синтеза пиразолонског језгра	21		
	1.2.5.	Функционализације пиразолонског нуклеуса	23		
	1.2.6.	Синтеза бис-пиразол(он)ских деривата	25		
	1.2.7.	Биолошке особине пиразолонских деривата	26		
•	3. О антиоксидантима				
	1.3.1.	Теорије старења и антиоксиданти	30		
	1.3.2.	Живот у аеробним условима – парадокс кисеоника	33		
	1.3.3.	Реактивне врсте – фактори настанка у људском организму	34		
	1.3.4.	Реактивне врсте – типови и карактеристике	35		
	1.3.5.	Реактивне врсте – путеви трансформације и реакције са биомолекулима	37		
	1.3.6.	Систем антиоксидативне заштите	41		
	1.3.7.	Фенолна једињења – механизми антиоксидативног деловања	43		
	1.3.8.	Реактивне врсте и антиоксиданти – сплет "двосеклих мачева"	45		
	1.3.9.	Оксидативни стрес – фактор настанка болести	47		
2.	ЕКСПЕР	ИМЕНТАЛНИ ДЕО	50		
	2.1. Mar	геријали и методе	51		
	2.1.1.	Хемикалије	51		
	2.1.2.	Синтетичке процедуре	52		
	2.1.3.	Структурна карактеризација производа	53		
	2.1.4.	Експериментална испитивања	69		
	2.1.5.	Рачунарске методе	72		
	2.1.6.	Теоријска испитивања	73		

3	. PE3	ЗУЛТ	ГАТИ И ДИСКУСИЈА	75	
	3.1.	Си	нтеза	76	
	3.1	.1.	Синтеза <i>N</i> -ацилхидразона	76	
	3.1	.2.	Синтеза пиразолона	76	
	3.2.	Спе	ектрална карактеризација	78	
3.2.1.			N-ацилхидразони	78	
3.2.2.		.2.	Пиразолони		
	3.3.	Ан	гиоксидативна активност		
	3.3	.1.	N-ацилхидразони		
	3.3	.2.	Пиразолони	100	
	3.4.	Ци	тотоксична активност	110	
	3.4	.1.	Вијабилност MRC-5 и HCT-116 ћелија	110	
	3.4	.2.	Испитивање редокс параметара у MRC-5 и HCT-116 ћелијама	113	
	3.5.	Ан	тибактеријска активност	114	
	3.6.	In s	silico интеракције са протеинима вируса SARS-CoV-2	116	
	3.6	.1.	Шиљасти (спајк) гликопротеин	120	
3.6.2.		.2.	Главна протеаза – М ^{рго}	120	
	3.6	.3.	Папаину слична протеаза – PL _{pro}	121	
3.6.4.		.4.	Хумани ангиотензин-конвертујући ензим 2 – АСЕ2	121	
	3.6	.5.	Комплекс рецептор-везујућег домена спајк протеина (RBD) и ангиотензин-конвертујућег ензима 2 (ACE2) – RBD-ACE2	122	
	3.7.	In s	silico ADMET анализа	122	
	3.7	.1.	АDMET профил пиразолона	123	
	3.7	.2.	АDMET профил <i>N</i> -ацилхидразона	125	
4	. ЗАК	ЉУЧ	ІАК	126	
5	. ЛИТ	EPA	ГУРА	129	
Π	[РИЛО]	ГА		143	
Π	[РИЛО]	ГБ		176	
Π	[РИЛО]	ΓВ		206	
Б	БИОГРАФИЈА				

1. ОПШТИ ДЕО

1.1. Хидразони

1.1.1. Емил Фишер – "случајни" зачетник историје хидразона

"Науке нису апстрактне творевине већ представљају резултат људских напора и тесно су повезане са личностима и судбинама посвећених истраживача" – речи су знаменитог органског хемичара Хермана Емила Фишера (нем. Hermann Emil *Fischer*).^[1] Многобројна професионална достигнућа и животни пут овог реномираног научника целовито поткрепљују релевантност његових речи и амплитуду напора којима је устројио темеље и пут савремене хемије. Научници памте Фишера као узорног, еминентног, готово најистакнутијег хемичара у историји, описујући га класичарем без премца, маестром органске и зачетником биолошке хемије.^[2,3] Епитети којима је Фишер овенчан поседују своје утемељење још од давне 1902. године, када му је Шведска краљевска академија наука доделила признање за рад на синтези шећера и пурина.^[4] Фишерова открића молекуларне структуре бројних биомолекула, пре свега шећера, ензима и различитих природних производа, убрајају се међу његове највеће доприносе у области биохемије.^[2] Фишеровим Мећутим, првим значајним открићем сматра ce његова "случајна" синтеза до тада непознатог једињења – фенилхидразина.^[2,5,6] Иако је званичном открићу фенилхидразина претходило пар "несвесних" синтеза одређених фенилхидразинских деривата, Фишер је први препознао непознато једињење дајући му назив хидразин, при чему је хидразин каквог данас познајемо још увек био непознаница научном свету.^[6] Фишер је свој први рад о хидразину (односно фенилхидразину) објавио 1875. године, док је тек Теодор Куртиус (нем. *Theodor Curtius*) 1887. године објавио синтезу хидразин сулфата, дајући му назив *диамид* (Слика 1).^[7] Поред ових научних сазнања, важно је и напоменути рад холандског хемичара Лобрија де Брајна (енгл. Lobry de Bruyn), који је 1895. године први добио чист анхидровани хидразин (Слика 1).^[8]



Слика 1. Емил Фишер (лево), Теодор Куртиус (средина) и Лобри де Брајн (десно).

Сазнања о хидразину и фенилхидразину се могу сматрати и зачетком историје хидразонских деривата, с обзиром на то да представљају њихове прекурсоре у реакцијама са карбонилним једињењима, пре свега алдехидима и кетонима. Штавише, Фишер је препознао потенцијал новооткривеног фенилхидразина, чијом је употребом описао молекулску структуру многих угљених хидрата, и то синтезом њихових хидразона и озазона.^[9] Неоспорно је да је Фишерово откриће фенилхидразина у великој мери утицало на плодоносност његовог рада на угљеним хидратима, последично и на његов допринос органској хемији. Занимљивост је и то да је Емил Фишер први органски хемичар који је постао лауреат Нобелове награде. Поред зачетка историје хидразонских једињења, откриће фенилхидразина отворило је и пут ка синтези различитих класа хетероцикличних једињења, почевши од Фишерове синтезе индолских деривата.^[3] О значају живота и рада Емила Фишера можда најбоље говори његова лична дефиниција науке, а такође и да су наизглед "случајна" научна открића, у крајњој линији, резултат напора посвећених истраживача.

1.1.2. Биодоступност хидразонских једињења

Хидразонски деривати обухватају разноврсна природна и синтетичка органска једињења, својствена по постојању азот-азот хемијске везе у оквиру општег R¹-NH-N=CH-R² скелета.^[10,11] У квантитативном смислу, плодоносан истраживачки рад на једињењима хидразонског типа допринео је обогаћивању фонда ове хемијске класе, што је од нарочитог значаја с обзиром на њихову ограничену доступност у природи. Уопштено посматрајући, природни производи који поседују N-N структурни фрагмент (диазо групу) су релативно ниско биодоступни.^[12] Према расположивим литературним подацима, до 2013. године идентификовано је тек преко две стотине једињења овог типа из природних извора, што и није изненађујуће узимајући у обзир комплексност механизама продукције ових једињења. Хидразин природно настаје као интермедијер у циклусу азота, дејством ензима хидразин-синтазе који учествује у бактеријским анаеробним оксидацијама амонијака.[11,12] Одређени производи који поред хидразонског фрагмента поседују и друге функционалне јединице идентификовани су и изоловани из појединих гљива, бактерија, биљака и морских организама (Слика 2).^[11] Такође, испитивања активности ових једињења указала су и на значајан биолошки потенцијал појединих деривата.^[13] Алкалоиди каторазон (1) и јоропиразон (2) изоловани из соја *Streptomyces* испољили су цитотоксично дејство према канцерогеним ћелијама.^[14,15]



Слика 2. Структуре каторазона (1), јоропиразона (2) и NG-061 (3).

Група јапанских истраживача је испитивањем деривата фенилсирћетне киселине NG-061 (3), метаболита изолованог из ферментационог бујона гљиве Penicillium minioluteum, открила његову способност стимулације неуротрофичног ефекта фактора раста нерава у РС12 ћелијама пацова.^[16] Поред бенефитних ефеката, поједини природни хидразони испољили су и штетна дејства. Хомолози гиромитрина (4) идентификовани су као токсична једињења присутна у "отровном двојнику" гљиве смрчак-*Gyromitra esculenta*, изазивајући гастроинтестиналне и неуролошке поремећаје (Слика 3). Такође, истраживања су показала да поједини деривати хидразона могу имати и особине хромогена, тј. једињења које (био)хемијским трансформацијама задобија одређено обојење. У природи се хромогена својства једињења, који заправо представљају прекурсоре пигмената, испољавају услед оксидационих процеса који настају као последица оштећења биљке, тј. плода.^[11] Управо су деривати шеферала (7) изоловани из гљива (шумска печурка и липика) окарактерисани као хромогене супстанце.^[17] Разноврсна својства и функције хидразона осликавају се и на примеру деривата псамаплина (6) изолованих из морског сунђера, који су испољили способност инхибиције ДНК метилтрансферазе и хистон деацетилазе.^[18] Поред поменутих једињења, идентификовани су и природни деривати хидразона чији биолошки потенцијал још увек није препознат, као што је вератрилиден-хидразид (5), присутан у биљци *Wedelia biflora*.^[11,19]



Слика 3. Структуре гиромитрина (4), вератрилиден-хидразида (5), псамаплина Г (6), и шеферала (7).

1.1.3. Структурне и хемијске особине хидразона

У погледу хемијске класификације, хидразони и њихови деривати се, на основу присуства азометинске групе (-CH=N-) као фундаменталног конституционог фрагмента, могу уопштено сврстати у класу *имина*, једињења познатих и као Шифове базе. Међутим, у поређењу са иминима, дистинктивно својство хидразонске јединице огледа се у постојању азот-азот (N-N) везе, чиме се хидразони истичу као јединствена хемијска врста, како у структурном тако и у физичко-хемијском аспекту (Слика 4).^[20] Такође, својеврсном подгрупом хидразонских једињења се могу сматрати и тзв. *N*-ацилхидразони, карактеристични по –CO–NH–N=CH– структурном фрагменту, те као такви представљају уникатну фузију амидне и имино групе.^[21]



Слика 4. Опште структуре имина, хидразона и *N*-ацилхидразона.

Уопштено говорећи, хидразони испољавају јединствено хемијско понашање првенствено услед конјугације C=N везе са слободним електронским паром на суседном азотовом атому.^[22-24] Атоми азота испољавају нуклеофилне особине, док угљеник имино групе (-CH=N-) поседује и нуклеофилни и електрофилни карактер (Слика 5). Код уобичајених хидразона, азот амино групе (-NH-) испољава већу реактивност у односу на азот имино групе (-CH=N-).^[24] У случају *N*-ацилхидразона, амино група (-NH-) је истовремено и амидна (-NH-C=O), стога водоников атом поседује кисела својства.^[21] Имајући у виду конјугацију имино и амидне групе, киселости *N*-ацилхидразона доприноси и водоников атом везан за угљеник имино групе (-CH=N-).^[20] Специфичне особине хидразонске групе, њена структурна варијабилност и могућност разноврсне функционализације, истичу синтетички значај хидразона као прекурсора, интермедијера и финалних производа.^[21-28] Модификацијом хидразонског језгра различитим функционалним групама добијају се производи јединствених структурних карактеристика и биолошких особина.^[22] Узимајући у обзир да хидразони могу реаговати како са електрофилима тако и са нуклеофилима, често се употребљавају као прекурсори различитих хетероцикличних једињења.[29]



Слика 5. Хемијска својства хидразонске и *N*-ацилхидразонске функционалне групе.

Генерално, хидразони се сматрају стабилним једињењима, превасходно због могућности делокализације π-електрона из C=N везе.^[30] Последично, премештањем ових електрона смањује се електронска густина на угљениковом атому имино групе, чиме он постаје мање подложан нуклеофилном нападу.^[30] У поређењу са иминима, хидразони показују већу хидролитичку стабилност, што је неретко пожељна карактеристика.^[24] Такође, од значаја је и способност кетоенолне таутомерије *N*-ацилхидразонских деривата, нарочито са аспекта биолошких активности и њиховог координовања са различитим металима (Шема 1).^[31] У чврстом стању *N*-ацилхидразони егзистирају у кето форми, док се у њиховим растворима успоставља равнотежа између кето и енолног облика.^[29]



Шема 1. Кето-енолни таутомеризам *N*-ацилхидразона.

Хидразонски деривати се могу понашати као акцептори и као донори протона.[27] С тим у вези, једна од одлика *N*-ацилхидразона јесте и могућност формирања интермолекулских водоничних веза, при чему у њиховом успостављању могу учествовати водоник и азот имино групе, карбонилни кисеоник, као и водоников атом амино групе.^[21] Поред тога, услед могућности ротације молекула око иминске (-CH=N-) и/или амидне (-NH-CO) везе, Nацилхидразони теоретски могу поседовати четири различита изомера (Слика 6).[32] Ротацијом C=N везе, *N*-ацилхидразони егзистирају као смеша *Z* и *E* геометријских стереоизомера, при чему је у погледу стабилности предоминантан Е изомер.^[21,32] Интерконверзија ова два изомера у раствору представља спор процес, при чему је за успостављање динамичке равнотеже потребно и до неколико дана.^[32] Превођење једног облика у други захтева утрошак енергије, која се може обезбедити хемијским, фотохемијским или термодинамичким путем.^[32] Са друге стране, *N*-ацилхидразони могу поседовати и два конформациона стереоизомера, чије је постојање условљено ротацијом око амидне везе, односно просторном оријентацијом N-H везе у односу на карбонилну С=О групу (Слика 6). Сходно томе, код ових деривата разликујемо синперипланарни конформер, када је N-H веза локализована са исте стране као и С=О, као и антиперипланарни, када су ове две везе оријентисане насупрот једна другој.^[21,32]



Слика 6. Геометријски и конформациони изомери *N*-ацилхидразона.

Стабилност и заступљеност ових конформера у раствору условљена је стерним факторима, електронским ефектима, као и могућношћу грађења водоничних веза

са молекулима растварача.^[32] Предоминантност одређеног конформера се може проценити применом NMR спектроскопских метода (енгл. *Nuclear Magnetic Resonance*), где се као пример може навести испитивање пиразоло[3,4б]хинолинских деривата хидразона. У овом конкретном случају, установљена је предоминантност *E* синперипланарног изомера услед повољних интермолекулских интеракција са молекулима растварача.^[32]

1.1.4. Синтеза хидразона

Поред својствених структурних и хемијских особина, једињења хидразонског типа карактерише једноставност синтезе и могућност разнолике хемијске трансформације.^[26] У погледу могућности њихове разноврсне функционализације, деривати хидразона се сматрају флексибилним и "подесивим" хемијским ентитетима, што је омогућило њихову широку примену.^[10] Уопштено, синтеза хидразона се може извести различитим синтетичким приступима, при чему је основни начин кондензација хидразина и органохидразинских деривата са алдехидима и кетонима (Шема 2). Слично томе, за добијање N-ацилхидразона се, уместо хидразина, као прекурсори употребљавају хидразиди карбоксилних киселина (Шема 2).^[33] У реакцијама добијања, хидразони се често издвајају у облику талога, неретко и у кристалном облику, чиме се избегавају комплексне технике пречишћавања.^[26] Као реакциони медијуми се најчешће користе поларни растварачи, као што су метанол, етанол, бутанол, тетрахидрофуран, глацијална сирћетна киселина и сл.^[28,29] Ове реакције се могу извести у кисело-катализованим условима, стога је, у циљу скраћења реакционог времена и побољшања приноса, честа употреба протон донора.^[30] Такоће, загревањем реакционе смеше може се значајно смањити време реакције уз обезбећивање високих приноса.^[10]



Шема 2. Синтеза хидразона и *N*-ацилхидразона.

Механистички посматрано, кисело-катализована реакција започиње протоновањем кисеоника карбонилне групе (I), чиме се повећава електрофилност карбонилног угљеника и олакшава нуклеофилни напад хидразина (II) (Шема 3). У новонасталом *sp*³ хибридизованом тетраедарском интермедијеру, азот носи позитивну шаржу (амонијум јон). Стога, наредни кораци реакције јесу депротоновање амонијум јона (III) и протоновање кисеоника (IV). Ова два корака се могу обједињено посматрати и као трансфер протона са азота на кисеоников атом. Сходно томе, следи елиминација молекула воде уз симултано формирање πвезе између угљеника и азота, при чему настаје иминијум јон (V). У највећем броју случајева, елиминација воде (V) представља спор процес, нарочито у одсуству протон донора. У финалној фази реакције (VI) долази до депротоновања иминијум јона, приликом чега се као производ добија хидразон.



Шема 3. Механизам реакције добијања хидразона на примеру хидразина.

У поређењу са кетонима, алдехиди су реактивнији према реакцијама нуклеофилне адиције услед стерних и електронских ефеката супституената. Узимајући у обзир да хидразин испољава јака нуклеофилна својства, примена киселих услова није суштински неопходна за синтезу хидразона. Штавише, до формирања хидразонског производа може доћи чак и при базним реакционим условима, као што је то код Волф-Кишнерове редукције (енгл. *Wolff-Kishner*). Међутим, употреба благих киселина поспешује елиминациону фазу (V), која је често корак који одређује брзину реакције.

Други синтетички пут за добијање хидразонских деривата јесте купловање арилдиазонијумових соли са активираним метиленским једињењима, најчешће βкетокиселинама и β-кетоестрима (Шема 4).^[24,26] Ова методологија позната је и као Џап-Клингеманова синтеза (енгл. *Japp-Klingemann*), названа по хемичарима Френсису Роберту Џапу (енгл. *Francis Robert Japp*) и Феликсу Клингеману (нем. *Felix Klingemann*).^[34]



Шема 4. Џап-Клингеманова синтеза хидразона.

Полазећи од β-кетоестра као прекурсора, реакција започиње депротоновањем метиленске групе, приликом чега настаје карбанјон који може бити резонантно стабилизован електрон-привлачним ефектима суседних група (Шема 5). У даљем

току реакције одвија се нуклеофилни напад енолатног анјона на диазонијумову со, при чему настаје азо међупроизвод. Нуклеофилним нападом хидроксилне групе на угљеник карбонилне групе генерише се тетраедарски интермедијер, што последично доводи до елиминације одговарајуће карбоксилне киселине. Финалну фазу реакције представља трансфер протона, чиме се као крајњи производ добија хидразонски дериват и одговарајући карбоксилат.



Шема 5. Механизам Џап-Клингеманове синтезе хидразона на примеру βкетоестра као прекурсора.

Поред представљених синтетичких путева, синтеза супституисаних хидразонских деривата се може извести полазећи од несупституисаних хидразона и арил халогенида (Шема 6).^[26]



Шема 6. Синтеза супституисаних хидразона.

Такође, трисупституисани деривати хидразона могу се успешно синтетисати мултикомпонентном "one pot" реакцијом алдехида, алкил халогенида и хидразина

у *t*-бутанолу као растварачу, под инертним условима (N₂), уз присуство калијум *t*бутоксида (Шема 7).^[35] Полазећи од сличних прекурсора, *Zhang* и сарадници представили су ефикасну синтезу *N*-ацилхидразона, применом мултикомпонентне паладијум-катализоване реакције (Шема 7).^[36] Овом методом, која у основи представља тандем реакцију кондензације и карбониловања, могуће је извршити "*one pot*" припрему разноврсних *N*-ацилхидразонских деривата у већим количинама.



Шема 7. Мултикомпонентне реакције синтезе хидразонских деривата.

Синтеза алкинил хидразонских деривата изведена је употребом 2-оксо-3бутиноата и хидразин-монохидрата као полазних једињења, у 2,2,2трифлуороетанолу (TFE) као реакционом медијуму, уз присуство 20mol% сирћетне киселине (Шема 8).^[37] Са друге стране, терминални алкини се у златомкатализованој реакцији купловања са различитим хидразидима могу конвертовати до одговарајућих *N*-ацилхидразона у добром до одличном приносу (Шема 8).^[38] Ова методологија подразумева употребу благих реакционих услова, а такође је означена толерантном према различитим функционалним групама и стерно-електронским ефектима супституената.



Шема 8. Добијање хидразона полазећи од 2-оксо-3-бутиноата и терминалних алкина.

Деривати хидразона се могу синтетисати употребом алкохола као прекурсора. *Milstein* и сарадници представили су реакцију купловања алкохола и хидразина у тетрахидрофурану као реакционом медијуму, катализовану комплексом мангана (Шема 9а).^[39] Такође, *Li* и сарадници извели су директну синтезу арилхидразона иридијум-катализованом реакцијом купловања арилхидразина и алкохола (Шема 9б).^[40] Са друге стране, уместо употребе металних комплекса, *Yavari* и *Shaabanzadeh* представили су електрохемијску синтезу хидразона, и то електрооксидацијом бензилне С(*sp*³)–Н везе одговарајућих алкохола, халогенида и толуена и њиховом даљом реакцијом са различитим хидразидима (Шема 9в).^[41] Као предности ове методе истичу се једноставност синтезе, економска приступачност примењеног електролита, могућност извођења реакције у воденој средини, као и избегавање употребе метала.^[41]



Шема 9. Синтеза хидразона из алкохола као прекурсора.

Деривати хидразона се могу добити и реакцијом Мајклове нуклеофилне адиције (енгл. *Michael*) хидразина на различито супституисане нитростирене, при чему се финални производ добија елиминацијом нитроалкана из формираног аза-Мајкловог адукта (Шема 10).^[42] Такође, региоселективном вициналном дифункционализацијом стирена помоћу арилазо сулфона и видљиве светлости извршена је синтеза α-сулфонил арилхидразона у умереном до одличном приносу (Шема 10).^[43]



Шема 10. Синтеза хидразона из нитростирена и стирена.

Синтезу *N*,*N*-диметил и арил хидразона могуће је извршити третманом азида одговарајућим дериватима хидразина у ацетонитрилу као растварачу, уз каталитичке количине гвожђе (III) хлорида (Шема 11).^[44]



Шема 11. Синтеза *N*,*N*-диметил и арил хидразона из азида.

1.1.5. Хемијске трансформације хидразонских деривата

Посматрано са синтетичког аспекта, хидразонска структурна јединица се сматра корисним синтоном за успостављање нових угљеник-азот и азотхетероатом веза, што је од практичног значаја за добијање разноврсних хетероцикличних система.^[45,46] Истраживања заснована на примени хидразона као прекурсора резултирала су бројним методологијама за синтезу различито функционализованих деривата пиразола, пиразина, тетразола, индазола, оксадиазина, тиадиазола, пиразолона, триазола, азетидинона, тиазолидинона, тетраазепина, пиридазина, фталазина и других хетероцикличних једињења. [24,28,45-^{52]} Молекулска структура полазног хидразонског једињења, као и природа и положај присутних функционалних група, умногоме одређују њихову употребу као прекурсора одређеног хетероцикличног система.^[53] У зависности од структурних карактеристика, хидразони могу подлећи реакцијама интер- и интрамолекулске циклизације, које могу бити метал-, фото- или органокатализоване.^[45] На пример, код деривата хидразона који не поседују водоникове атоме на амино групи, C=N веза може подлећи [2+2] циклоадицији у реакцији са кетенима, чиме се као производи добијају β-лактами (Шема 12).^[53] У овим реакцијама, хидразони представљају повољна полазна једињења у погледу њихове стабилности, реакционих услова, стереоселективности и приноса.[53]



Шема 12. Пример [2+2] циклоадиције хидразона у реакцији са кетенима.

Такође, хидразони добијени из α, β-незасићених алдехида и кетона могу се употребити као супстрати у перицикличним реакцијама. У овом случају, таква хидразонска једињења се могу посматрати као аза-деривати бутадиена услед

постојања 1-аза-1,3-диенског система.^[53] Присуством додатне амино групе на иминском атому азота успоставља се конјуговани систем што утиче на повећање електронске густине, последично и на реактивност ових једињења. Специфична електронска својства ових деривата погодна су за извођење [4+2] циклоадиција, односно концертованих Диелс-Алдерових реакција (енгл. *Diels-Alder*), чиме се као производи добијају различито функционализована једињења пиридина (Шема 13).^[53]



Шема 13. Хидразони у Диелс-Алдеровим реакцијама.

Електронска природа ових система, односно њихова реактивност у овим ce контролисати варијацијом положаја реакцијама, може И природе супституената.^[53] Структурна варијабилност је од значаја за ток и одвијање Диелс-Алдерових реакција, имајући у виду да реакциони услови и ефикасност реакције зависе од енергије и преклапања НОМО диена и LUMO диенофила. Поједини хидразонски деривати могу подлећи и интрамолекулској Диелс-Алдеровој циклизацији (Шема 14), с тим да су такве синтетичке методологије ограничене, односно, условљене специфичном структуром полазног једињења.^[53,54] Штавише, хидразонска једињења се у овим реакцијама могу применити и као диенофили, што додатно проширује могућност њихове разноврсне примене. На пример, *N*ацилхидразони у реакцији са бутадиенима, у присуству цирконијумовог катализатора са аксијално хиралним лигандом, као производе дају одговарајуће дихидропиридоне (Шема 14).





Термалном изомеризацијом или кисело-катализованим 1,2-трансфером протона, хидразони се могу конвертовати до азометин имина, односно 1,3-дипола (алил анјона) који представљају повољне супстрате за 1,3-циклоадиције интра- и интермолекулског типа (Шема 15).^[53]



Шема 15. Пример 1,3-циклоадиције азометин имина.

Поред добијања хетероцикличних једињења, хидразони се могу хемијски трансформисати и до многих других значајних производа. Конкретно, *N*ацилхидразони се могу редуковати до одговарајућих деривата хидразина, а такође и подлећи реакцијама алиловања, радикалским адицијама, адицији нитрила, чак и Маниховој (нем. *Mannich*) реакцији (Шема 16).^[52]



Шема 16. Реакције *N*-ацилхидразона.

1.1.6. Биоактивна својства хидразонских деривата

Хидразонска јединица, а нарочито *N*-ацилхидразонски нуклеус, убраја се међу синтетички најексплоатисаније фармакофоре на пољу дизајна биолошки агенаса.^[55-58] потентних Захваљујући могућности широке структурне диверсификације, једињења са инкорпорираном хидразонском компонентом се истичу по богатом дијапазону биолошких карактеристика, услед чега уживају посебан статус у области медицинске хемије.[33] Хидразони су нарочито квалификовани за концепт молекулске хибридизације, односно за комбинацију са другим структурним мотивима, са циљем добијања нових једињења са побољшаним биолошким профилом.^[59] Екстензивна истраживања у овој области резултирала су развојем разноврсних биоактивних хибрида, где о плодотворности приступа сведочи употреба бројних хидразонских једињења као лекова. Хидразони неретко испољавају антимикобактеријско дејство, при чему се дизајн нових агенаса често базира на функционализацији лека изониазида, познатог антибиотика за лечење туберкулозе.^[60,61] Нифуроксазид (8) и нитрофурантоин (9) су међу лековима хидразонског типа који се употребљавају као антибиотици, превасходно у лечењу инфекција интестиналног и уринарног тракта, док се лек веразид (10) примењује као туберкулостатик (Слика 7). Такође, познат је и антипротозоални лек нифуртимокс (11), који је одобрен за лечење Шагасове болести, зоонозе изазване паразитом *Trypanosoma cruzi*.



Слика 7. Неки антимикробни лекови хидразонског типа.

Поред антимикробне активности,^[62-65] деривати хидразона могу показати и антиоксидативна,^[66-69] антитуморска,^[57,70-74] антиинфламаторна,^[75-79] антидијабетска,^[80-82] антивирусна,^[56,83] и друга бројна дејства. Штавише, хидразони могу испољити активност према више циљних мета (енгл. *multitarget agents*),^[76] што је од посебног значаја за њихову потенцијалну примену код комплексних стања, као што су Алцхајмерова болест и Паркинсонизам.^[84-87] Поред тога, присуство водоник-донорских и -акцепторских локуса омогућава им инхибиторну активност према бројним ензимима, као што су циклооксигеназе,^[78,88] моноаминооксидаза,^[89] ацетил- и бутирилхолинестераза.^[90] Раскошна лепеза бенефитних биолошких дејстава хидразонских деривата изнедрила је и друге лекове различите намене (Слика 8). На пример, лек левосимедан (**12**) користи се за лечење срчане инсуфицијенције и других кардиоваскуларних обољења, док су хидралазин (**13**) и дихидралазин (**14**) вазодилататори, односно антихипертензиви. Са друге стране, карбазохром (15) се употребљава за заустављање крварења (антихеморагијски агенс), елтромбопаг (16) за лечење тромбоцитопеније, дантролен је мишићни релаксант (17), док се милотарг (антитело-лек конјугат) примењује у третману акутне мијелоидне леукемије. Познат је хидразонски пролек тестостерона, односно тестостерон 17-енантат-3-хидразон бензилне киселине (енгл. *TEBH*), који се интрамускуларном администрацијом користи као хормонска терапија у одређеним стањима.



Слика 8. Разноврсни лекови хидразонског типа.

Бројна једињења хидразонског типа су у прекличничким или клиничким фазама испитивања, као што је алдоксорубицин (18), пролек доксорубицина, намењен за лечење саркома меких ткива (Слика 9).^[91] Дериватизација доксорубицина хидразонским нуклеусом поседује научно утемељење у погледу транспорта лека и селективног таргетирања туморских ћелија. Наиме, након интравенске администрације, алдоксорубицин се до канцерогених ћелија транспортује албумином, и то ковалентним везивањем за тиолну групу Cys34.^[91] Овакав приступ је оправдан с обзиром на то да се албумин акумулира у ћелијама рака услед њихове измењене архитектуре, ангиогенских фактора, као и поремећаја циркулације лимфе у туморским ткивима.^[91] Са друге стране, присуство хидразонске јединице омогућава селективно ослобађање доксорубицина у киселој средини, која је карактеристична за ћелије рака.^[91] Резултати ових испитивања указују на побољшане ефекте алдоксорубицина у односу на доксорубицин, како у третману канцера, тако и са токсиколошког аспекта.^[91] У фази клиничких испитивања налази се и хидразонски дериват означен као РАС-1 (19) (енгл. procaspase-activating compound-1), са циљем његове примене код узнапредовалих малигних стања.^[92] Ово једињење је идентификовано као први мали молекул који поседује способност директне активације прокаспазе-3 (инактивне форме) до активне каспазе-3, протеина укљученог у процес програмиране ћелијске смртиапоптозе.^[93]



Слика 9. Структура алдоксорубицина (18) и једињења РАС-1 (19).

1.2. Пиразолони

1.2.1. Првосинтетисани пиразол(он) – антипирин

Откриће пиразолонских деривата везује се за давну 1883. годину, као резултат још једне "случајности" у потрази за новим антипиретским једињењима. Са првобитном намером синтезе хинолинских деривата, немачки хемичар Лудвиг Кнор (нем. Ludwig Knorr) је метиловањем производа реакције фенилхидразина са β-кетоестром добио први пиразолонски дериват–*антипирин* (Слика 10).^[94,95] Кнор је класу нових петочланих хетероцикличних система са два суседна азотова атома назвао пиразолима.^[96] У том погледу, пиразолонска једињења представљају деривате пиразола која на једном од угљеникових атома поседују додатну оксо групу. Новодобијено једињење са антипиретским, аналгетским И антиинфламаторним својствима је по патентирању релативно брзо пронашло комерцијалну примену, поставши један од првих синтетичких медикамената тог доба.^[97] Антипирин и његови деривати били су дуго и широко примењивани као аналгетски и антипиретски агенси, све до појаве модернијих лекова попут аспирина, парацетамола и ибупрофена. Иако се откриће антипирина (познат и под називом феназон) генерално (и са правом) приписује Кнору, занимљива је "случајна" чињеница да је његов ментор био ни мање ни више него Емил Фишер, на чији је позив Кнор започео испитивање реакције фенилхидразина са ацетсирћетним естром.^[94] Неспорно је да су Кнорова сазнања на овом пољу подстакла интересовања за хемијом пиразола и пиразолона, што је до данашњег дана резултирало синтезом бројних деривата и лекова са разноврсним биолошким активностима. У области органске хемије значајна су и друга Кнорова достигнућа, међу којима су најпознатије: Пал-Кнорове реакције за добијање различито функционализованих деривата пирола, тиофена и фурана;^[98,99] синтеза хинолина из β-кетоанилида;^[100] као и добијање пирола из α-аминокетона и β-кетоестара.^[101]





Слика 10. Лудвиг Кнор и антипирин.

1.2.2. Пиразолска једињења у природи

Пиразоли се генерално сматрају синтетичким органским једињењима,^[102] с обзиром на њихову врло ограничену биодоступност. Ретко налажење пиразола у природи приписује се специфичности N–N везе, односно, њеном отежаном грађењу у живим организмима.^[103] Међу прве пиразолске деривате изоловане из природних извора убрајају се β -(1-пиразолил)аланин (**20**) из семена лубенице и 3-*n*-нонил-1*H*-пиразол (**21**) из азијске биљке *Houttuynia cordatau* (Слика 11).^[104] Такође, алкалоид

витасомнин (22) идентификован је у лековитој биљци ашваганди (Withania somnifera Dun), који поред аналгетских и антиинфламаторних особина испољава и депресорске ефекте на централни нервни систем (Слика 11).^[105] Временом су пиразолски деривати са антивиралним, антитуморским и антимикробним својствима изоловани и из различитих микроорганизама, као што су пиразофурини (23) (Streptomyces candidus), формицини (24) (Streptomyces candidus, Streptomyces lavendulae, и Nocardia interforma) и флувиоли (25) (Pseudomonas fluorescens) (Слика 11).^[105] Поред поменутих, пиразолонски дериват ностоцин А (26) изолован је из цијанобактерије Nostoc spongiaeforme, који као екстрацелуларни пигмент испољава цитотоксично дејство (Слика 11).^[103]



Слика 11. Једињења са пиразолским фрагментом изоловани из природних извора.

1.2.3. Структура и карактеристике пиразолона

У структурном погледу, основни градивни елемент пиразолонских деривата јесте пиразолско језгро (27), које представља петочлани хетероароматични систем састављен од три угљеникова и два азотова атома, позиционираних у суседству један другом (Слика 12). Услед могућности различите хемијске функционализације и њиховог богатог структурног диверзитета, у литератури се пиразолонски деривати неретко посматрају и као деривати пиразолина, парцијално редукованих форми пиразола, и то 1-пиразолина (28), 2-пиразолина (29) и 3-пиразолина (30) (Слика 12). Последично, пиразолони се још називају и пиразолинонима, чиме се децидније описују као оксо деривати пиразолина.^[106]



Слика 12. Пиразол и његови редуковани облици.

У том погледу, разликују се три основна структурна типа пиразолона: 2пиразолин-5-он (**31**), 2-пиразолин-4-он (**32**) и 3-пиразолин-5-он (**33**) (Слика 13).^[107]



Слика 13. Генерална структурна класификација пиразолона.

Литература обилује разноврсним дериватима пиразолона, а такође и различитим начинима њихове номенклатуре, с обзиром на то да се ова једињења могу посматрати као деривати пиразола, пиразолина, или пак као својеврсна класа једињења. Последично, одређени дериват може поседовати више назива, што на први поглед може бити изазовно за тумачење. На пример, према *PubChem* бази података (<u>https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/</u>), пиразолонски дериват приказан на Слици 14 (CID број: 574489) поседује готово десетак различитих синонима, при чему се у литератури генерално не наглашава употреба одређене номенклатуре.



PubChem

Слика 14. Номенклатура пиразолона.

Разноликости пиразолонских једињења доприноси и њихова способност егзистирања у више таутомерних форми, па тако нпр. пиразолин-5-они могу постојати у кетохидразинском NH (**34**), кетохидразонском CH (**35**), или енолном OH (**36**) облику,^[108] што је омогућено кето-енолном, имин-енамин и лактам-лактим таутомеријом (Слика 15).^[107] Испитивање таутомеризма пиразолонских деривата сматра се захтевним научним проблемом,^[109] услед утицаја мноштва фактора на доминантност одређеног таутомерног облика. Број таутомерних форми пиразолонских деривата и њихова стабилност умногоме зависе од положаја, броја и врсте присутних супституената, природе растварача, концентрације, температуре, као и од могућности формирања водоничних веза.^[110,111] Код пиразолона у чврстом (кристалном) стању, рендгенска структурна анализа пружа готово недвосмислене резултате, док испитивање таутомеризма у раствору може представљати изазован задатак.^[109] Одређивање доминантног таутомерног облика се може извршити применом IR (енгл. *Infrared*) и ¹H NMR спектроскопских метода, с тим да је разликовање NH i OH облика отежано услед брзе измене протона.^[112] Други начини испитивања таутомерије подразумевају примену ултраљубичасте спектроскопије и pK мерења, при чему и теоријска изучавања могу помоћи у расветљавању стабилности таутомерних облика.^[111] На пример, комбинованом применом различитих техника установљено је да је у воденом раствору 1,3дисупституисаних-5-пиразолона успостављена равнотежа између 90% NH и 10% OH облика, док је у неполарним растварачима предоминантан CH облик.^[111]



Слика 15. Таутомерни облици пиразолин-5-она.

У погледу њихових физичких карактеристика, пиразолони су често безбојне до жуте чврсте супстанце, са тачкама топљења изнад 100 °C.^[111] Нискомолекуларни пиразолони су растворни у води, док су деривати веће молекулске масе растворни у органским растварачима.^[111] Пиразолони могу поседовати и кисели и базни карактер, с тим да се чешће понашају као слабе киселине.^[111] Са друге стране, деривати пиразолона су својствени и по хемијском понашању, поседујући различите реактивне центре ^[113]. На примеру пиразолин-5-она, позиције N-1, C-4, и 5-OH су препознате као нуклеофилни центри, док C-3 испољава електрофилни карактер.^[107]

1.2.4. Синтеза пиразолонског језгра

Кондензација хидразина и његових аналога са 1,3-дикарбонилним системима представља један од основних синтетичких приступа за добијање пиразолског језгра.^[114] Применом ове методологије, пиразолонски прстен се може синтетисати из β-кетоестара као прекурсора, реакцијама са хидразином и његовим дериватима (Шема 17).^[115]



Шема 17. Синтеза пиразолона.

Лудвиг Кнор је прву синтезу пиразолона извео реакцијом етил ацетоацетата са фенилхидразином (Шема 18). Реакција започиње нуклеофилним нападом моносупституисаног азотовог атома на угљеников атом кето групе, где након елиминације молекула воде из карбиноламина првобитно настаје хидразонски интермедијер.^[116] Реакциони пут се наставља интрамолекулском циклизацијом, где се након елиминације алкохола добија пиразолонски дериват 1-фенил-3метил-5-пиразолон (**37**), чијим се метиловањем добија антипирин.



Шема 18. Механизам реакције етил ацетоацетата са фенилхидразином.

Услед постојања два нуклеофилна центра у молекулу хидразина, као и два електрофилна у случају β-кетоестара, механизам и производи ових реакција се могу разликовати.[117] Конкретно, региоселективност реакције етил ацетоацетата и фенилхидразина последица је мање стерне заклоњености и јаче нуклеофилности моносупституисаног азота, а такође и веће електрофилности угљеника кето групе у односу на естарску.^[116] Са друге стране, реакција метилхидразина са етил ацетоацетатом одвија се другачијим механизмом. У овом случају, присуство алкил групе резултује јачим нуклеофилним својствима дисупституисаног азота (I), чиме се смањује реактивност суседног моносупституисаног азотовог атома (II) (Шема 19). Последично, реакција започиње нуклеофилним нападом на естарску групу, где ce након елиминације етанола као интермедијер добија N-метил-3оксобутанхидразид.^[117] Даљи ток реакције подразумева циклизацију овог интермедијера, где се након ослобађања воде као производ добија 1,3-диметил-5пиразолон.[117]



Шема 19. Механизам реакције етил ацетоацетата са метилхидразином.

Поред ацетсирћетних естара, као прекурсори пиразолонских система могу послужити и друга карбонилна једињења, као што су диетилоксалацетат и његове соли, естри ацетилсукцинске киселине и естри ацетилендикарбоксилне киселине (Шема 20).^[111,118,119]



Шема 20. Синтеза пиразолонских система.

1.2.5. Функционализације пиразолонског нуклеуса

Захваљујући присуству различитих реактивних центара, пиразолонски прстен може подлећи различитим хемијским трансформацијама, стога је пиразолонски фрагмент неретко један од градивних блокова комплекснијих хемијских ентитета. У зависности од присутних функционалних група и степена функционализације, пиразолони могу поседовати и нуклеофилне и електрофилне локусе. Једна од главних синтетичких стратегија јесте функционализација С-4 атома, односно активиране метиленске групе. Захваљујући нуклеофилним особинама ове групе, пиразолони могу реаговати са различитим једињењима. Са ароматичним алдехидима, пиразолони ступају у реакцију кондензације Кневенагеловог типа (енгл. Knoevenagel) чиме настају 4-арилиден деривати. Реакције алкиловања и ациловања могу се извести, како у положају С-4, тако и на кисеонику и азоту, што зависи од врсте употребљеног реагенса и реакционих услова.^[111] Пиразолони се могу употребити као прекурсори у Маниховој реакцији, подлећи реакцијама формиловања, нитровања, сулфоновања, халогеновања и купловања са диазонијумовим солима (Шема 21).^[111,120,121] Реактивност пиразолонских деривата (посебно пиразолин-5-она) искоришћена је и у бројним асиметричним, односно енантиоселективним синтезама, где ce употребом различитих (органо)каталитичких система могу добити енантиомерно чисти пиразолски и пиразолонски деривати.^[108,122] У том погледу, значајне су реакције адиције са нитроалкенима, α,β-незасићеним карбонилним системима, арилиден малонитрилима, а такође и реакције алилног алкиловања, аминације и хидрогенизације.^[108]



Шема 21. С-4 функционализације пиразолонског прстена.

1.2.6. Синтеза бис-пиразол(он)ских деривата

Једну од засебних класа пиразолонских деривата представљају тзв. биспиразолони, односно 4,4'-(арилметилен)бис-пиразол(он)и, који се могу добити реакцијом одговарајућих алдехида са 2 еквивалента С4-несупституисаног пиразол-5-она (Шема 22). Синтетички приступ подразумева комбинацију Кневенагелове кондензације и Мајклове адиције, при чему се одговарајући пиразолонски прекурсор (најчешће 1-фенил-3-метил-5-пиразолон или 3-метил-5-пиразолон) може директно употребити (реакција А) или генерисати у тзв. "one pot" псеудо мултикомпонентним реакцијама (реакција Б).^[123] Добијени производи могу егзистирати у пиразолском или пиразолонском облику у зависности од финалне таутомерне форме.^[124,125] Ипак, структуре ових једињења се најчешће приказују у бис-пиразолском облику.



Шема 22. Синтеза бис-пиразол(он)а.

Механистички посматрано, реакција грађења бис-пиразолонских деривата започиње Кневенагеловом кондензацијом, односно, нуклеофилном адицијом енолне форме полазног пиразолонског прекурсора на угљеник карбонилне групе (Шема 23). Након елиминације молекула воде, наредну фазу реакције представља Мајклова адиција другог молекула пиразолонског прекурсора на 4-арилиденски интермедијер, приликом чега настаје одговарајући бис-дериват. Ове реакције се могу извести под различитим реакционим условима, најчешће у води и етанолу као реакционим медијумима.^[111] Истраживања новијег датума описују примену обновљивих хетерогених катализатора, ултразвучних услова, зелених метода, јонских течности, лед лампи (енгл. LED - *Light Emitting Diode*) и бројних нанокаталитичких система.^[125-134]



Шема 23. Механизам Кневенагел/Мајклове реакције за синтезу бис-пиразолона.

Такође, развијени су и различити методолошки приступи, реакциони медијуми и каталитички системи за добијање бис-пиразолона полазећи од З-метил-5пиразолона као прекурсора. Синтеза ових деривата се може извршити применом различитих (магнетних) наночестица, еутектичких растварача, ултразвука, (био)сурфактаната, порозних материјала, јонских течности, хетерогених катализатора и др.^[135-152]

1.2.7. Биолошке особине пиразолонских деривата

Са историјске тачке гледишта, епоха изучавања пиразолонских деривата траје више од једног и по века, што је пружило многобројна значајна сазнања о овој јединственој класи хетероцикличних система. Мноштво прегледних чланака и научних радова квалификује пиразолонски структурни мотив као истакнуту фармакофорну јединицу и важан синтон за добијање медицински релевантних молекула.[106,107,115,153-164] Заинтересованости истраживача за једињења пиразолонског типа је несумњиво допринело откриће бенефитних биолошких својстава антипирина (38) и његових структурних сродника,^[165] чиме је отпочела ера нових синтетичких антипиретских лекова (Слика 16). Антипирин (феназон) је класификован неопиоидни аналгетик, односно, нестероидни као антиинфламаторни лек (енгл. Non-Steroidal Anti-inflammatory Drug-NSAID), првобитно намењен за третман грознице, упалу зглобова и мишићно-скелетног система.^[107] Структурном модификацијом антипирина развијени су и други аналгетски и антиинфламаторни агенси, као што су пропифеназон (39), аминопирин (40), ампирон (41), метамизол (43), моразон (44), фампрофазон (45), нифеназон (46), пиперилон (47), фенилбутазон (49) (примена код животиња), оксифенбутазон (51) и кебузон (52) (Слика 16).^[107,166,167] Међу наведенима, вероватно најпознатији јесте метамизол,^[168] препознатљив и по комерцијалном

називу аналгин, који се у виду натријумове соли примењује као средство за ублажавање болова различитог порекла.^[169] Противупално дејство антипирина и његових аналога огледа се у њиховој способности инхибиције циклооксигеназе, ензима који врши продукцију простагландина, физиолошких гласника и интермедијера у упалним процесима. Отежавајућа околност у примени ових лекова јесу њихова нежељена дејства, услед чега су у појединим деловима света повучени са тржишта, или је њихова употреба ограничена. Поред могућих алергијских реакција и промена на кожи, као потенцијалне озбиљније контраиндикације наведене cv агранулоцитоза, оштећења бубрега, коштане сржи. гастроинтестиналног система и др.[165,168-171] Поред антипиретских лекова, развијени су пиразолонски деривати и са другачијим фармаколошким дејством. Једињење сулфинпиразон (50) (комерцијални назив Антуран) јесте урикозурик, односно, лек који поспешује елиминацију мокраћне киселине из организма, са применом у третману гихта.^[172] Такође, елтромбопаг (48) је одобрен за лечење хроничне тромбоцитопеније, док се едаравон (42) употребљава у лечењу акутног инфаркта мозга.^[173] Лек едаравон је показао неуропротективни ефекат код амиотрофичне латералне склерозе и Паркинсонове болести.^[173] Утврђено је и његово превентивно дејство након исхемије и инфаркта миокарда, као и могућност примене код хроничне опструктивне болести плућа, Алцхајмерове болести, реуматоидног артритиса, канцера и многих других стања.^[174,175] Вишенаменски потенцијал овог лека, а посебно неуропротективно дејство, резултат су његове способности инактивације слободно-радикалских врста,^[176] чиме се спречава оксидативно оштећење ћелијске мембране, а самим тим и смрт неурона.[107]

Мноштво лекова базираних на пиразолонском структурном мотиву плод су вишедеценијских истраживања ове хемијске класе, а њихов разноврсни биолошки потенцијал и јединствене структурне карактеристике обезбеђују готово континуирано интересовање научника.^[107,155,158,161,164,177-179] Имајући у виду његово доминантно синтетичко порекло, пиразолонски нуклеус препознат је и као биоизостерни ентитет, што је од значаја за развој нових лекова.^[115] Такође, доминантна су и настојања комбинације пиразолонског језгра са другим фармакофорним јединицама, чиме настају хибридна једињења јединствених карактеристика. Генерално, молекуларна фузија различитих структурних елемената један је од приступа у рационалном дизајну лекова, са циљем добијања агенаса са тзв. вишециљним дејством код одређене болести.^[180] Коначан циљ овакве стратегије јесте унапређење ефикасности деловања, смањење токсичних ефеката и резистентности на лекове, што је од посебног значаја у третману комплексних стања.^[181] Имплементација пиразолонског мотива у областима комбинаторне и медицинске хемије обогатила је хемијску библиотеку разноврсним пиразолонским хибридима, који неретко испољавају више биолошких активности.^[153,157,159,182-185] Поред аналгетских и антиинфламаторних карактеристика, широкој лепези биолошких дејстава пиразолонских деривата антиоксидативна,[186,187] припадају што cv И друге активности, као антибактеријска,^[156,167,189] антимикробна,^[177,178,188] антифунгална,^[184,190-192] антихелминтска,^[193,194] антитуморска,^[106,159] антипролиферативна,[195,196] антивирална,^[197-200] антитуберкулозна,^[157,189] антиконвулзивна,^[201,202] антидепресивна,^[203] анти-Алцхајмер,^[166,204,205] антидијабетска^[161,206] итд.



Слика 16. Структуре лекова пиразолонског типа.

Разноврсности деловања пиразолона допринела је њихова способност интеракције са многим ензимима и протеинима, као што су ацетил- и бутирилхолинестераза,^[166,204,207] α-амилаза,^[161] α-глукозидаза,^[160] циклооксигеназа,^[208] HIV-1 интеграза,^[209] алдоза редуктаза,^[210] анапластична лимфомна киназа,^[211] с-Меt тирозин киназа,^[212,213] ССR3 хемокин рецептор,^[214] фарнезоид X рецептор,^[215] VEGFR-2 киназа,^[216] панкреасна липаза,^[163] ТGFβR1 киназа,^[217] фосфодиестераза,^[218] ангиотензин-конвертујући ензим,^[183]
липоксигеназа,^[219] карбоксилестераза,^[162] моноаминооксидаза,^[205] теломераза ^[220] и др. Такође, поједини деривати пиразолона (Слика 17) испољили су инхибиторну активност и према главној протеази (енгл. *main protease*, познате као M^{pro} i 3CL^{pro}) корона вируса SARS-CoV и MERS-CoV, изазивача тешког акутног респираторног синдрома (енгл. *Severe Acute Respiratory Syndrome*), односно блискоисточног респираторног синдрома (енгл. *Middle East Respiratory Syndrome*).^[198,199,221]



Слика 17. Пиразолони са инхибиторним дејством према главној протеази.

Ова сазнања подстакла су и испитивања потенцијалног дејства пиразолонских једињења према корона вирусу SARS-CoV-2,^[200] одговорног за изазивање пандемије болести COVID-19. Човечанство се у условима глобалне кризе суочавало са бројним политичким, економским, и друштвеним изазовима, што је захтевало промптне одговоре научне заједнице на бројне непознанице растуће здравствене претње [222]. Према подацима Светске здравствене организације (СЗО), до маја 2025-те регистровано је око 780 милиона оболелих, при чему је преко 7 милиона људи подлегло леталном исходу. Велики напори савремене науке уложени су у развој ефикасних и безбедних вакцина, но висока способност мутације вируса и појављивање нових сојева представљали су својеврсну отежавајућу околност.^[223] Друге стратегије подразумевале су испитивање потенцијала постојећих антивиралних лекова (тзв. drug repurposing) и развој нових агенаса, применом теоријских и експерименталних техника.^[224,225] У том погледу, као неке од основних мета идентификовани су вирусни и хумани протеини, тј. шиљасти (енгл. spike) протеин, главна протеза М^{рго} (енгл. main protease), папаину слична протеза PLpro (енгл. papaine-like protease), РНК-зависна РНК полимераза RdRp (енгл. RNApolymerase), ангиотензин-конвертујући ензим dependent RNA 2 (ACE2), трансмембранска серин протеаза 2 (TMPRSS2) и др.^[224,226-231] Генерално, исходи ефикасног таргетирања ових протеинских структура јесу спречавање везивања вируса за ћелију домаћина, онемогућавања синтезе виралне РНК, репликације, транскрипције, његовог сазревања, ширења, као и способности избегавања имуног одговора.^[228,229,232-236] Међу развијеним медикаментима за третман COVID-а јесу паксловид и молнупиравир. Активне компоненте лека паксловид јесу ритонавир и нирматрелвир, чије се дејство огледа у инхибицији главне протеазе вируса SARS-CoV-2, док молнупиравир, као синтетички рибонуклеозидни пролек, изазива мутације вирусне РНК преко РНК-зависне РНК полимеразе.^[237-239]

1.3. О антиоксидантима

Према генералној дефиницији, антиоксидантом се сматра супстанца која, присутна у малој количини, спречава, одлаже или неутралише оксидативна супстрата.^[240] оштећења одређеног Историјски посматрано, откриће антиоксиданата није везано за одређени датум, али се може нагласити да је антиоксидативно деловање неких једињења емпиријски запажено у 19. веку, приликом индустријског процеса вулканизације.^[241] Прва половина 20. века доноси открића везана за антиоксидативне способности витамина Е и Ц, чиме антиоксидативна активност постаје релевантна и у биолошким системима.[241] Својеврсна увертира у широко изучавање антиоксиданата и слободно-радикалских врста била је хипотеза Ребеке Гершман (енгл. Rebeca Gerschman) о токсичности кисеоника, односно утицају његових реактивних облика на старење и настанак болести.^[242] Ове претпоставке је др Денам Харман (енгл. Denham Harman), називан и "оцем антиоксиданата", преточио и обликовао у својој теорији слободних радикала, по којој су реактивне врсте, које настају као нуспроизвод ћелијског дисања, означене као узрочници старења и болести.^[243] Такође, предложена теорија изнедрила је могућност спречавања читавог ланаца оксидативних реакција једињењима која "пресрећу" радикалске иницијаторе И пропагатореантиоксидантима.^[241] Ова сазнања и претпоставке, заједно са другим, каснијим открићима, као што су ензими антиоксидативне заштите, утицала су на експанзију изучавања слободних радикала и антиоксиданата, односно, њихових ефеката на људски организам.

1.3.1. Теорије старења и антиоксиданти

Изучавање антиоксиданата и слободно-радикалских врста покренуто је великим питањима: како и зашто старимо? Старост као животно доба, и старење, као универзални природни процес, одувек су предмет људског интересовања и саставни сегмент човекове знатижеље. За Сенеку, старост је неизлечива болест, но наглашава да је и као такву треба волети, неговати и искористити. Са друге стране, Цицерон истиче човекову жељу да дочека старост, на коју се ипак, ако је дочека, напослетку жали. Платон описује старост као упориште мира и ослобођење од страсти, док Сократ наглашава да је срамота остарити а не искусити пун потенцијал снаге и лепоте сопственог тела. О младости и старости писао је и Јован Дучић, где младост оштро описује као богатство и краљевање, а старост као најружнију ствар на свету – наказу. Мудрост, знање и искуство издвајају се као позитивне стране старости, док су опадање физичке снаге, расположења и здравља негативне последице старења.

У античким временима, посебно интересовање за процес старења имао је отац биологије Аристотел, чије су теорије сажете у делу *Parva Naturalia*, посебно у расправи о старости, младости, животу, смрти и дисању (лат. *De Juventute et Senectute, De Vita et Morte, De Respiratione*). У оквиру своје дискусије, Аристотел препознаје срце као орган виталне топлоте, и плућа, односно, дисање, као процес хлађења, а процес старења као прогресивно хлађење организма које изазива детериорацију тела и душе.^[244] До данашњег дана предложено је више стотина теорија о могућим узроцима биолошког старења, но чини се да ниједна од њих не пружа комплетан одговор. Модерна наука генерално сагледава могуће узроке старења у оквиру две категорије, тзв. програмских теорија и теорија оштећења/грешака.^[245] Код програмских теорија, старење је саставни део биолошког распореда, процес регулисан експресијом одређених гена након раста и развоја јединке.^[245] Са друге стране, теорије грешака истичу дејство различитих унутрашњих и спољашњих фактора као узрока кумулативног оштећења ћелија. што последично доводи до старења организма.^[245] За немачког биолога Аугуста Bajсмана (нем. August Weismann), старење је последица истрошености организма, практично "хабања" услед дугог "коришћења" и излагања стресорима.^[245] Макс Рубнер (нем. Max Rubner), немачки физиолог, истицао је повезаност животног века са брзином базалног метаболизма, односно, са метаболичком потрошњом кисеоника.^[246] По овој теорији, код организама са бржим метаболизмом очекује се краћи животни век и vice versa, као што се неретко може чути: "живи брзо и умри млад". Теорија унакрсног повезивања (енгл. cross-linking theory) Јохана Бјоркстена (енгл. Johan Bjorksten) као могући узрок старења наводи прогресивно "умрежавање" виталних биомолекула што последично доводи до оштећења ћелија и ткива.^[247] Такоће, претпоставка је и да је старење резултат оштећења ДНК услед нерепарираних грешака које се временом акумулирају.^[245] Узроцима старења бави се и епигенетика, чије је становиште да је губитак епигенетичких информација узрок старења, те да је епигенетски репрограм кључ за преокретање процеса старења и продужавање животног века.^[248,249] Познат је и концепт да постоји дефинисан број колико се пута ћелија може поделити-Хејфликова граница (енгл. Havflick limit), што је одређено дужином теломера-репетитивне ДНК секвенце на крајевима хромозома.^[250] Процес старења се може сагледавати и помоћу другог закона термодинамике, односно ентропијом.^[251] Како ентропија изолованог система расте са временом, у том погледу, старење је процес преласка организма у стање веће неурећености (нереда), која свој максимум достиже у тренутку престанка живота. Неоспорна је констатација да је одговор на питање зашто старимо једнак одговору на питање шта је живот.^[252] Различити су ставови по питању да ли је старење болест *per se* коју треба лечити, но чињеница је да носи факторе ризика за настанак многих хроничних обољења.^[252,253] Препознавши старење као утицај међусобно повезаних фактора, модерна геронаука предлаже интегративни приступ, при чему су напори усмерени ка продужавању трајања здравог периода живота (енгл. *healthspan*), свесни чињенице да су, дословно, људи који дуже живе, дуже и болесни.[253]

Научна заједница је свесна комплексности процеса старења, а такође и могућности утицаја бројних фактора на његово одвијање.^[250-252] Једна од сложенијих, свеобухватнијих и шире прихваћених хипотеза јесте теорија слободних радикала, која ове реактивне врсте сврстава међу главне узрочнике оксидативних оштећења ћелијских компоненти, кумулативних односно, нуклеинских киселина, липида, протеина, угљених хидрата, последично и старења.^[243] Како се физиолошки настанак слободних радикала предоминантно одвија у митохондрији, прецизније је предложена митохондријална слободнорадикалска теорија старења.^[254] Јединственост митохондрије огледа се у томе да поседује сопствену ДНК, односно мтДНК (енгл. *mtDNA*), подложнију оксидативним оштећењима у односу на ДНК у ћелијском нуклеусу.^[254] Сходно томе, прогресивно оштећење мтДНК резултира дисфункцијом митохондрије и повећањем продукције слободних радикала, што се последично одражава на функционисање читаве ћелије. Но, људски организам није препуштен на милост и немилост штетним нуспроизводима аеробног метаболизма, захваљујући постојању читавог комплекса ензима, пептида, витамина и других једињења са антиоксидативним дејством, данас познат као систем антиоксидативне заштите (САЗ). Сазнања о постојању механизама за неутралисање оксидативног дејства слободних радикала довела су до надограђивања претходних теорија старења, увођењем новог концепта који нам је данас познат као оксидативни стрес.^[255] Како се у организму природно одвијају и генерисање и неутралисање слободних радикала, оксидативни стрес је најједноставније дефинисати као стање изазвано неравнотежом између ова два процеса.^[256] Резултат овог дисбаланса јесте повећана количина слободнорадикалских врста, који ланчаним реакцијама могу изазвати оксидативна оштећења биомолекула. Временом је оксидативни стрес повезиван како са старењем тако и са патогенезом многих болести. Стога је рационално поставити питање да ли су антиоксиданти ултимативно решење за третман и превенцију различитих патолошких стања, последично и антидоти процеса старења?

Упркос широком интересовању научника, ове претпоставке су још увек предмет дебате,^[257] с обзиром на то да постоје аргументи који потврђују, али и они који оповргавају теорију слободних радикала. Ипак, за поједине делове комплексне мистерије старења постоје одређена запажања и докази. Постоје сазнања да функција митохондрије опада са временом, као и да се продукција реактивних врста и акумулација мутиране мтДНК повећава са старењем.^[255,258] Такође, уочено је да поједине врсте сисара и птица имају ниску стопу производње реактивних врста кисеоника, што је повезано са њиховим споријим старењем.^[255] Насупрот томе, повећана продукција реактивних врста код мишева и пацова повезана је са њиховим краћим животним веком.^[255] Интересантна је чињеница да се калоријском рестрикцијом може успорити процес старења код ових глодара, што се објашњава регулацијом митохондријалне активности, односно, смањеном продукцијом реактивних врста кисеоника.^[259] Генерално, код различитих организама је запажено повећање оксидативних оштећења са старењем, као и утицај повећане продукције слободних радикала на скраћење животног века.^[260] Излагањем винских мушица различитим амбијенталним температурама уочено је да се у хладнијим условима (успорен метаболизам) продужава њихов животни век.[246] Занимљивост је да је животни век пчеле матице дужи него код пчела радилица, као и да мушице којима су одстрањена крила живе дуже од оних које лете, што се повезује са смањеном потрошњом кисеоника.^[251] Постоје наводи да повећана концентрација кисеоника у ћелијама скраћује њихов животни век и убрзава скраћивање теломера, за које се истиче да су изузетно подложне оксидативним оштећењима.^[259,261] Запажене су и промене мишићног ткива код примата настале услед оксидативног оштећења, што је од значаја с обзиром да се саркопенија (смањење мишићне масе) сматра једним од обележја старења.[262] Такође, уочена је и корелација да врсте које дуже живе имају ефикасније механизме антиоксидативне заштите,^[251] као и да појачана експресија ензима који неутралишу слободно-радикалске врсте смањује оксидативна оштећења и продужава животни век.^[255]

Поред запаженог штетног утицаја оксидативног стреса у процесима старења и болести, поједина клиничка испитивања нису уочила ефекте суплементације антиоксидантима на статус болести.^[259] Штавише, постоје и студије које сведоче не само о неефективности већ и о штетности суплементације антиоксидантима у одређеним случајевима.^[263,264] Чињеница је да је фреквентно неиспољавање жељене ефикасности антиоксиданата у клиничким испитивањима један од главних разлога неконзистентности у овој области.^[265] Временом је научна заједница постала свесна одређених мисконцепција, пре свега исувише поларизованих погледа на антиоксиданте и слободне радикале, где новија сазнања назиру "дволичну" природу ових агенаса.^[241,266]

1.3.2. Живот у аеробним условима – парадокс кисеоника

Кисеоник је најраспрострањенији елемент на Земљи, двоатомни гас "деструктивне" природе који омогућава живот.^[267] Парадоксално, кисеоник је и неизоставни елемент ватре, неоспорног фактора успона људске цивилизације. Да је ватра добар слуга али зао господар учи нас народна мудрост, но човечанство није одувек знало да је кисеоник неопходни фактор сагоревања. У грчкој митологији, Прометеј је украо ватру боговима и даровао је људима. За Хераклита из Ефеса, ватра је основни елемент, почетак и крај свих ствари. Алхемичари су предлагали постојање флогистона, елемента сличном ватри, који се ослобађа при сагоревању. Карл Вилхелм Шиле (енгл. *Carl Wilhelm Scheele*) и Џозеф Пристли (енгл. *Joseph Priestley*) су у 18. веку открили кисеоник, док га је отац модерне хемије Лавоазје (фр. *Lavoisier*) препознао као нови хемијски елемент, као и његову улогу у сагоревању.^[268] Данас знамо да ватра представља хемијску реакцију оксидације материје при чему се ослобађа енергија, за чији настанак и самоодржање су неопходни гориво, кисеоник, и топлота. Каква је улога кисеоника у одржавању "ватре" живих бића и да ли и он поседује своју "другу страну"?

Сажето илустровати улогу кисеоника у функционисању људског организма представља изазован задатак, али се може површно представити аналогијом са начином рада аутомобила, односно мотора са унутрашњим сагоревањем. Организму човека, као и аутомобилу, потребна је енергија зарад континуалног одржавања својих функција. Извор енергије аутомобилу јесте одговарајуће гориво, док се људски организам снабдева "горивом" путем исхране. За сагоревање је неопходан кисеоник из ваздуха, чији се доток до мотора аутомобила обезбеђује системом усисних цеви. Улогу "усисавања" ваздуха код човека има респираторни систем, при чему се кисеоник до ћелија транспортује кардиоваскуларним системом. Чињеница је да су аутомобили предвиђени да користе искључиво одређену врсту горива, док човек поседује далеко већи избор, стога и далеко сложенији "систем сагоревања". Комплексни систем органа за варење разлаже макромолекуле до једноставнијих фрагмента, који се даље сложеном каскадом ензимских реакција метаболишу до енергије, воде и угљен-диоксида.

Познавајући ове основне чињенице, ништа не наводи да би кисеоник, као есенцијални фактор живота, могао имати и нека токсична дејства. Ваздух који удишемо представља смешу гасова са уделом кисеоника од око 21%, при чему је људско тело осетљиво на промену његове концентрације.^[246] Истина је да би удисање стопроцентног кисеоника дужи временски период било погубно за људски организам.^[269] но његова контролисана примена је бенефитна у одређеним медицинским стањима, нпр. у хипербаричним коморама. Људски организам осетљив је и на промену парцијалног притиска кисеоника. Познато је да у води амбијентални притисак расте са повећањем дубине, стога поред обичног ваздуха, рониоци неретко користе специјалне смеше гасова, зависно од дубине и трајања роњења. Супротно томе, са повећањем надморске висине смањује се атмосферски притисак, последично и парцијални притисак кисеоника, те је нпр. на Монт Евересту количина расположивог кисеоника за 70% мања него на нивоу мора. Постоје и наводи да живот на већим надморским висинама продужава животни век, те да градијентно излагање хроничној хипоксији може имати бенефитна својства.[270] Кисеоник је квалификован као реактиван халкогени елемент

захваљујући карактеристичној електронској конфигурацији у молекулском стању.[251,268] Међутим, кисеоник поседује своје реактивније, редуковане облике, познате као реактивне врсте кисеоника – РВК (енгл. reactive oxygen species-ROS), коіе ce нормално генеришу у нашем организму као нуспроизводи "сагоревања" хране. По дефиницији, за РВК се сматрају слободни радикали и нерадикалски молекули који поседују бар један кисеоников атом и чија је реактивност већа од молекулског кисеоника.^[271] Услед оксидативних особина, др Денам Харман је РВК "окривио" за оштећења биомолекула, последично, за настанак болести и старење организма. Сматра се да је живот у оксидативној атмосфери истовремено услов и "претња" егзистенцији живих бића, што се често назива парадоксом кисеоника.^[272] као и да је систем антиоксидативне заштите настао као резултат прилагођавања живих бића аеробним условима живота.^[241]

1.3.3. Реактивне врсте - фактори настанка у људском организму

У хемији, термин "радикал" (лат. radix-корен) датира још из 18. века, при чему је коришћен за означавање дела неког молекула. Прави научни пробој и настанак хемије слободних радикала одиграо се 1900. године, када је Мозес Гомберг (енгл. Moses Gomberg) добио трифенилметил радикал, први синтетисани слободни радикал.^[273] Данас се назив радикал односи на било који хемијски ентитет (атом, молекул или јон) који поседује бар један неспарени електрон у последњој, валентној орбитали, где термин "слободни" описује могућност њиховог независног, слободног постојања.^[269,274] Познато је да се слободни радикали добијају хомолитичким раскидањем ковалентне везе, за шта је неопходно обезбедити енергију, најчешће у виду топлоте или светлости. Иако су слободно-радикалске реакције синтетички корисне у органској хемији, њихово *in vivo* одвијање је препознато као иницијатор бројних патолошких стања. Постојање неспареног електрона разлог је нестабилности и високе реактивности радикалских система, што одређује њихову потребу за спаривањем истог реакцијом са другим једињењима.^[269] Наиме, претпоставка да су старење и настанак болести резултат дејства слободних радикала првобитно је заснована на запажању да јонизујуће зрачење живих бића генерише РВК, скраћује животни век и изазива промене сличне старењу.^[246] Један од главних извора РВК у људском организму јесте митохондрија ^[271]. Улога митохондрије као јединствене "ћелијске електране" јесте производња енергије, док је сврха кисеоника "прихватање" електрона из ензимских реакција. Електрони настају у тзв. циклусу трикарбоксилних киселина, тј. серији биохемијских реакција којима се врши трансформација ацетил-коензима А, основног полазног материјала овог процеса. Електроне из ензимских реакција иницијално преузимају оксиданти NAD⁺ и FAD, при чему настају NADH и FADH₂ молекули.^[275] Ови привремени носачи електрона иницирају фазу оксидативне фосфорилације, комплексног процеса преноса електрона и протона у коме се генерише енергија у виду АТР молекула, уз секвенцијалну редукцију кисеоника до воде. Процес оксидативне фосфорилације, који се још назива и електронтранспортни ланац (енгл. eletron transport chain-ETC) је управо главни извор РВК.^[276] Конкретно, електрон-транспортни ланац чине пет протеинских структура, тзв. комплекса, интегрисаних унутар унутрашње мембране митохондрије, при чему су комплекси I и III препознати као главно место настанка РВК.[251,258,271,275] Мерењима је установљено да 1–3% од укупног броја е- дословно "процури" из транспортног система и са кисеоником награди супероксид радикал анјон (02•-).[251] Генерисани O₂•- сматра се примарном реактивном врстом, која интеракцијом са другим молекулима може индуковати настанак других, секундарних врста.^[251] Такође, РВК настају у пероксизомима и ендоплазматичном ретикулуму, производе их и фагоцитне ћелије, а настају и дејством NADPH оксидаза, пероксидаза, ксантин оксидазе, ензима цитохром P450, циклооксигеназе, липоксигеназе и др.^[269,271,275,277] Штавише, идентификовано је више од педесет ензима који производе PBK у људском организму.^[275] Поред ендогеног порекла, на настанак PBK могу утицати и егзогени фактори, животне навике (неадекватна исхрана, цигарете, алкохол), загађен ваздух, одређени лекови, као и излагање зрачењу, индустријским растварачима и тешким металима.^[275,277]

1.3.4. Реактивне врсте - типови и карактеристике

Термин "реактивне врсте" иницијално асоцира на слободне радикале, али се односи и на нерадикалске молекуле,^[271] при чему су, поред кисеоникових, биолошки релевантне и реактивне врсте азота (енгл. *reactive nitrogen species–RNS*), сумпора (енгл. *reactive sulfur species–RSS*) и хлора (енгл. *reactive chlorine species–RCS*)(Табела 1). ^[278]

	Тип	Назив	формула
Реактивне врсте кисеоника (РВК)	радикалски	супероксид радикал анјон	02*-
		хидрокси радикал	HO•
		хидроперокси радикал	НОО•
		алкилперокси радикал	RO0•
		алкокси радикал	R0•
		карбонатни радикал анјон	CO3•-
		угљендиоксидни радикал анјон	CO2*-
	нерадикалски	синглетни кисеоник	$^{1}O_{2}$
		030Н	03
		водоник пероксид	H_2O_2
		органски пероксид	ROOH
		хипохлораста киселина	HOCl
		нитрозопероксикарбонат	ONOOCO2-
Реактивне врсте азота (РВА)	радикалски	азот моноксид	•NO
		азот диоксид	•NO2
		нитратни радикал	•NO3
	нерадикалски	пероксинитритна киселина	ONOOH
		пероксинитрит	ONO0-
		алкил пероксинитрит	ONOOR
		пероксинитрат	02N00-

Табела 1. Примери реактивних врста кисеоника и азота.

Генерално, способност реактивних врста да изазову оксидативна оштећења је различита, односно, зависна од карактеристика одређене врсте, физиолошких услова, као и од типа биомолекула са којим реагују. У том погледу, термин "реактивне" треба сматрати релативним појмом, узимајући у обзир могућност одвијања тзв. једноелектронских или двоелектронских реакција, време полуживота одређене врсте, миграциони капацитет, као и селективност према одређеном супстрату.^[257,279] Кисеоник се често квалификује као високо реактиван елемент, с обзиром на чињеницу да формира оксиде са већином хемијских елемената. Упркос својим јаким оксидативним својствима, афинитет молекулског кисеоника према органским биомолекулима је незнатан, јер би у супротном људско тело директно "сагорело" на ваздуху.^[279] Разлог таквог хемијског понашања лежи у

његовој специфичној електронској конфигурацији. За разлику од других двоатомских молекула, молекулски кисеоник егзистира у основном триплетном стању (302) као парамагнетична бирадикалска врста, услед постојања два неспарена *e*⁻ истих спинова у π^{*} (антивезивним) орбиталама (Слика 18).^[278,280] Наиме, паралелна спинска оријентација ³О₂ ограничава директну оксидацију биомолекула, с обзиром да би у том случају, кисеоник морао преузети такође два *е*паралелних спинова, супротних у односу на своје неспарене *e*^{-.[257,278,279]} Како су *e*⁻ у слободним паровима и хемијским везама нерадикалских биомолекула антипаралелне оријентације, ³О₂ испољава афинитет према радикалским врстама и прелазним металима. [267,279,281] Последично, услед спинске рестрикције, молекулски кисеоник је у редокс реакцијама ограничен на једноелектронске трансфере, што га чини безопасним по дијамагнетичне биомолекуле.^[257] Са друге стране, вредности стандардних редокс потенцијала нам указују да је једноелектронска редукција O₂ до O₂-- термодинамички мање фаворизована у односу на директну двоелектронску редукцију до H2O2 (E° (O2/O2•-)=-0,33 V; E° (0₂/H₂O₂)=+0,30 V; на pH=7, 1 atm, водени раствор), што је такође један од разлога његове слабе оксидативне способности.^[267] Упркос томе, услед јединствене организације транспорта е- у митохондрији, предоминантна је секвенцијална редукција кисеоника (један по један *e*-), при чему сваки молекул О₂ преузима 4*e*формирајући два молекула H₂O ^[281].



Слика 18. Молекулско-орбитални дијаграми ³О₂ и његових реактивних форми.

Реактивнију форму кисеоника представља тзв. синглетни кисеоник (102) који настаје довођењем енергије триплетном облику, што резултује променом спина једног *e*^{-.[279]} Прво ексцитовано стање ¹О₂ представља делта облик (Δg), код кога се *е*- антипаралелних спинова налазе у истој орбитали.^[282] Преласком у више енергетско стање настаје сигма облик (Σg⁺), карактеристичан по *e*⁻ супротних спинова који су појединачно распоређени у две различите орбитале.^[282] Постојање Σg⁺ форме мери се пикосекундама, при чему се брзо конвертује до Δg облика чији је животни век знатно дужи.^[283] Како код ¹О₂ не постоји спинска рестрикција, он поседује јачи оксидативни карактер у поређењу са ³O₂ (Е[°](¹O₂/O₂•-)=+0,65 V).^[257,284] У одређеним околностима ¹О₂ се може генерисати *in vivo*, где испољава електрофилни карактер у реакцијама са биомолекулима, посебно π-системима, вршећи њихове оксидативне трансформације.^[278,282,283] Преузимањем једног *е*-, ³О₂ се конвертује до реактивнијег О2•-, при чему долази до спаривања једног антипаралелног *e*⁻ (Слика 18). Стандардни редокс потенцијал Е[°](O₂•-/H₂O₂)=+0,94 V описује изражене оксидативне особине O2•-, но присуство негативне шарже лимитира његову реактивност према биомолекулима, посебно према системима богатим е-.[267,278,282] Као јон релативно мале величине одликује се кратким временом полуживота (10⁻⁶ s) и локалним дејством, растворан је и солватисан у води, при чему не може лако мигрирати кроз ћелијске мембране.^[280,285] Иако

"супериорног" назива, О2•- испољава слабу реактивност према већини биомолекула превасходно због кинетике реакција, тј. ниских вредности константи брзина, али ипак поседује изражен афинитет према одређеним биолошким супстратима, нпр. Fe-S центрима протеина.^[285,286] У физиолошким условима доминира O₂•- форма, но при нижим рН вредностима може егзистирати као хидроперокси радикал НОО, реактивност који поседује већу И израженија оксидативна својства V), $(E^{\circ}(HOO^{\bullet}/H_2O_2)=+1,06)$ нарочито према полинезасићеним масним киселинама.^[257,285,286] Даљом редукцијом О2^{•-} настаје водоник пероксид H₂O₂, који представља далеко стабилнију форму, без неспарених е- (Слика 18). У хемијском смислу, H₂O₂ се као и O₂ - може понашати и као оксидативно и као редукционо средство, али је, услед споре кинетике реакција, његов утицај на биомолекуле релативно благ.^[278,287] Вредности стандардних редокс потенцијала указују да је двоелектронска редукција H₂O₂ далеко повољнија од једноелектронске (E° (H₂O₂/H₂O, HO•)=+0,38 V; E° (H₂O₂/H₂O)=+1,35 V).^[267] Иако H₂O₂ не испољава директне ефекте према већини биомолекула, на његово дејство осетљиве су тиолне групе.^[287] Као неутрални молекул, H₂O₂ може пролазити кроз биолошке мембране и акумулирати се у организму у већим концентрацијама, при чему му се оксидативно дејство нарочито манифестује у присуству јона метала.^[278] У таквим околностима настаје хидрокси радикал НО•, који са стандардним редокс потенцијалом Е[°] (HO•/H₂O) од +2,33 V представља далеко опаснију реактивну врсту.^[267] Неспарени *е*- и кратко време полуживота реда величине 10⁻⁹ s чини НО• изузетно реактивним и неселективним оксидативним агенсом који може узроковати оштећења готово свих биомолекула.^[278] Изузетно ниска енергија активације онемогућава даљу миграцију и дифузију НО•, стога реагује близу места генерисања готово брже од него што настаје.^[269,286] Карбонатни радикал анјон СО₃•се такође сматра јаким оксидантом (Е° (СО3⁻⁻/СО3²⁻)=+1,78 V на pH=7),^[288] са различитим механизмима настанка у људском организму. израженом реактивношћу ка различитим биомолекулима и далекосежнијим ефектима v односу на НО^{•.[269]} Јака оксидативна својства поседују и алкилперокси (ROO•) и алкокси (RO•) радикали (E° (ROO•/ROOH)=+1,00 V; E° (RO•/ROH)=+1,60 V).^[257] Време полуживота RO• износи 10⁻⁶ s, док се код ROO• мери секундама.^[282] Ове врсте су такође биолошки релевантне, при чему у организму генерално настају липидном пероксидацијом и декомпозицијом пероксида.^[278] Азот моноксид (•NO) је важан међућелијски сигнални молекул, растворан у води и липидима, са слабим оксидативним својствима.^[289] Иако је директно нетоксичан, реакција •NO са другим радикалима може генерисати опасније PBA, као што је пероксинитрит ONOO-.^[269] Јаке оксидативне способности ОNOO- (Е°(ОNOO-/•NO2)=+1,40 V; Е°(ОNOO-/-NO₂)=+1,20 V; pH=7) омогућавају изазивање оштећења различитих биомолекула, као и бројне реакције којима се генеришу и друге реактивне врсте. [269,290]

1.3.5. Реактивне врсте – путеви трансформације и реакције са биомолекулима

Супероксид радикал анјон (O₂•-) се сматра једном од примарних PBK из кога настају бројне друге реактивне врсте (Шема 24). Главни извор O₂•- јесте митохондрија, односно електрон-транспортни ланац (ЕТС) у коме настаје редукцијом O₂, а такође се генерише и дејством различитих оксидаза.^[291] Део система антиоксидативне заштите јесте ензим супероксид-дисмутаза (енгл. *SOD*), који настали O₂•- дисмутира до O₂ и H₂O₂. Реакција ензимске дисмутације сматра се одбрамбеним одговором организма, где је улога SOD-а конверзија O₂•- до мање реактивног облика. Осим дисмутацијом O₂•-, H₂O₂ у организму настаје и у пероксизомима, као и дејством бројних других ензима, превасходно оксидаза, као што је ксантин-оксидоредуктаза (енгл. *xantine oxidoreductase-XOR*).^[286,287] Заштиту од накупљања H₂O₂ у организму и његовог штетног дејства обезбеђује високо ефикасни ензим каталаза (енгл. *CAT*), способан да преведе милионе молекула H₂O₂ у секунди до кисеоника и воде, а поред тога, његову декомпозицију врши и глутатион пероксидаза.^[285]



Шема 24. Трансформације реактивних врста у организму.

Штетни утицај H₂O₂ долази до изражаја када се нађе у средини заједно са јонима прелазних метала, најчешће Fe²⁺, чијим дејством долази до настанка изузетно реактивних хидрокси радикала (HO•).^[251] Настанак HO• из H₂O₂ дејством јона прелазних метала познат је као Фентонова реакција (енгл. *Fenton reaction*). Такође, ова PBK-а се може генерисати и Хабер-Вајсовом реакцијом (енгл. *Haber–Weiss*) H₂O₂ са O₂•-.^[251] Метали у људском организму могу бити у везаној, недоступној форми за одигравање ових штетних реакција, но PBK могу иницирати стварање и ослобађање њихових јона, нпр. из хемоглобина и Fe–S кластера чиме истовремено оштећују протеине и ензиме.^[251,285,287] Поред тога, до настанка HO• може доћи и директним излагањем H₂O₂ ултраљубичастом зрачењу, а познати су и механизми настанка ¹О₂ дејством H₂O₂ и других пероксида.^[269,287] Генерисање O₂•-, OH• и H₂O₂ отвара могућност одигравања "зачараног круга" разноврсних ланчаних реакција, како са биомолекулима тако и са другим реактивним врстама. На пример, 02 - може ступити у реакцију са •NO, PBA која у организму настаје дејством азот-оксид синтаза (енгл. nitric oxide synthase–NOS), при чему се генерише пероксинитрит ONOO- (Шема 24).^[269] Како је ОNOO⁻ својствен и нуклеофилни карактер, његовом реакцијом са СО₂ реактивни нитрозопероксикарбонат (ONOOCO₂-) коіи настаіе ce даље трансформише до СО₃•-.^[269] Такође, из ОNОО- може настати и пероксинитритна киселина (ONOOH), чијом декомпозицијом настаје HO• и •NO₂.^[269] Протоновањем 02•- генерише се НОО• који се даље може трансформисати до различитих органских хидропероксида. По свом настанку, НО• може оксидовати различите супстрате, нпр. алкохоле и тиоле, и притом иницирати настанак RO• и RS•.^[286] Реакцијом са биомолекулима (RH), НО• и НОО• могу генерисати карбоцентричне радикале R• чији су путеви трансформације различити.^[286] Један од могућих је настанак алкилперокси радикала ROO• реакцијом R• са O₂, чији даљи биолошки путеви укључују генерисање различитих пероксида и нових ROO^{•.[286]}

Протеини, липиди, угљени хидрати и нуклеинске киселине јесу мете реактивних врста у људском организму, при чему је тип оксидативног оштећења карактеристичан за сваки биомолекул (Шема 25). Наиме, слободни радикали могу испунити своју потребу за e^- на неколико начина. На пример, •OH може директно преузети е- или атом водоника, чак и ступити у реакције адиције.^[267] Интеракцијом са ДНК, •ОН може лако преузети водоник са угљеникових атома деоксирибозе, чиме настаје карбоцентрични радикал.^[292] Настали радикал подлеже лаљим оксидативним трансформацијама које доводе до отварања прстена и формирања карактеристичних енамин пропенал деривата (Шема 25А).[292] На дејство •ОН осетљива је и метил група тимина, где након апстракције водоника финално настаје хидроксиметил дериват (Шема 25А).^[292] •ОН се може адирати на двоструку везу пуринских и пиримидинских база, при чему је посебно карактеристична адиција на С-8 гуанина, чиме настаје 8-ОН адукт који може индуковати отварање прстена (Шема 25А).^[292] На штетно дејство радикалских врста нарочито су сензитивне полинезасићене масне киселине, које изложене њиховом утицају подлежу тзв. липидној пероксидацији. Апстракцијом водоника из метиленске настаје карбоцентрични радикал (Шема групе липида 24). коіи ce међутрансформацијама до различитих пероксида финално разлаже до штетних алдехидних продуката (малонилдиалдехид, акролеински деривати итд.) (Шема 25Б).^[292] Штетни ефекти производа липидне пероксидације се одгледају у томе да адиционим реакцијама могу изазвати трансформације, последично и оштећења нуклеинских киселина и протеина (Шема 25Б).^[292] Оксидативно оштећење протеина може имати више исхода. Након преузимања водоника настаје тзв. протеински карбоцентрични радикал који може подлећи самоагрегацији, генерисати хидрокси и перокси адукте, чак и условити раскидање пептидне везе (Шема 25В).^[292]



Шема 25. Биомолекули као мете реактивних врста кисеоника.

1.3.6. Систем антиоксидативне заштите

Оксидативна атмосфера је фундаментални чинилац живота аеробних организама, но ефекти кисеоника и његових реактивних врста чине да егзистенција у таквим приликама није искључиво безазлена. Својеврсни бастион одбране од нагомилавања реактивних врста и њихових штетних утицаја представља систем антиоксидативне заштите (САЗ), мултилатерални ансамбл антиоксидативних агенаса различитог механизма деловања и физичко-хемијских особина (Слика 19). САЗ превасходно чине природни антиоксиданти,^[293] чије порекло може бити егзогено или ендогено. Генерално, САЗ сачињавају антиоксиданти класификовани у оквиру тзв. примарног и секундарног нивоа заштите, те је директна или индиректна улога сваког од њих кључна за функционисање целокупног система. Класификовани према модусу антиоксидативног деловања, ендогеним антиоксидантима припадају многи ензими и бројна неензимска једињења.^[293] Поред супероксид дисмутазе и каталазе, ензими који директно или индиректно испољавају антиоксидативно дејство јесу глутатион пероксидаза (*GPx*), глутатион редуктаза (*GR*) и глутатион-S-трансфераза (GST). Деловање ових ензима је уско повезано са глутатионом (GSH), у-глутамилцистеил-глицин трипептидом, који представља њихов кофактор (Слика 19). GPx уз помоћ GSH и својих селеноцистеинских структура врши редукцију H₂O₂ до H₂O, GR рециклира ті. редукује оксидовану, димерну форму глутатиона GSSG до GSH, док GST спречава оштећења биомолекула везујући реактивне електрофилне врсте за GSH.^[293,294] GSH је важан регулатор ћелијске редокс хомеостазе, производи се у јетри и присутан је готово у свим ћелијским структурама у релативно високим концентрацијама.^[294] GSH је и сам по себи неензимски антиоксидант који инактивира радикалске врсте донирајући им е- или водоников атом, а такође учествује и у регенерацији других антиоксиданата.^[294,295] Поред поменутих, многе друге ендогене врсте су индиректно део САЗ, што илуструје његову комплексност и међусобну повезаност са другим биохемијским процесима. Убихинон, полизопреноид познат и као коензим Q, део је ЕТС ланца који у свом редукованом облику (убихинол) испољава антиоксидативне особине.^[295] Ензим глукоза-6фосфат дехидрогеназа (G6PD) поседује важну улогу у тзв. метаболичком путу пентозофосфата, но поред улоге у анаболизму, G6PD врши регенерацију NADP до NADPH, који као електрон донор даље редукује GSSG до GSH.^[296] Уринска киселина, као производ метаболизма пурина, је заправо најзаступљенији антиоксидант у плазми и један од најефикаснијих инактиватора радикалских врста у воденом медијуму.^[297] Позната је улога мелатонина у одржавању циркадијалног ритма, а такође, овај хормон поседује и способност неутрализације различитих радикалских врста.^[298] Кофактор важних ензима јесте и липоинска киселина, која у свом редукованом облику испољава јака антиоксидативна својства у липидној и воденој средини.^[299] Поред мултифункционалних особина, ендогени антиоксиданти се одликују и богатим структурним диверзитетом, чије познавање истиче неопходно присуство кључних конституционих фрагмената за одвијање редокс реакција. Пример таквог структурног мотива јесте тиолна група цистеина, која поред редокс регулације често има улогу стабилизатора, катализатора, или везивања металних јона.[300] Штавише, и поједини метали су неопходни за деловање ензима антиоксидативне заштите. Поред хема, улогу кофактора имају цинк, бакар, манган, па чак и селен који омогућава активност бројних селеноензима као што су GPx и тиоредоксин редуктаза (*TrxR*).^[301]



Слика 19. Класификација и поједини представници природних антиоксиданата.

Упркос постојању широког спектра унутрашњих, ендогених антиоксиданата, нормално функционисање људског организма захтева уношење и спољашњих, егзогених, антиоксиданата путем свакодневне исхране. Егзогеним антиоксидантима припадају витамини, минерали, каротеноиди, као и различите класе фенолних и полифенолних једињења. Једни од најрепрезентативнијих примера егзогених антиоксиданата јесу витамини Ц и Е, који синергистичким дејством неутралишу слободно-радикалске врсте у организму.^[295] Витамин Ц (аскорбинска киселина) као хидросолубилно једињење делује у воденом медијуму, док витамин Е (токоферол) испољава дејство у липидној средини спречавајући њихову пероксидацију.^[302] Витамин Ц, егзистирајући као L-аскорбинска киселина или L-дехидроаскорбинска киселина, поседује способност уклањања различитих реактивних врста у организму, а такође и улогу регенерације витамина Е, GSH, и других антиоксиданата.^[293,294] Такође, витамин Е може постојати у различитим изоформама, при чему је α-токоферол најпотентнији и најзаступљенији облик у биолошким системима.^[293] Полифеноли представљају широко распрострањене секундарне метаболите биљака, имајући превасходно заштитну улогу од утицаја различитих стресора из околине.^[303] Полифеноли су познати по својим антиоксидативним својствима, а такође и по бенефитним ефектима на здравствени статус људи, како у превенцији тако и третману хроничних обољења.^[304]

1.3.7. Фенолна једињења - механизми антиоксидативног деловања

Према генералној дефиницији, једињењима фенолног типа припадају деривати који поседују бар један ароматичан систем са једном или више хидрокси група.^[305] Захваљујући структурној разноликости, класу фенола и полифенола сачињавају бројне врсте једињења, од једноставнијих аналога (фенолне киселине, флавоноиди) до комплекснијих полимерних структура (лигнани, танини) који у биљкама могу егзистирати у слободном или везаном облику.^[306,307] Широко распрострањени у биљном свету, полифеноли су саставни део свакодневне исхране, чије редовно уношење доприноси општем благостању људског организма.^[308] Француски народ је познат по својеврсном умећу живљења, јединственој гастрономији и богатој винској култури из које проистиче специфичан, тзв. "француски парадокс". Упркос јакој и богатој исхрани, Французи имају нижу стопу кардиоваскуларних болести у поређењу са северним народима, што се приписује свакодневној конзумацији црвених вина која су богата фенолним једињењима.^[309] Временом су истраживања полифенола показала њихова многобројна биолошка својства, као што су антитуморска, антивирална, антиинфламаторна, антиалергијска, антимикробна, имуностимулативна, неуропротективна, кардиопротективна, антидепресивна и др.^[306,308,310,311] Бројна бенефитна дејства полифенолних једињења су заправо последица њиховог израженог антиоксидативног дејства, односно способности слободно-радикалских врста, где се њиховом редовном неутрализације конзумациіом смањује могућност настанка различитих болести.^[307,312] Антиоксидативну активност и способност уклањања слободних радикала, тзв. антирадикалско дејство, треба схватити као два блиска, но ипак различита појма. Као што је сваки коњак бренди али не и сваки бренди коњак, тако је и свако антирадикалско једињење антиоксидант али не и нужно обрнуто. У биолошким условима, антиоксиданти контролишу оксидативне процесе спречавањем настанака реактивних врста (регулацијом ензима, интеракцијом са јонима метала). уклањањем радикалских врста (енгл. radical scavenging) или репарацијом оштећених молекула.^[313] С обзиром на то да појам "антиоксидант" обухвата различите механизме спречавања оксидације, термин "антирадикалска активност" прецизније описује способност редукције радикалских врста.^[314] У хемијском погледу, полифеноли поседују погодне карактеристике за инактивацију слободних радикала, захваљујући присуству -ОН група и конјугованих πсистема.^[315] Генерално, полифеноли могу донирати радикалским врстама *е*- или водоников атом преко НАТ (енгл. hydrogen atom transfer), SET-PT (енгл. singleelectron transfer-proton transfer) или SPLET (енгл. sequential proton loss electron transfer) механизма (Шема 26).^[312]



Шема 26. Механизми реакције фенола са радикалским врстама.

НАТ механизам се заснива на хомолитичком раскидању О-Н везе, при чему се неутрализација радикалских врста врши директним трансфером водониковог атома. Могућност одвијања НАТ механизма је условљена јачином О-Н везе, што је са становишта термодинамике одређено вредношћу BDE параметра (енгл. bond dissociation enthalpy), тј. енталпијом дисоцијације везе.^[312] Са друге стране, полифеноли могу инактивирати радикалске врсте и хетеролитичким разлагањем О-Н везе, што отвара могућност одвијања двостепених реакција. Реакциони пут SET-PT иницијално започиње трансфером *е*- слободном радикалу, при чему се фенолно једињење трансформише до одговарајућег радикал катјона.^[316] Последично, други корак SET-PT механизма представља његово депротоновање, које је одређено вредношћу енталпије дисоцијације протона PDE (енгл. proton dissociation enthalpy).^[317] Први корак јонизације фенолног једињења условљен је јонизационим потенцијалом IP (енгл. ionization potential), те је уједно и кључан за одвијање реакција путем SET-PT механизма.^[309] Обрнуто SET-PT механизму, SPLET механизам започиње депротоновањем фенолног једињења до феноксидног анјона, након чега долази до трансфера е- радикалској врсти. Ови процеси су условљени вредностима РА (енгл. proton affinity) и ЕТЕ (енгл. electron transfer enthalpy), параметрима који описују лакоћу депротоновања фенолног једињења, односно, електрон-донорске особине феноксидног анјона.^[312] Сваки од ових реакционих путева има за производе неутралисану радикалску врсту и одговарајући фенокси радикал, који се захваљујући бољој стабилизацији одликује и нижом реактивношћу у поређењу са инактивираним радикалом.^[309] Генерално, НАТ, SET-PT и SPLET механизми се могу одигравати истовремено, но у специфичним околностима одређени реакциони пут може бити фаворизован.^[318] На предоминантност механизма утичу бројни фактори, као што су карактеристике антиоксиданта и радикалске врсте, реакционог медијума, рН вредност и др.^[319] Структурне, електронске, конформационе и геометријске карактеристике фенолних једињења умногоме одређују њихове антирадикалске способности. Наиме, деривати са више фенолних група испољавају бољу активност од монофенола, но поред броја важан је и њихов међусобни положај.^[320] Значајан фактор представља стабилизација насталог фенокси радикала, на шта утичу број, положај и природа других супституената, присуство конјугованих π-система, као и планарност самог молекула.^[309] Структурни диверзитет је одлика витамина Е, што му управо омогућава да са свега једном фенолном групом инактивира радикалске врсте у липидним срединама.^[309] Утицај поменутих фактора на антирадикалску активност осликава се и на примеру фенолних киселина, које поред фенолних поседују и карбоксилну групу. Фенолне киселине су у основи класификоване према структурном скелету, као деривати хидроксибензоеве и хидроксициметне киселине (Слика 20). Различите фенолне киселине испољавају различиту активност према слободним радикалима, али је генерално уочено да су, услед стерно-електронских ефеката, деривати хидроксициметне киселине активнији од аналога хидроксибензоеве киселине.^[312,321] Испитивање антиоксидативне активности фенолних једињења обједињује различите експерименталне и рачунарске методе, при чему израчунавања помоћу теорије функционала густине неретко доприносе расветљавању механизма антирадикалског деловања.[314,317]



Слика 20. Деривати хидроксибензоеве и хидроксициметне киселине.

Поред директног "уклањања" слободно-радикалских врста, полифенолна једињења могу хелирати прелазне метале спречавајући њихово учествовање у генерисању реактивних врста.^[309] Штавише, поједина истраживања су установила да фенолна једињења могу испољити модулаторне ефекте на различите путеве ћелијске сигнализације, укључујући и интеракцију са транскрипционим елементима антиоксидативних механизама, као што је Nrf-2 (енгл. nuclear factor erythroid 2-related factor 2).^[307,311,321,322]

1.3.8. Реактивне врсте и антиоксиданти – сплет "двосеклих мачева"

Шекспир је говорио да ништа само по себи није ни добро ни лоше, већ да само зависи шта о томе мислимо. Уистину, поимање антиоксиданата и слободних радикала је са новијим сазнањима еволуирало до становишта да слободни радикали нису апсолутни "негативци" како се првобитно сматрало. Поред штетних ефеката и импликација у патогенези болести, препозната је и физиолошка улога реактивних врста као сигналних молекула.^[258,323] Наиме, реактивне врсте испољавају својства медијатора у околностима када ћелија бива изложена дејству стресора, олакшавајући њену адаптацију и одбрамбени одговор. Реактивне врсте, као што су O2•- и •NO, обављају "гласничку" функцију приликом ћелијских оштећења, дејства ксенобиотика и инфективних агенаса, а такође могу иницирати и митогени одговор, односно, деобу ћелија.^[251] Физиолошке функције реактивних врста обухватају: експресију гена, раст ћелија, одржавање васкуларног тонуса, регулацију

вентилације, парцијалног притиска кисеоника, синтезе еритропоетина. циркадијалног ритма, апоптозе, као учествовање имунолошким, И y неуротрансмисионим и биосинтетичким процесима.^[251,256,324] Штавише, макрофаге и неутрофили генеришу реактивне врсте у борби са бактеријским инфекцијама.^[324] Занимљивост је да посредовање реактивних врста у одређеним сигналним процесима може утицати на одржавање или поправљање редокс статуса ћелије.^[251,262] Досадашња сазнања свеобухватно истичу дволичну природу реактивних врста, но питање је у којим околностима долази до испољавања њихове токсичне, односно, патолошке нарави? У потрази за одговорима можемо се ослонити на Парацелзусову констатацију sola dosis facit venenum, тј. да је токсичност сваке, чак и наизглед безазлене супстанце одређена њеном дозом. Присутне у ниским концетрацијама, реактивне врсте испуњавају физиолошке функције и подижу борбену готовост организма, док при повишеним концентрацијама испољавају токсичне ефекте. Феномен зависности биолошких ефеката од дозе је у токсикологији познат као хормеза (енгл. hormesis), што се у односу на митохондрију и реактивне врсте ближе описује као митохормеза (енгл. *mitohormesis*).^[325] Ова појава истиче јединство супротности као карактеристику реактивних врста, које изазивајући "лакши" стрес штите ћелију од тежих последица, иронично и од сопственог штетног дејства. Народна мудрост, да у мало може бити доста а у доста мало, осликава се и у односу реактивних врста и физичке активности. Услед повећане потрошње кисеоника, производња реактивних врста се повећава током вежбања,^[262] но чини се да и таква здрава навика има своје нивое делотворности. Физичка активност се сматра благотворном за опште здравље, при чему ефекти на организам зависе од учесталости, трајања и интензитета исте, као и од кондиције и општег здравственог статуса појединца. Генерално посматрано, честа И исувише напорна физичка активност превише може бити контрапродуктивна, те је умереност у учесталости, трајању и интензитету кључ постизања бенефитних ефеката.^[241,326] Суштински, правилно одмерена физичка активност може бити својеврсни антиоксидант, која генерисањем радикалских врста подстиче и подиже системе антиоксидативне заштите.^[241,326-328]

Антиоксиданти су кроз историју изучавања прешли пут од чудотворних, преко чудесних до физиолошких молекула, што је последица њиховог дволичног карактера.^[293] Природа антиоксиданата нам потврђује да више није увек и боље, те да у одређеним околностима и при повишеној концентрацији, антиоксиданти могу испољити прооксидативно дејство.^[329] Антиоксиданти врше редукцију других врста, при чему редукција не води увек ка превођењу истих у мање реактивне облике.^[320] Сходно таквом исходу, важно је сагледати чињеницу да редукција нема увек за резултат антиоксидативно деловање.^[320] Пример такве околности јесте деловање витамина Ц. Наиме, у средини богатој јонима Fe³⁺, витамин С може извршити њихову редукцију до Fe²⁺, који даљом реакцијом са O₂ или H₂O₂ генерише РВК.[329] Штавише, у условима оксидативног стреса, високе концентрације витамина Е резултују и повећаном концентрацијом његових тзв. токоферолских радикала, који могу деловати као прооксиданти, изазивајући липидну пероксидацију.^[329] Ове чињенице појашњавају појаву да намирнице које садрже витамин Е испољавају боље ефекте по организам у поређењу са суплементима, где је његова концентрација значајно већа.^[329] Један од разлога је адитивно и синергистичко дејство фитохемикалија, где је здружена активност више компоненти неретко боља од њихових појединачних ефеката.^[310,330] Узимајући у обзир физиолошку функцију реактивних врста у стресним околностима,

суплементација антиоксидантима може спречити адекватни ћелијски одговор.^[241] Поред витамина, прооксидативно дејство могу показати и полифенолна једињења, у условима високе рН вредности, присуству кисеоника и јона прелазних метала.^[310,315,323] Чињеница је да су за антиоксиданте, укључујући и полифеноле, важни доза, време и место деловања, као и физичко-хемијски услови који у њему владају.^[320] Једноставно, да би добар *in vitro* антиоксидант могао бити ефикасан и у *in vivo* условима, такво једињење мора деловати на правом месту и у право време, поседовати могућност дистрибуције кроз сложене биолошке односно баријере.^[320,331] Познавајући карактеристике реактивних врста (нпр. •ОН), сматра се да је приступ њихове директне инактивације непрактичан и неефективан, те да је боље решење спречавање њиховог настанка.^[332] Повољна околност је што полифеноли не испољавају само директно антирадикалско дејство, већ могу интеракцијом са различитим протеинима, ензимима и сигналним путевима активирати САЗ.^[251,311] Чињеница је да се и добре и лоше стране реактивних врста и антиоксиданата могу искористити, обзиром да постоје ситуације у којима је прооксидативна активност повољнија од антиоксидативног деловања. Један од примера јесте способност полифенола да изазову генерисање реактивних врста у активношћу бактеријама. испољавајући прооксидативном антимикробно дејство.^[313]

1.3.9. Оксидативни стрес - фактор настанка болести

Процењује се да на дневном нивоу, свака ћелија бива изложена нападу од десет до двадесет хиљада слободно-радикалских врста.^[267] У нормалним околностима, постојање и правилно функционисање САЗ одржава равнотежу између продукције и неутралисања реактивних врста (редокс хомеостазе), спречавајући њихова штетна дејства. У случају када реактивне врсте надјачају одбрамбене системе организма, било због њихове повећане продукције или ослабљене антиоксидативне заштите, долази до нарушавања редокс хомеостазе ћелије, стања познатог као оксидативни стрес.^[263,324] Овај концепт описује квантитативну доминацију реактивних врста над антиоксидантима, при чему пролонгирана изложеност ћелије овој неравнотежи доводи до поремећаја функционисања редокс сигнализације и оштећења биомолекула.^[333] Аналогно дуалној природи реактивних врста и антиоксиданата, оксидативни стрес се може квалификовати као физиолошка (енгл. oxidative eustress) или супрафизиолошка девијација (енгл. oxidative distress) редокс равнотеже.^[259,275,333] Такође, посебно је препознат и нитрозативни стрес, који као резултат хиперпродукције РВА може изазвати структурна оштећења протеина и поремећај њихове функције.^[251] Упални процеси могу бити један од разлога повећане продукције реактивних врста, последично и настанка оксидативног стреса. Акутна инфламација може бити бенефитна за организам, но хронична упала изазива повећану потрошњу кисеоника и нагомилавање реактивних врста на месту упале.^[334] У том погледу, инфламација и оксидативни стрес су блиско повезане појаве истог зачараног круга, с обзиром да оштећења молекула услед оксидативног стреса могу имати проинфламаторне ефекте.^[335] Оксидативна оштећења могу бити узрок мутација различитих гена и промена ћелијских функција и сигналних путева, стога је оксидативни стрес широко повезан са настанком многих болести.^[264,336] Оксидативни стрес препознат іе у патогенези кардиоваскуларних, неуродегенеративних и аутоимуних стања, канцера, остеоартритиса, катаракте, болести репродуктивног система, јетре, плућа, бубрега и других органа.^[251,254,255,324,337,338]

Парадоксално је да се аспекти реактивних врста, антиоксиданата и оксидативног стреса могу различито тумачити у зависности од околности, нпр. код канцерогених обољења. Настанак канцера је квалификован као мултифакторски процес, карактеристичан по генетским мутацијама и абнормалној деоби ћелија, при чему су оштећења биомолекула (пре свега ДНК) препозната као кључни фактор његове иницијације.^[251,291,336] У поређењу са здравом ћелијом, ћелија канцера се одликује појачаним нагоном за преживљавањем, измењеним сигналним путевима и ћелијским функцијама.^[334] Људски организам поседује способност да програмираним процесима изазове самодеструкцију (апоптозу) компромитованих ћелија које представљају претњу организму.^[251] Упркос томе, ћелија канцера може избећи "суицидне" сигнале услед измењеног метаболизма и сигналних путева, као и изостанка различитих проапоптотичких фактора. За разлику од здраве ћелије, канцерогена ћелија испољава веће енергетске прохтеве, те је услед повећаног метаболизма последично и увећан ниво реактивних врста.^[264,339] У том погледу, туморска ћелија је константно изложена оксидативном стресу, при чему су реактивне врсте укључене у одржавање њених функција.^[291,339] Канцерогена ћелија поседује развијене механизме адаптације на оксидативни стрес, као и могућност контроле нивоа реактивних врста.^[291,339-341] Неки од механизама укључују појачану експресију антиоксидативних ензима, што им омогућава преживљавање у оксидативним условима.^[339,342] Наиме, ниже концентрације реактивних врста подстичу пролиферацију, ангиогенезу, преживљавање и миграцију туморских ћелија.^[334,341,343] Са друге стране, преласком одређеног прага концентрације, реактивне врсте могу иницирати апоптозу ћелије канцера, те у том погледу делују као антитуморски агенси.^[251,340,341] Ове чињенице нам указују на дуалну природу оксидативног стреса, односно на тумор-супресивне и тумор-промотивне ефекте реактивних врста у функцији њихове концентрације. Иако туморске ћелије имају појачане одбрамбене механизме, оне такође постају и осетљивије на даље промене редокс статуса.^[339] Ове чињенице представљају пример да оксидативни стрес може послужити као инструмент у борби против рака, било појачавањем продукције реактивних врста или супресијом антиоксидативних механизама.^[339,342] У овом погледу, поимање реактивних врста и прооксидативних особина антиоксиданата заузима позитивну димензију, на шта указује и интересовање научника за развијање селективних прооксидативних терапеутика.^[342] Са друге стране, антиоксиданти могу спречити настанак тумора модулацијом различитих сигналних путева,^[315] стимулишући нормалну ћелијску регулацију и апоптозу, а такође и спречавајући инфламацију, пролиферацију и ангиогенезу.^[251] Ипак, делотворност антиоксиданата се може посматрати кроз призму зависности од различитих фактора и сплета околности. Поједине клиничке студије и истраживања која су проучавала утицај суплементације антиоксидантима на превенцију или третман канцера и других болести практично нису успевале да докажу директне бенефитне ефекте, већ неретко супротне.[259,263-265,328,339,343,344] Поједини аутори истичу да су у третману канцера ефекти терапије антиоксидантима зависни од стадијума болести, те да би у прогресивним стањима могла стимулисати преживљавање и раст тумора.^[251,264] Са друге стране, уочено је да антиоксиданти инхибирају карциногенезу у анималним моделима, као и да витамин Е може смањити токсичност хемотерапије продужавајући живот пацијената у терминалним фазама болести.^[264] С обзиром на недовољне и неретко

опречне клиничке резултате, за потпуно разумевање антиоксиданата неопходно је спровођење опсежних контролисаних студија, нарочито у погледу дозе, дугорочних ефеката и њиховог могућег прооксидативног дејства.^[258,263,337]

Улога антиоксиданата, реактивних врста и оксидативног стреса још увек није расветљена ни у процесу старења. За др Денама Хармана, старост није број већ опсесија, при чему његови напори нису били усмерени ка вечном животу, већ ка функционалној старости.^[345] Један од доказа његових тврдњи, тј. постојања оксидативних оштећења у живим организмима јесте генерисање липофусцина, пигмента који настаје дејством продуката липидне пероксидације, који се акумулира са старењем.^[246] Други значајан доказ слободно-радикалске теорије јесте генерисање и акумулација 8-ОН гуанина са старењем ^[276]. Ипак, директна веза између оксидативног стреса и старења још увек није пронађена, као ни утицај антиоксиданата на смањење смртности.^[254,255] Обзиром на бројне мистерије о утицају оксидативног стреса на старење и настанак болести, поједини аутори изражавају могућност да је оксидативни стрес, односно повећана продукција реактивних врста заправо последица а не узрок старења и болести.[251,258,259,263] Иако је оксидативни стрес повезан са многим болестима, асоцијација не значи нужно и каузалитет.^[263] Сходно тренутним сазнањима, прецизније је изразити оксидативни стрес као компоненту многих болести,[332] што свакако не умањује његов значај. Штавише, неопходно је расветлити до које мере је оксидативни стрес уплетен у настанак и развој одређене болести, с обзиром да може бити како примарни узрочник, тако и секундарни пратилац патолошких стања.[332]

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

2.1. Материјали и методе

2.1.1. Хемикалије

За извођење синтетичких процедура, карактеризацију добијених производа и експериментална испитивања биолошких активности употребљене су хемикалије приказане у Табели 2. Наведени прекурсори, реагенси, растварачи и помоћне хемикалије набављене су од Sigma-Aldrich Co., Merck & Co, Fisher Chemical, Capricorn Scientific, Acros Organics или од домаћих произвођача.

Габела 2. Списак основни	х коришћених	хемикалија.
--------------------------	--------------	-------------

Назив	CAS или каталошка ознака
бензоева киселина	65-85-0
2-хидроксибензоева киселина	69-72-7
4-хидрокси-3-метокси бензоева киселина	121-34-6
3,4,5-трихидроксибензоева киселина	149-91-7
2,3-дихидроксибензоева киселина	303-38-8
2,3,4-трихидроксибензоева киселина	610-02-6
бензалдехид	100-52-7
2-хидроксибензалдехид	90-02-8
3-хидроксибензалдехид	100-83-4
4-хидроксибензалдехид	123-08-0
3-хлорбензалдехид	587-04-2
4-хлорбензалдехид	104-88-1
4-флуорбензалдехид	459-57-4
2-нитробензалдехид	552-89-6
3-нитробензалдехид	99-61-6
4-нитробензалдехид	555-16-8
2-метилбензалдехид	529-20-4
3-метилбензалдехид	620-23-5
2,3-дихидроксибензалдехид	24677-78-9
2,4-дихидроксибензалдехид	95-01-2
3,4-дихидроксибензалдехид	139-85-5
2-хидрокси-3-метоксибензалдехид	148-53-8
4-хидрокси-3-метоксибензалдехид	121-33-5
4-хидрокси-3,5-диметоксибензалдехид	134-96-3
3,4-диметокси-5-хидроксибензалдехид	29865-90-5
3,4,5-триметоксибензалдехид	86-81-7
3,5-дихлоро-2-хидроксибензалдехид	90-60-8
диетаноламин	111-42-2
триетаноламин	102-71-6
сирћетна киселина	64-19-7
диетил етар	60-29-7
хидразин-монохидрат	7803-57-8
диметил сулфоксид	67-68-5
диметил сулфоксид- <i>d6</i>	2206-27-1
хлороформ- <i>d</i>	865-49-6
метанол	67-56-1

Назив	САЅ или каталошка ознака
етанол	64-17-5
ацетонитрил	75-05-8
метил ацетоацетат	105-45-3
2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH)	1898-66-4
нордихидрогвајаретинска киселина (NDGA)	500-38-9
кверцетин	117-39-5
Дулбеков модификовани "eagle" медијум	Sigma, D5796,
(DMEM)	Capricorn Scientific, DMEM-HHSTA
Domo HULL DODONIL CODUM (EPC)	<i>Sigma</i> , F4135,
Фетални говеји серум (г.б.3)	Capricorn Scientific, FBS-11A
	<i>Sigma</i> , P4333,
пеницилин-стрептомицин раствор	<i>Merck</i> , P4458
Tuggo tu tu tuggo totago tuju (powet	Acros Organics, 158990010,
тиазолил плаво тетразолијум оромид	<i>Merck</i> , M2128
Mueller-Hinton Broth	Oxoid, MHB

Табела 2 (наставак). Списак основних коришћених хемикалија.

2.1.2. Синтетичке процедуре

2.1.2.1. Синтеза фенолних N-ацилхидразона

Синтетичка методологија за добијање хидразонских деривата заснивала се на кондензацији хидразида ароматичних карбоксилних киселина са различито супституисаним ароматичним алдехидима (Шема 27).^[346,347]



Шема 27. Синтеза *N*-ацилхидразона.

У ове сврхе, првобитно је извршена синтеза (хидрокси)бензохидразидских деривата, естерификацијом карбоксилних киселина и њиховом даљом реакцијом са хидразин-монохидратом. Еквимоларна смеша одговарајућег бензохидразида и ароматичног алдехида (1 mmol) рефлуктована је на температури од 80 °C у трајању од 3 часа у етанолу као растварачу, уз праћење тока реакције помоћу хроматографије на танком слоју (TLC). По завршетку реакције, добијени преципитати су филтрирани и испрани водом, пре чему су након сушења, подвргнути испитивањима структурних карактеристика.

2.1.2.2. Синтеза пиразолона

Синтеза различито функционализованих пиразолонских деривата извршена је реакцијом 5-метил-2,4-дихидро-3*H*-пиразол-3-она са ароматичним алдехидима (Шема 28).^[348] Полазни пиразолон је синтетисан кондензацијом метил ацетоацетата и хидразин-монохидрата применом уобичајених синтетичких поступака. Смеша 5-метил-2,4-дихидро-3*H*-пиразол-3-она (1 mmol) и одговарајућег алдехида (0,5 mmol) загревана је на температури од 80 °C у трајању од 3 часа у етанолу као растварачу, уз присуство каталитичке количине диетаноламина (DEA, 20mol%). Ток реакције је праћен помоћу TLC-а, где су по њеном завршетку и хлађењу реакционе смеше, чврсти производи процеђени и испрани минималним количинама етанола, воде и етра. Пречишћавање појединих производа извршено је њиховим поновним растварањем и преципитацијом из смеше етанола и воде (1:4), при чему је дериват **23** добијен у кристалном облику из смеше етанола и воде у односу 1:2.





2.1.3. Структурна карактеризација производа

Хемијска структура синтетисаних хидразонских и пиразолонских деривата је потврђена применом ¹H NMR, ¹³C NMR, UV-Vis, и IR метода.^[346-348] NMR спектри су снимљени на Varian Gemini спектрометру (200 MHz за ¹H; 50 MHz за ¹³C) у одговарајућим деутерисаним растварачима и са тетраметилсиланом (TMS) као стандардом. Употребом KBr пилула, IR спектри су снимљени на PerkinElmer Spectrum One FT-IR спектрометру. UV-Vis карактеризација је извршена мерењем апсорбанце метанолских раствора једињења у опсегу од 200–600 nm на Agilent Technologies, Cary 300 Series UV-Vis спектрофотометру. За новосинтетисана једињења извршена је и елементална микроанализа (C, N, H), која је урађена на Хемијском факултету Универзитета у Београду и Институту за информационе технологије, Крагујевац, Универзитета у Крагујевцу.^[346,348] За нова једињења одређене су и тачке топљења помоћу стаклених капилара на Melt-Temp апарату, модел 1001. Структура производа **23** потврђена је и рендгенском структурном анализом (ССDC број 2132092) помоћу Bruker APEX-II ССD дифрактометра (МоКа, λ = 0.71073 Å) као и применом CrysAlisPRO, SHELXS, SHELXL, PLATON, и Mercury софтвера.^[348]

Течна хроматографија високих перформанси (енгл. *HPLC*) примењена је као додатна метода за потврђивање чистоће појединих хидразонских производа.^[347] У ове сврхе коришћен је *Shimadzu Prominence* HPLC систем састављен од LC-20AT пумпе, DGU-20A дегасера, CTO-20A пећи, петље од 20 микролитара, A Luna C18 колоне, SPDM20A PDA детектора и CBM-20 A *Prominence* контролора. Као мобилна фаза коришћени су ацетонитрил и вода применом градијентног програма (0–5 min, 50% CH₃CN, 50% H₂O; 5–10 min, 60% CH₃CN, 40% H₂O), температуре пећи од 35 °C и протока од 1mL/min.

2.1.3.1. Спектрални подаци



(*E*)-*N'-Бензилиденбензохидразид* – **1а**; бела чврста супстанца (принос 64%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 11,85 (s, 1H), 8,46 (s, 1H), 7,92 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 7,77–7,68 (m, 2H), 7,51 (d, J = 7,4 Hz, 3H), 7,46–7,38 (m, 3H); ¹³C NMR (50 MHz,

DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 163,23, 147,83, 134,34, 133,46, 131,58, 129,92, 128,67, 128,32, 127,60, 127,06; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 296,5, 220,5, 201; IR (KBr): ν_{max} = 3200, 3060, 1641, 1601, 1552, 1487, 1447, 1364, 1287, 1142 cm⁻¹.



(Е)-N'-(2-Хидроксибензилиден)бензохидразид – **16**; жута чврста супстанца (принос 64%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 12,13 (s, 1H), 11,30 (s, 1H), 8,65 (s, 1H), 7,94 (dd, J = 7,9, 1,5 Hz, 2H), 7,56 (qd, J = 6,3, 2,6 Hz, 4H), 7.31 (td, J = 8,0, 1,6 Hz,

1H), 6,92 (dd, J = 11,0, 4,3 Hz, 2H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO) δ (ppm): 162,87, 157,52, 148,43, 132,88, 132,02, 131,44, 129,64, 128,60, 127,70, 119,41, 118,74, 116,50; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 326,5, 296, 285, 232,5, 211; IR (KBr): ν_{max} = 3435, 3266, 3056, 1673, 1621, 1606, 1540, 1488, 1445, 1356, 1274, 1179 cm⁻¹.



(Е)-N'-(4-Хидроксибензилиден)бензохидразид– **1**в; бела чврста супстанца (принос 52%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 11,62 (s, 1H), 9,79 (s, 1H), 8,34 (s, 1H), 7,93– 7,85 (m, 2H), 7,51 (dd, J = 13,2, 8,0 Hz, 5H), 6,81 (d, J = 8,5 Hz, 2H);

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6* μ CDCl₃) δ (ppm): 163,04, 159,42, 148,25, 133,68, 131,30, 128,75, 128,17, 127,49, 125,27, 115,99; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm)= 315,5, 225,5; IR (KBr): ν_{max} = 3399, 3199, 3058, 1631, 1608, 1581, 1566, 1517, 1445, 1366, 1308, 1288, 1232, 1168 cm⁻¹.



(E)-N'-(2-Хидрокси-З-метоксибензилиден)бензохидразид – 1г;
бела чврста супстанца (принос 84%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 12,10 (s, 1H), 11,00 (s, 1H), 8,66 (s, 1H), 7,94 (d, J = 6,6 Hz, 2H), 7,66 – 7,46 (m, 3H), 7,10 (dd, J = 23,0, 7,5 Hz, 2H), 6,87 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 3,82 (s, 3H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 162,84, 148,31, 148,00, 147,27, 132,92, 131,99,

128,58, 127,68, 120,96, 119,09, 118,99, 113,99, 56,00; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 340,5, 298, 219,5, 201; IR (KBr): ν_{max} = 3405, 3226, 3064, 2941, 1652, 1607, 1576, 1472, 1367, 1299, 1249, 1149 cm⁻¹.



(*E*)-*N'-(4-Хидрокси-3-метоксибензилиден)бензохидразид* – **1**д; жута чврста супстанца (принос 98%); ¹Н NMR (200 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 11,70 (s, 1H), 9,58 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 7,97 – 7,85 (m, 2H), 7,61 – 7,45 (m, 3H), 7,33 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 7,09 (dd, J = 8,1, 1,6 Hz, 1H), 6,85 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 3,83 (s, 3H); ¹³C NMR

(50 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 162,98, 149,08, 148,47, 148,11, 133,74, 131,61, 128,48, 127,60, 125,84, 122,22, 115,56, 109,19, 55,73; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 325,5, 300,5, 227,5, 201; IR (KBr): ν_{max} = 3486, 3243, 3078, 2948, 1637, 1607, 1578, 1562, 1514, 1463, 1386, 1291, 1271, 1165 cm⁻¹.



(E)-N'-(4-Хидрокси-3,5-диметоксибензилиден)бензохидразид –
 1ђ; бела чврста супстанца (принос 77%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 11,75 (s, 1H), 8,95 (s, 1H), 8,34 (s, 1H), 7,96 –
 7,84 (m, 2H), 7,61 – 7,45 (m, 3H), 6,99 (s, 2H), 3,82 (s, 6H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 163,03, 148,57, 148,22, 138,09,

133,75, 131,63, 128,49, 127,61, 124,67, 104,82, 56,20; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 326, 235,5, 218, 201; IR (KBr): ν_{max} = 3457, 3227, 3070, 2961, 1645, 1604, 1580, 1559, 1517, 1458, 1355, 1328, 1299, 1167, 1117 cm⁻¹.



(*E*)-*N*'-(*2*,*4*-Дихидроксибензилиден)бензохидразид – **1е**; жута чврста супстанца (принос 61%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 11,94 (s, 1H), 11,49 (s, 1H), 9,99 (s, 1H), 8,51 (s, 1H), 7,98 – 7,87 (m, 2H), 7,63 – 7,48 (m, 3H), 7,31 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 6,35

(dt, J = 6,8, 2,2 Hz, 2H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 162,54, 160,76, 159,56, 149,34, 133,07, 131,84, 131,45, 128,55, 127,60, 110,62, 107,79, 102,78; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 330,5, 301, 290, 251,5, 236,5, 215,5; IR (KBr): ν_{max} = 3459, 3259, 1658, 1632, 1607, 1555, 1519, 1465, 1361, 1282, 1261, 1222, 1182 cm⁻¹.



(*E*)-*N'-(3,4-Дихидроксибензилиден)бензохидразид* – **1ж**; чврста супстанца беж боје (принос 49%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 11,62 (s, 1H), 9,36 (s, 2H), 8,26 (s, 1H), 7,89 (dd, J = 7,8, 1,6 Hz, 2H), 7,60 – 7,45 (m, 3H), 7,25 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 6,93 (dd, J = 8,2, 1,9 Hz, 1H), 6,78 (d, J = 8,1 Hz, 1H); ¹³C NMR (50 MHz,

DMSO-*d6*) δ (ppm): 162,87, 148,43, 148,04, 145,79, 133,79, 131,59, 128,49, 127,59, 125,89, 120,65, 115,68, 112,84; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 327,5, 302, 289, 255, 229, 216; IR (KBr): ν_{max} = 3350, 3265, 1649, 1628, 1607, 1554, 1508, 1445, 1364, 1285, 1240, 1176 cm⁻¹.



(*E*)-*N'-Бензилиден-2-хидроксибензохидразид* – **2а**; бела чврста супстанца (принос 79%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 11,87 (s, 2H), 8,47 (s, 1H), 7,91 (dd, J = 7,8, 1,4 Hz, 1H), 7,76 (dd, J = 6,6, 3,1 Hz, 2H), 7,52 – 7,39 (m, 4H), 6,96 (dd, J = 12,3, 4,6 Hz,

2H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 164,83, 159,08, 148,79, 134,19, 133,88, 130,34, 128,92, 128,62, 127,30, 119,03, 117,36, 115,99; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 312,5, 300, 224, 202; IR (KBr): ν_{max} = 3443, 3241, 3042, 1629, 1613, 1586, 1559, 1493, 1457, 1380, 1311, 1235, 1215, 1178 cm⁻¹.



(s, 1H), 7,90 (dd, J = 7,7, 1,1 Hz, 1H), 7,63 – 7,52 (m, 1H), 7,51 – 7,40 (m, 1H), 7,37 – 7,25 (m, 1H), 7,04 – 6,87 (m, 4H); ¹³C NMR (50 MHz DMSO-*d6*) δ (ppm): 164,56, 159,06, 157,56, 149,11, 134,02, 131,67, 129,57, 128,63, 119,46, 119,08, 118,69, 117,38, 116,53, 115,68; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 330,5, 288,5, 235, 210,5; IR (KBr): ν_{max} = 3430, 3188, 3043, 1619, 1559, 1488, 1454, 1376, 1305, 1271, 1231, 1156 cm⁻¹.



(*E*)-2-Хидрокси-N'-(4-хидроксибензилиден)бензохидразид – **2в**; жута чврста супстанца (принос 96%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 12,00 (s, 1H), 11,71 (s, 1H), 10,00 (s, 1H), 8,36 (s, 1H), 7,89 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,59 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,51 – 7,36

(*E*)-2-Хидрокси-N'-(2-хидроксибензилиден)бензохидразид – **26**; жута чврста супстанца (принос 83%); ¹Н NMR (200 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 12,04 (s, 1H), 11,79 (s, 1H), 11,21 (s, 1H), 8,69

(m, 1H), 7,00 – 6,79 (m, 4H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 164,73, 159,70, 159,33, 149,28, 133,79, 129,15, 128,36, 125,15, 118,94, 117,39, 115,85, 115,76; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 325, 229, 204; IR (KBr): ν_{max} = 3365, 3241, 3069, 1629, 1607, 1582, 1562, 1516, 1457, 1374, 1310, 1278, 1237, 1163 cm⁻¹.



(*E*)-2-Хидрокси-N'-(2-хидрокси-Зметоксинбензилиден)бензохидразид – **2г**; бела чврста супстанца (принос 85%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm): 12,01 (s, 1H), 11,81 (s, 1H), 10,87 (s, 1H), 8,70 (s, 1H), 7,90 (dd, J = 7,9, 1,4 Hz, 1H), 7,52 – 7,38 (m, 1H), 7,17 (dd, J = 7,8, 1,4 Hz, 1H), 7,08 – 6,81 (m, 4H), 3,82 (s, 3H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm): 164,58, 159,10, 148,99,

148,04, 147,34, 134,02, 128,60, 120,87, 119,16, 119,07, 118,98, 117,39, 115,69, 114,16, 56,03; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 348, 315, 300, 237, 213,5, 200,5; IR (KBr): ν_{max} = 3416, 3226, 3082, 2936, 1606, 1583, 1561, 1481, 1456, 1376, 1312, 1256, 1236, 1155 cm⁻¹.



(*E*)-2-Хидрокси-N'-(4-хидрокси-3-метоксибензилиден)бензохидразид – **2д**; бела чврста супстанца (принос 80%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm): 11,98 (s, 1H), 11,72 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 7,96 – 7,84 (m, 1H), 7,41 (ddd, J = 13,4, 10,1, 1,6 Hz, 2H), 7,12 (dd, J = 8,2, 1,8 Hz, 1H), 7,01 – 6,82 (m, 3H), 3,83 (s,

3H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 164,68, 159,27, 149,47, 149,33, 148,14, 133,79, 128,41, 125,58, 122,49, 118,96, 117,39, 115,86, 115,60, 109,34, 55,76 UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) =331,5, 289, 235, 208,5; IR (KBr): ν_{max} = 3478, 3258, 3044, 2934, 1636, 1605, 1588, 1543, 1515, 1449, 1373, 1300, 1275, 1240, 1144 cm⁻¹.



(*E*)-2-Хидрокси-N'-(4-хидрокси-3,5-диметоксибензилиден) бензохидразид – **2ђ**; чврста супстанца беж боје (принос 95%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 11,93 (s, 1H), 11,75 (s, 1H), 8,98 (s, 1H), 8,34 (s, 1H), 7,96 – 7,84 (m, 1H), 7,50 – 7,36 (m, 1H), 6,97 (dd, J = 14,0, 6,2 Hz, 4H), 3,82 (s, 6H); ¹³C NMR (50 MHz,

DMSO-*d6*) δ (ppm): 164,59, 159,10, 149,53, 148,23, 138,33, 133,75, 128,50, 124,40, 118,98, 117,35, 115,98, 105,03, 56,22; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 336, 243, 212, 200,5; IR (KBr): ν_{max} = 3408, 3275, 3070, 2937, 1639, 1592, 1555, 1513, 1456, 1424, 1359, 1329, 1218, 1174, 1114 cm⁻¹.



(*E*)-*N*'-(2,4-Дихидроксибензилиден)-2-хидроксибензохидразид – **2е**; чврста супстанца беж боје (принос 84%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 11,90 (s, 2H), 11,37 (s, 1H), 10,03 (s, 1H), 8,55 (s, 1H), 7,95 – 7,82 (m, 1H), 7,51 – 7,29 (m, 2H), 6,95 (t, J =

7,6 Hz, 2H), 6,36 (dt, J = 3,7, 2,2 Hz, 2H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm): 164,36, 161,02, 159,63, 159,26, 150,07, 133,93, 131,45, 128,39, 119,02, 117,41, 115,50, 110,56, 107,93, 102,79,; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 336, 304,5, 293, 244, 209; IR (KBr): ν_{max} = 3451, 3382, 3071, 1629, 1610, 1582, 1556, 1507, 1455, 1368, 1305, 1233, 1160 cm⁻¹.



(*E*)-*N*'-(*3*,*4*-Дихидроксибензилиден)-2-хидроксибензохидразид – **2ж**; бела чврста супстанца (принос 86%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm): 12,03 (s, 1H), 11,67 (s, 1H), 9,39 (d, J = 27,2 Hz, 2H), 8,28 (s, 1H), 7,89 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,43 (t, J = 7,1 Hz, 1H), 7,27 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 6,94 (t, J = 7,6 Hz, 3H), 6,80 (d, J = 8,1 Hz,

1H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 164,72, 159,38, 149,50, 148,30, 145,81, 133,78, 128,30, 125,60, 120,95, 118,92, 117,40, 115,70, 112,97; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm)= 333,5, 307, 291, 239, 204,5; IR (KBr): ν_{max} = 3274, 3089, 1639, 1612, 1589, 1555, 1493, 1443, 1357, 1312, 1287, 1248, 1180 cm⁻¹.



(Е)-N'-Бензилиден-4-хидроксибензохидразид – **За**; бела чврста супстанца (принос 87%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 11,40 (s, 1H), 9,67 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 7,71 (dd, J = 21,5, 5,2 Hz, 5H), 7,29 (s, 2H), 6,82 (s, 1H), 6,78 (s, 1H); ¹³C NMR (50

MHz, DMSO-*d6* μ CDCl₃) δ (ppm): 160,51, 147,02, 134,23, 129,40, 128,15, 126,89, 123,93, 114,77; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 302,5, 216, 201; IR (KBr): ν_{max} = 3440, 3227, 3043, 1617, 1607, 1589, 1551, 1511, 1447, 1359, 1285, 1215, 1173 cm⁻¹.



(*E*)-4-Хидрокси-N'-(2-хидроксибензилиден)бензохидразид – **36**; жута чврста супстанца (принос 68%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 11,82 (s, 1H), 9,91 (s, 1H), 8,52 (s, 1H), 7,78 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 7,40 – 7,10 (m, 2H), 6,84 (t, J = 7,9 Hz, 4H);

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6* μ CDCl₃) δ (ppm): 160,93, 157,79, 148,31, 130,74, 130,00, 129,55, 123,17, 118,89, 118,23, 116,37, 114,99; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 325,5, 298, 288, 235, 211; IR (KBr): ν_{max} = 3440, 3269, 3054, 1638, 1608, 1585, 1550, 1512, 1493, 1362, 1283, 1260, 1220, 1170 cm⁻¹.

^{OH} (*E*)-4-Хидрокси-N'-(4-хидроксибензилиден)бензохидразид – **3в**; бела чврста супстанца (принос 96%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 11,34 (s, 1H), 9,69 (s, 2H), 8,28 (s, 1H), 7,76 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,50 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 6,82 (s, 1H), 6,76 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 160,44, 159,18, 129,39, 128,53, 125,42, 124,10, 115,44, 114,77; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 316,5, 218, 201; IR (KBr): ν_{max} = 3397, 3281, 3077, 1606, 1577, 1512, 1454, 1370, 1310, 1287, 1259, 1183 cm⁻¹.

(*E*)-4-Хидрокси-N'-(2-хидрокси-3-метоксибензилиден)бензохидразид – **3г**; чврста супстанца беж боје (принос 96%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 11,28 (s, 1H), 9,41 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 7,65 (d, *J* = 7,4 Hz, 2H), 6,71 (d, *J* = 6,9 Hz, 5H), 3,71 (s, 3H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm):

160,82, 148,83, 147,85, 129,54, 123,31, 122,03, 118,56, 118,17, 115,03, 113,43, 55,86;

UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 338, 301,5, 215, 200,5; IR (KBr): ν_{max} = 3412, 3254, 3085, 2930, 1630, 1608, 1591, 1516, 1468, 1369, 1323, 1301, 1251, 1188 cm⁻¹.



 (E)-4-Хидрокси-N'-(4-Хидрокси-З-метоксибензилиден)бензохидразид – Зд; жута чврста супстанца (принос 94%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d6 и CDCl₃) δ (ppm): 11,10 (s, 1H), 9,55 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,23 (s, 1H), 7,76 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,43 (d, J = 14,6

Hz, 1H), 6,93 (dd, J = 8,2, 1,7 Hz, 1H), 6,80 (tt, J = 6,1, 3,0 Hz, 3H), 3,80 (s, 3H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*6 μ CDCl₃) δ (ppm): 163,80, 160,55, 148,63, 148,11, 147,76, 129,46, 125,98, 124,05, 122,56, 116,48, 114,93, 114,85, 108,48, 108,37, 55,61; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 325,5, 289, 232, 210; IR (KBr): ν_{max} = 3379, 3245, 3064, 2933, 1603, 1581, 1561, 1509, 1462, 1373, 1305, 1279, 1265, 1179 cm⁻¹.



(E)-4-Хидрокси-N'-(4-хидрокси-3,5-диметоксибензилиден)
 бензохидразид – **3ђ**; жута чврста супстанца (принос 81%); ¹H
 NMR (200 MHz, DMSO-d6 и CDCl₃) δ (ppm): 11,38 (s, 1H), 9,74 (s, 1H), 8,46 (s, 1H), 8,24 (s, 1H), 7,76 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 6,90 (s, 2H),

6,79 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 3,80 (s, 6H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6* μ CDCl₃) δ (ppm): 160,60, 147,90, 137,81, 129,49, 124,84, 124,01, 114,87, 104,66, 56,01; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 328, 284,5, 260, 239, 214, 201,5; IR (KBr): ν_{max} = 3531, 3328, 3068, 2947, 1642, 1610, 1579, 1550, 1508, 1465, 1369, 1323, 1279, 1238, 1215, 1172, 1109 cm⁻¹.



(E)-N'-(2,4-Дихидроксибензилиден)-4-хидроксибензохидразид
 - Зе; жута чврста супстанца (принос 85%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d6 и CDCl₃) δ (ppm): 11,25 (s, 1H), 9,41 (d, J = 32,5 Hz, 2H),

8,31 (s, 1H), 7,72 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,43 (s, 1H), 6,95 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 6,79 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 6,39 – 6,24 (m, 2H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6* μ CDCl₃) δ (ppm): 162,72, 160,69, 160,41, 159,91, 149,36, 131,58, 129,40, 123,48, 114,95, 110,33, 107,39, 102,93; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 330, 288,5, 247, 215, 201; IR (KBr): ν_{max} = 3400, 3349, 3030, 1650, 1633, 1603, 1554, 1507, 1456, 1360, 1329, 1260, 1221, 1175 cm⁻¹.



(E)-N'-(3,4-Дихидроксибензилиден)-4-хидроксибензохидразид
 - Зж; чврста супстанца беж боје (принос 67%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d6 и CDCl₃) δ (ppm): 11,24 (s, 1H), 9,73 (s, 1H), 8,93 (s, 2H), 8,19 (s, 1H), 7,74 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,01 – 6,51 (m, 4H);

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6* μ CDCl₃) δ (ppm): 160,50, 147,53, 145,36, 129,41, 126,08, 124,16, 120,35, 115,30, 114,88, 113,21; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 327, 288, 278, 231, 212, 201; IR (KBr): ν_{max} = 3400, 3303, 3137, 1626, 1616, 1606, 1576, 1507, 1445, 1360, 1326, 1288, 1258, 1174 cm⁻¹.



(*E*)-*N'-Бензилиден-4-хидрокси-3-метоксибензохидразид* – **4а**; чврста супстанца беж боје (принос 97%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 11,65 (s, 1H), 9,76 (s, 1H), 8,45 (s, 1H), 7,71 (d, *J* = 4,2 Hz, 2H), 7,53 – 7,37 (m, 5H), 6,89 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 3,85

(s, 3H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 162,86, 150,21, 147,35, 146,99, 134,59, 129,94, 128,89, 127,03, 124,25, 121,51, 115,07, 111,89, 55,93; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 308,5, 289,5, 219,5, 200,5; IR (KBr): ν_{max} = 3424, 3230, 3063, 2960, 1655, 1632, 1605, 1576, 1515, 1448, 1369, 1312, 1292, 1238 cm⁻¹.



(*E*)-4-Хидрокси-N'-(2-хидроксибензилиден)-3-метоксибензохидразид – **46**; жута чврста супстанца (принос 98%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 11,92 (s, 1H), 11,41 (s, 1H), 9,82 (s, 1H), 8,62 (s, 1H), 7,57 – 7,43 (m, 3H), 7,35 – 7,23 (m, 1H), 6,92 (t,

J = 7,6 Hz, 3H), 3,86 (s, 3H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 160,52, 155,49, 148,46, 145,69, 145,45, 129,25, 127,65, 121,61, 119,57, 117,40, 116,85, 114,51, 113,18, 109,83, 53,95; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 326,5, 289, 225, 200,5; IR (KBr): ν_{max} = 3430, 3232, 3062, 2927, 1638, 1622, 1606, 1516, 1464, 1369, 1312, 1290, 1225 cm⁻¹.



(E)-4-Хидрокси-N'-(4-хидроксибензилиден)-3-метоксибензохидразид – **4в**; чврста супстанца беж боје (принос 97%); ¹Н NMR (200 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 11,45 (s, 1H), 9,84 (s, 2H),

8,34 (s, 1H), 7,60 – 7,39 (m, 4H), 6,85 (dd, J = 8,3, 6,5 Hz, 3H), 3,84 (s, 3H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 162,61, 159,32, 150,04, 147,34, 128,79, 125,60, 124,51, 121,35, 115,81, 115,06, 111,78, 55,93; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 319, 223, 200,5; IR (KBr): ν_{max} = 3374, 3267, 3032, 2946, 1606, 1587, 1562, 1511, 1465, 1376, 1293, 1251, 1241, 1165 cm⁻¹.



(*E*)-4-Хидрокси-*N'*-(2-хидрокси-3-метоксибензилиден)-3метоксибензохидразид – **4г**; жута чврста супстанца (принос 97%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 11,87 (s, 1H), 11,12 (s, 1H), 9,80 (s, 1H), 8,62 (s, 1H), 7,56 – 7,41 (m, 2H), 7,12 (dd, *J* = 7,8, 1,3 Hz, 1H), 7,07 – 6,98 (m, 1H), 6,93 – 6,80 (m, 2H), 3,83 (d, *J*

= 8,8 Hz, 6H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 162,47, 150,44, 148,03, 147,61, 147,45, 147,24, 123,66, 121,55, 121,06, 119,09, 115,17, 113,88, 111,85, 55,96; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 312, 299,5, 285,5, 221, 201; IR (KBr): ν_{max} = 3476, 3229, 3076, 2943, 1634, 1606, 1577, 1517, 1466, 1364, 1292, 1264, 1250, 1175 cm⁻¹.



(*E*)-4-Хидрокси-*N'*-(4-хидрокси-3-метоксибензилиден)-3метоксибензохидразид – **4**д; чврста супстанца беж боје (принос 80%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm): 11,48 (s, 1H), 9,63 (s, 2H), 8,34 (s, 1H), 7,52 – 7,40 (m, 2H), 7,31 (s, 1H), 1H) 6.86 (dd *L*= 7.9, 7.0 Hz, 2H) 2.82 (d, *L*= 4.6 Hz, 6H): 13C NMP

7,07 (dd, *J* = 8,2, 1,4 Hz, 1H), 6,86 (dd, *J* = 7,9, 7,0 Hz, 2H), 3,83 (d, *J* = 4,6 Hz, 6H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 162,63, 150,06, 148,92, 148,12, 147,70, 147,33, 126,02, 124,49, 122,05, 121,36, 115,58, 115,07, 111,78, 109,15, 55,93; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 327,5, 301, 288, 276, 221, 200,5; IR (KBr): ν_{max} = 3423, 3398, 3087, 2962, 1617, 1596, 1570, 1514, 1464, 1372, 1326, 1286, 1235, 1167 cm⁻¹.



(*E*)-4-Хидрокси-*N'*-(4-хидрокси-3,5-диметоксибензилиден)-3метоксибензохидразид – **4**ђ; чврста супстанца беж боје (принос 96%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm): 11,53 (s, 1H), 9,73 (s, 1H), 8,92 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 7,52 – 7,40 (m, 2H),

7,01 - 6,83 (m, 3H), 3,83 (d, *J* = 6,3 Hz, 9H), ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 162,68, 150,05, 148,23, 147,71, 147,29, 137,98, 124,85, 124,47, 121,42, 115,03, 111,89, 104,81, 56,22, 55,93; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 329,5, 244, 218,5, 201; IR (KBr): ν_{max} = 3429, 3310, 3098, 2942, 1641, 1599, 1586, 1561, 1509, 1453, 1378, 1326, 1286, 1217, 1164 cm⁻¹.

^{H0} ^{H0}



(E)-N'-(3,4-Дихидроксибензилиден)-4-хидрокси-3-метокси бензохидразид – **4ж**; чврста супстанца беж боје (принос 96%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 11,41 (s, 1H), 9,73 (s, 1H), 9,36 (d, *J* = 19,7 Hz, 2H), 8,25 (s, 1H), 7,44 (d, *J* = 10,4 Hz, 2H), 7,24

(s, 1H), 6,85 (dt, J = 24,5, 8,3 Hz, 3H), 3,84 (s, 3H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 162,57, 150,02, 147,88, 147,66, 147,36, 145,79, 126,09, 124,55, 121,29, 120,49, 115,72, 115,07, 112,83, 111,75, 55,94; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 328,5, 218,5, 201,5; IR (KBr): ν_{max} = 3407, 3243, 2854, 1607, 1595, 1579, 1520, 1474, 1366, 1291, 1257, 1240, 1195 cm⁻¹.



(*E*)-*N*'-*Бензилиден-2,3-дихидроксибензохидразид* – **5а**; чврста супстанца браон боје (принос 47%), Т.т. 235–237 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 12,28 (s, 1H), 11,80 (s, 1H), 8,92 (s, 1H), 8,50 (s, 1H), 7,83 – 7,72 (m, 2H), 7,42 (dd, J = 3,8, 2,7

Hz, 4H), 7,01 (dd, J = 7,8, 1,3 Hz, 1H), 6,75 (t, J = 8,0 Hz, 1H);¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 166,32, 149,53, 149,03, 146,00, 133,71, 129,88, 128,24, 127,07, 119,05, 117,85, 117,25, 113,99; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 301, 218, 200,5; IR (KBr): ν_{max} = 3423, 3281, 3055, 1639, 1605, 1584, 1562, 1488, 1468, 1371, 1324, 1315, 1275, 1238, 1174 cm⁻¹; C₁₄H₁₂N₂O₃ (MW=256,26), израчунато: C, 65,62%; H, 4,42%; N, 10,93%; нађено: C, 65,86%; H, 4,78%; N, 11,29%.



(E)-2,3-Дихидрокси-N'-(2-хидроксибензилиден)бензохидразид – **56**; чврста супстанца беж боје (принос 90%), Т.т. 251–252 °С; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d6 и CDCl₃) δ (ppm): 12,02 (s, 2H), 11,33 (s, 1H), 8,59 (s, 1H), 7,45 – 7,29 (m, 2H), 7,29 – 7,17 (m, 1H),

7,04 – 6,77 (m, 3H), 6,69 (t, J = 7,9 Hz, 1H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 165,77, 157,77, 150,02, 149,47, 146,06, 131,12, 130,01, 119,23, 118,86, 118,00, 117,85, 117,23, 116,33, 113,80; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 329, 298, 287,5, 218, 200,5; IR (KBr): ν_{max} = 3359, 3320, 3050, 1649, 1614, 1575, 1541, 1491, 1454, 1369, 1327, 1312, 1251, 1158 cm⁻¹; C₁₄H₁₂N₂O₄ (MW=272,26), израчунато: C, 61,76%; H, 4,44%; N, 10,29%; нађено: C, 61,89%; H, 4,36%; N, 10,38%.

(E)-2,3-Дихидрокси-N'-(4-хидроксибензилиден)бензохидразид – **5в**; чврста супстанца беж боје (принос 86%), Т.т. 245–247 °С; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*6 и CDCl₃) δ (ppm): 12,32 (s, 1H),

11,69 (s, 1H), 9,79 (s, 1H), 9,09 (s, 1H), 8,39 (s, 1H), 7,59 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,39 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 6,97 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 6,84 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 6,73 (t, J = 7,9 Hz, 1H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6* μ CDCl₃) δ (ppm): 165,95, 159,61, 149,51, 146,09, 128,88, 124,81, 118,96, 117,89, 117,22, 115,51, 114,26;UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 319, 219,5, 200,5; IR (KBr): ν_{max} = 3419, 3339, 1644, 1604, 1546, 1516, 1448, 1391, 1323, 1307, 1276, 1253,

1173 ст⁻¹; С₁₄H₁₂N₂O₄ (MW=272,26), израчунато: С, 61,76%; Н, 4,44%; N, 10,29%; нађено: С, 61,95%; Н, 4,56%; N, 10,48%.



(*E*)-2,3-Дихидрокси-N'-(2-хидрокси-3-метоксибензилиден) бензохидразид – **5г**; чврста супстанца беж боје (принос 94%), Т.т. 221–223 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 12,00 (s, 2H), 11,03 (s, 1H), 8,61 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), 7,34 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 7,11 – 6,86 (m, 3H), 6,80 (t, J = 7,3 Hz, 1H), 6,69 (t, J =

8,1 Hz, 1H), 3,82 (s, 3H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 165,77, 149,82, 149,49, 147,68, 146,04, 121,60, 119,21, 118,59, 118,17, 117,98, 117,21, 113,98, 113,80, 55,84; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 340, 302, 202; IR (KBr): ν_{max} = 3392, 3289, 3070, 2943, 1648, 1608, 1578, 1546, 1480, 1464, 1367, 1330, 1256, 1165 cm-1; C₁₅H₁₄N₂O₅ (MW=302,29), израчунато: C, 59,60%; H, 4,67%; N, 9,27%; нађено: C, 59,78%; H, 4,87%; N, 9,44%.



(E)-2,3-Дихидрокси-N'-(4-хидрокси-3-метоксибензилиден) бензохидразид – **5д**; чврста супстанца беж боје (принос 73%), Т.т. 218–221 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 12,23 (s, 1H), 11,65 (s, 1H), 9,30 (s, 2H), 8,34 (s, 1H), 7,36 (d, J =

7,8 Hz, 2H), 6,98 (dd, J = 21,0, 7,9 Hz, 2H), 6,81 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 6,68 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 3,85 (s, 3H); 13 C NMR (50 MHz, DMSO-*d6* μ CDCl₃) δ (ppm): 165,93, 149,72, 149,45, 149,14, 147,76, 145,99, 125,28, 122,49, 118,89, 117,79, 117,20, 115,08, 114,17, 108,97, 55,58; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 330,5, 300,5, 288,5, 216,5, 200,5; IR (KBr): ν_{max} = 3407, 3287, 3076, 2988, 1644, 1584, 1559, 1509, 1452, 1353, 1319, 1255, 1182 cm⁻¹; C₁₅H₁₄N₂O₅ (MW=302,29), израчунато: C, 59,60%; H, 4,67%; N, 9,27%; нађено: C, 59,98%; H, 4,98%; N, 9,63%.



(E)-2,3-Дихидрокси-N'-(4-хидрокси-3,5-диметоксибензилиден) бензохидразид – **5ђ**; чврста супстанца беж боје (принос 85%), Т.т. 253–255 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 12,21 (s, 1H), 11,69 (s, 1H), 9,01 (s, 2H), 8,33 (s, 1H), 7,36 (d, J =

7,9 Hz, 1H), 6,94 (d, J = 9,1 Hz, 3H), 6,69 (t, J = 8,1 Hz, 1H), 3,83 (s, 6H); ¹³C NMR (DMSOd6 и CDCl₃) δ (ppm): 165,92, 149,78, 149,43, 147,85, 146,07, 138,29, 124,15, 118,98, 117,91, 117,32, 114,26, 104,96, 68,23, 56,03; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 332, 242, 218, 201; IR (KBr): ν_{max} = 3400, 3313, 3079, 2947, 1643, 1593, 1549, 1513, 1462, 1372, 1320, 1282, 1177, 1113 cm⁻¹; C₁₆H₁₆N₂O₆ (MW=332,31), израчунато: C, 57,83%; H, 4,85%; N, 8,43%; нађено: C, 57,59%; H, 4,55%; N, 8,17%.

(*E*)-*N'-(2,4-Дихидроксибензилиден)-2,3-дихидроксибензохидразид – 5е; жута чврста супстанца (принос 70%), Т.т. 276– 277 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-<i>d6* и CDCl₃) δ (ppm): 12,10 (s,

1H), 11,89 (s, 1H), 11,40 (s, 1H), 9,84 (s, 1H), 9,13 (s, 1H), 8,50 (s, 1H), 7,27 (dd, J = 22,9, 8,4 Hz, 2H), 6,94 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 6,70 (t, J = 8,1 Hz, 1H), 6,33 (d, J = 8,8 Hz, 2H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 165,39, 160,89, 159,73, 150,57, 149,40, 146,14, 131,53, 119,10, 118,04, 117,22, 114,16, 110,14, 107,63, 102,74; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 334,5, 302,5, 244,5, 220,5, 200,5; IR (KBr): ν_{max} = 3468, 3285, 1633, 1607, 1586, 1512, 1467, 1382, 1310, 1301, 1252, 1159 cm⁻¹; C₁₄H₁₂N₂O₅ (MW=288,26), израчунато: C, 58,33%; H, 4,20%; N, 9,72%; нађено: C, 58,65%; H, 4,48%; N, 9,88%.



(*E*)-*N'-(3,4-Дихидроксибензилиден)-2,3-дихидроксибензохидразид – 5ж; чврста супстанца браон боје (принос 76%), Т.т. 254–255 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-<i>d6* и CDCl₃) δ (ppm): 12,18 (s, 1H), 11,65 (s, 1H), 9,30 (d, J = 32,6 Hz, 3H), 8,28 (s, 1H), 7,47 –

7,08 (m, 2H), 6,94 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 6,74 (dd, J = 15,6, 7,7 Hz, 2H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 165,73, 149,59, 149,38, 148,06, 146,08, 145,52, 125,44, 120,59, 118,90, 117,89, 117,29, 115,37, 114,57, 113,05; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 331, 302,5, 223, 203; IR (KBr): ν_{max} = 3467, 3281, 3069, 1640, 1608, 1586, 1552, 1526, 1446, 1367, 1334, 1314, 1267, 1182 cm⁻¹; C₁₄H₁₂N₂O₅ (MW=288,26), израчунато: C, 58,33%; H, 4,20%; N, 9,72%; нађено: C, 58,37%; H, 4,20%; N, 9,77%.



(*E*)-*N*'-Бензилиден-2,3,4-трихидроксибензохидразид – **6а**; чврста супстанца браон боје (принос 85%), Т.т. 205–207 °С; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 12,46 (s, 2H), 11,52 (s, 1H), 9,02 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 7,68 (dd, J = 6,7, 2,8 Hz, 2H), 7,41

- 7,20 (m, 4H), 6,35 (d, J = 8,8 Hz, 1H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 166,79, 151,11, 149,91, 148,19, 133,91, 132,54, 129,79, 128,28, 127,09, 118,26, 106,86, 105,98; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 313, 228, 208; IR (KBr): ν_{max} = 3411, 3280, 1638, 1607, 1566, 1507, 1450, 1370, 1331, 1308, 1266, 1230, 1165 cm⁻¹; C₁₄H₁₂N₂O₇ (MW=272,26), израчунато: C, 61,76%; H, 4,44%; N, 10,29%; нађено: C, 61,97%; H, 4,65%; N, 10,37%.



(*E*)-2,3,4-Трихидрокси-N'-(2-хидрокси-3-метоксибензилиден) бензохидразид – **6г**; чврста супстанца беж боје (принос 59%), Т.т. 245–246 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 12,38 (s, 1H), 11,89 (s, 1H), 11,10 (s, 1H), 9,49 (s, 2H), 8,60 (s, 1H), 7,30 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 7,12 – 6,89 (m, 2H), 6,81 (t, J = 7,8 Hz, 1H),

6,37 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 3,82 (s, 3H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 166,15, 151,20, 150,41, 148,70, 147,82, 147,44, 132,74, 121,29, 118,74, 118,54, 118,14, 113,76, 107,07, 105,55, 55,85; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 349, 314,5, 207,5; IR (KBr): ν_{max} = 3327, 2950, 1634, 1605, 1553, 1508, 1473, 1367, 1289, 1266, 1167 cm⁻¹; C₁₅H₁₄N₂O₆ (MW=318,29), израчунато: C, 56,60%; H, 4,43%; N, 8,80%; нађено: C, 56,50%; H, 4,24%; N, 8,73%.



(Е)-2,3,4-Трихидрокси-N'-(4-хидрокси-3,5-диметокси бензилиден)бензохидразид – 6ђ; чврста супстанца браон боје (принос 29%), Т.т. 265-267 °С; ¹Н NMR (200 MHz, DMSO-d6 и CDCl₃) δ (ppm): 12,53 (s, 2H), 11,53 (s, 1H), 9,36 (s, 1H), 8,69 (s, 1H), 8,29 (s, 1H), 7,31 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 6,95 (s, 2H), 6,35 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 3,83 (s, 6H); ¹³С NMR (50 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 166,25, 151,05, 149,97, 148,77, 147,90, 138,15, 132,62, 124,37, 118,06, 106,76, 105,97, 104,90, 56,04; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 333,5, 238, 207,5; IR (KBr): ν_{max} = 3506, 3322, 3090, 2949, 1643, 1622, 1591, 1556, 1514. 1461, 1325, 1292, 1216, 1166, 1113 ст⁻¹; С₁₆Н₁₆N₂O₇ (МW=348,31), израчунато: С. 55,17%; Н. 4,63%; N. 8,04%; нађено: С. 55,42%; Н. 4,86%; N. 8,39%.

(Е)-N'-(2,4-Дихидроксибензилиден)-2,3,4-трихидрокси бензохидразид – 6е; чврста супстанца браон боје (принос 94%), Т.т. 280-282 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d6 и CDCl₃) δ (ppm): 12,42 (s, 2H), 11,62 (s, 1H), 9,67 (s, 3H), 8,40 (s, 1H), 7,24 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 7,13 - 7,03 (m, 1H), 6,39 - 6,24 (m, 3H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*6 и CDCl₃) δ (ppm): 164,66, 159,45, 158,61, 149,85, 148,81, 131,40, 130,36, 116,72, 108,94, 106,29, 105,69, 104,44, 101,65; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 334,5, 303,5, 235, 207; IR (KBr): ν_{max} = 3327, 1630, 1610, 1502, 1452, 1388, 1284, 1220, 1167 ст⁻¹; С₁₄Н₁₂N₂O₆ (МW=304,26), израчунато: С, 55,27%; Н, 3,98%; N, 9,21%; нађено: С, 55,43%; Н, 4,12%; N, 9,33%.



(E)-N'-(3,4-Дихидроксибензилиден)-2,3,4-трихидрокси *бензохидразид – 6ж; чврста супстанца браон боје (принос* 79%), Т.т. 253–255 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d6 и CDCl₃) δ (ppm): 12,63 (s, 2H), 11,38 (s, 1H), 9,21 (s, 3H), 8,22 (s, 1H), 7,35

- 7,17 (m, 2H), 6,91 (dt, J = 4,0, 2,0 Hz, 1H), 6,74 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 6,33 (d, J = 8,8 Hz, 1H); ¹³С NMR (50 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 166,32, 151,12, 149,80, 148,73, 147,76, 145,36, 132,57, 125,62, 120,37, 117,96, 115,27, 113,15, 106,72, 106,01; UV-Vis (MeOH) $\lambda_{max}(nm) = 333, 305, 236, 208; IR (KBr): \nu_{max} = 3394, 3312, 1638, 1583, 1500, 1445, 1386, 1583, 1500, 1445, 1386, 1583, 1500, 1445, 1386, 1583, 1500, 1445, 1386, 1583, 1500, 1445, 1386, 1583, 1500, 1445, 1386, 1583, 1500, 1445, 1386, 1583, 1500, 1445, 1386, 1583, 1500, 1445, 1386, 1583, 1500, 1445, 1386, 1583, 1500, 1445, 1386, 1583, 1500, 1445, 1386, 1583, 1583, 1500, 1445, 1386, 1583, 1583, 1500, 1445, 1386, 1583, 1583, 1500, 1445, 1386, 1583$ 1308, 1284, 1202 ст⁻¹; С₁₄H₁₂N₂O₆ (МW=304,26), израчунато: С, 55,27%; Н, 3,98%; N, 9,21%; нађено: С, 55,50%; Н, 4,25%; N, 9,06%.



(Е)-N'-Бензилиден-3,4,5-трихидроксибензохидразид 7a; чврста супстанца беж боје (принос 68%); ¹Н NMR (200 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 11,10 (s, 1H), 8,30 (s, 1H), 7,66 (d, *J* = 3.6 Hz, 3H), 7.38 (d, / = 0.9 Hz, 1H), 7.33 - 7.18 (m, 4H), 7.03 (s, 2H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d6 и CDCl₃) δ (ppm): 145,19,

136,56, 134,34, 129,59, 128,28, 127,17, 123,80, 107,54; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 308,5, 213,5; IR (KBr): v_{max} = 3433, 3332, 3070, 1667, 1607, 1578, 1542, 1499, 1449, 1382, 1346, 1278, 1260, 1230 cm⁻¹.



(Е)-3,4,5-Трихидрокси-N'-(2-хидроксибензилиден)бензо*хидразид* – **76**; чврста супстанца браон боје (принос 92%); ¹Н NMR (200 MHz, DMSO-d6 и CDCl₃) δ (ppm): 11,66 (s, 1H), 11,60 (s, 1H), 8,79 (s, 3H), 8,44 (s, 1H), 7,17 (dd, *J* = 12,7, 4,5 Hz, 2H), 6,95 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 6,91 - 6,74 (m, 2H); ¹³C NMR (50 MHz,

DMSO-d6 и CDCl₃) δ (ppm): 163,34, 157,99, 148,76, 145,36, 137,30, 136,93, 130,76, 130,30, 123,05, 118,89, 118,12, 116,48, 107,48; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 327,5, 299,5, 290, 213,5; IR (KBr): v_{max} = 3394, 3221, 1608, 1592, 1546, 1489, 1449, 1345, 1281, 1264, 1215, 1034 cm⁻¹.

OH



бензохидразид – 7в; чврста супстанца браон боје (принос 82%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 11,34 (s, 1H), 9,89 (s, 1H), 9,15 (s, 2H), 8,81 (s, 1H), 8,29 (s, 1H), 7,51 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 6,95 – 6,76 (m, 4H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 163,14, 159,15, 146,99, 145,53, 136,78, 128,64, 125,69, 123,75, 115,71, 107,29; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 320, 213; IR (KBr): v_{max} = 3466, 3313, 1595, 1581, 1561, 1510, 1442, 1359, 1328, 1260, 1214, 1165 cm⁻¹.



(Е)-3,4,5-Трихидрокси-N'-(2-хидрокси-3-метоксибензилиден) бензохидразид – 7г; чврста супстанца беж боје (принос 95%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 11,82 (s, 1H), 11,25 (s, 1H), 9,13 (s, 3H), 8,58 (s, 1H), 7,08 (dd, J = 7,8, 1,5 Hz, 1H), 7,01 (dd, J = 8,2, 1,5 Hz, 1H), 6,95 (s, 2H), 6,83 (dd, / = 13,7, 5,8 Hz, 1H), 3,80 (s, 3H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 162,93, 148,00,

(Е)-3,4,5-Трихидрокси-N'-(4-хидроксибензилиден)

147,30, 145,71, 145,50, 137,34, 136,24, 123,71, 122,81, 121,30, 119,00, 113,91, 107,37, 106,64, 56,04; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 341, 310,5, 297,5, 213; IR (KBr): ν_{max} = 3430, 3233, 2943, 1658, 1607, 1577, 1539, 1463, 1341, 1250, 1172, 1025 cm⁻¹.



(Е)-3,4,5-Трихидрокси-N'-(4-хидрокси-3-метоксибензилиден) бензохидразид – 7д; чврста супстанца беж боје (принос 97%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 11,20 (s, 1H), 9,01 (s, 1H), 8,72 (s, 2H), 8,27 (d, J = 20,4 Hz, 2H), 7,33 (s, 1H), 6,98 -6,91 (m, 3H), 6,76 (d, / = 8,1 Hz, 1H), 3,81 (s, 3H); ¹³C NMR (50

МНz, DMSO-d6 и CDCl₃) δ (ppm): 163,88, 148,74, 147,90, 145,36, 136,66, 126,12, 123,80, 122,41, 115,07, 108,83, 107,40, 55,70; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 327,5, 301, 288, 212,5; IR (KBr): v_{max} = 3438, 3242, 1634, 1592, 1543, 1516, 1448, 1385, 1344, 1279, 1221, 1169, 1035 cm⁻¹.



(Е)-3,4,5-Трихидрокси-N'-(4-хидрокси-3,5-диметокси бензилиден)бензохидразид – 7ђ; жута чврста супстанца (принос 78%); ¹Н NMR (200 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 11,43 (s, 1H), 9,35 (s, 1H), 8,84 (s, 2H), 8,28 (s, 1H), 6,93 (d, J = 5,8 Hz, 3H), 6,79 (s, 1H), 4,33 (s, 1H), 3,81 (s, 6H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-

*d*6) δ (ppm): 166,48, 148,23, 145,62, 145,51, 137,84, 136,94, 136,25, 125,00, 123,70, 107,28, 106,64, 104,66, 56,22; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 328,5, 242, 212; IR (KBr): ν_{max} = 3483, 3314, 3085, 2951, 1620, 1587, 1557, 1505, 1463, 1363, 1324, 1216, 1163 cm⁻¹.



(E)-N'-(2,4-Дихидроксибензилиден)-3,4,5-трихидрокси бензохидразид – 7е; чврста супстанца беж боје (принос 92%); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 11,70 (s, 1H), 11,41 (s, 1H), 9,48 (s, 1H), 8,71 (s, 2H), 8,34 (d, *J* = 6,7 Hz, 2H),

6,97 (d, J = 10,4 Hz, 3H), 6,29 (dd, J = 5,7, 2,3 Hz, 2H); ¹³С NMR (50 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 160,36, 159,90, 149,27, 145,33, 136,71, 131,61, 123,28, 110,44, 107,32, 102,94; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 332, 302,5, 289,5, 242,5, 212; IR (KBr): ν_{max} = 3390, 3254, 1606, 1578, 1557, 1515, 1464, 1339, 1314, 1244, 1218, 1034 cm⁻¹.


(E)-N'-(3,4-Дихидроксибензилиден)-3,4,5-трихидрокси *бензохидразид – 7ж; чврста супстанца беж боје (принос 83%);* ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6* и CDCl₃) δ (ppm): 11,24 (s, 1H), 9,35 - 8,53 (m, 5H), 8,16 (d, J = 12,8 Hz, 1H), 7,25 (dd, J = 16,2, 1,6 Hz, 1H), 6,96 – 6,67 (m, 4H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*6 и CDCl₃) δ (ppm): 147,68, 145,61, 145,52, 145,45, 136,73, 136,24, 126,22, 123,86, 120,33, 115,48, 113,00, 108,37, 107,29, 106,70; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 328,5, 303,5, 292, 236, 213; IR (KBr): v_{max} = 3460, 3314, 1598, 1543, 1519, 1461, 1375, 1343, 1287, 1210, 1032 cm⁻¹.



4-((3-Хидрокси-5-метил-1Н-пиразол-4-ил)(фенил)метил)-5метил-1,2-дихидро-3Н-пиразол-3-он – 8; бела чврста супстанца (принос 82%), Т.т. 233–235 °С; ¹Н NMR (200 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 11,36 (s, 4H), 7,17 (dt, J = 14,1, 7,8 Hz, 5H), 4,81 (s, 1H), 2,07 (s, 6H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm): 161,1, 143,4, 139,8, 127,7, 127,5, 125,4, 104,3, 33,0, 10,5; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 248,5, 230, 203; IR

(KBr): v_{max} = 3360, 3193, 3028, 2968, 1612, 1523, 1491, 1475, 1450, 1401, 1287, 1217, 1146, 788, 718 cm⁻¹.



4-((3-Хидрокси-5-метил-1Н-пиразол-4-ил)(2-хидроксифенил) метил)-5-метил-1,2-дихидро-ЗН-пиразол-3-он – 9; наранџаста чврста супстанца (принос 64%), Т.т. 193-195 °С; ¹Н NMR (200 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 11,36 (s, 4H), 9,34 (s, 1H), 7,47 (dd, J = 7,6, 1,7 Hz, 1H), 6,91 (ddd, J = 7,9, 7,1, 1,7 Hz, 1H), 6,71 – 6,58 (m, 2H), 5,05 (s, 1H), 2,05 (s, 6H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d6) δ: 161,6, 154,0, 140,2, 130,6,

129,4, 126,4, 118,4, 114,7, 104,4, 27,1, 10,8; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 249, 223, 201; IR (KBr): v_{max} = 3211, 2928, 1595, 1532, 1501, 1456, 1387, 1368, 1275, 1229, 1144, 1097, 822, 811, 789, 752 cm⁻¹.



4-((3-Хидрокси-5-метил-1Н-пиразол-4-ил)(3-хидроксифенил) метил)-5-метил-1,2-дихидро-3Н-пиразол-3-он **10**: чврста супстанца беж боје (принос 72%), Т.т. 193-195 °С; ¹Н NMR (200 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 11,36 (s, 4H), 9,09 (s, 1H), 6,97 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 6,52 (d, J = 8,1 Hz, 3H), 4,72 (s, 1H), 2,06 (s, 6H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 161,1, 157,0, 144,9, 139,9, 128,6, 118,3, 114,7,

112,5, 104,4, 32,8, 10,6; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 248,5, 223, 202,5; IR (KBr): ν_{max} = 3456, 3325, 2927, 1603, 1517, 1479, 1458, 1362, 1261, 1212, 1142, 1072, 1031, 784, 752 cm⁻¹.



4-((3-Хидрокси-5-метил-1Н-пиразол-4-ил)(4-хидроксифенил) метил)-5-метил-1,2-дихидро-ЗН-пиразол-З-он – 11; бела чврста супстанца (принос 72%), Т.т. >250 °С; ¹Н NMR (200 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 11,33 (s, 4H), 9,07 (s, 1H), 6,97 – 6,83 (m, 2H), 6,66 – 6,52 (m, 2H), 4,70 (s, 1H), 2,05 (s, 6H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm): 161,1, 155,1, 139,7, 133,5, 128,3, 114,5, 104,8, 32,1, 10,5; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 248,5, 228, 202; IR (KBr): ν_{max} = 3268, 3085, 2958,

1562, 1514, 1467, 1400, 1376, 1283, 1238, 1172, 873, 844, 757, 731 cm⁻¹.



4-((3-Хлорофенил)(3-хидрокси-5-метил-1H-пиразол-4-ил)метил)-5-метил-1,2-дихидро-3H-пиразол-3-он – **12**; чврста супстанца светло розе боје (принос 72%), Т.т. 240–243 °С; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 11,39 (s, 4H), 7,30 – 7,04 (m, 4H), 4,87 – 4,81 (m, 1H), 2,09 (s, 6H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 160,9, 146,1, 139,9, 132,5, 129,5, 127,2, 126,3, 125,4, 103,7, 32,8, 10,4; UV-Vis

(MeOH) λ_{max} (nm) = 247, 202; IR (KBr): ν_{max} = 3418, 3096, 2967, 1599, 1525, 1476, 1439, 1389, 1359, 1284, 1179, 1095, 806, 774 cm⁻¹.



4-((4-Хлорфенил)(3-хидрокси-5-метил-1H-пиразол-4-ил)метил)-5метил-1,2-дихидро-3H-пиразол-3-он – **13**; чврста супстанца светло розе боје (принос 76%), Т.т. 235–238 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSOd6) δ (ppm): 11,37 (s, 4H), 7,31 – 7,23 (m, 2H), 7,17 – 7,07 (m, 2H), 4,81 (s, 1H), 2,08 (s, 6H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 161,0, 142,4, 139,9, 130,1, 129,4, 127,6, 104,0, 32,5, 10,5; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 277, 266, 247, 221,5, 202; IR (KBr): ν_{max} = 3427, 2969, 1600, 1533,

1489, 1443, 1398, 1358, 1284, 1179, 1088, 1016, 871, 834, 795, 768 cm⁻¹.



4-((4-Флуорофенил)(3-хидрокси-5-метил-1H-пиразол-4-ил)метил) -5-метил-1,2-дихидро-3H-пиразол-3-он – **14**; бела чврста супстанца (принос 70%), Т.т. 247–250 °С; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 11,34 (s, 4H), 7,19 – 6,95 (m, 4H), 4,81 (s, 1H), 2,07 (s, 6H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 162,8, 160,9, 158,0, 139,7, 139,4, 129,3, 129,1, 114,5, 114,0, 104,2, 32,3, 10,5; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 249, 203,5; IR (KBr): ν_{max} = 3427, 2969, 1598, 1506, 1440, 1394, 1359, 1284, 877, 840, 757 cm⁻¹.

1211, 1180, 1156, 877, 840, 757 cm⁻¹.



4-((3-Хидрокси-5-метил-1H-пиразол-4-ил)(2-нитрофенил)метил)-5-метил-1,2-дихидро-3H-пиразол-3-он – **15**; чврста супстанца беж боје (принос 72%), Т.т. 238–240 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 10,99 (s, 4H), 7,69 (dd, *J* = 7,8, 1,4 Hz, 1H), 7,62 – 7,50 (m, 1H), 7,48–7,34 (m, 2H), 5,45 (s, 1H), 1,92 (s, 6H);¹³C NMR (50 MHz, DMSO*d6*) δ (ppm): 160,6, 149,6, 138,8, 136,4, 131,7, 130,5, 127,2, 123,9,

102,1, 29,2, 10,3; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 346, 245, 226, 200,5, IR (KBr): ν_{max} = 3081, 2921, 1599, 1526, 1450, 1388, 1358, 1164, 720 cm⁻¹.



4-((3-Хидрокси-5-метил-1H-пиразол-4-ил)(3-нитрофенил)метил)-5-метил-1,2-дихидро-3H-пиразол-3-он – **16**; чврста супстанца беж боје (принос 78%), Т.т. >250 °С; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 11,35 (s, 4H), 8,07 – 7,92 (m, 2H), 7,63 – 7,48 (m, 2H), 4,99 (s, 1H), 2,10 (s, 6H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 160,8, 147,6, 145,9, 139,9, 134,6, 129,2, 122,0, 120,7, 103,4, 32,8, 10,4; UV-Vis

(MeOH) λ_{max} (nm) = 250,5, 220, 202; IR (KBr): ν_{max} = 3200, 3095, 2967, 1599, 1528, 1442, 1390, 1344, 1287, 1180, 797, 766 cm⁻¹.



4-((3-Xudpoκcu-5-метил-1H-пиразол-4-ил)(4-нитрофенил)метил)-5-метил-1,2-дихидро-3H-пиразол-3-он – **17**; наранџаста чврста супстанца (принос 85%), Т.т. = >250 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 11,33 (s, 4H), 8,17 – 8,07 (m, 2H), 7,42 – 7,31 (m, 2H), 4,97 (s, 1H), 2,09 (s, 6H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 160,8, 151,8, 145,6, 139,8, 128,8, 122,9, 103,3, 33,2, 10,4; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 280, 250,5, 212, 202; IR (KBr): ν_{max} = 3406, 3069, 2968, 1605, 1506, 1286 1176 1108 878 842 775 728 cm⁻¹

1442, 1392, 1346, 1286, 1176, 1108, 878, 842, 775, 728 cm⁻¹.



4-((3-Хидрокси-5-метил-1H-пиразол-4-ил)(о-толил)метил)-5метил-1,2-дихидро-3H-пиразол-3-он – **18**; бела чврста супстанца (принос 91%), Т.т. = >250 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 10,67 (s, 4H), 7,27 – 7,16 (m, 1H), 7,08 – 6,99 (m, 3H), 4,92 (s, 1H), 2,11 (s, 3H), 1,80 (s, 6H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 160,5, 141,5, 138,0, 135,4, 129,9, 128,4, 125,6, 125,1, 102,8, 31,2, 19,3, 10,6; UV-Vis

(MeOH) λ_{max} (nm) = 249, 230, 201; IR (KBr): ν_{max} = 3391, 2920, 1631, 1603, 1524, 1479, 1450, 1392, 1324, 1200, 1047, 985, 753 cm⁻¹.



4-((3-Хидрокси-5-метил-1H-пиразол-4-ил)(т-толил)метил)-5метил-1,2-дихидро-3H-пиразол-3-он – **19**; бела чврста супстанца (принос 70%), Т.т. = 247–250 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 11,34 (s, 4H), 7,14 – 7,03 (m, 1H), 6,92 (d, J = 6,1 Hz, 3H), 4,77 (s, 1H), 2,21 (s, 3H), 2,07 (s, 6H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 161,2, 143,4, 139,9, 136,6, 128,1, 127,7, 126,2, 124,7, 104,4, 32,9, 21,4,

10,6; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 249,5, 201; IR (KBr): ν_{max} = 3333, 2920, 1602, 1512, 1457, 1387, 1287, 1211, 1138, 1026, 784 cm⁻¹.



4-((2,3-Дихидроксифенил)(3-хидрокси-5-метил-1H-пиразол-4ил)метил)-5-метил-1,2-дихидро-3H-пиразол-3-он – **20**; чврста супстанца браон боје (принос 45%), Т.т. = 180–182 °С; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d6) δ (ррт): 11,27 (s, 4H), 9,14 (s, 2H), 6,98 (dd, J = 7,6, 1,7 Hz, 1H), 6,60–6,38 (m, 2H), 5,07 (s, 1H), 2,06 (s, 6H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d6) δ (ррт): 161,5, 144,4, 142,0, 140,4, 131,3, 120,1, 117,9,

112,7, 104,4, 27,1, 10,7; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 249, 226, 202; IR (KBr): ν_{max} = 3192, 2928, 1603, 1525, 1476, 1436, 1394, 1372, 1317, 1285, 1225, 1206, 1079, 980, 767, 731 cm⁻¹; C₁₅H₁₆N₄O₄×2H₂O (FW= 352,32), израчунато: C, 51,13%; H, 5,72%; N, 15,90%; нађено: C, 50,89%; H, 5,72%; N, 15,80%.



4-((3,4-Дихидроксифенил)(3-Хидрокси-5-метил-1H-пиразол-4ил)метил)-5-метил-1,2-дихидро-3H-пиразол-3-он –**21**; жута чврста супстанца (принос 71%), Т.т. = 197–200 °С; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 11,25 (s, 4H), 8,56 (d, J = 22,1 Hz, 2H), 6,58 – 6,49 (m, 2H), 6,38 – 6,28 (m, 1H), 4,65 (s, 1H), 2,05 (s, 6H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 161,2, 144,5, 143,0, 139,8, 134,2, 118,2, 115,2, 114,9, 104,8, 32,1, 10,5; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 285, 246, 224, 201;

IR (KBr): $v_{max} = 3501, 3244, 3028, 2952, 1602, 1530, 1474, 1371, 1280, 1250, 1199, 1149, 1113, 787, 749 cm⁻¹.$



4-((2-Хидрокси-3-метоксифенил)(3-Хидрокси-5-метил-1Hпиразол-4-ил)метил)-5-метил-1,2-дихидро-3H-пиразол-3-он – **22**; жута чврста супстанца (принос 61%), Т.т. = 186–188 °С; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 11,22 (s, 4H), 8,47 (s, 1H), 7,12 (dd, J = 7,7, 1,5 Hz, 1H), 6,77 – 6,54 (m, 2H), 5,08 (s, 1H), 3,73 (s, 3H), 2,05 (s, 6H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d6*) δ (ppm): 161,5, 146,9, 142,8, 140,2,

131,1, 121,6, 117,8, 109,2, 104,3, 55,9, 27,1, 10,7; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 282, 249, 227, 202; IR (KBr): ν_{max} = 3428, 3214, 2925, 1592, 1523, 1478, 1443, 1361, 1272, 1232, 1193, 1166, 1074, 926, 793, 730 cm⁻¹;C₁₆H₁₈N₄O₄×2H₂O (FW=366,34), израчунато: C, 52,45%; H, 6,05%; N, 15,29%; нађено: C, 52,84%; H, 5,96%; N, 15,54%.



4-((4-Хидрокси-3-метоксифенил)(3-хидрокси-5-метил-1H-пиразол-4-ил)метил)-5-метил-1,2- дихидро-3H-пиразол-3-он – **23**; бела чврста супстанца (принос 85%), Т.т. = >250 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 11,26 (s, 4H), 8,64 (s, 1H), 6,73 (d, J = 1,9 Hz, 1H), 6,63 – 6,48 (m, 2H), 4,71 (s, 1H), 3,63 (s, 3H), 2,05 (s, 6H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 161,0, 147,0, 144,5, 139,6, 134,5, 120,0, 114,9, 112,6, 104,7, 55,8, 32,6, 10,6; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 281,

252, 232, 202; IR (KBr): $v_{max} = 3373$, 3187, 3066, 2957, 1610, 1587, 1533, 1485, 1470, 1405, 1344, 1296, 1260, 1225, 1154, 1129, 1038, 788 cm⁻¹.



4-((4-Хидрокси-3,5-диметоксифенил)(3-хидрокси-5-метил-1Hпиразол-4-ил)метил)-5-метил-1,2-дихидро-3H-пиразол-3-он – **24**; наранџаста чврста супстанца (принос 31%), Т.т. = 178–180 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 11,25 (s, 4H), 8,08 (s, 1H), 6,45 (d, J = 0,7 Hz, 2H), 4,72 (s, 1H), 3,62 (s, 6H), 2,05 (s, 6H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 160,9, 147,6, 139,7, 133,9, 133,8, 106,0, 104,6, 56,4, 56,2, 48,9, 33,0, 10,6; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 248, 230, 201,5; IR

(KBr): v_{max} = 3216, 2956, 1612, 1516, 1457, 1424, 1363, 1320, 1213, 1117, 759, 618 сm⁻¹; C₁₇H₂₀N₄O₅×2H₂O (FW = 396,37), израчунато: C, 51,51%; H, 6,10%; N, 14,13%; нађено: C, 52,00%; H, 5,71%; N, 14,39%.



4-((3-Хидрокси-4,5-диметоксифенил)(3-хидрокси-5-метил-1*H*пиразол-4-ил)метил)-5-метил-1,2-дихидро-3*H*-пиразол-3-он – **25**; чврста супстанца беж боје (принос 31%), Т.т. = 173–175 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 11,30 (s, 4H), 8,89 (s, 1H), 6,26 (q, J = 2,1 Hz, 2H), 4,67 (s, 1H), 3,61 (d, J = 2,5 Hz, 6H), 2,06 (s, 6H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 161,1, 152,4, 149,8, 139,8, 139,0, 134,5, 108,9, 104,3, 103,4, 59,9, 55,7, 32,9, 10,5; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) =

252, 231, 203; IR (KBr): v_{max} = 3400, 3236, 2936, 1591, 1541, 1522, 1468, 1419, 1338, 1231, 1105, 999, 753 сm⁻¹; С₁₇H₂₀N₄O₅×H₂O (FW = 378,37), израчунато: С, 53,96%; Н, 5,86%; N, 14,81%; нађено: С, 53,43%; Н, 5,95%; N, 14,6%.



4-((3-Хидрокси-5-метил-1H-пиразол-4-ил)(3,4,5-триметокси фенил)метил)-5-метил-1,2-дихидро-3H-пиразол-3-он – **26**; жута чврста супстанца (принос 87%), Т.т. = 223–225 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 11,35 (s, 4H), 6,52 (s, 2H), 4,74 (s, 1H), 3,64 (s, 6H), 3,60 (s, 3H), 2,07 (s, 6H); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 161,0, 152,4, 139,8, 139,5, 105,6, 104,3, 60,1, 56,0, 33,5, 10,6; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 253,5, 230, 203; IR (KBr): ν_{max} = 3161, 2999, 2935, 1609, 1590, 1507, 1488, 1456, 1424, 1369, 1332, 1239, 1124, 1068, 1011, 966, 787, 758 cm⁻¹.



4-((3,5-Дихлоро-2-хидроксифенил)(3-хидрокси-5-метил-1Hпиразол-4-ил)метил)-5-метил-1,2-дихидро-3H-пиразол-3-он – **27**; чврста супстанца беж боје (принос 94%), Т.т. = 178–180 °С; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 11,01 (s, 5H), 7,37 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 7,25 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 5,02 (s, 1H), 2,04 (s, 6H); ¹³C NMR (50 MHz, , DMSO-d6) δ (ppm): 160,8, 150,1, 139,9, 135,8, 128,1, 126,0, 122,0, 10.8: UV Vis (MoOH) λ (pm) = 253, 232, 202: IP (KBr): Nucleic 3268

121,8, 102,9, 29,4, 10,8; UV-Vis (MeOH) λ_{max} (nm) = 253, 232, 202; IR (KBr): ν_{max} = 3368, 1601, 1577, 1541, 1517, 1464, 1410, 1387, 1355, 1312, 1257, 1228, 1161, 1143, 1095, 769, 734 cm⁻¹; C₁₅H₁₄Cl₂N₄O₃×4H₂O (FW=441,20), израчунато: C, 40,83%; H, 5,03%; N, 12,70%; нађено: C, 40,75%; H, 5,27%; N, 12,59%.

2.1.3.2. Кристалографски подаци



Емпиријска формула	C ₁₆ H ₁₈ N ₄ O ₄
Молекулска маса	330,3
Боја, облик кристала	наранџаста, призма
Величина кристала (mm)	0,52 x 0,35 x 0,18
Температура (К)	293(2)
Таласна дужина (Å)	0,71073
Кристални систем	орторомбични
Просторна група	$P_n 2_1 a$
a (Å)	14,9633(3)
b (Å)	12,6206(2)
<i>c</i> (Å)	8,60670(10)
V (Å ³)	1625,34(5)
Z	4
Израчуната густина D _{calc} (Mg/m ³)	1,350
θ (°) опсег	од 2,72 до 26,4
Број измерених рефлексија	25332
Број независних рефлексија, R _{int}	3334, 0,0263
Комплетност (%)	100
Метода побољшања	матрица најмањих квадрата на F ²
Подаци/параметри	3048/241
Степен поклапања вредности за F ²	1,040
Коначни R1/wR2 индекси [I >2σ(I)]	0,0354/0,0824
Коначни R1/wR2 индекси (сви подаци)	0,0314/0,0850
Δρmax/Δρmin (e Å ⁻³)	0,110 /-0,136

2.1.4. Експериментална испитивања

2.1.4.1. Антиоксидативна активност

Антиоксидативна способност хидразонских и пиразолонских деривата испитана је спектрофотометријски применом 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил методе (енгл. *DPPH*) и то одређивањем IC₅₀ вредности, тј. минималне

концентрације потребне за инактивацију 50% DPPH радикала.^[346,347,349] Узорак запремине 2000 µL припремљен је мешањем 20 µL раствора испитиваног једињења у диметил сулфоксиду, 980 µL метанола и 1000 µL 0,05 mM метанолског раствора DPPH радикала. Прелиминарни увид у активност синтетисаних деривата остварен је применом концентрација једињења од 100 µМ, 50 µМ и 25 µМ, при чему је IC₅₀ вредност одређена за једињења код којих је степен инхибиције већи од 50% при 100 µМ концентрацији. Одређивању IC₅₀ вредности претходило је дефинисање концентрационог опсега и припрема радних раствора једињења одговарајућих концентрација. Након припреме и инкубације узорака без присуства светлости, мерена је њихова апсорбанца на 517 nm, и то након 20 и 60 минута од почетка реакције. Иако је на основу UV-Vis спектралне карактеризације закључено да испитивана једињења не апсорбују на наведеној таласној дужини, ради елиминисања евентуалних интерференција измерена је и апсорбанца слепих проба припремљених без DPPH радикала (20 µL једињења и 1980 µL метанола). Као контролни раствор коришћен је метанол, док су NDGA и кверцетин примењени као референтна једињења. Сви узорци су припремљени у трипликату, при чему је IC₅₀ вредност израчуната као средња вредност три независна мерења. У ове сврхе, за сваку концентрацију испитиваног једињења израчунат је проценат инхибиције DPPH радикала према једначини:

проценат инхибиције (%) =
$$\left[\frac{(A'-A)}{A'}\right] \times 100$$
 (1)

где је *A*' апсорбанца чистог DPPH радикала, док је *A* апсорбанца смеше DPPH радикала са испитиваним једињењем. У случају једињења која показују антиоксидативну активност израчунат је и стехиометријски фактор (енгл. *stoichiometric factor–SF*) према формули:

$$SF = \frac{[DPPH]}{(2 \times IC_{50})}$$
(2)

где [DPPH] представља полазну концентрацију DPPH радикала у узорку.

2.1.4.2. Одређивање цитотоксичне активности и редокс параметара

Цитотоксичне особине хидразонских деривата испитане су на здравим хуманим ћелијама фибробласта (MRC-5) и ћелијама хуманог колоректалног канцера (НСТ-116) које су набављене од Европске колекције ћелијских култура (енгл. ECACC).^[346,347] Ћелије су култивисане у посудама од 25 cm³ и 75 cm³ употребом Дулбековог модификованог "*eagle*" медијума (DMEM) са додатком 10% феталног говеђег серума (FBS) и 1% пеницилин-стрептомицин раствора, до достизања конфлуетности од око 80%. Испитивање цитотоксичних ефеката хидразонских деривата извршено је применом МТТ методе, која се заснива на спектрофотометријском мерењу редукције тетразолијум бромида до љубичастог формазана. У ове сврхе, приближно 10⁴ ћелија/месту је засејано на микротитар плочи са 96 места и инкубирано у 5% атмосфери СО₂ на 37 °С у трајању од 24 часа. инкубационог ћелије По истеку периода, cy третиране различитим концентрацијама испитиваних једињења (0,1–500 µМ) након чега су узорци даље инкубирани у трајању од 24, односно 72 часа. Апсорбанца узорака мерена је на микротитар UV-Vis спектрофотометру на 550 nm, где је проценат преживелих ћелија израчунат дељењем апсорбанце третираних са апсорбанцом контролних (нетретираних) ћелија и множењем добијене вредности са 100.

Цитотоксична активност новосинтетисаних једињења испитана је на идентичан начин, с тим да је пре спровођења детаљних процедура изведен тзв. прескрининг.^[346] Селекција перспективних кандидата изведена је на основу степена преживљавање НСТ-116 ћелија при концентрацији испитиваних једињења од 50 μ M. Сва једињења која су у иницијалној фази истраживања изазвала пад вијабилности ћелија испод 60% одабрана су за детаљна *in vitro* испитивања цитотоксичности и редокс статуса. У ове сврхе, извршено је спектрофотометријско одређивање нивоа супероксид радикал анјона, нитрита и редукованог глутатиона применом стандардизованих нитро плаво тетразолијум (енгл. *nitroblue tetrazolium-NBT*), Грисове (енгл. *Griess*) и Елманове (енгл. *5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)–DTNB*) методе које су детаљно описане у литератури.^[346] Слично МТТ протоколу, ћелије су инкубиране у микротитар плочама са 96 места (3×10⁴ ћелија за одређивање супероксид радикал анјона и нитрита; 3×10⁵ ћелија за одређивање редукованог глутатиона) при концентрацијама испитиваних једињења од 1, 50 и 100 μ M, након чега је мерена апсорбанца узорака на 630, 492 и 405 nm.

Добијени *in vitro* резултати подвргнути су анализи варијансе (енгл. *ANOVA test*) применом SPSS (Chicago, IL) статистичког програмског пакета (*SPSS* за *Windows, v. 17, 2008*). У циљу квантификације цитотоксичног ефекта испитиваних једињења конструисане су одговарајуће доза-одговор (енгл. *dose-responce*) криве. Применом *CalcuSyn* програма израчунате су IC₅₀ вредности, тј. концентрације једињења при којима је раст ћелија инхибиран за 50%. Увид у селективност испитиваних једињења остварен је израчунавањем тзв. индекса селективности (*SI*), који практично представља количник IC₅₀ вредности за здраве ћелије и IC₅₀ вредности добијених за ћелије тумора. Код одређивања нивоа реактивних врста, добијене вредности су нормализоване у односу на број преживелих ћелија.

2.1.4.3. Антибактеријска активност

Антибактеријска својства новосинтетисаних хидразонских деривата испитана су на одабраним Грам-позитивним (Listeria monocytogenes CCM 4699, Staphylococcus aureus ССМ 2261 и Bacillus cereus ССМ 7934) и Грам-негативним (Yersinia enterocolitica CCM 7204, Vibrio parahaemolyticus CCM 5937 и Escherichia coli CCM 3954) бактеријским сојевима.^[346] Увид у активност тестираних једињења остварен је спектрофотометријским одређивањем минималне инхибиторне концентрације-МИК (енгл. minimal inhibitory concentration–MIC) применом микродилуционе методе, пратећи смернице Института за клиничке и лабораторијске стандарде (енгл. *Clinical & Laboratory Standards Institute – CLSI*). Одабрани микроорганизми култивисани су у Милер Хинтоновом медијуму (енгл. Mueller Hinton Broth-MHB), при чему су радне популације припремљене разблаживањем бактеријског инокулума помоћу МНВ до оптичке густине од 0,5 према МекФарландовом (енгл. McFarland) стандарду. Серије радних раствора једињења и референтног ванкомицина (опсег концентрација од 2 до 0,000977 mg/mL) антибиотика припремљене су иницијалним растварањем у диметил сулфоксиду и даљим разблаживањем помоћу МНВ, тако да је садржај диметил сулфоксида при највишој концентрацији мањи од 5%. Узорци су припремљени у трипликату у микротитар плочама са 96 места, и то мешањем 100 µL бактеријског инокулума са 100 µL раствора испитиваног једињења различитих концентрација. Као негативна контрола коришћен је узорак добијен мешањем раствора испитиваног једињења и МНВ. Са друге стране, узорак припремљен мешањем бактеријског инокулума и медијума коришћен је као позитивна контрола, односно као индикатор

максималног бактеријског раста. По истеку инкубационог периода од 24 часа на 37 °С, измерена је апсорбанца узорака на 570 nm на микротитар *Glomax* спектрофотометру (*Promega Inc.*). На основу добијених резултата израчунате су МИК₅₀ вредности, које представљају минималну концентрацију испитиваног једињења која врши инхибицију 50% бактеријског раста.

2.1.5. Рачунарске методе

Синтетисана једињења подвргнута су опсежним теоријским испитивањима у циљу јаснијег разумевања и потпунијег објашњавања експерименталних резултата.^[346-349] Методе теорије функционала густине примењене су ради стицања увида у структурне и електронске карактеристике испитиваних једињења, симулацију спектралних података и израчунавање релевантних термодинамичких параметара. Добијени структурни, електронски и термодинамички дескриптори коришћени су као теоријска потпора структурној карактеризацији производа, а такође и за процену њихове антиоксидативне способности и испитивање механизама антирадикалског деловања. Молекулски докинг примењен је као метода за предвиђање интеракција испитиваних једињења са одабраним протеинима вируса SARS-CoV-2.^[348]

2.1.5.1. Израчунавања помоћу метода теорије функционала густине

Структуре синтетисаних молекула су конструисане и оптимизоване помоћу Gaussian 09 програмског пакета (Прилог А).^[346-349] Равнотежне геометрије неутралних молекула и свих слободно-радикалских врста су израчунате помоћу методе теорије функционала густине (енгл. density functional theory-DFT), применом B3LYP (енгл. Becke, 3-parameter, Lee-Yang-Parr) функционала и 6-311+g(d,p) базисног скупа. Израчунавања у гасној фази коришћена су за симулацију IR спектара, при чему су локални минимуми једињења потврђени на основу имагинарних (негативних) фреквенција. изостанка Добијене вредности апсорпционих трака скалиране су фактором чија је вредност израчуната методом најмањих квадрата. Поред гасне фазе, оптимизација геометрија је извршена и у различитим медијумима (вода, метанол, бензен, диметил сулфоксид), за шта су примењивани *CPCM* (енгл. conductor-like polarizable continuum model) и SMD (енгл. solvation model based on density) солватациони модели. Резултати добијени у диметил сулфоксиду коришћени су за симулацију NMR спектара, при чему су хемијска померања водоникових и угљеникових атома израчуната у односу на TMS, применом GIAO (енгл. Gauge-Independent Atomic Orbital) методе. Оптимизацијом једињења у метанолу извршена је и TD-DFT симулација (енгл. time-dependent density functional theory) њихових UV-Vis спектара, који су представљени Лоренцовим обликом спектралне линије (енгл. Lorentzian lineshape) са полувисином на полуширини од 8 nm. Израчунавања у метанолу, води и бензену спроведена су у циљу испитивања механизама инактивације слободно-радикалских врста. У ове сврхе су конструисани и оптимизовани одговарајући јони и радикалске врсте, уз адекватно подешавање параметара наелектрисања (н) и мултиплицитета (м) (за неутралне молекуле *н*=0, *м*=1; за анјоне *н*=–1, *м*=1; за радикале *н*=0, *м*=2; за радикалкатјоне *н*=1, *м*=2).

2.1.5.2. Молекулски докинг

Израчунавања помоћу молекулског докинга изведена су коришћењем AutoDock *Vina* софтверског пакета.^[348] Релевантне кристалне структуре протеина преузете су са сајта PDB базе података (енгл. *Protein Data Bank–PDB*, <u>https://www.rcsb.org</u>), и то: шиљасти (енгл. spike-спајк) гликопротеин (PDB број: 6VSB), главна протеаза М^{рго} (PDB број: 6LU7), папаину слична протеаза PLpro (PDB број: 6WZU), ангиотензинконвертујући ензим 2-АСЕ2 (PDB број: 1R4L) и RBD-АСЕ2 комплекс рецепторвезујућег домена (енгл. RBD) шиљастог протеина и ангиотензин-конвертујућег ензима 2 (PDB број: 6LZG). Иницијалне активности обухватале су адекватну припрему протеина и испитиваних једињења за молекулски докинг. Структуре протеина су адекватно рафинисане помоћу UCSF Chimera v1.16 програма. Оптимизоване структуре испитиваних једињења су првобитно подвргнуте конформационој анализи помоћу VeraChem's Vconf 2.0 програма (VeraChem LLC, *Germantown, MA, USA*), при чему су за молекулски докинг одабране конформације у енергетском оквиру од 5 kcal/mol. Предвиђање активних места испитиваних протеина спроведено је помоћу CASTp (<u>https://sts.bioe.uic.edu/castp/</u>) и CHARMM-GUI (https://www.charmm-gui.org) сервера. Параметри мреже и поља претраге подешени су тако да обухвате целокупну структуру макромолекула, при чему је за молекулски докинг коришћен модел ригидни макромолекул-флексибилни лиганд. Поред пиразолонских деривата, истраживања помоћу молекулског докинга обухватала су и испитивање одабраних лекова који су до тог момента употребљавани за третман COVID-а, и то: лопинавир, ремдесивир, хлорокин и фавипиравир (PubChem идентификациони кодови: 92727, 121304016, 2719 и 492405, респективно).

2.1.6. Теоријска испитивања

2.1.6.1. Испитивање антиоксидативног потенцијала и механизама антирадикалског деловања

Иницијална истраживања обухватала су процену антиоксидативног потенцијала испитиваних једињења на основу израчунатих енергија HOMO и LUMO, као и енергије стабилизације (ΔE_{iso}) појединачних радикалских врста (једначина 3).^[346,347,349] Испитивање антирадикалских механизама (HAT, SET-PT и SPLET) изведено је на основу израчунатих термодинамичких параметара, и то: енталпија дисоцијације везе (BDE), јонизационих потенцијала (IP), афинитета према протону (PA), енталпија дисоцијације протона (PDE) и енталпија трансфера електрона (ETE). Ови параметри су израчунати помоћу једначина 4–8, где је *А* антиоксидант, односно испитивано једињење.

$\Delta E_{iso} = (H(A^{\bullet}) + H(Ph-OH)) - (H(A) + H(Ph-O^{\bullet}))$	(3)
$BDE = H(A^{\bullet}) + H(H^{\bullet}) - H(A)$	(4)
$IP = H(A^{\bullet+}) + H(e^{-}) - H(A)$	(5)
$PDE = H(A^{\bullet}) + H(H^{+}) - H(A^{\bullet+})$	(6)
$PA = H(A^{-}) + H(H^{+}) - H(A)$	(7)
$ETE = H(A^{\bullet}) + H(e^{-}) - H(A^{-})$	(8)

Свеобухватније истраживање антирадикалских механизама извршено је израчунавањем енталпија реакција испитиваних једињења ($\Delta_r H_{BDE}$, $\Delta_r H_{IP}$, $\Delta_r H_{PDE}$,

 $\Delta_r H_{PA}$ и $\Delta_r H_{ETE}$) са одабраним релевантним реактивним врстама кисеоника (једначине 9–14).^[346,347,349] Поред НАТ, SET-PT и SPLET механизама, код пиразолонских деривата разматрана је и могућност одвијања RAF реакционог пута (енгл. *radical adduct formation*) израчунавањем енталпије реакције грађења радикалског адукта помоћу једначине 15.^[349] Овим рачунским операцијама претходило је израчунавање Фукуи функција (енгл. *Fukui functions*), где су на основу вредности $f_{0\,nbo}$ установљене позиције са највећом вероватноћом за одигравање радикалског напада и формирање адукта.

$\Delta_{\mathrm{r}}H_{\mathrm{BDE}} = [H(A^{\bullet}) + H(\mathrm{R-OH})] - [H(A) + H(\mathrm{R-O^{\bullet}})]$	(9)
$\Delta_{\mathrm{r}}H_{\mathrm{IP}} = [H(A^{\bullet+}) + H(\mathrm{R}-\mathrm{O}^{-})] - [H(A) + H(\mathrm{R}-\mathrm{O}^{\bullet})]$	(10)
$\Delta_{\mathrm{r}}H_{\mathrm{PDE}} = [H(A^{\bullet}) + H(\mathrm{R-OH})] - [H(A^{\bullet+}) + H(\mathrm{R-O}^{-})]$	(11)
$\Delta_{\rm r} H_{\rm PA} = [H(A^{-}) + H({\rm R-OH})] - [H(A) + H({\rm R-O^{-}})]$	(12)
$\Delta_{\mathrm{r}}H_{\mathrm{ETE}} = [H(A^{\bullet}) + H(\mathrm{R-O^{-}})] - [H(A^{-}) + H(\mathrm{R-O^{\bullet}})]$	(13)
$\Delta_{\rm r} H_{\rm BDE} = \Delta_{\rm r} H_{\rm IP} + \Delta_{\rm r} H_{\rm PDE} = \Delta_{\rm r} H_{\rm PA} + \Delta_{\rm r} H_{\rm ETE}$	(14)
$\Delta_{\rm r} H_{\rm RAF} = H(\boldsymbol{A} - \mathrm{OH}^{\bullet}) - H(\boldsymbol{A}) - H(^{\bullet}\mathrm{OH})$	(15)

2.1.6.2. Испитивање интеракција са одабраним протеинима

Израчунавања помоћу молекулског докинга спроведена су у циљу испитивања способности и модалитета интеракција пиразолонских деривата са протеинима вируса SARS-CoV-2.^[348] Селекција протеина извршена је на основу њиховог учествовања у регулацији различитих процеса у животном циклусу вируса. Наиме, шиљасти протеин одговоран је за везивање вируса за ћелију домаћина, и то интеракцијом са екстрацелуларним доменима ACE2 рецептора. Са друге стране, протеазе М^{рго} и PL_{pro} својим деловањем омогућавају вирусне репликационе и транскрипционе процесе, при чему активност PL_{pro} може обезбедити и заштиту од имуног одговора домаћина. Молекулским докингом испитан је афинитет везивања пиразолонских деривата према овим антивирусним метама, и то израчунавањем енергије везивања. Такође, докингом је испитан најповољнији положај везивања једињења, као и врста и броја успостављених интеракција са аминокиселинским остацима. За анализу и интерпретацију лиганд-макромолекул интеракција коришћени су програми *UCSF Chimera v1.16* и *Discovery Studio Visualizer*.

2.1.6.3. ADMET анализа

Пиразолонска једињења и новосинтетисани хидразонски деривати подвргнути су теоријском испитивању физичко-хемијских, фармакокинетичких, токсиколошких и других карактеристика које описују потенцијал њихове примене као лекова.^[346,348] За израчунавање релевантних параметара коришћени су *SwissADME, pkCSM* и *ProTox-II* веб сервиси. Поред тога, биолошки потенцијал хидразона и пиразолона испитан је помоћу *SwissTargetPrediction* онлајн платформе. У ове сврхе, структуре испитиваних једињења конвертоване су у кодове по тзв. *SMILES* номенклатури (енгл. *simplified molecular-input line entry specification*) који су коришћени као улазни параметар ових израчунавања.

3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

3.1. Синтеза

3.1.1. Синтеза *N*-ацилхидразона

Хидразонски деривати добијени су реакцијама кондензације одабраних хидразида ароматичних карбоксилних киселина са различито супституисаним ароматичним алдехидима (Шема 27, страна 52).^[346,347] Мешањем стехиометријских количина полазних компоненти, без употребе катализатора, у етанолу као растварачу (80 °C) у трајању од 3 часа, укупно је синтетисано педесет и четири једињења у оквиру седам различитих серија (1а-ж, 2а-ж, 3а-ж, 4а-ж, 5а-ж, 6а, 6гж и 7а-ж, Шема 27, страна 52). Приноси изведених реакција остварени су у опсегу од 29-98%, што се може приписати структурној разноликости полазних једињења. 2,3-дихидроксибензохидразида Деривати добијени ИЗ И 2.3.4трихидроксибензохидразида (5а-ж, 6а и 6г-ж) представљају новосинтетисана једињења. С обзиром на то да су као прекурсори коришћени хидразиди киселина, сва добијена једињења у ужем смислу представљају *N*-ацилхидразонске деривате, при чему сви аналози осим **1a** садрже бар једну хидрокси групу. Сви производи су окарактерисани помоћу ¹Н NMR, ¹³С NMR, FT-IR и UV-Vis спектралних метода, при чему је за нова једињења извршена елементална микроанализа, као и одређивање тачке топљења.

3.1.2. Синтеза пиразолона

Развој нових метода за добијање бис-пиразол(он)ских деривата генерално је усмерен ка имплементацији економских и еколошких принципа, што је резултовало употребом различитих катализатора у синтетичким методологијама, превасходно различитих јонских течности и наночестица. У складу са савременим тенденцијама, добијање пиразолонских деривата испитано је реакцијама 5-метил-2,4-дихидро-3*H*-пиразол-3-она са ароматичним алдехидима **V** Присуству различитих реакционих медијума и катализатора.^[348] У ове сврхе, разматрана је употреба воде, етанола и њихове смеше као реакционих медијума, док су као катализатори реакција испитани диетаноламин (DEA). потенцијални триетаноламин (ТЕА), као и њихове одговарајуће ацетатне соли диетаноламонијум ацетат ([HDEA][OAc]) и триетаноламонијум ацетат ([HTEA][OAc]). Основ за разматрање примене етаноламинских деривата поседује упориште у њиховим бенефитним познатим еколошким економским својствима (лака И биодеградибилност, ниска биоакумулација, економска исплативост), као и широкој примени у индустрији и уобичајеним комерцијалним производима. Реакција са бензалдехидом као полазном компонентом послужила је као модел за оптимизацију реакционих услова (Табела 4, модел реакција 1). Ток реакција праћен је помоћу TLC-а, при чему је уочено да је период од 3 часа оптимално време за конверзију полазних компоненти. Формирање производа констатовано је при свим примењеним реакционим условима, с тим да је највећи принос остварен употребом DEA као катализатора у етанолу као растварачу (Табела 4). Ефикасност катализатора испитана је и у присуству супституената са електрон-донорским и електрон-привлачним ефектима, односно у реакцијама 5-метил-2,4-дихидро-3Нпиразол-3-она са 4-хидроксибензалдехидом и 4-хлорбензалдехидом (Табела 4, модел реакција 2). На основу добијених резултата утврђено је да су оптимални услови за синтезу пиразолонских деривата примена DEA (20mol%) као катализатора и етанола као реакционог медијума. Применом ових услова добијено

је двадесет различито функционализованих пиразолонских деривата (8–27), при чему деривати 20, 22, 24, 25 и 27 представљају новосинтетисана једињења. Производи реакција изоловани су у добром до одличном приносу, осим једињења 20, 24 и 25 чији је принос од 31–45% (Табела 5).





Табела 5. Синтеза деривата пиразолона.

R^1 R^2 R^3) + 2 R ⁴	$0 = \frac{1}{\frac{N}{H}} \frac{1}{\frac{D}{E}}$	0EA 20 mol% tOH, 3h, 80 °C	HN B N	R^3 R^2 R^1 A NH NH O
			- 0	8-2	27
Једињење	R ¹	R ²	R ³	R4	принос (%)
8	Н	Н	Н	Н	82
9	ОН	Н	Н	Н	64
10	Н	ОН	Н	Н	72
11	Н	Н	ОН	Н	72
12	Н	Cl	Н	Н	72
13	Н	Н	Cl	Н	76
14	Н	Н	F	Н	70
15	NO ₂	Н	Н	Н	72
16	Н	NO ₂	Н	Н	78
17	Н	Н	NO ₂	Н	85
18	CH3	Н	Н	Н	91
19	Н	CH ₃	Н	Н	70
20	ОН	ОН	Н	Н	45
21	Н	ОН	ОН	Н	71
22	OH	OCH ₃	Н	Н	61
23	Н	OCH ₃	ОН	Н	85
24	Н	OCH ₃	ОН	OCH ₃	31
25	Н	ОН	OCH ₃	OCH ₃	31
26	Н	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	87
27	OH	Cl	Н	C]	94

3.2. Спектрална карактеризација

Структуре синтетисаних хидразонских и пиразолонских деривата потврђене су помоћу ¹Н NMR, ¹³С NMR, FT-IR и UV-Vis спектара. Комплетна спектрална карактеризација свих производа доступна је у додатним материјалима објављених радова,^[346-348] при чему су спектри новосинтетисаних једињења дати и у Прилогу А.

3.2.1. *N*-ацилхидразони

3.2.1.1. Анализа NMR спектара

Структуре синтетисаних хидразона (**1а-ж**, **2а-ж**, **3а-ж**, **4а-ж**, **5а-ж**, **6а**, **6г-ж** и **7а-ж**) потврђене су помођу ¹Н NMR и ¹³С NMR спектара.^[346,347] Такође, применом

метода теорије функционала густине израчунате су теоријске вредности хемијских померања (δ), при чему је установљено добро слагање са експерименталним резултатима. У зависности од присутних функционалних група, у ¹H NMR спектрима хидразонских деривата идентификовани су сигнали који одговарају протонима фенил, имино, амино, метокси и хидрокси група (пример Слика 21, новосинтетисано једињење **5**ђ). Сигнали који потичу од ароматичних протона уочени су у области 8,5–6,3 ррт и то у облику дублета, мултиплета или дублета дублета. Оштри синглети који одговарају протонима имино групе (H–C=N) уочени су на око 8,5 ррт, док су протони N-H групе идентификовани у области од 12,0–11,0 ррт. Са друге стране, хемијска померања протона хидрокси група варирала су у зависности од једињења. Генерално, ови сигнали су уочени у региону од 10,0–9,0 ррт и/или 12,6–11,0 ррт у облику оштрих или широких синглета. Код деривата који поседују метокси групе, сигнали одговарајућих протона идентификовани су као синглети на око 3,8 ррт.



¹³С NMR спектри хидразона састојали су се од сигнала угљеникових атома из фенил, метокси, имино и карбонилних група. Сигнали са највишим вредностима хемијског померања одговарају угљениковим атомима карбонилних и имино група, док они на најнижим вредностима (око 60,0 ppm) потичу од угљеника метокси група. Такође, на основу експерименталних и симулираних спектара уочено је да се сигнали супституисаних ароматичних угљеника налазе на вишим вредностима хемијског померања у односу на несупституисане угљеникове атоме.

3.2.1.2. Анализа IR спектара

Присуство карактеристичних функционалних група у структурама хидразонских производа потврђено је помоћу IR спектроскопије.^[346,347] Компарацијом експерименталних и симулираних спектара утврђено је њихово

одлично слагање (пример Слика 22, новосинтетисано једињење **5ђ**), што је значајно допринело асигнацији карактеристичних сигнала у IR спектрима.



Слика 22. IR спектар једињења 5ђ.

Генерално, у области од 3600-3200 ст⁻¹ идентификоване су траке које потичу од валенционих вибрација О-Н и N-Н веза. Такође, од 3100-3000 ст⁻¹ идентификоване су траке које одговарају ароматичним С-Н вибрацијама, док су траке у области од 3000-2800 ст⁻¹ приписане вибрацијама алифатичних С-Н веза. На вредностима таласног броја од 1650-1600 ст⁻¹ запажени су сигнали који су идентификовани као последица истезања С=О и С=N веза. Траке које одговарају ароматичним скелетним С=С вибрацијама запажене су на око 1600 ст⁻¹ и 1450 ст⁻¹, док су оне које настају као последица савијања H-C=C веза уочене на око 1500 ст⁻¹. Сигнали који потичу од деформационог савијања H-N-N и H-C=N веза детектовани су у областима од 1570-1540 ст⁻¹ и 1390-1370 ст⁻¹. Поред тога, у спектрима ових једињења уочене су и траке које одговарају вибрацијама Аг-C-C=O, С-O и N-N веза и то у области од 1335-1100 ст⁻¹. У појединим случајевима запажен је изостанак одређених трака, превасходно услед преклапања или спајања истих са другим блиским сигналима.

3.2.1.3. Анализа UV-Vis спектара

UV-Vis спектри хидразона снимљени су у метанолу као растварачу.^[346,347] Услед структурне сличности, UV-Vis спектри хидразонских једињења одликовали су се значајном међусобном подударношћу. Са друге стране, присуство, позиција и облик одређених апсорпционих трака разликовали су се од једињења до једињења, што је последица различите супституције у ароматичним деловима молекула. Теоријска израчунавања су у великој мери допринела анализи експерименталних резултата, пре свега идентификацијом електронских прелаза одговорних за појаву одређеног апсорпционог максимума (λ_{max}). У ове сврхе конструисане су и Кон-Шамове орбитале (енгл. *Коhn–Sham*), на основу којих је добијен увид у просторни распоред

орбитала и одигравање електронских прелаза на молекуларном нивоу (пример Слика 23, једињење **5**ђ).



Слика 23. UV-Vis спектрална анализа једињења 5ђ.

Конкретно, у спектрима новосинтетисаних једињења (5а-ж, 6а и 6г-ж) уочено је неколико предоминантних апсорпционих трака углавном на око 330, 300, 240, 220 и 200 nm (Прилог А).^[346] Појава трака у опсегу од 350-320 nm идентификована је као последица предоминантно HOMO→LUMO електронских прелаза. Увидом у просторни распоред молекулских орбитала уочено је да су LUMO делокализоване преко целокупног молекула, док су НОМО позициониране или на појединим фрагментима или преко целог молекула. На основу ових сазнања установљено је да је појава апсорпционих максимума у овој области последица ниског енергетског и просторног прага HOMO->LUMO електронских прелаза. Такође, запажен је и допринос HOMO-1→LUMO и HOMO-3→LUMO електронских прелаза настанку ових трака у спектрима једињења **56**, **5в и 6ђ**. Трака на око 300 nm уочена је код већине новосинтетисаних једињења, и то као последица НОМО-1→LUMO, НОМО-2→LUMO и HOMO→LUMO+2 електронских прелаза. Са друге стране, апсорпциони максимуми на око 240 nm и 220 nm углавном су резултат прелаза електрона са енергетски нижих НОМО на LUMO или са НОМО на енергетски више LUMO (НОМО-4→LUMO, HOMO→LUMO+3, HOMO→LUMO+4 итд.). Трака на око 200 nm идентификована је у спектрима свих новосинтетисаних једињења, као последица бројних и различитих електронских прелаза. Допринос и врста електронског прелаза различит је од једињења до једињења, с тим да су у већини случајева запажени прелази са енергетски нижих НОМО на енергетски више LUMO. Иако овакви прелази поседују високе енергетске захтеве, они су ипак омогућени блиском просторном оријентацијом одговарајућих молекулских орбитала. Слична запажања уочена су и код других серија хидразонских деривата (1а-ж, 2а-ж, 3а-ж, 4а-ж и 7а-ж).^[347] У појединим случајевима примећено је одсуство одређених трака као и појава додатних апсорпционих максимума, чији је детаљан опис доступан у објављеним радовима.^[346,347]

3.2.2. Пиразолони

3.2.2.1. NMR спектрална карактеризација

NMR спектри пиразолонских деривата 8-27 снимљени су у DMSO-d6 као растварачу.^[348] У зависности од структуре једињења, односно, супституције прстена B, ¹H NMR спектри састојали су се од неколико група карактеристичних сигнала (пример Слика 24, новосинтетисано једињење 25). Генерално, сви деривати у својој структури поседују метил групе на А и Б прстеновима, чији су сигнали идентификовани у облику синглета на око 2,0 ppm. Код деривата који поседују метокси групе, одговарајући сигнали уочени су на око 3,6 ppm. Заједнички структурни мотив свих пиразолонских деривата јесте и метинска група, која спаја прстенове А, Б и В, односно, пиразолонски, пиразолски и фенил фрагмент. Хемијска померања синглетних сигнала који потичу од протона метинске групе идентификована су у области од 5,1–4,6 ppm. Са друге стране, у области од 8,1–6,3 ррт детектовани су сигнали ароматичних протона фенил прстена В. У зависности од супституције прстена В, ови сигнали идентификовани су као оштри синглети, дублети, дублети дублета или мултиплети. Сигнали протона фенолних –ОН група уочени су у области од 9,0-8,0 ррт као оштри или широки синглети. Такође, протони – ОН и – NH група са прстенова А и Б резонирали су у области од 11,4–11,0 ррт у облику широких синглета.



Са друге стране, ¹³С NMR спектри једињења **8–27** садржали су сигнале који потичу од угљеникових атома из метил, метокси, метинских и фенил група. На вредностима хемијских померања изнад 160,0 ppm идентификовани су сигнали карбонилних угљеникових атома. У области од 160,0–103,0 ppm детектовани су сигнали угљеника А, Б и В прстена, при чему они на вишим вредностима хемијског померања одговарају вишесупституисаним угљениковим атомима. Такође, код деривата који поседују метокси групе уочени су сигнали одговарајућих угљеникових атома у области од 60,0–55,0 ppm. Поред тога, синглети на око 32,0 ppm приписани су резонирању угљеникових атома метинске групе, док сигнали на око 10,0 ppm одговарају угљениковим атомима метил група.

3.2.2.2. IR спектрална карактеризација

Анализом експерименталних IR спектара пиразолонских деривата **8–27** иницијално је уочена њихова визуелна сличност, што је првобитни показатељ њихове структурне сличности.^[348] Такође, запажена је и добра подударност експерименталних и симулираних IR спектара (пример Слика 25, новосинтетисано једињење **25**) чијом је детаљном анализом потврђено присуство карактеристичних функционалних група у структурама пиразолонских деривата. Уопштено говорећи, у области од 3600–3200 сm⁻¹ уочене су траке које потичу од истезања О–Н и N–Н веза. Даље, траке које одговарају вибрацијама ароматичних и алифатичних С–Н веза идентификоване су око 3000 сm⁻¹, односно у области од 3000–2800 сm⁻¹. IR траке на око 1600 сm⁻¹ последица су валенционих вибрација С=О веза, док су оне на 1530 сm⁻¹ приписане истезању С=N веза. Такође, уочене су и траке на око 1500 сm⁻¹ и 1450 сm⁻¹ које су карактеристичне за ароматичне системе, а које се јављају као резултат савијања Н–С=С, односно, вибрација С=С веза. Такође, у области од 1400–1350 сm⁻¹ детектовани су сигнали који одговарају вибрацијама савијања HNN и HOC. Поред тога, у области од 1330–1000 сm⁻¹ уочене су траке које су последица торзије

НОСС и НNCС веза, као и НССС вибрација. Код деривата који поседују –NO₂, –F и –Cl супституенте идентификовани су сигнали који одговарају вибрацијама N=O, C–F, и C–Cl веза.



Слика 25. IR спектар једињења 25.

3.2.2.3. UV-Vis спектрална карактеризација

Анализа апсорпционих трака пиразолонских деривата 8-27 изведена је на основу експерименталних и симулираних UV-Vis спектара,^[348] за које је уочен висок степен међусобне подударности (пример Слика 26, новосинтетисано једињење 25). За новосинтетисана једињења 20, 22, 24, 25 и 27 конструисане су Кон-Шамове орбитале, а такође идентификовани су и електронски прелази који доприносе појави појединачних апсорпционих трака. Генерално посматрано, у UV-Vis спектрима новосинтетисаних пиразолона уочено је неколико апсорпционих максимума, предоминантно на око 280, 250, 230 и 202 nm. У спектру једињења 22 идентификована је трака на 282 nm чија појава представља резултат HOMO→LUMO електронских прелаза. Апсорпциони максимуми на око 250 nm идентификовани су у спектрима свих новодобијених једињења, предоминантно као последица HOMO→LUMO и HOMO-1→LUMO електронских прелаза. Код једињења 20, 22 и 25 установљено је да појави трака на око 230 nm највише доприносе HOMO-3→LUMO електронски прелази. Са друге стране, код једињења 24 је уочено да ова трака настаје услед НОМО-4→LUMO прелаза, док код деривата 27 као последица НОМО-1→LUMO-1 трансфера. Такође, сличности и разлике у електронским прелазима уочене су и за апсорпционе траке на око 202 nm. Наиме, код једињења 20, 22 и 24 је утврђено да појави ове траке доприносе прелази електрона из енергетски различитих НОМО, превасходно на LUMO вишег реда (као што су LUMO+4, LUMO+5, LUMO+6 и LUMO+7). Са друге стране, појава ових трака код деривата 25 и 27 последица је електронских прелаза електрона из нижих НОМО (НОМО-4, НОМО-5 и HOMO-6) на LUMO, LUMO+1 и LUMO+2.



Слика 26. UV-Vis спектрална анализа једињења 25.

3.2.2.4. Рендгенска структурна анализа

Кристалографски подаци који се односе на ову врсту пиразолонских деривата су у литератури врло оскудни. Штавише, досадашњи публиковани резултати истичу искључиво –ОН таутомерну форму оба пиразолонска прстена, што је такође и резултат једног истраживања у коме је одређена кристална структура једињења 8.[348] Истраживањима у оквиру ове докторске дисертације је по први пут добијен пиразолонски дериват 23 у кристалном облику.^[348] Кристална структура једињења 23 представљена је на Слици 27, при чему су дужине и углови одговарајућих веза приказани у Табели 6. Рендгенском структурном анализом је утврђено да је испитивано једињење конституисано од два пиразол(он)ска и једног супституисаног фенил фрагмента, који су међусобно повезани бензилним С1 угљениковим атомом. Пиразолонски фрагменти егзистирају у кето-енолном таутомерном облику, при чему су карбонилни акцептор и хидрокси донор оријентисани тако да формирају јаку интрамолекуларну О2-Н…О1 водоничну везу која стабилизује кристалну структуру (Слика 27). Фенил прстен је скоро симетрично позициониран у односу на пиразолонске фрагменте, при чему је диедарски угао између фенил и N-Н пиразолонског прстена 77,26(7)°, односно, 70,85(7)° између фенил и О-Н пиразолонског прстена. Са друге стране, диедарски угао између пиразолонских фрагмената износи 47,44(10)°. Дужине и углови веза једињења 23 су у доброј сагласности са претходно објављеним кристалним подацима за једињења која поседују сличну структурну композицију. Различита позиција протона у пиразолонским фрагментима првенствено се огледа у дужинама СЗ-О1 и С7-О2 веза (Табела 6). Такође, дужине вициналних веза у односу на протоновани N1 атом су веће него оне код депротонованог N3 атома. Углови веза код бензилног С1 атома значајно одступају од регуларне тетраедарске геометрије (Табела 6).



Слика 27. Кристална структура једињења 23.

Веза		Угао	
C3-01	1.267(3)	N1-N2-C4	107.6(2)
C7-02	1.346(3)	N3-N4-C8	112.5(2)
N1-C3	1.355(3)	C3-N1-N2	109.4(2)
N2-C4	1.358(3)	C7-N3-N4	112.5(2)
N3-C7	1.327(3)	C2-C3-N1	106.3(2)
N4-C8	1.340(3)	C6-C7-N3	111.9(2)
N1-N2	1.371(4)	C1-C2-C3	125.9(2)
N3-N4	1.354(3)	C1-C6-C7	129.4(2)
C2-C3	1.424(3)	C2-C1-C6	114.6(2)
C2-C4	1.364(3)	C10-C1-C6	112.6(2)
C6-C7	1.412(3)	C10-C1-C2	111.5(2)
C6-C8	1.375(3)	C11-C10-C1	120.8(2)

Табела 6. Дужине и углови веза једињења 23 (Å, °).

Специфична карактеристика ове кристалне структуре свакако јесте постојање јаке 02-Н…01 водоничне везе између карбонилне групе једног прстена и хидрокси групе другог прстена пиразолона. На овај начин формира се осмочлани S8 мотив који делимично фиксира оријентацију пиразолонских прстенова са готово линераном дистрибуцијом акцепторских и донорских места. Кристално паковање молекула омогућено је успостављањем снажних интермолекулских О-Н···N и N-Н…О водоничних веза (Табела 7). За просторни распоред молекула у кристалној структури одговоран је настанак R₃³(9) тримера повезаних водоничним везама, међусобним умрежавањем чијим ce даљим формира комплексна тродимензионална мрежа (Слика 28). У тримеру су заступљене три јаке водоничне везе, при чему свака појединачна интеракција утиче на формирање ланаца молекула у одређеном правцу. Сходно томе, О4-Н…N3, као најјача интеракција у систему, распоређује молекуле у цик-цак ланац дуж кристалографске осе b. Са друге стране, 04-Н···N3 интеракција успостављена између пиразолонских фрагмената утиче на формирање ланаца дуж кристалографске осе а. Финално, пиразолонски донор N1-H1 интерагује са 0…О донорским системом супституената фенил групе, што омогућава повезивање молекула у [011] правцу.

Табела 7. Геометрија водоничних веза.

D-HA	D-H (Å)	HA (Å)	DA (Å)	D-HA (°)	Симетријски кодови:
02-H101	0.94(5)	1.64(5)	2.579(3)	174(4)	X,Y,Z
N4-H1n401	0.93(3)	1.93(4)	2.842(3)	168(3)	x−1/2, y, −z+1/2
N1-H1n103	0.85(4)	2.58(3)	3.164(3)	127(3)	-x+1/2, y-1/2, z-1/2
N1-H1n104	0.85(4)	1.95(4)	2.777(3)	164(3)	-x+1/2, y-1/2, z-1/2
04-H1o4N3	0.82(4)	1.83(4)	2.648(3)	169(4)	−x, y+1/2, −z+1
C9-H9aCg1	0.96	3.05	3.769(3)	132	x+1/2, y, −z+1/2
C16-H16aCg2	0.96	3.20	3.919(3)	133	−x, y+1/2, −z
0.4.04045		108			

Cg1 = C10/C15; Cg2 = N3/C7



Слика 28. Приказ молекуларног паковања једињења **23** са најјачим водоничним везама.

3.3. Антиоксидативна активност

Испитивање способности хидразонских и пиразолонских деривата да инактивирају радикалске врсте извршено је применом 2,2-дифенил-1пикрилхидразил (енгл. DPPH) есеја.^[346,347,349] Иако је DPPH радикал синтетичког порекла, ова *in vitro* метода сматра се валидном и за предвиђање способности неутрализације реактивних врста у живим системима. Такође, DPPH метода се често примењује за одређивање антиоксидативног капацитета биљних уља и екстраката, као и различитих (поли)фенолних једињења. Генерално, DPPH метода погодна је и са економског аспекта, јер поред валидности резултата и прецизности одређивања нуди и могућност скрининга великог броја једињења различитих хемијских класа.

Иницијална истраживања обухватала су процену активности испитиваних једињења при концентрацијама од 100 μ M, 50 μ M и 25 μ M, чиме је остварен прелиминарни увид у њихове антирадикалске способности. За једињења која су испољила активност (проценат инхибиције DPPH већи од 50% при 100 μ M концентрацији) прецизно је одређена IC₅₀ вредност, која представља минималну концентрацију једињења неопходну за инактивацију 50% DPPH радикала. Добијени резултати упоређени су са активностима нордихидрогвајаретинске киселине (NDGA) и кверцетина (Q), стандардних референтних антиоксиданата чије су IC₅₀ вредности одређене применом исте методологије као и код испитивања представљени су у Прилогу Б, док су за друге деривате доступна у објављеним радовима и њиховим одговарајућим допунским материјалима.^[347,349] Поред

експерименталних истраживања спроведена су и опсежна теоријска (*in silico*) израчунавања ради процене антиоксидативног потенцијала синтетисаних једињења, као и стицања увида у преферабилни механизам антирадикалског деловања. Комплетни теоријски резултати доступни су у објављеним радовима и њиховим одговарајућим допунским материјалима,^[346,347,349] при чему је одабрани део истих приказан у Резултатима и Прилогу Б ове докторске дисертације.

3.3.1. *N*-ацилхидразони

3.3.1.1. Инхибиција DPPH радикала

Резултати испитивања интеракција хидразонских деривата са DPPH радикалом приказани су у Табели 8.^[346,347] Генерално, од укупно педесет и четири синтетисана једињења, њих тридесет и четири је испољило инхибиторну активност према DPPH радикалу, са IC₅₀ вредностима у опсегу од 0,7–31,4 μМ. Изразита активност уочена је код једињења серија **5**–**7**, где су сви деривати показали одличну способност неутрализације DPPH радикала. У поређењу са стандардним референтним антиоксидантима, дванаест хидразонских једињења испољило је унапређену или сличну активност, нарочито деривати серије **7**. Конкретно, међу тестираним хидразонима, најбољу способност инактивације DPPH испољио је дериват **7ж**, чија је IC₅₀ вредност 0,7±0,1 μМ.

	1a	16	1в	1г	1д	1ħ	1e	1ж
IC ₅₀	>100	>100	>100	>100	31,4±0,9	17,2±1,1	>100	2,9±0,1
SF	/	/	/	/	0,4	0,7	/	4,3
	2a	2б	2в	2г	2д	2ħ	2e	2ж
IC ₅₀	>100	>100	>100	>100	20,1±0,9	6,5±0,4	>100	1,6±0,0
SF	/	/	/	/	0,6	1,9	/	7,8
	3a	3б	Зв	3г	3д	3ħ	3e	3ж
IC50	>100	>100	>100	>100	28,4±0,2	16,6±0,2	>100	2,5±0,1
SF	/	/	/	/	0,4	0,8	/	5
	4 a	4б	4в	4Γ	4д	4ħ	4e	4ж
IC50	>100	>100	>100	>100	22,1±1,1	6,3±0,3	>100	3,4±0,1
SF	/	/	/	/	0,6	2	/	3,7
	5a	5б	5в	5г	5д	5ħ	5e	5ж
IC50	2,3±0,1	3,1±0,1	3,3±0,1	3,5±0,2	2,4±0,1	2,0±0,1	2,6±0,1	1,7±0,1
SF	5,4	4,0	3,8	3,6	5,2	6,3	4,8	7,4
	6a	/	/	6г	6д	6ђ	6e	6ж
IC50	4,3±0,1	/	/	5,9±0,2	4,1±0,1	1,9±0,1	5,3±0,1	2,0±0,1
SF	2,9	/	/	2,1	3,0	6,6	2,4	6,3
	7a	7б	7в	7г	7д	7ħ	7e	7ж
IC50	1,3±0,1	1,2±0,1	2,9±0,1	$1,0\pm0,1$	1,9±0,1	$1,1\pm0,1$	0,9±0,1	0,7±0,1
SF	9,6	10,4	4,3	12,5	6,6	11,4	13,9	17,9
	NDGA	Q						
IC50	1,7±0,1	1,9±0,1						
SF	7,4	6,6						

Табела 8. Експерименталне IC₅₀ вредности (µМ) и стехиометријски фактори (SF) хидразонских деривата за неутрализацију DPPH радикала.

Антиоксидативни потенцијал хидразонских деривата изражен је и преко вредности стехиометријског фактора (SF). Наиме, испитивано једињење сматра се добрим антиоксидантом уколико је његова SF вредност ≥2. На основу добијених резултата (SF вредности израчунате у опсегу од 0,4–17,9, Табела 8) може се закључити да сви деривати серија **5–7**, као и **ж** аналози серија **1–4**, поседују добар до одличан антиоксидативни капацитет.

На основу добијених експерименталних резултата и присуства различитих функционалних група на А и Б фрагментима (Шема 27, страна 52), запажени су одређени обрасци у активности хидразонских деривата. Генерално, сви синтетисани хидразони, осим несупституисаног деривата **1**а, поседују бар једну – ОН групу на А или Б фрагменту. Важно је истаћи да једињења серија 5-7 представљају деривате полифенолних карбоксилних киселина, односно, 2,3дихидроксибензоеве (пирокатехуинске), 2,3,4-трихидроксибензоеве (пирогалолкарбоксилне) и 3,4,5-трихидроксибензоеве (галне) киселине, респективно. Позната је чињеница да антиоксидативна активност фенолних једињења зависи, како од броја и положаја -ОН група, тако и од врсте и природе њима суседних супституената. Наиме, присуство додатних електрон-донорских група у суседству -ОН групе (као што су -ОН, -OR и -NH₂) доприноси бољој стабилизацији фенокси радикала који настаје након антиоксидативног деловања. Штавише, код деривата који поседују катехолски или пирогалолски фрагмент, фенокси радикал може бити додатно стабилизован успостављањем водоничних веза. Овим ефектима се објашњава изразита активност једињења 5-7 у односу на деривате серија 1-4, као и боља активност ж аналога у односу на једињења е серије. Поред тога, електрондонорским ефектима суседних група се може образложити и унапређена активност д, ђ и ж аналога, што се нарочито уочава у серијама 1-4. Са друге стране, неактивност а-г и е аналога серије 1-4 може се приписати изостанку поменутих ефеката, односно, немогућности стабилизације одговарајућег фенокси радикала.

3.3.1.2. In silico анализа антиоксидативне способности

Антиоксидативни потенцијал синтетисаних деривата процењен је на основу израчунатих енергија НОМО и LUMO (*Е*_{НОМО} и *Е*_{LUMO}), као и енергије стабилизације (ΔE_{iso}) одговарајућих радикала насталих након антиоксидативног деловања.^[346,347] Уопштено, помоћу ових параметара може се остварити увид у хемијску реактивност испитиваних једињења према инактивацији радикалских врста. Вредност Еномо описује електрон-донорске способности испитиваног једињења, што је важна карактеристика за неутрализацију слободних радикала. Такође, реактивност једињења се може описати разликом између *Е*_{НОМО} и *Е*_{LUMO} (енгл. *НОМО-LUMO gap*), која заправо указује на енергетске потребе за реакцију са слободним радикалима. Поред тога, реактивност једињења условљена је и стабилношћу радикала који се формира након реакције, на шта указују вредности ΔE_{iso} параметра. Такође, на основу вредности ΔE_{iso} може се проценити и учешће одређене функционалне групе у инактивацији радикалских врста, што је у случају хидразонских деривата појединачно извршено за све -NH и -OH групе. Добијене in silico резултате је најадекватније међусобно упоредити на примерима једињења која су испољила различиту активност у *in vitro* тестовима, нпр. на дериватима серије **1** (Слика 29).



Слика 29. Израчунате вредности *Еномо, Ецимо и Еномо-Ецимо* разлике за једињења 1а-ж у метанолу као растварачу.

У оквиру ове серије, способност инхибиције DPPH радикала испољила су једињења **1д**, **1ђ** и **1ж**, при чему су највеће вредности *Е*номо параметара израчунате управо за ове деривате, -0,221, -0,216 и -0,223 eV, респективно. Веће вредности *Е*номо указују на боље електрон-донорске особине, што је у случају једињења **1ђ** резултат присуства две метокси групе на прстену Б. Такође, на повећану реактивност деривата **1д**, **1ђ** и **1ж** указују и ниже вредности енергетске разлике између НОМО и LUMO (Слика 29). Иако би се на основу ових резултата могло претпоставити да једињења **1е** и **1г** такође поседују добре предуслове за антиоксидативно деловање, израчунате вредности ΔE_{iso} указују на разлоге другачијег исхода (Слика 30).



Слика 30. Израчунате вредности енергије стабилизације ∆*E*_{iso} за једињења **1а**-ж у метанолу као растварачу.

Наиме, ниже вредности ΔE_{iso} упућују на бољу стабилизацију одговарајућег радикала. Компарацијом ΔE_{iso} параметара утврђено је да су најниже вредности израчунате за деривате **1д**, **1ђ** и **1ж** (Слика 30), што додатно објашњава њихову изражену *in vitro* активност у односу на друге аналоге серије **1**. Такође, израчунате вредности ΔE_{iso} посебно истичу учешће R⁷-OH група у инактивацији радикалских врста. Услед адекватне стабилизације, нарочито је фаворизован настанак R⁷-O• радикала, што се посебно уочава код једињења **1ж**.

Слична запажања уочена су и код једињења **2**–**4**. У оквиру ових серија, деривати типа **д**, **ђ** и **ж** испољили су активност у *in vitro* испитивањима. На основу вредности E_{HOMO} , E_{LUMO} , E_{HOMO} - E_{LUMO} разлике и ΔE_{iso} , утврђено је да ова једињења поседују потенцијал за антиоксидативно деловање, посебно захваљујући R⁷-OH функционалним групама.

Сви деривати серија 5–7 показали су одличну способност инхибиције DPPH радикала. Компаративном анализом теоријских резултата запажене су мале али приметне разлике у вредностима израчунатих електронских параметара. Добијени резултати за деривате серија 5–7 приказани су на Сликама 31–34. На основу вредности E_{HOMO} , E_{LUMO} и E_{HOMO} - E_{LUMO} разлике, утврђен је изражен антиоксидативни профил **д**, **ђ** и **ж** деривата серије 5–7, уз фаворизовано учешће R⁷-OH група у инактивацији радикалских врста. Такође, код деривата серије **5** и **6**, вредности израчунатих ΔE_{iso} истичу и фаворизовано учешће -OH група прстена A, посебно оних на позицији R² (Слика 32). Учешће -OH група прстена A у неутрализацији радикалских врста је још израженије код деривата серије **7**, при чему се посебно истиче потенцијал R³-OH група (Слика 34).

Важно је нагласити да је израчунавање електронских параметара извршено у води и бензену, при чему су добијени слични резултати као у метанолу. У случају свих испитиваних једињења добијене су позитивне вредности ΔE_{iso} за настанак N• радикалских врста, што практично сугерише да -NH групе не доприносе антирадикалској активности хидразонских деривата.



Слика 31. Израчунате вредности *Еномо, Ецимо и Еномо-Ецимо* разлике за једињења серија 5 и 6 у метанолу као растварачу.



Слика 32. Израчунате вредности енергије стабилизације Δ*E*_{iso} за једињења серије **5** и **6** у метанолу као растварачу.



Слика 33. Израчунате вредности *Е*_{НОМО}, *Е*_{LUMO} и *Е*_{НОМО}-*Е*_{LUMO} разлике за једињења серије 7 у метанолу као растварачу.



Слика 34. Израчунате вредности енергије стабилизације ΔE_{iso} за једињења серије 7 у метанолу као растварачу.

3.3.1.3. In silico анализа механизама антирадикалског деловања

Испитивање механизама антирадикалског деловања хидразонских деривата изведено је применом метода теорије функционала густине.^[346,347] У оквиру ових истраживања разматрани су НАТ, SET-PT и SPLET путеви радикалске инактивације, што је обухватало израчунавање релевантних термодинамичких дескриптора, односно енталпија дисоцијације везе (BDE), јонизационих потенцијала (IP), афинитета према протону (РА), енталпија дисоцијације протона (РDЕ) и енталпија трансфера електрона (ЕТЕ). Саставни сегмент in silico истраживања било је и израчунавање енталпија реакција сваког појединачног деривата са различитим реактивним врстама (•OCH₃,•OC(CH₃)₃, •OH, •OOH, •OOCH₃, •OOCH=CH₂, O₂•- и DPPH) који су присутни у ћелији или опонашају утицај тамо присутних радикала. Компаративном анализом BDE, IP, PA, PDE и ETE параметара остварен је увид у преферабилни механизам антирадикалског деловања са генералног становишта, тј. на основу карактеристика самих испитиваних једињења. Са друге стране, израчунавањем енталпија реакција ($\Delta_r H_{BDE}$, $\Delta_r H_{IP}$, $\Delta_r H_{PDE}$, $\Delta_r H_{PA}$ и $\Delta_r H_{ETE}$) са појединачним радикалским врстама омогућено је конкретније сагледавање путева њихове неутрализације, јер се у овом случају узимају у обзир електронске карактеристике појединачних радикала. Такође, разматран је и утицај средине, односно поларности, на механизам инактивације радикалских врста, стога је израчунавање свих параметара спроведено у метанолу, води и бензену. Поред процене механизма антирадикалског деловања, анализа термодинамичких дескриптора нуди и поглед на степен учешћа појединачних функционалних група у неутрализацији слободних радикала. Израчунавање BDE, IP, PA, PDE и ETE параметара извршено је за сва испитивана једињења, док су енталпије реакција са радикалским врстама израчунате за деривате који су испољили способност инактивације DPPH радикала у *in vitro* тестовима. Вредности израчунатих термодинамичких параметара у метанолу за најактивније серије хидразона (5-7) приказане су у Табелама 9-11, док су резултати добијени у води и бензену представљени у Прилогу Б.

·	· .	HAT	SET	SET-PT		SPLET		
једињење	позиција	BDE	IP	PDE	PA	ETE		
5a	R1-OH (A)	349		23	148	363		
	R ² -OH (A)	340	488	14	156	346		
	NH	375		48	140	396		
56	R1-OH (A)	349		2	146	365		
	R ² -OH (A)	341	508	-6	154	348		
	R ⁵ -ОН (Б)	378	300	32	168	372		
	NH	367		21	124	404		
	R1-OH (A)	349		21	150	361		
5 P	R ² -OH (A)	340	1.90	11	157	345		
JB	R ⁷ -ОН (Б)	337	490	8	131	367		
	NH	367		39	143	386		
	R ¹ -OH (A)	349		30	146	365		
50	R ² -OH (A)	341	481	21	157	346		
51	R⁵-ОН (Б)	356		37	169	348		
	NH	367		48	125	404		
۲-	R1-OH (A)	349	476	34	149	361		
	R ² -OH (A)	340		25	159	342		
5д	R ⁷ -ОН (Б)	328		14	142	348		
	NH	365		50	143	383		
	R1-OH (A)	349		48	149	361		
5ħ	R ² -OH (A)	340	163	38	159	343		
51)	R ⁷ -ОН (Б)	311	705	9	143	329		
	NH	361		60	142	380		
	R1-OH (A)	349		24	147	364		
	R ² -OH (A)	340		15	155	347		
5e	R⁵-ОН (Б)	375	487	50	165	371		
	R ⁷ -ОН (Б)	343		18	132	373		
	NH	357		32	127	391		
	R1-OH (A)	349		28	149	361		
	R ² -OH (A)	340		19	159	342		
5ж	R ⁶ -ОН (Б)	337	482	16	153	346		
	R ⁷ -ОН (Б)	308		-12	115	355		
	NH	367		47	143	386		

Табела 9. Вредности израчунатих термодинамичких параметара (kJ mol⁻¹) за деривате **5а-ж** у метанолу.

		HAT	SET	Г-РТ	SPLET		
једињење	позиција	BDE	IP	PDE	PA	ETE	
6а	R1-OH (A)	332		-16	107	387	
	R ² -OH (A)	317	510	-31	135	345	
	R ³ -OH (A)	337	510	-12	121	377	
	NH	371		22	143	389	
	R1-OH (A)	336		18	105	393	
	R ² -OH (A)	318		0	136	344	
6г	R ³ -OH (A)	337	479	20	120	379	
	R ⁵ -ОН (Б)	356		38	171	347	
	NH	366		48	131	397	
	R1-OH (A)	335		25	109	388	
	R ² -OH (A)	315		4	135	341	
6д	R ³ -OH (A)	336	472	25	123	374	
	R ⁷ -ОН (Б)	328		17	143	346	
	NH	359		48	147	374	
	R1-OH (A)	332		37	109	385	
	R ² -OH (A)	317	457	22	138	341	
6ђ	R ³ -OH (A)	333		38	120	374	
	R ⁷ -ОН (Б)	310		14	142	330	
	NH	356		61	143	374	
	R1-OH (A)	334		17	105	391	
	R ² -OH (A)	318		1	136	343	
60	R ³ -OH (A)	336	478	20	121	377	
Ue	R ⁵ -ОН (Б)	377	470	60	167	371	
	R ⁷ -ОН (Б)	342		25	133	370	
	NH	354		37	130	385	
	R1-OH (A)	335		17	111	386	
	R ² -OH (A)	317		-1	140	339	
6770	R ³ -OH (A)	336	400	17	122	375	
UAK	R ⁶ -ОН (Б)	320	400	2	129	353	
	R ⁷ -ОН (Б)	310		-9	116	356	
	NH	364		45	146	380	

Табела 10. Вредности израчунатих термодинамичких параметара (kJ mol⁻¹) за деривате **6а и 6г-ж** у метанолу.

•		HAT	SET	SET-PT		SPLET		
једињење	позиција	BDE	IP	PDE	PA	ETE		
7a	R ² -OH (A)	331		-14	123	370		
	R ³ -OH (A)	305	FOG	-40	101	366		
	R4-OH (A)	328	500	-17	122	367		
	NH	373		28	162	373		
	R ² -OH (A)	332		-5	122	372		
	R ³ -OH (A)	306		-31	99	369		
7б	R4-OH (A)	329	498	-8	121	370		
	R ⁵ -ОН (Б)	377		40	176	363		
	NH	366		29	145	383		
	R ² -OH (A)	330		14	123	368		
	R ³ -OH (A)	304		-12	102	364		
7в	R4-OH (A)	327	478	11	123	366		
	R ⁷ -ОН (Б)	333		17	137	358		
	NH	365		49	166	361		
	R ² -OH (A)	332		13	124	369		
	R ³ -OH (A)	306	480	-12	102	366		
7г	R4-OH (A)	331		13	123	369		
	R ⁵ -ОН (Б)	346		28	161	347		
	NH	367		48	145	383		
	R ² -OH (A)	331		24	124	368		
	R ³ -OH (A)	304	468	-3	102	364		
7д	R4-OH (A)	327		21	123	366		
	R ⁷ -ОН (Б)	326		19	146	342		
	NH	363		56	163	361		
	R ² -OH (A)	328		33	123	366		
	R ³ -OH (A)	304		10	102	364		
7ħ	R4-OH (A)	328	456	33	122	367		
	R ⁷ -ОН (Б)	309		14	144	326		
	NH	360		65	165	357		
	R ² -OH (A)	331		15	122	370		
	R ³ -OH (A)	305		-11	100	367		
7e	R ⁴ -OH (A)	328	478	12	121	369		
	R ⁵ -ОН (Б)	376		59	173	365		
	R ⁷ -ОН (Б)	340		23	135	366		
	NH	357		41	148	371		
	R^2 -OH (A)	331		18	123	369		
	R ³ -OH (A)	304		-8	102	364		
7ж	K⁴-OH (A)	327	474	15	123	366		
	К°-ОН (Б)	317		5	128	351		
	К′-ОН (Б)	306		-6	118	350		
	NH	365		53	165	362		

Табела 11. Вредности израчунатих термодинамичких параметара (kJ mol⁻¹) за деривате **7а-ж** у метанолу.

Генерално посматрано, нижа вредност одређеног параметра упуђује на ниже енергетске захтеве одређеног корака реакције, самим тим и на повољност одигравања одређеног реакционог пута. Добијени резултати указују да је SET-PT механизам термодинамички најмање фаворизован у односу на друге реакционе путеве радикалске инактивације. Наиме, високе вредности израчунатих IP сугеришу да се могућност одвијања SET-PT механизма може искључити у случају свих једињења, као и у свим посматраним реакционим медијумима (Табела 9-11, Прилог Б). Овакав исход оставља могућност одвијања НАТ или SPLET реакционих путева, што је, на основу добијених резултата, условљено карактеристикама реакционог медијума. Наиме, у води и метанолу добијене су значајно ниже вредности РА параметара у односу на BDE, чиме се SPLET механизам истиче као термодинамички повољнији у поларним срединама (Табела 9-11, Прилог Б). Са друге стране, резултати добијени у бензену указују на благо преовладавање НАТ механизма, услед нижих вредности BDE параметара у односу на PA. С обзиром на мале разлике између BDE и PA, неопходно је истаћи компетицију између НАТ и SPLET реакционих путева у бензену као медијуму, односно, у неполарним срединама. Поред ових сазнања, израчунати параметри су указали на потенцијал појединачних функционалних група да врше неутрализацију радикалских врста. Међу једињењима серија 5-7, посебно је препознат потенцијал R⁷-OH група на прстену Б. Поред тога, добијени резултати указују и на антирадикалски капацитет R²–OH група деривата серија **5** и **6**, односно R³–OH група прстена А код деривата серије 7.

Израчунавање енталпија реакција са различитим реактивним врстама пружило је сазнања о најповољнијем механизму инактивације појединачне радикалске врсте. Добијени резултати у метанолу за in vitro најактивнији дериват 7ж приказани су у Табели 12, док су вредности параметара израчунатих у води и бензену дати у Прилогу Б. На основу вредности $\Delta H_{\rm IP}$ параметара, SET-PT механизам може бити елиминисан као могући пут инактивације слободних радикала у свим разматраним случајевима. Генерално, у поларним медијумима запажена је компетиција НАТ и SPLET механизама, док је у бензену SPLET механизам предоминантан у већини случајева. Иако су уочени генерални трендови, запажено је и да је одвијање одређеног механизма зависно, како од реакционог медијума, тако и од карактеристика одређене радикалске врсте. На примеру резултата добијених у метанолу за једињење 7ж (Табела 12) уочено је да НАТ механизам преовладава у случају инактивације •ОН, па и DPPH радикала. Супротно томе, на основу израчунатих ΔH_{PA} , SPLET реакциони пут је извеснији у случају неутрализације •ООН, •ООСН₃ и О₂•-. Са друге стране, резултати добијени у бензену истичу да се одвијање НАТ механизма једино да размотрити у случају •OH и DPPH радикала, при чему у осталим случајевима предоминира SPLET. Слична запажања уочена су и код осталих деривата серија 5-7, као и код аналога д, ђ и ж серија 1-4. Такође, вредности енталпија реакција истичу и изражен потенцијал одређених група, последично и степен њиховог ангажовања у антирадикалском деловању. На примеру деривата 7ж, евидентно је да је, у неутрализацији радикалских врста, нарочито термодинамички фаворизовано ангажовање R³-OH и R⁷-OH група.

		НАТ	HAT SE		SP	SPLET	
радикал	позиција	$\Delta H_{\rm BDE}$	$\Delta H_{\rm IP}$	$\Delta H_{\rm PDE}$	$\Delta H_{\rm PA}$	$\Delta H_{\rm ETE}$	
	R ² -OH (A)	-89		-219	-114	25	
•004	R ³ -OH (A)	-115		-245	-136	21	
	R ⁴ -OH (A)	-92	120	-222	-115	23	
OCH3	R ⁶ -ОН (Б)	-102	130	-233	-110	7	
	R ⁷ -ОН (Б)	-113		-244	-120	6	
	NH	-54		-185	-73	19	
	R ² -OH (A)	-97		-227	-122	25	
	R ³ -OH (A)	-123		-253	-144	21	
	R4-OH (Ă)	-100	120	-230	-123	23	
•OC(CH3)3	R6-ОН (́Б)́	-110	130	-241	-117	7	
	R ⁷ -ОН (́Б)́	-121		-252	-128	6	
	NH	-62		-192	-81	18	
	R ² -OH (A)	-158		-216	-110	-48	
	R ³ -OH (A)	-185		-242	-132	-52	
•04	R4-OH (A)	-162	57	-219	-111	-51	
ЮП	R ⁶ -ОН (Б)	-172	57	-229	-106	-66	
	R ⁷ -ОН (Б)	-183		-240	-116	-67	
	NH	-124		-181	-69	-55	
	R ² -OH (A)	-21		-175	-70	49	
	R ³ -OH (A)	-47		-201	-91	45	
•ООН	R4-OH (A)	-24	154	-178	-71	47	
	R6-ОН (Б)	-34		-188	-65	31	
	R ⁷ -ОН (Б)	-45		-200	-75	30	
	NH	14		-140	-28	42	
	R ² -OH (A)	-12		-176	-71	59	
	R ³ -OH (A)	-38		-202	-93	55	
•00CH2	R4-OH (A)	-15	164	-179	-72	56	
000115	R ⁶ -OH (B)	-26	104	-190	-66	41	
	R ⁷ -OH (B)	-37		-201	-77	40	
	NH	23		-141	-30	52	
	R ² -OH (A)	-13		-147	-42	30	
	R ³ -OH (A)	-39		-174	-64	25	
•00-CH=CH2	R ⁴ -OH (A)	-16	135	-151	-43	27	
	R ⁶ -ОН (Б)	-26	100	-161	-38	12	
	R ⁷ -ОН (Б)	-38		-172	-48	11	
	NH	22		-113	-1	23	
	R^2 -OH (A)	10		-79	26	-16	
	R^3 -OH (A)	-16		-105	4	-20	
DPPH	R ⁴ -OH (A)	7	89	-82	25	-18	
21111	R ⁶ -ОН (Б)	-3	0,7	-93	30	-34	
	R ⁷ -ОН (Б)	-15		-104	20	-35	
	NH	45		-45	67	-23	
	R^2 -OH (A)	63		-318	14	49	
	$R^3-OH(A)$	37		-344	-7	45	
02•-	K ⁴ -UH (A)	6U	382	-322	13	47	
	К⁰-ОН (Б)	50		-332	19	31	
	к ⁷ -ОН (Б)	39		-343	9	30	
	NH	98		-284	55	42	

Табела 12. Вредности израчунатих енталпија реакција (kJ mol⁻¹) за дериват **7ж** у метанолу.

3.3.2. Пиразолони

3.3.2.1. Инхибиција DPPH радикала

Резултати испитивања *in vitro* интеракција различито функционализованих пиразолонских деривата **8–27** са DPPH радикалом приказани су у Табели 13.^[349] Сви синтетисани пиразолони испољили су одличну способност инхибиције DPPH радикала, при чему су IC₅₀ вредности одређене у опсегу од 2,6–7,8 µM.

Табела	13.	Структурна	функционализација	пиразолона	8-27	И	њихова
интеракција са DPPH радикалом.							

једињење	R ¹	R ²	R ³	R ⁴		IC ₅₀ (μM)	SF
8	Н	Н	Н	Н		5,1±0,1	2,5
9	OH	Н	Н	Н		6,2±0,1	2,0
10	Н	OH	Н	Н		4,3±0,1	2,9
11	Н	Н	OH	Н		4,9±0,1	2,6
12	Н	Cl	Н	Н		4,5±0,1	2,8
13	Н	Н	Cl	Н	R ³	5,4±0,1	2,3
14	Н	Н	F	Н	\mathbf{p}^4 \mathbf{p}^2	4,8±0,1	2,6
15	NO_2	Н	Н	Н		7,8±0,1	1,6
16	Н	NO_2	Н	Н		4,5±0,1	2,8
17	Н	Н	NO_2	Н	R	5,1±0,1	2,5
18	CH3	Н	Н	Н		4,2±0,1	3,0
19	Н	CH3	Н	Н		3,5±0,1	3,6
20	OH	OH	Н	Н	HN B A NH	2,6±0,1	4,8
21	Н	OH	OH	Н	N // NH	2,9±0,1	4,3
22	OH	OCH ₃	Н	Н	ОН О	3,6±0,1	3,5
23	Н	OCH_3	OH	Н		6,1±0,1	2,0
24	Н	OCH ₃	OH	OCH ₃		5,5±0,1	2,3
25	Н	OH	OCH ₃	OCH ₃		4,4±0,1	2,8
26	Н	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃		6,2±0,1	2,0
27	OH	Cl	Н	Cl		6,4±0,1	2,0
П						9,3±0,1	1,3
NDGA						$1,7\pm0,1$	7,4
Q						1,9±0,1	6,6

Експериментална испитивања обухватала су и процену антиоксидативног потенцијала полазног пиразолонског једињења, 5-метил-2,4-дихидро-3*H*-пиразол-3-она (П). Сходно очекивањима, сва синтетисана једињења **8–27** испољила су побољшану способност инактивације DPPH радикала у односу на полазни пиразолон (IC₅₀ (П)=9,3±0,1 μ M). На основу израчунатих вредности стехиометријских фактора (SF), свим дериватима, осим једињењу **15**, могу се приписати добра антиоксидативна својства. Такође, важно је нагласити да су једињења **8–27** показала значајно бољу антиоксидативну активност у односу на друге, структурно сличне пиразолонске деривате.^[349]

Анализом структурних карактеристика и добијених експерименталних IC₅₀ вредности запажено је да на активност ових једињења утиче супституција прстена В (Табела 13). У овом погледу, утицај природе и положаја супституената код једињења **9–27** се најадекватније осликава упоређивањем резултата са
несупституисаним дериватом 8, који је са IC₅₀ вредношћу од 5,1±0,1 µМ показао добру способност инактивације DPPH. Наиме, аналози 9-11 поседују једну -OH групу (R¹, R² и R³, респективно), при чему је најбољу активност испољило једињење **10** (IC₅₀ =4,3 \pm 0,1 μ M). Са друге стране, дериват **9** показао је слабију активност од несупституисаног деривата 8. Овакав исход, односно, повољнија R² супституција у односу на R¹ и R³, поклапа се са литературним резултатима добијеним за једињења са сличном структурном композицијом.^[349] Међу дериватима који на прстену В поседују један атом халогена (12-14), најбољу активност испољило је R² супституисано једињење **12** (IC₅₀ =4,5±0,1 µМ). У односу на једињење **8**, унапређену активност испољио је и производ 14, док је дериват 13 показао нешто нижу активност. Такође, код једињења који садрже нитро групу, најбољу активност испољило је једињење **16** (R^2 – NO_2), а најнижу аналог **15** (R^1 – NO_2). Са друге стране, присуство метил група утицало је на побољшавање активности, посебно код једињења **19** (R²-CH₃). Једињења **20-26** садрже различито позициониране -OH и/или -OCH₃ супституенте. Међу њима, уједно и међу свим испитиваним једињењима, најбољу способност неутрализације DPPH радикала показао је катехолски дериват **20** (IC₅₀ =2,6±0,1 µM). Важно је истаћи и значајну активност деривата **21**, **22** и **25**, чије су IC₅₀ вредности одређене на 2,9, 3,6, и 4,4 µМ, респективно. На крају, једињење **27,** са једном – ОН групом на позицији R¹ и атомима хлора на положајима R² и R⁴, показало је сличну активност као и једињење **9** (R¹-OH).

На основу анализе добијених резултата изведено је неколико закључака:

1) Сва једињења испољила су бољу способност инхибиције DPPH радикала од полазног пиразолона **П**;

2) Супституција прстена В, односно, број, природа и позиција функционалних група, утицала је на активност пиразолонских деривата према DPPH радикалу;

3) У односу на друге положаје (као и на несупституисани дериват 8), супституција у положају R² резултовала је најзначајним побољшавањем антиоксидативних својстава пиразолонских деривата. Ово запажање се превасходно уочава код деривата **10** (R²–OH), **12** (R²–Cl), **16** (R²–NO₂) и **19** (R²–CH₃). Штавише, унапређење активности је израженије у случају присуства додатне групе у суседству R² супституента, што се уочава код деривата **20**, **21**, **22** и **25**. Наиме, ови деривати поседују додатне –OH или –OCH₃ супституенте, што услед њихових електрон-донорских ефеката и/или могућности грађења водоничних веза, резултује бољом стабилизацијом фенокси радикала;

4) Поред положаја, запажен је и утицај природе супституента на активност пиразолонских деривата. Ова појава се може уочити код деривата **9** (R¹–OH), **15** (R¹–NO₂) и **18** (R¹–CH₃), који поседују групе са различитим електронским особинама. Генерално, R¹ супституција је најмање фаворизована у односу на R² и R³, нарочито ако је присутан супституент са снажним електрон-привлачним особинама, као што је нитро група. Међутим, уколико је у положају R¹ присутан – ОН супституент, активност је унапређена уколико постоје додатне групе у његовом суседству. Ово се посебно уочава међусобним поређењем резултата за једињења **9**, **20**, **22** и **27**, где присуство суседних електрон-донорских група повећава активност (деривати **20** и **22**), док присуство халогена практично нема ефекта (дериват **27**). Са друге стране, поређење резултата за деривате **10**, **12** и **16** истиче да електронска природа групе у R² положају нема значајан утицај на активност. Благи изузетак од овог феномена је једињење **19** (R²–CH₃), које је у *in vitro* испитивањима показало нешто бољу активност од деривата **10**, **12** и **16**.

5) Број функционалних група утицао је на активност пиразолонских деривата, али је истовремено важна њихова природа и положај. Ово запажање се осликава упоређивањем резултата за деривате **23**, **24** и **26**. Међу њима, највећу активност испољио је дериват **24**, што се може приписати присуству две додатне –OCH₃ групе у суседству –OH, односно, бољој стабилизацији фенокси радикала. Такође, утицај позиције група на активност осликава се на примерима једињења **24** и **25**, где је једињење **25** показало бољу активност. У овом случају очекивао се супротан исход, имајући у виду да се код једињења **25** само једна –OCH₃ налази у суседству –OH групе. Слично томе, очекивала се боља активност деривата **23** од једињења **11**. Овакав исход може бити последица негативног утицаја –OCH₃ група, односно, њихових стерних ефеката.

3.3.2.2. In silico анализа антиоксидативне способности

Антиоксидативни потенцијал пиразолонских деривата **8–27** процењен је на основу израчунатих вредности *Еномо, Ецимо* и *Еномо-Ецимо* разлике.^[349] Резултати добијени у метанолу као растварачу приказани су у Табели 14, док су резултати израчунавања у води и бензену дати у Прилогу Б.

једињење	<i>Е</i> номо (eV)	<i>Е</i> LUMO (eV)	Еномо-Ецимо разлика (eV)
8	-0,226	-0,026	0,200
9	-0,224	-0,026	0,198
10	-0,226	-0,025	0,200
11	-0,225	-0,027	0,198
12	-0,226	-0,028	0,198
13	-0,226	-0,029	0,196
14	-0,225	-0,029	0,197
15	-0,226	-0,106	0,120
16	-0,227	-0,113	0,115
17	-0,227	-0,112	0,115
18	-0,227	-0,024	0,203
19	-0,225	-0,026	0,199
20	-0,222	-0,024	0,198
21	-0,219	-0,025	0,194
22	-0,219	-0,024	0,195
23	-0,216	-0,025	0,192
24	-0,213	-0,025	0,187
25	-0,226	-0,025	0,201
26	-0,225	-0,026	0,199
27	-0,225	-0,037	0,188

Табела 14. Израчунате вредности *Е*номо, *Е*LUMO и *Е*номо-*Е*LUMO разлике (eV) за деривате **8–27** у метанолу.

Највише вредности *Е*_{НОМО} израчунате су за једињења **20–24**. Ова сазнања сагласна су са експерименталним резултатима, с обзиром на то да су деривати **20–22** испољили одличну способност инхибиције DPPH радикала у *in vitro* тестовима. Са друге стране, уочено је да су вредности *Е*_{НОМО} осталих деривата врло сличне

(опсег од -0,224 до -0,227 eV), при чему су најниже израчунате за нитросупституисане деривате **15–17**. У том погледу, констатовано је умерено слагање са експерименталним резултатима, с обзиром на то да је дериват **15** показао најслабију способност инактивације DPPH радикала. Слична запажања су примећена и у другим испитиваним растварачима.

Најниже вредности *Е*_{НОМО}-*Е*_{LUMO} разлике добијене су за једињења **15–17**, које евидентно одступају од резултата добијених за друге аналоге. Овакав исход последица је готово вишеструко нижих вредности *Е*_{LUMO} у односу на друга једињења. Иако би се на основу ових резултата могла претпоставити већа вероватноћа реакције једињења **15–17** са DPPH радикалом, вредности израчунатих параметара нису довољно различите да би се, на основу њих, међусобно упоредиле њихове различите IC₅₀ вредности. Изостанак ове аналогије истиче да реактивност деривата **15–17** није једини предуслов за инактивацију радикалских врста. У том погледу, одигравање реакције може зависити и од других фактора, што такође говоре вредности *Е*номо-*Е*LUMO разлике и свих осталих испитиваних једињења.

Израчунавањем енергија стабилизације ΔE_{iso} одговарајућих О• и № радикалских врста остварен је прецизнији увид у антиоксидативни потенцијал испитиваних пиразолона. У ове сврхе, разматрана је могућност настанка и стабилност појединачних радикала на пиразолонском (прстен А, позиције N1A и N2A), пиразолском (прстен Б, позиције О1Б и N2Б) и фенил фрагменту (прстен В, позиције O1B, O2B и O3B)(Слика 35).



Слика 35. Позиције и ознаке испитиваних радикалских врста (О• и №). Словима А, Б и В означени су појединачни фрагменти молекула.

Анализом добијених резултата уочено је да су најниже вредности ΔE_{iso} израчунате за О• прстена В код деривата **20–24** (Табела 15). Ова сазнања указују на фаворизовано учешће –ОН група прстена В у инактивацији слободних радикала, посебно код аналога **20**, **21** и **24**, што је у складу са експерименталним резултатима. Израчунате вредности ΔE_{iso} указују и на антиоксидативни потенцијал прстена А, превасходно -NH група на позицији 2, уз мали допринос NH група на позицији 1. Са друге стране, високе вредности ΔE_{iso} за N2Б радикале сугеришу да директно учешће прстена Б у активности пиразолона није енергетски фаворизовано. Такође, у случају прстена Б, допринос –ОН група антиоксидативној активности се практично може сматрати занемарљивим.

	прстен А		прс	ген Б		прстен В	
једињење	N1	N2	01	N2	01	02	03
8	-5,83	-20,47	-0,58	28,53	/	/	/
9	-5,10	-21,09	-3,55	25,12	-7,99	/	/
10	-5,74	-20,66	0,30	28,75	/	-2,47	/
11	-5,60	-20,20	0,34	29,33	/	/	-9,61
12	-5,03	-19,13	0,07	29,21	/	/	/
13	-4,74	-19,00	0,69	29,76	/	/	/
14	-5,06	-19,44	0,38	29,52	/	/	/
15	-2,31	-15,80	-2,21	31,26	/	/	/
16	-1,95	-15,76	3,90	32,38	/	/	/
17	-3,72	-17,51	0,97	30,99	/	/	/
18	-10,16	-19,18	-5,72	31,59	/	/	/
19	-8,19	-20,66	0,45	28,51	/	/	/
20	-3,79	-18,24	-4,22	29,84	-34,66	-31,42	/
21	-5,04	-19,62	0,20	28,49	/	-33,09	-35,89
22	-4,64	-19,54	-3,04	28,45	-25,59	/	/
23	-6,25	-20,90	0,57	27,74	/	/	-28,48
24	-5,21	-19,93	0,93	29,02	/	/	-44,34
25	-5,41	-19,58	0,82	28,85	/	-17,06	/
26	-5,04	-19,82	1,20	28,90	/	/	/
27	-3,10	-18,05	-1,88	29,76	-12,84	/	/

Табела 15. Израчунате вредности енергија стабилизације ΔE_{iso} (kJ mol⁻¹) различитих О• и N• радикала за деривате **8–27** у метанолу.

Добијени резултати истичу да функционализација прстена В утиче на стабилност радикала на фрагментима А и Б. Пример овог феномена јесу деривати 18 и 19, код којих је прстен В супституисан метил групама. У поређењу са несупституисаним дериватом 8, код једињења 18 и 19 уочена је боља стабилизација N1A радикала. Штавише, О1Б радикал је најбоље стабилизован код једињења 18. Ови ефекти могу бити разлог побољшане активности метилсупституисаних деривата у in vitro испитивањима. Са друге стране, код једињења 15-17 је запажено да присуство нитро група (посебно у позицији R²) смањује стабилност N1A и N2A радикала. Сходно томе, супституција нитро групама се може сматрати неповољном, посебно код деривата 16. Логична је претпоставка да би, услед ових ефеката, једињење 16 требало испољити мању способност неутрализације DPPH од несупституисаног деривата 8. Ипак, једињење 16 је у експерименталним испитивањима испољило нешто бољу активност. Важно је поменути да варијације између експерименталних и теоријских резултата нису реткост, нарочито у погледу утицаја одређене функционалне групе на неутрализацију радикалских врста. Штавише, код најактивнијих деривата 20 и 21 стабилност N1A и N2A радикала је нешто нижа него код једињења 8. Ипак, евидентно је да незнатно смањен антиоксидативни потенцијал прстена А надомешћује присуство катехолског мотива на прстену В.

Слични резултати добијени су у води као растварачу, уз одређене изузетке. Генерално, добијене су нешто ниже вредности ΔE_{iso} него у метанолу, што указује на незнатно већу стабилност радикала у води. Одлично слагање теоријских и експерименталних резултата остварено је за једињења **9–11**. Такође, присуство

нитро супституената је најмање повољно, нарочито у положају R¹. Штавише, добијене вредности за нитро деривате 15-17 су се значајно међусобно разликовале, што је сагласно са експерименталним резултатима. Са друге стране, запажена је и нешто нижа стабилност N1A и N2A радикала код деривата 18-20. На основу резултата добијених V бензену, нитро-супституција је такође слагање термодинамички најмање повољна. Добро теоријских И експерименталних резултата остварено је за најактивније деривате 19-22, као и за једињења **9-11**.

3.3.2.3. In silico анализа механизама антирадикалског деловања

Испитивање механизама антирадикалске активности пиразолона **8–27** реализовано је по сличном методолошком концепту као и код хидразонских деривата.^[349] Компаративном анализом израчунатих BDE, IP, PDE, PA и ETE параметара извршена је процена најповољнијег механизма са општег термодинамичког становишта. Са друге стране, опширнији увид у путеве антирадикалског деловања остварен је израчунавањем енталпија реакција са одабраним радикалским врстама. Поред HAT, SET-PT и SPLET механизама, разматран је и RAF реакциони пут, где је анализирана могућност формирања адукта реакцијом пиразолона са •OH.

Вредности израчунатих термодинамичких дескриптора у метанолу приказани су у Табелама 16–18.

	енталпија дисоцијације везе BDE (kJ mol ⁻¹)										
једињење	N1(A)	N2(A)	01(Б)	N2(Б)	01(B)	02(B)	03(B)				
8	347	332	352	381	/	/	/				
9	347	331	349	378	344	/	/				
10	347	332	353	381	/	350	/				
11	347	332	353	382	/	/	343				
12	347	333	352	382	/	/	/				
13	348	333	353	382	/	/	/				
14	347	333	353	382	/	/	/				
15	350	337	350	384	/	/	/				
16	350	337	356	385	/	/	/				
17	349	335	353	383	/	/	/				
18	342	333	347	384	/	/	/				
19	344	332	353	381	/	/	/				
20	349	334	348	382	318	321	/				
21	347	333	353	381	/	319	317				
22	348	333	349	381	327	/	/				
23	346	332	353	380	/	/	324				
24	347	333	353	381	/	/	308				
25	347	333	353	381	/	335	/				
26	347	333	354	381	/	/	/				
27	349	334	351	382	340	/	/				

Табела 16. Израчунате вредности BDE (kJ mol⁻¹) за деривате 8–27 у метанолу.

једињење	IP				PDE			
		N1(A)	N2(A)	01(Б)	N2(Б)	01(B)	02(B)	03(B)
8	457	51	36	56	85	/	/	/
9	456	53	37	54	83	50	/	/
10	458	50	35	56	85	/	54	/
11	466	43	28	49	78	/	/	39
12	460	49	35	54	83	/	/	/
13	460	49	35	55	84	/	/	/
14	459	50	35	55	84	/	/	/
15	463	49	36	49	83	/	/	/
16	465	47	34	53	82	/	/	/
17	464	46	33	51	81	/	/	/
18	457	47	38	51	88	/	/	/
19	457	49	37	58	86	/	/	/
20	461	49	35	49	83	19	22	/
21	450	59	44	64	92	/	31	28
22	454	56	41	57	89	35	/	/
23	444	64	50	71	98	/	/	42
24	437	72	57	78	106	/	/	33
25	459	50	36	56	84	/	38	/
26	439	70	56	77	104	/	/	/
27	432	79	64	81	112	70	/	/

Табела 17. Израчунате IP и PDE (kJ mol⁻¹) за деривате 8–27 у метанолу.

I augusta 10. Inspany nate degradet i franchi i franchi i sa depubate 0^{-27} y metanoli y	Табела 18. Изра	ачунате вредности	РА и ЕТЕ (kJ mol ⁻¹)	за деривате 8-27	у метанолу.
---	------------------------	-------------------	----------------------------------	-------------------------	-------------

	N1	(A)	N2	(A)	01	(Б)	N2	(Б)	01	(B)	02	(B)	03	(B)
	PA	ETE												
8	139	369	133	360	176	338	197	346	/	/	/	/	/	/
9	138	370	132	361	169	341	199	340	152	354	/	/	/	/
10	140	369	133	360	176	338	200	343	/	/	156	356	/	/
11	140	368	134	360	177	337	200	344	/	/	/	/	156	348
12	138	371	132	363	174	340	198	345	/	/	/	/	/	/
13	139	371	133	362	175	340	198	346	/	/	/	/	/	/
14	139	370	133	362	175	339	198	345	/	/	/	/	/	/
15	135	377	128	370	166	345	196	350	/	/	/	/	/	/
16	139	373	133	366	176	342	199	347	/	/	/	/	/	/
17	136	374	130	366	171	344	196	349	/	/	/	/	/	/
18	141	363	133	362	172	336	199	347	/	/	/	/	/	/
19	140	366	134	360	177	338	200	343	/	/	/	/	/	/
20	140	370	132	363	175	335	200	344	137	342	138	345	/	/
21	137	372	134	361	177	337	200	343	/	/	140	341	141	337
22	139	370	133	361	170	341	200	343	156	333	/	/	/	/
23	139	368	134	360	176	338	199	343	/	/	/	/	157	329
24	140	369	133	361	179	336	199	344	/	/	/	/	157	313
25	139	369	133	361	176	339	199	344	/	/	147	350	/	/
26	139	370	133	361	177	339	199	344	/	/	/	/	/	/
27	136	375	130	366	167	346	197	347	128	373	/	/	/	/

Високе вредности IP указују да је SET-PT механизам термодинамички најнеповољнији у свим испитиваним медијумима, што искључује могућност његовог одвијања. Порећењем ВDE и РА вредности установљено је да је у поларним срединама фаворизован SPLET механизам, док је у неполарном медијуму нешто повољније одигравање НАТ реакционог пута. Овакав исход је донекле очекиван, с обзиром на то да је у неполарној средини мања могућност одвијања реакција које укључују настанак наелектрисаних интермедијера. Такође, анализом добијених резултата стечен је увид у антиоксидативни потенцијал појединачних функционалних група. Вредности израчунатих параметара указују да је допринос прстена Б антиоксидативној активности практично занемарљив. Са друге стране, изражен антиоксидативни потенцијал идентификован је за -ОН групе прстена В. код деривата 20-22. Поред тога, препознат је и повољан нарочито антиоксидативни профил прстена А, нарочито -NH група на позицији 2. Ова запажања истичу да је прстен А одговоран за генералну активност пиразолона 8-27, при чему супституенти прстена В доприносе активности у одређеним околностима.

Вредности енталпија реакција са одабраним слободним радикалима израчунате су за све пиразолонске деривате.^[349] Резултати добијени у метанолу за *in vitro* најактивнији дериват **20** приказани су у Табели 19, док су они у води и бензену дати у Прилогу Б. Уопштено посматрано, резултати ових истраживања варирали су у зависности од испитиваног једињења, радикалске врсте и реакционог медијума, али су примећени и неки генерални трендови. Наиме, високе позитивне вредности ΔH_{IP} указују да је јонизација једињења **8–27** ендотерман процес, стога могућност одвијања реакција по SET-PT механизму може бити искључена готово у свим случајевима. Штавише, енергетске потребе за јонизацију значајно су веће у бензену него у поларним растварачима. Могућност компетиције SET-PT механизма са другим реакционим путевима може се узети у обзир једино у случају реакције појединих деривата са DPPH радикалом у поларној средини. Ипак, у поларним медијумима је евидентна компетиција НАТ и SPLET реакционих путева, при чему је и већини случаја НАТ незнатно термодинамички повољнији. Услед значајне разлике између ΔH_{BDE} и ΔH_{PA} , НАТ је јасно предоминантан једино у случају реакције са •ОН радикалом. Са друге стране, у бензену је повољније одигравање реакција по SPLET механизму, осим у случају инактивације DPPH где преовладава НАТ. Слично претходним запажањима, израчунате вредности енталпија реакција истичу фаворизовано учешће функционалних група прстена А и В у инактивацији радикалских врста, док је допринос прстена Б практично занемарљив.

Испитивање могућности одигравања RAF механизма, односно, формирања радикалског адукта, обухватало је иницијалну процену најпогоднијег положаја за напад •OH. У ове сврхе израчунате су Фукуи функције за све деривате пиразолона, где су на основу израчунатих вредности f^{0}_{nbo} (већа вредност указује на већу вероватноћу) издвојене најповољније позиције за адицију радикала.^[349] На основу тога, конструисани су и оптимизовани одговарајући радикалски адукти, при чему су израчунате енталпије реакција са •OH (ΔH_{RAF}) у метанолу и бензену (Табела 20). На основу израчунатих вредности ΔH_{RAF} , адиција •OH радикала је најповољнија на пиразолонском прстену A, при чему најреактивнију позицију представља угљеников атом који је супституисан метил групом (Табела 20, ознака *). Уочено је да на овакав исход утиче супституција прстена B, односно, присуство група са електрон-донорским ефектима. Са друге стране, код деривата **15–17** који на прстену B поседују групе са снажним електрон-привлачним ефектима,

	•	НАТ	SE	Г-РТ	SP	LET
радикал	позиција	$\Delta H_{\rm BDE}$	$\Delta H_{\rm IP}$	$\Delta H_{\rm PDE}$	$\Delta H_{\rm PA}$	$\Delta H_{\rm ETE}$
	N1 (A)	-79		-162	-72	-7
	N2 (Ă)	-93		-177	-79	-14
•OCU2	N2 (Б)	-45	01	-129	-12	-33
0013	01 (Б)	-79	04	-163	-37	-42
	01 (B)	-109		-193	-74	-35
	02 (B)	-106		-190	-74	-33
	N1 (A)	-87		-171	-80	-7
	N2 (A)	-101		-185	-88	-13
•OC(CH ₂) ₂	N2 (Б)	-53	Q.4.	-137	-20	-33
00(0113)3	01 (Б)	-87	04	-171	-46	-41
	01 (B)	-118		-202	-83	-35
	02 (B)	-114		-199	-82	-32
	N1 (A)	-150		-155	-64	-86
	N2 (A)	-165		-169	-72	-93
•04	N2 (Б)	-116	5	-121	-4	-112
011	01 (Б)	-150	5	-155	-30	-121
	01 (B)	-181		-186	-67	-114
	02 (B)	-178		-183	-66	-111
	N1 (A)	-10		-116	-26	16
	N2 (A)	-25		-131	-33	9
•00H	N2 (Б)	24	106	-83	34	-11
0011	01 (Б)	-11	100	-117	9	-19
	01 (B)	-41		-147	-28	-13
	02 (B)	-38		-144	-28	-10
	N1 (A)	-3		-118	-27	24
	N2 (A)	-17		-132	-35	17
•OOCH3	N2 (Б)	31	115	-84	33	-2
	01(Б)	-3		-118	8	-11
	01 (B)	-34		-148	-30	-4
	<u>UZ (B)</u>	-30		-145	-29	-1
	NI (A)	-2		-98	-/	5
	NZ (A)	-1/		-112	-15	-2
•00-CH=CH2	NZ (D) 01 (E)	31	95	-04	23	-22
		-3		-98	28	-30
		-33		-129 125	-10	-24
	$\frac{02(D)}{N1(A)}$	-30		-125	-9	-21
	N1(A)	20 11		-37	33 26	-/ 1/
	N2 (A) N2 (E)	60		-72	20 02	-14
DPPH	$N_{2}(D)$	25	83	-24	53 60	-34
	01(D)	-5		-98	21	-42
	01(D)	-3		-00	21	-33
	$\frac{02}{N1}$	62		-05	46	<u>-33</u> 16
	$N2(\Delta)$	47		_225	20	Q
	N2 (F)	 96		_177	106	-11
O2•-		62	273	-1// _711	Q1	-10
		04 21		-211 _212	<u>11</u>	-12
		24		-242 770	77	-13
	U2 (D)	34		-230	44	-10

Табела 19. Израчунате вредности енталпија реакција (kJ mol⁻¹) за дериват **20** у метанолу.

фаворизовано је одигравање адиције на прстену Б. У овим случајевима, истакнута позиција за напад •ОН радикала јесте угљеников атом који се налази у суседству метинске групе (Табела 20, ознака #). Поред тога, код деривата **20–24** могуће је формирање адукта и на прстену В, и то нападом радикала на угљеникове атоме који

су супституисани хидрокси или метокси групама. Овакав исход се може објаснити близином кисеоникових атома и њиховим могућим учешћем у стабилизацији радикалског адукта. Слично томе, код деривата **27**, најповољнија позиција за напад радикала јесте прстен В, односно, угљеник који је смештен између угљеникових атома супституисаних хлором. Сличан тренд је запажен и у бензену као медијуму.

Табела 20. Израчунате вредности ΔH_{RAF} (kJ mol⁻¹) за деривате **8–27**. Симболима * и # означене су еквивалентне позиције испитиваних једињења за напад радикала.

једињење	Позиција	ΔH _{RAF} (метанол)	Δ <i>H</i> _{RAF} (бензен)
8 + •OH	C20*	-90	-97
9 + •OH	C19*	-89	-85
10 + •OH	C20*	-89	-97
11 + • OH	C20*	-90	-97
12 + •OH	C19*	-89	-96
13 + •OH	C20*	-90	-96
14 + •OH	C20*	-90	-97
15 + •OH	C9#	-40	-42
16 + •OH	C10#	-102	-57
17 + •OH	C10#	-100	-57
18 + • OH	C19*	-88	-98
19 + •OH	C20*	-90	-98
	C19*	-87	-95
20 + •OH	C1	-84	-78
	C35	-84	-89
	C22*	-90	-98
21 + •OH	C2	-90	-80
	C3	-88	-92
	C18*	-88	-86
22 + •OH	C2	-81	-82
	C3	-88	-80
	C20*	-91	-97
23 + •OH	C34	-95	-85
	C35	-84	-79
24 + •∩⊔	C33	-106	-103
24 + 011	C19*	-91	-98
25 + •OH	C17*	-90	-97
26 + •OH	C19*	-87	-98
27 ± • ∩H	C4	-85	-77
	C32	-77	-72

Упоређивањем вредности ΔH_{RAF} и ΔH_{BDE} добијених за реакцију са •OH у метанолу, може се закључити да је НАТ механизам и даље најповољнији реакциони пут за неутрализацију овог радикала. Са друге стране, компарацијом ΔH_{RAF} , ΔH_{IP} , ΔH_{PDE} , ΔH_{PA} и ΔH_{ETE} вредности, установљено је да је RAF термодинамички повољнији у поларним срединама од SET-PT и SPLET механизама.

3.4. Цитотоксична активност

3.4.1. Вијабилност MRC-5 и HCT-116 ћелија

Сви синтетисани *N*-ацилхидразони подвргнути су испитивању цитотоксичних карактеристика, односно, њихових ефеката на преживљавање хуманих ћелија фибробласта MRC-5 и рака дебелог црева HCT-116.^[346,347] Првобитно су испитана својства познатих деривата хидразона (серије **1–4** и **7**), чије су експериментално одређене IC₅₀ вредности приказане у Табели 21.

Табела 21. IC₅₀ вредности познатих хидразонских деривата и референтних цитостатика (µM) за MRC-5 и HCT-116 ћелијске линије након третмана од 24 и 72 сата.

IC ₅₀		1a	1б	1в	1г	1д	1ħ	1e	1ж
	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
MRC-5	72h	>500	>500	>500	306,5	>500	>500	>500	>500
UCT 11(24h	>500	249,4	>500	>500	>500	>500	>500	>500
HC1-116	72h	>500	139,1	>500	66,6	>500	>500	315,9	>500
		2a	2б	2в	2г	2д	2ħ	2e	2ж
	24h	>500	>500	>500	37,9	>500	>500	>500	>500
MRC-5	72h	>500	232,7	>500	87,3	>500	>500	>500	>500
UCT 11(24h	>500	26,9	>500	80,5	>500	>500	>500	>500
HCI-116	72h	>500	70,5	>500	26,2	>500	>500	61,2	208
		3a	3б	Зв	3г	3д	3ħ	3e	3ж
	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
MRC-5	72h	>500	>500	>500	213,2	>500	>500	439,7	>500
UCT 11(24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
HCI-116	72h	>500	101,3	>500	94,1	>500	>500	129,8	106,9
		4a	4б	4в	4г	4д	4ħ	4e	4ж
	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
MRC-5	72h	>500	290	>500	127,6	>500	>500	306,6	>500
UCT 116	24h	>500	249,7	>500	>500	>500	>500	193,5	>500
пс1-116	72h	>500	91,4	>500	202,1	>500	>500	>500	>500
		7a	7б	7в	7г	7д	7ħ	7e	7ж
	24h	175,46	104,44	91,99	179,64	>500	84,33	76,35	>500
MIKC-5	72h	59,24	52,15	31,88	457,52	45,76	40,0	78,6	50,55
UCT 116	24h	247,2	62,6	71,75	89,91	>500	86,92	99,9	>500
пс1-116	72h	63,53	32,35	38,45	>500	65,23	43,6	77,34	58,76
		Леуко	ворин	Ирин	отекан				
MRC-5	24h	>5	00	>!	500				
MINC-J	72h	179	9,76	35	5,19				
НСТ_116	24h	>5	00	>!	500				
1101-110	72h	>5	00	10	0,88				

Генерално посматрано, у оквиру серија **1–4** и **7** идентификовани су деривати који индукују смањење вијабилности ћелија, али такође и они који не испољавају цитотоксичне ефекте. У поређењу са добијеним резултатима, у литератури се могу наћи слични подаци за различите деривате хидразона, али такође и они у којима су одређене значајно ниже IC₅₀ вредности. Анализом добијених резултата запажено је да једињења са одређеном структурном композицијом испољавају цитотоксични карактер према ћелијама рака. У овом погледу се нарочито издвајају деривати са б, **г**, **е** и **ж** структурном модификацијом на прстену Б (Табела 21). Наиме, једињења типа **б**, **г** и **е** поседују *орто*-позиционирану –ОН групу на прстену Б (положај R⁵)(Шема 27, страна 52), што указује на фаворизовано учешће ових група у цитотоксичној активности. Резултати претходних истраживања такоће наглашавају повољно присуство група у орто-положају, што се у овом случају објашњава могућношћу формирања интрамолекулске водоничне везе између орто-ОН и хидразонске -СН=N-NH- групе. За разлику од деривата б, г, и е, једињења **ж** типа поседују две – ОН групе на позицијама R⁶ и R⁷ (Шема 27, страна 52), при чему су благе цитотоксичне ефекте испољили деривати 2ж, 3ж и 7ж (Табела 21). Поред супституције прстена Б, уочено је да на цитотоксична својства хидразонских деривата утиче и структурна композиција прстена А. На основу одређених IC₅₀ вредности установљено је да **б**, **г**, и **е** деривати серије **2** испољавају јаче цитотоксичне ефекте од одговарајућих аналога серија 1, 3 и 4. Међу овим дериватима, најбољу активност показало је једињење 26 које на оба прстена поседује по једну орто-позиционирану –ОН групу. Са друге стране, а, в, д и ђ аналози серија 1-4 нису манифестовали цитотоксичне ефекте према испитиваним ћелијама. Поред тога, сви деривати серије 7 испољили су активност према одабраним ћелијским линијама, што указује на повољан утицај супституције прстена А код ових једињења. Важно је истаћи да ови деривати садрже фрагмент галне киселине, за коју је од раније познато да испољава цитотоксичне ефекте према канцерогеним ћелијама.

Поред цитотоксичности, значајно је дискутовати и селективност хидразона према одабраним модел системима, односно, здравим и канцерогеним ћелијама. У овом погледу, посебно се истичу деривати групе **б**, који су уз добре цитотоксичне ефекте испољили и значајну селективност према ћелијама рака (Табела 22). Такође, снажан цитотоксични ефекат према HCT-116 ћелијама показали су и деривати **1**г, **2**г и **3**г, са индексима селективности (након 72 часа) од 4,6, 3,3 и 2,3, респективно.

SI	16	2б	3б	4б	7б	Леуковорин	Иринотекан
24h	> 2,01	>18,59	1,00	>2,00	1,67	1,00	1,00
72h	>3,59	3,30	>4,94	3,17	1,61	<0,36	0,35

Табела 22. Индекси селективности (SI) **б** аналога и комерцијалних цитостатика након третмана од 24 и 72 сата.

У погледу активности и селективности, деривати серије 7 манифестовали су различите ефекте. Наиме, дериват 7в показао је најјача цитотоксична својства, док је 76 испољио највећу селективност након оба времена трајања третмана (Табела 23). Такође, селективно дејство уочено је код једињења 7г након 24 часа (SI=2,0), при чему након 72 сата долази до опоравка обе ћелијске линије. Са друге стране, аналози 7в, 7д, 7ђ, 7е и 7ж испољили су цитотоксичне ефекте на обе ћелијске линије. Овакав исход истиче да је присуство супституента у позицији R⁷ неповољно за постизање аспекта селективности ових једињења. Супротно томе, добијени резултати за 7б и 7г додатно потврђују повољан утицај R⁵–ОН група на прстену Б, како на активност тако и на селективност хидразонских деривата.

SI	7a	7б	7в	7г	7д	7ħ	7e	7ж
24 h	0,71	1,67	1,28	2,00	1,00	0,97	0,76	1,00
72 h	0,93	1,61	0,83	<0,92	0,70	0,92	1,02	0,86

Табела 23. Индекси селективности (SI) деривата серије 7 након 24 и 72 сата.

Такође, анализом резултата за деривате **б**, **г**, **е** и **ж** идентификована је зависност степена преживљавања ћелија од концентрације испитиваног једињења и периода излагања. Генерално је уочено да вијабилност ћелија опада са порастом концентрације и времена третмана, али су поред тога примећени и другачији исходи. У неколико случајева, јачи цитотоксични ефекат уочен је након краћег времена третмана (24 часа), након чега долази до опоравка ћелија. Репрезентативни пример оваквог акутног дејства јесте једињење **7г**, које уједно и имплицира могућност настанка различитих механизама резистентности.

Цитотоксичност и селективност деривата хидразона упоређена је са резултатима добијеним за комерцијалне цитостатике, леуковорин и иринотекан (Табеле 21 и 22). Ови лекови су одабрани на основу њихове структурне сличности са дериватима хидразона, као и примене у третману канцера дебелог црева. Добијене IC₅₀ вредности показују да леуковорин не испољава активност према НСТ-116 ћелијама, док иринотекан манифестује умерено цитотоксично дејство након 72 часа. Штавише, ови лекови испољавају снажније ефекте према здравим MRC-5 ћелијама. Овакав исход није изненађење, с обзиром на то да је лечење цитостатицима често праћено нежељеним дејствима на здрава ткива. Важно је нагласити да ефекти појединачних цитостатика нису од круцијалног значаја, имајући у виду да су протоколи лечења неретко засновани на синергизму различитих лекова. Један од стандардних протокола за третман рака дебелог црева јесте Folfiri, који обухвата комбиновану примену иринотекана, леуковорина и 5флуороурацила. У генералном погледу, испитивани хидразони испољили су бољу активност, као и селективнији карактер према ћелијама канцера од одабраних комерцијалних лекова.

Имајући у виду да значајан број деривата у оквиру серија 1-4 није испољио цитотоксичне ефекте, испитивање новосинтетисаних хидразона (серије 5 и 6) спроведено је у две фазе, превасходно из практичних разлога.^[346] Наиме, у прелиминарној фази урађен је прескрининг, чиме је извршен одабир перспективних кандидата. По устаљеној лабораторијској пракси, детаљно испитивање цитотоксичности спроведено је за једињења која су при 50 µМ концентрацији индуковала пад вијабилности ћелија туморских ћелија испод 60%. На основу резултата прелиминарних истраживања (Прилог Б), деривати 56, 5г, 5ђ и 6ђ испунили су постављене критеријуме, на основу чега су даље подвргнути опсежним испитивањима. Добијене IC₅₀ вредности и индекси селективности ових једињења приказани су у Табели 24. Добијени резултати указују да вијабилност ћелија опада са порастом концентрације једињења и временом третмана, при чему је благо одступање од оваквог тренда уочено код једињења 56 након 24 часа (Прилог Б). Поред ћелија канцера, тестирана једињења испољила су одређени степен токсичности и према здравим ћелијама (Табела 24). На основу одређених IC₅₀ вредности може се закључити да испитивана једињења показују умерено до јако цитотоксично дејство, при чему су 5г и 5ђ испољили и селективност према туморским ћелијама. У структурном погледу, једињења **56** и **5**г поседују R⁵-OH групу, чиме се поново истиче бенефитни утицај ових супституената на цитотоксично дејство. Својеврсно одступање од овог тренда представља дериват **6г**, који, супротно очекивањима, није испољио цитотоксичне ефекте. Са друге стране, цитотоксичну активност испољили су деривати **ђ**, што није био случај у другим испитаним серијама хидразонских деривата.

Табела 24. IC₅₀ вредности и индекси селективности новосинтетисаних хидразонских деривата (μ M) за MRC-5 и HCT-116 ћелијске линије након 24 и 72 сата.

	IC50 (HCT116)		IC50 (MI	RC-5)	индекс се	индекс селективности		
	24h	72h	24h	72h	24h	72h		
5б	>500	51,6	>500	44,1	2,0	0,9		
5г	>500	49,2	>500	171,6	1,3	3,5		
5ħ	219,8	183,5	>500	>500	4,5	5,3		
6ђ	103,7	73,9	180,9	70,7	1,7	1,0		

3.4.2. Испитивање редокс параметара у MRC-5 и HCT-116 ћелијама

У студијама које проучавају утицај одређене супстанце на ћелијске модел системе, испитивање цитотоксичности је неретко први корак истраживања. Међутим, важно је истаћи да испољавању цитотоксичног ефекта претходе бројни други процеси, који су последица интеракције ксенобиотика са различитим ћелијским компонентама. Наиме, прва реакција ћелије јесте везивање стране супстанце за глутатион (GSH), што даље иницира додатну синтезу GSH и редукцију GSSG. Поред тога, ксенобиотици могу интераговати и са другим молекулима у ћелији, што често доводи до генерисања слободних радикала. Штавише, настале радикалске врсте могу иницирати читаву каскаду хемијских реакција, што даље може изазвати поремећај редокс статуса ћелије. У условима редокс неравнотеже могу настати различита иреверзибилна оштећења, која неретко доводе до смрти ћелије. Посматрано са овог становишта, цитоксичност је ефекат који наступа тек на крају бројних физичких и хемијских процеса, а који започињу интеракцијом ћелије са одређеном супстанцом. Сходно томе, поред цитотоксичне активности, испитан је и утицај деривата 56, 5г, 5ћ и 6ћ на редокс статус здравих и туморских ћелија. У ове сврхе, одређени су нивои O₂•-, NO₂- и GSH у MRC-5 и HCT-116 ћелијама након третмана са **5б**, **5г**, **5ђ** и **6ђ** (Прилог Б).^[346]

У случају НСТ-116 запажено је да ниво 02^{•-} расте са повећањем концентрације једињења и времена третмана, што се посебно уочава код деривата **56** и **5г**. Умерено повећање садржаја 02^{•-} идентификовано је у случају третмана НСТ-116 ћелија са **6ђ**, док је код **5ђ** значајан пораст нивоа 02^{•-} запажен тек при вишим концентрацијама након 72 часа. Такође, у свим случајевима је идентификовано и повећање нивоа нитрита и глутатиона. Након третмана MRC-5 ћелија са **56**, **5г** и **6ђ** детектован је пораст нивоа 02^{•-} после 72 часа, при чему након 24 сата нису уочене значајне промене. Насупрот томе, дериват **5ђ** није индуковао промене нивоа 02^{•-} у MRC-5 ћелијама. Са друге стране, нивои нитрита расли су са повећањем концентрације и времена у свим случајевима, док је ниво експресије GSH био сличан тренду производње 02^{•-}.

Генерално, добијени резултати указују да испитивана једињења испољавају јаче цитотоксично дејство и селективност према НСТ-116 ћелијама. На основу анализе редокс параметара може се закључити да је овакав исход последица нарушене редокс равнотеже, што се нарочито уочава код НСТ-116 ћелија. Наиме, нивои О₂-- су код НСТ-116 одређени у опсегу од 9 до 100 µМ, односно, од 11 до 58

µМ код здравих MRC-5 ћелија. Ове вредности истичу да се ћелије рака налазе у стању већег оксидативног стреса у поређењу са здравим ћелијама. Слични резултати су добијени и у случају нитрита, чије су концентрације код НСТ-116 одређене у опсегу од 9–70 µМ, односно, 10–48 µМ код MRC-5 ћелија. Такође, уочено је и повећање концентрације GSH након третмана, што практично указује на неопходност његове додатне синтезе. Наиме, GSH је индикатор ћелијског одговора на дејство стресора, односно, што је већа претња реактивних врста интегритету ћелије, већа је и производња GSH. Добијени резултати указују на перспективност испитиваних једињења за будућа истраживања, посебно у области тзв. оксидативне терапије, која се заснива на принципу индукције оксидативног стреса у ћелијама канцера. Овакав ефекат може бити постигнут било појачаном производњом реактивних врста или инхибицијом антиоксидативног система канцерогених ћелија. Познато је да у ћелији рака владају израженији оксидативни услови него у здравој ћелији, што је чини осетљивијом на акутне промене нивоа реактивних врста. Добијени резултати указују да испитивана једињења испољавају цитотоксичност и селективност ка канцерогеним ћелијама највероватније захваљујући управо овим ефектима.

3.5. Антибактеријска активност

Једињења која у својој структури поседују хидразонски фрагмент често испољавају антимикобактеријска својства. Имајући то у виду, у оквиру ове дисертације извршено је *in vitro* испитивање антибактеријске активности новосинтетисаних *N*-ацилхидразона (серије **5** и **6**) према одабраним G⁺ и G⁻ бактеријским сојевима.^[346] Добијене МИК₅₀ вредности испитиваних једињења и референтног антибиотика ванкомицина приказани су у Табели 25.

	МИК50 (mM)			
	Грам-позитивни микроорганизми			
	L. monocytogenes	S. aureus	B. cereus	
једињење				
5a	2,22 ± 0,00	1,66 ± 0,02	1,76 ± 0,00	
5б	0,55 ± 0,01	$0,32 \pm 0,02$	0,44 ± 0,02	
5в	$1,27 \pm 0,01$	$1,16 \pm 0,00$	$0,96 \pm 0,01$	
5г	$0,43 \pm 0,00$	$0,21 \pm 0,00$	$0,21 \pm 0,01$	
5д	$1,52 \pm 0,03$	$1,33 \pm 0,02$	$0,93 \pm 0,01$	
5方	$1,87 \pm 0,02$	$1,31 \pm 0,02$	$1,07 \pm 0,02$	
5e	$0,49 \pm 0,01$	$0,47 \pm 0,01$	$0,41 \pm 0,01$	
5ж	$1,88 \pm 0,03$	$1,51 \pm 0,01$	$1,09 \pm 0,03$	
6a	>5	>5	$0,33 \pm 0,01$	
бг	>5	0,18 ± 0,03	$0,13 \pm 0,01$	
6д	>5	>5	$0,24 \pm 0,02$	
6页	>5	>5	>5	
6e	>5	>5	>5	
бж	>5	>5	>5	
ванкомицин	0,26 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,37 ± 0,00	

Табела 25. Антибактеријска активност хидразона и антибиотика ванкомицина.

	МИК ₅₀ (mM)			
	Грам-негативни микроорганизми			
	Y. enterocolitica	V. parahaemolyticus	E. coli	
једињење				
5a	1,03 ± 0,00	1,13 ± 0,00	1,79 ± 0,01	
5б	$0,18 \pm 0,00$	$0,22 \pm 0,00$	0,32 ± 0,00	
5в	$0,76 \pm 0,00$	$1,00 \pm 0,01$	1,23 ± 0,01	
5г	0,24 ± 0,01	$0,22 \pm 0,01$	0,40 ± 0,01	
5д	0,67 ± 0,03	$1,01 \pm 0,01$	1,73 ± 0,02	
5ħ	0,94 ± 0,02	1,19 ± 0,01	1,74 ± 0,02	
5e	0,33 ± 0,01	$0,41 \pm 0,00$	0,53 ± 0,00	
5ж	1,04 ± 0,03	1,19 ± 0,02	2,10 ± 0,01	
6a	2,75 ± 0,03	4,16 ± 0,00	>5	
6г	$0,12 \pm 0,00$	0,16 ± 0,01	>5	
6д	>5	>5	>5	
6ђ	>5	>5	>5	
6e	>5	>5	>5	
6ж	>5	>5	>5	
ванкомицин	0,37 ± 0,00	$0,02 \pm 0,00$	0,30 ± 0,00	

Табела 25 (наставак). Антибактеријска активност хидразона и антибиотика ванкомицина.

Генерално, антибактеријска активност хидразона зависила је од врсте бактеријског соја, као и од структуре испитиваног једињења. У поређењу са аналозима серије 6, запажено је да једињења 5а-ж испољавају бољу активност и неселективност према тестираним бактеријама, са МИК₅₀ вредностима у опсегу од 2,22-0,18 mM (Табела 25). Важно је нагласити да ова једињења представљају деривате 2,3-дихидроксибензоеве киселине (R¹–OH и R²–OH), која је од раније позната по својим добрим антимикробним својствима. У погледу структуре прстена Б, међу дериватима серије 5 изражену активност испољили су 56, 5г и 5е (0,55-0,18 mM), којима је заједничка карактеристика присуство -OH групе у положају R⁵. Такође, уочено је да је Грам-негативни сој *Y. enterocolitica* најосетљивији на третман са **56**, **5г** и **5е** (МИК₅₀ вредности од 0,18, 0,24 и 0, 33 mM, респективно). Ови резултати су од значаја с обзиром на то да је ванкомицин инхибирао 50% раста ове бактерије при концентрацији од 0,37 mM. Поред тога, дериват **56** показао је добру активност према *S. aureus*, *V. parahaemolvticus* и *E. coli* (МІК₅₀ вредности 0,32, 0,22 и 0,32 mM), док је **5г** испољио најбољу ефикасност према сојевима *S. aureus* и *B. Cereus* (0,21mM). Међу дериватима серије **6** (R¹, R², R³= OH), једињења 6ђ, 6е и 6ж нису испољила антибактеријску активност, док су 6а, 6г и 6д селективно инхибирали раст одређених бактеријских сојева. Наиме, ба и бд испољили су активност према *B. cereus* са МІК₅₀ вредностима од 0,33 и 0,24 mM (Табела 25), што је нешто бољи резултат него код ванкомицина (0,37 mM). Поред тога, уочено је да је дериват **6г** испољио најбољу активност према S. aureus, B. cereus, *Y. enterocolitica* и *V. parahaemolyticus* у односу на све друге тестиране хидразоне. Штавише, 6r се показао ефикаснијим према сојевима S. aureus, B. cereus и Y. enterocolitica од ванкомицина (Табела 25). Генерално посматрано, добијени резултати истичу деривате 56, 5г, 5е и 6г као оне са највећим антибактеријским потенцијалом. Ови деривати поседују R⁵–OH групу на прстену Б, чији се бенефитни утицај на антибактеријску активност нарочито уочава упоређивањем резултата добијених за несупституисане аналоге **5а** и **6а**. У литератури се могу наћи примери структурно сличних хидразонских деривата који такоће поседују антимикобактеријски карактер. Међутим, услед њихове различите функционализације, није могуће извести генералне закључке о утицају појединачних супституената на активност. Оно што се да приметити јесте да хидразони са антимикробном активношћу неретко поседују орто-позициониране супституенте (положај еквивалентан позицији R⁵), као што су -OH, -I и OCH₃. Са друге стране, резултати добијени за дериват **6e** (такође поседује R⁵-OH) имплицирају могућност утицаја других фактора на активност ових деривата.

3.6. In silico интеракције са протеинима вируса SARS-CoV-2

Пиразолонски деривати 8-27 подвргнути су теоријском испитивању њиховог потенцијалног антивирусног деловања према вирусу SARS-CoV-2.^[348] Израчунавањима помоћу молекулског докинга остварен је увид у афинитет везивања и модалитете интеракција пиразолона са релевантним хуманим и вирусним протеинима (Слика 36). Наиме, као потенцијална антивирусна мета разматран је шиљасти (спајк) гликопротеин, који има улогу у везивању вируса за ћелију домаћина. Такође, испитан је и инхибиторни потенцијал пиразолонских деривата према протеинима који учествују у репродукцији вируса, односно, главној протеази М^{рго} и папаину сличној протеази РL_{pro}. Поред тога, истраживања су обухватала и испитивање интеракција пиразолона са хуманим ангиотензинконвертујућим ензим 2 рецептором (АСЕ2), као и са комплексом рецепторвезујућег домена шиљастог протеина (RBD) и АСЕ2.

У циљу комплетнијег сагледавања интеракција пиразолона са одабраним протеинима спроведена је тзв. "blind docking" метода испитивања. Наиме, овај приступ обухвата извођење докинг симулација узимајући у обзир комплетну структуру протеина, што омогућава разматрање различитих позиција везивања и интеракција. Други могући приступ је тзв. "site-specific" метода, којом се специфично испитује везивање лиганда за одређени сегмент протеина, најчешће добро познато и дефинисано активно место. Важно је нагласити да обе стратегије поседују своје предности и недостатке, што умногоме зависи од карактеристика, циљева и околности истраживања. Како је пандемија COVID-а захтевала промптне и ефикасне одговоре на бројне научне непознанице, свеобухватна анализа свих аспеката инфекције била је од велике важности за дефинисање ефикасних стратегија за борбу против вируса SARS-CoV-2. У овом погледу, "blind docking" метода је нарочито погодна када не постоје довољна сазнања о одређеном ензиму, односно, његовом активном месту и стандардним инхибиторима. Иако је поље претраге у докинг симулацијама обухватало целокупну структуру протеина, помоћу CASTp и CHARMM-GUI сервера извршено је предвиђање тзв. активних "џепова" (енгл. active site pocket) протеина (Слика 36). Добијени резултати указали су на добро међусобно слагање ових предиктора. Такође, важно је истаћи да су у докинг симулацијама сви пиразолони били позиционирани унутар предвиђених активних цепова. Израчунате вредности афинитета везивања пиразолона и референтних лекова приказани су на Слици 37, док су модалитети везивања најистакнутијих пиразолонских деривата представљени на Сликама 38 и 39.



Слика 36. Предвиђени активни џепови помоћу *CASTp* (плаве, црвене и зелене површине) и *CHARMM*-GUI сервера (црне тачке): а) спајк протеина; б) главне протеазе М^{pro}; в) папаину сличне протеазе PL_{pro}; г) ACE2 рецептора; д) RDB-ACE2 комплекса.







Слика 38. Модалитети везивања пиразолона са највећим афинитетом и одобрених лекова уз дводимензионални приказ успостављених интеракција са аминокиселинским остацима: а) спајк протеина; б) М^{pro}; в) PL_{pro}.



Слика 39. Модалитети везивања пиразолона са највећим афинитетом и одобрених лекова уз дводимензионални приказ успостављених интеракција са аминокиселинским остацима: а) ACE2 рецептора; б) RBD-ACE2 комплекса.

3.6.1. Шиљасти (спајк) гликопротеин

Генерално посматрано, нижа вредност афинитета везивања (нижа енергија) заправо указује на већи афинитет лиганда за везивање са макромолекулом. Анализом добијених резултата установљено је да деривати 17 (-9,3 kcal/mol) и 16 (-9,0 kcal/mol) поседују највећи афинитет везивања према спајк протеину.^[348] Оба аналога су позиционирана између тримерних хеликса протомерних ланаца А и Ц, успостављајући водоничне веза са различитим аминокиселинама (Слика 38а). У случају ланца А уочено је формирање две водоничне везе, једне између -NH групе пиразолског прстена Б и пептидне карбонилне групе Gln₁₀₃₆ (дужина водоничне везе dHB=2,49 Å), и друге између карбонилне групе пиразолонског прстена А и –NH групе Trp₈₈₆ (dHB=2,12 Å). Истовремено, карбонилна група прстена А формира водоничну везу са Туг₁₀₄₇ ланца Ц, што финално резултује успостављањем трицентричне водоничне везе (Слика 38а). Такође, запажено је и грађење јаке водоничне везе између нитро групе прстена В и пептидне –NH групе His1048 на Ц ланцу (dHB=2,05 Å). На овај начин, деривати **16** и **17** појединачно успостављају по четири водоничне везе са аминокиселинама ланаца А и Ц. Поред грађења конвенционалних водоничних веза, запажено је формирање других нековалентних интеракција (Слика 38а). Наиме, идентификовано је грађење π-донор водоничне везе између индолског фрагмента Trp886 и – ОН групе на прстену Б. Код деривата **17**, ова аминокиселина учествује и у формирању електростатичких π-π интеракција (Тоблик) са п-електронима прстена Б. Такође, успостављање п-п интеракција запажено је између Туг₁₀₄₇ и ароматичног прстена В, као и између Туг₉₀₄ и прстена А. Поред тога, констатовано је и успостављање хидрофобне алкил интеракције између Lys1038 и метил групе на прстену Б. Важно је напоменути да су сви деривати осим трисупституисаних аналога 24-26 заузели исту докинг позицију унутар спајк протеина. С обзиром на то да ови деривати поседују више хидрокси и/или метокси група, овакав исход је највероватније последица волуминозности ових једињења.

Поред пиразолонских деривата, испитивању помоћу молекулског докинга подвргнути су и лекови употребљавани за третман COVID-а, и то ремдесивир, лопинавир, хлорокин и фавипиравир. Међу испитаним лековима, једино је лопинавир (-9,5 kcal/mol) показао већи афинитет везивања ка спајк протеину од деривата **17**. У односу на друге испитане лекове, пиразолонски деривати (осим аналога **21**) су генерално показали већи афинитет везивања ка спајк протеину, нарочито од хлорокина и фавипиравира (Слика 37; Прилог Б).

3.6.2. Главна протеаза – М^{рго}

Као потенцијална мета антивирусног деловања пиразолонских деривата разматрана је и главна протеаза М^{рго} вируса SARS-CoV-2 (Слика 386).^[348] Истраживањима је установљено да је каталитички центар М^{рго} очуван међу различитим корона вирусима. Наиме, највише структурних промена претрпео је спирални домен III, док је каталитички џеп 1 (између домена I и II) остао практично непромењен. Познавајући ове чињенице, рационално је очекивати да једињења која се преферабилно везују за ово активно место могу интераговати са различитим сојевима корона вируса. Симулације помоћу молекулског докинга показале су да се сви пиразолонски деривати преферабилно позиционирају унутар активног џепа 1 (Слика 366 и 386). Међу њима, највећи афинитет везивања према М^{рго} испољили су деривати **11** и **18** (-8,4 и -8,3 kcal/mol, респективно). Анализом лиганд-макромолекул интеракција за најистакнутији дериват **11** идентификовано је формирање четири водоничне везе (Слика 38б). Једна водонична веза успостављена је између – NH групе прстена А и карбонилне групе Glu₁₆₆ (dHB=2,62 Å). Са друге стране, прстен Б учествује у формирању чак три водоничне везе. Наиме, -NH група прстена Б гради водоничну везу са бочним остатком Glu₁₆₆ (dHB=2,61 Å), као и са кисеоником пептидне карбонилне групе Phe₁₄₀ (dHB=2,07 Å). На овај начин долази до успостављања трицентричне 0…H(N)…О водоничне везе (Слика 38б). Поред тога, уочено је и формирање водоничне везе између – NH групе бочног низа His163 и азотовог атома Б прстена. Осим конвенцијалних водоничних веза, констатовано је и грађење једне π-донор водоничне везе између –NH групе Glu₁₆₆ и π-електрона прстена А, као и једне С-Н…О, односно, угљеник-водоничне везе, између α-CH групе Met₁₆₅ и кисеоника карбонилне групе прстена А. Међу одабраним лековима, највећи афинитет везивања према М^{рго} показао је лопинавир (-7,7 kcal/mol) (Прилог Б). У поређењу са лопинавиром, деривати пиразолона испољили су сличан или виши афинитет везивања према М^{рго}. Као и у случају спајк протеина, редоковањем референтних лекова добијене су нешто ниже вредности афинитета везивања у односу на литературне податке (Прилог Б). Међутим, и у овом случају, једињења 11 и 18 испољила су већи афинитет везивања у односу на референтне лекове.

3.6.3. Папаину слична протеаза - PLpro

Активни џеп 3 идентификован је као преферабилно место везивања пиразолонских деривата за папаину сличну протеазу PLpro (Слика 38в).^[348] Највећи афинитет везивања испољио је дериват **19** (-7,7 kcal/mol), док су нешто ниже вредности добијене за једињења **10**, **12** и **16** (-7,6 kcal/mol). Анализом модалитета везивања деривата 19 идентификовано је формирање различитих типова интеракција са PLpro (Слика 38в). Формирање водоничне везе идентификовано је између бочног ланца Thr₃₀₁ и –NH групе прстена А (dHB=2,58 Å), као и између пептидне карбонилне групе Asn₂₆₇ и –OH групе прстена Б (dHB=2,25 Å). Поред тога, Asn₂₆₇ учествује у успостављању амидне-π стекинг интеракције са прстеном В. Такође, преко бочног ланца Asp₁₆₄ успостављене су две π-анјон интеракције са прстеновима А и Б. Са друге стране, уочено је и формирање хидрофобних алкил интеракција Pro247 и Pro248 са метил групама прстена А. Пред тога, Pro248 успоставља две π-алкил интеракције са прстеновима А и В, при чему на исти начин интерагује и Leu₁₆₂ са прстеном Б. У поређењу са референтним лековима, сви пиразолони испољили су већи афинитет везивања од хлорокина и фавипиравира, при чему се једињења **10**, **12**, **16** и **19** ефикасније везују за PL_{pro} од лопинавира (-7,5 kcal/mol) и ремдесивира (-7,4 kcal/mol) (Прилог Б).

3.6.4. Хумани ангиотензин-конвертујући ензим 2 – АСЕ2

Поред протеина вируса SARS-CoV-2, испитан је и афинитет везивања пиразолонских деривата према хуманим ACE2 рецепторима.^[348] Сврха ових истраживања лежи у чињеници да се везивање вируса за ћелију домаћина одвија интеракцијом спајк протеина са екстрацелуларним доменима ACE2 рецептора, те да се ометањем ових процеса може спречити ширење вирусне инфекције. На основу добијених резултата установљено је да дериват **16** (-9,9 kcal/mol) поседује највећи афинитет везивања према ACE2 рецептору (Слика 37; Прилог Б). Анализом интеракција деривата **16** са ACE2 идентификовано је успостављање чак седам водоничних веза (Слика 39а). Наиме, нитро група прстена В учествује у формирању четири појединачне, односно, две трицентричне водоничне везе са ACE2. У овом случају, један од кисеоника нитро групе формира водоничне везе са бочним низовима His₃₄₅ (dHB=2,56 Å) и His₅₀₅ (dHB=2,74 Å), док други кисеоник успоставља исту интеракцију са His₅₀₅ (dHB=2,98 Å) и Arg₂₇₃ (dHB=1,98 Å) (Слика 39а). Поред тога, у грађењу две водоничне везе учествује и Thr₃₇₁, и то са –OH групом прстена Б (dHB=2,59 Å) и кисеоником карбонилне групе прстена A (dHB=2,37 Å). Такође, настанак водоничне везе уочен је и између Glu₄₀₆ и –NH групе прстена A (dHB=2,30 Å). Са друге стране, констатовано је и успостављање електростатичких и хидрофобних интеракција (Слика 39а): п-анјон (Glu406–прстен A), п-катјон (Arg₅₁₈–прстен B), п-т стекинг (Phe₂₇₄–прстен Б), п-т Тоблик (His₃₇₄–прстен B), п-сигма (Phe₂₇₄–метил група прстена Б) и п-алкил (Leu₃₇₀–прстен A, Phe₂₇₄–метил група прстена A). У поређењу са пиразолонским дериватима, лопинавир (-11,2 kcal/mol) и ремдесивир (-10,8 kcal/mol) испољили су већи афинитет везивања према ACE2, док су афинитети хлорокина и фавипиравира значајно нижи (-7,2 и -5,8 kcal/mol) (Слика 37, Прилог Б).

3.6.5. Комплекс рецептор-везујућег домена спајк протеина (RBD) и ангиотензин-конвертујућег ензима 2 (ACE2) – RBD-ACE2

Рецептор-везујући домен (*RBD*) представља део S1 протомера спајк протеина који има улогу препознавања и везивања за АСЕ2 рецептор. Молекулским докингом испитани су модалитети интеракција пиразолона и референтних лекова са RBD-ACE2 комплексом, при чему су највећи афинитет везивања (-8,9 kcal/mol) испољили деривати 16, 19 и 22 (Слика 37; Прилог Б).^[348] Ова једињења заузела су исту позицију у RBD-ACE2 комплексу, што је резултовало формирањем три идентичне водоничне везе са прстеном А ових аналога, и то између: Алаз96 и -NH групе (dHB=2,30, 2,36 и 2,36 Å, респективно), пептидне карбонилне групе Lys562 и друге – NH групе (dHB=2,24, 2,13 и 2,27 Å, респективно) и пептидне –NH групе Trp566 и карбонилне групе (dHB=2,15, 2,15 и 2,10 Å, респективно) (Слика 39б). Такође, запажено је и грађење водоничних веза преко –ОН група на прстену Б, и то са Gly205 (dHB=2,26 Å), Asp₂₀₆ (dHB=2,22 Å), и Glu₂₀₈ (dHB=2,27 Å), респективно. Услед различите супституције ових аналога, запажено је и формирање додатних водоничних веза. У случају деривата 16, водонична веза је успостављена између Asn210 и нитро групе (dHB=2,36 Å), док је код 22 формирана између –OH групе прстена В и Glu₂₀₈ (dHB=1,86 Å). Такође, код сва три једињења уочено је и постојање π-водоничне везе између прстена В и Asn₂₁₀. Поред тога, једињења **16**, **19** и **22** су са RBD-ACE2 комплексом остварила и бројне електростатичке и хидрофобне интеракције. Наиме, сва три деривата остварила су π-катјон, π-алкил и алкил интеракције са Lys₅₆₂, π-сигма и алкил са Leu₉₅, као и π-алкил интеракције са Pro₅₆₅ и Val209 (Слика 39б).

3.7. In silico ADMET анализа

Сви деривати пиразолона, као и новодобијена хидразонска једињења, подвргнути су *in silico* испитивању физичко-хемијских, фармакокинетичких, токсиколошких и других карактеристика којима се описују тзв. "*drug-like*" особине неког испитиваног једињења.^[346,348] Уопштено говорећи, ADMET анализа представља саставни сегмент истраживања нових лекова, на основу којег се остварује увид у перспективност, безбедност, па и ефикасност њихове потенцијалне примене. Наиме, добар кандидат мора задовољити одређене критеријуме, што се процењује анализом различитих параметара који описују његово понашање у организму, тј. апсорпцију, дистрибуцију, метаболизам, екскрецију и токсиколошке ефекте (ADMET профил). У овом погледу, термином "drug-like" означавају се једињења која поседују својства слична карактеристикама које поседују лекови, као што су добра апсорпција, ефикасна дистрибуција до места деловања и ниска токсичност. Једна од генералних смерница за препознавање таквог једињења јесте Липинскијево правило, познато и као "правило од 5" (енгл. Lipinski's rule; rule of five), које се у начелу односи на кандидате за оралну примену. Према овим мерилима, биоактивно једињење не би смело поседовати више од пет донора и десет акцептора водоничне везе, као ни молекулску масу већу од петсто далтона. Такође, важан параметар јесте и растворљивост у води, односно, липофилност једињења, при чему је повољно да вредност логаритма коефицијента расподеле октанол/вода (Log Po/w) буде мања од 5. У суштини, ова "правила" заснована су на запажању да су већина оралних лекова заправо релативно мали молекули са умереном липофилношћу. Поред Липинскијевих смерница, познати су и критеријуми (енгл. Ghose Rule, Vebers rule, Egan rule, Muegge Rule) који разматрају и друге параметре, као што су број и врста атома, број ротабилних веза, поларна површина и рефракција молекула.

In silico испитивање ADMET профила пиразолона и хидразона извршено је помоћу *SwissADME* и *pkCSM* онлајн сервера. Ови алати користе различите теоријске моделе за израчунавање бројних релевантних дескриптора за свако појединачно једињење. Коришћени програми представљају добијене резултате у графичкој или табеларној форми, као нумеричку вредност одређеног параметра, описни или категорички одговор (да или не) на посматрано својство. Добијени подаци растумачени су на основу приложеног упутства и референтних вредности за сваки појединачни параметар. Поред ових програма, коришћен је и сервис SwissTaraetPrediction. коіи врши генерално предвиђање биоактивности испитиваних једињења и потенцијалних мета деловања. Сви резултати доступни су у додатним материјалима објављених радова.^[346,348]

3.7.1. ADMET профил пиразолона

Први резултати ADMET испитивања пружили су увид у којој мери пиразолонски деривати испуњавају критеријуме за оралну примену, односно Липинскијева и друга допунска правила. Анализом добијених резултата установљено је да практично сви пиразолонски деривати генерално испуњавају задате предуслове, уз нека минорна одступања.^[348] Такође, релевантне особине пиразолона су јасно приказане помоћу SwissADME радара биодоступности, који обједињују оптималне карактеристике за њихову добру апсорпцију. На основу ових графика запажено је да пиразолони генерално поседују добре карактеристике, с тим да су примећене минорне девијације у погледу поларности и незасићености молекула. На основу израчунатих вредности Log P_{0/w} утврђено је да сви деривати испуњавају критеријум липофилности, а такође су окарактерисани као растворни или умерено растворни у води. Поред тога, SwissADME BOILED-Egg модел предвидео је високу гастроинтестиналну апсорпцију скоро свих пиразолонских деривата. Са друге стране, *pkCSM* је степен апсорпције представио у процентуалном облику, при чему је на нивоу свих испитиваних једињења израчунат у опсегу од 61,5-76,5%. Додатно, разматрана је и интеракција пиразолона са Р-гликопротеином, АТР транспортером који утиче на концентрацију лека у плазми и ткивима. Наиме, супстрати овог протеина се могу понашати као његови инхибитори или индуктори, при чему инхибиција повећава биодоступност лека, док је индукција смањује. На основу *SwissADME* предвиђања, већина једињења није идентификована као супстрат Р-гликопротеина, док су у резултатима *pkCSM* сви пиразолони окарактерисани као супстрати овог транспортера.

У оквиру предвиђања дистрибуције лека у организму, израчунат је волумен дистрибуције (VDss) за свако испитивано једињење. Овај параметар представља меру расподеле лека између плазме и ткива, при чему већа вредност указује на потребу примене веће дозе лека за постизање одређене концентрације у плазми. У оквиру *pkCSM* испитивања, вредности волумена дистрибуције израчунате су у опсегу од -0,2 до 0,8 (референтна скала -0,15<VDss<0,45). Такође, познато је да у крвној плазми лекови егзистирају у слободној форми, а такође и везаном облику са серумским протеинима. Наиме, што је већа фракција лека у везаном облику, мања је ефикасност његове дистрибуције у организму. У оквиру *pkCSM* израчунавања предвиђене су вредности слободне фракције пиразолонских деривата, и то у опсегу од 0,17–0,31. Такође, испитана је и способност пермеабилности пиразолонских деривата кроз крвно-мождану баријеру, што је од нарочите важности при разматрању могућих нежељених дејстава и токсичних ефеката. Добијени резултати *SwissADME* и *pkCSM* израчунавања истичу да испитивана једињења не поседују способност проласка кроз крвно-мождану баријеру.

Испитивање метаболизма пиразолонских деривата превасходно је обухватало могућност њихове интеракције са цитохром Р450 фамилијом ензима, међу којима су као кључне изоформе посебно препознате СҮРЗА4 и СҮР2D6. С обзиром на то да ови ензими имају улогу у метаболичким трансформацијама и елиминацији лекова, њихова инхибиција довела би до настанка различитих нежељених ефеката. На основу *SwissADME* резултата, једино је дериват **26** препознат као могући инхибитор СҮРЗА4, док према СҮР2D6 није запажена инхибиторна активност. У оквиру испитивања параметара екскреције, израчунате су вредности логаритма укупног клиренса пиразолонских деривата (log ml⁻¹×min⁻¹×kg⁻¹) у опсегу од -0,004 до 0,514, а такође је запажено да испитивана једињења нису окарактерисана као супстрати ОСТ2 транспортера.

Потенцијални токсични ефекти пиразолонских једињења испитани су помоћу *pkCSM* и *ProTox-II* онлајн софтвера. У оквиру *pkCSM* испитивања добијени су категорички резултати везани за предвиђање понашања пиразолона у различитим тестовима или за могућност испољавања одређених ефеката (AMES тест, мутагеност, инхибиција hERG ензима, хепатотоксичност, промене на кожи, токсичност према T. Pyriformis, итд.). Наиме, већина једињења означена је нетоксичним у AMES тестовима, при чему је неколико једињења сврстано и међу потенцијалне инхибиторе *hERG* II ензима. Уопштено посматрано, добијени резултати истичу генералну нетоксичност пиразолонских деривата. Поред тога, израчунате су и нумеричке вредности максимално толерантне дозе код људи (3,1-7,2 mg/по килограму/по дану), као и акутне токсичности (2,55–2,75 mol×kg⁻¹) и хроничне токсичности код пацова (1,28-3,31 log mg по килограму/по дану). Са друге стране, израчунавања помоћу ProTox-II програма обухватала су процену леталне дозе (класа 4, $LD_{50} = 800 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$), хепатотоксичности, карциногености, имунотоксичности, мутагености, цитотоксичности, као и разматрање сигналних путева и механизама одговора на дејство стресора. Важно је нагласити да је већина ових категорија означено инактивним. Са друге стране, хепатотоксичност пиразолона предвиђена је у оквиру просечних вредности за посматрану класу једињења. Такође, канцерогени потенцијал запажен је код половине испитиваних деривата, док је мутагени потенцијал уочен у неколико случајева.

Уопштено, на основу ADMET анализе може се закључити да деривати пиразолона поседују добре "drug-like" особине, растворљивост, липофилност и гастроинтестиналну апсорпцију. Поред тога, идентификовано је да пиразолони не могу проћи крвно-мождану баријеру, нити испољити инхибиторне особине према ензимима цитохрома, што су важне карактеристике у погледу избегавања нежељених дејстава. Такође, за већину токсиколошких параметара добијени су добри резултати. На основу предвиђања *SwissTargetPrediction* сервиса, ензими киназе, протеазе, оксидоредуктазе и Г-протеин спрегнути рецептори означени су као потенцијалне мете деловања пиразолонских деривата.

3.7.2. ADMET профил N-ацилхидразона

Израчунавањима помоћу SwissADME и pkCSM онлајн алата испитан је ADMET профил новосинтетисаних хидразонских деривата серије 5 и 6.[346] Анализом добијених резултата констатовано је да сва једињења серије 5, као и дериват 6а, испуњавају критеријуме Липинскијевих и других правила, при чему су за остале деривате серије 6 уочена минорна одступања. Такође, на основу SwissADME радара биодоступности установљено је да хидразони углавном испуњавају критеријуме за апсорпцију, осим у погледу поларности и незасићености молекула. За све деривате, осим за 6е и 6ж, установљен је висок степен гастроинтестиналне апсорпције, са израчунатим вредностима у опсегу од 48-91%. Такође, SwissADME и pkCSM предвиђају да испитивани хидразони не могу проћи кроз крвно-мождану баријеру нити утицати на централни нервни систем. Ниједан дериват није окарактерисан као инхибитор CYP2C19, CYP2D6, и CYP3A4 ензима из цитохром фамилије, нити као супстрат ОСТ2 транспортера. Вредност логаритма укупног клиренса испитиваних хидразона израчунат је у опсегу од 0,118-0,695. На основу предвиђања токсичности констатовано је да ови деривати поседују задовољавајући токсиколошки профил. Наиме, већина деривата окарактерисана је нетоксичним у AMES тестовима, при чему није идентификована инхибиторна активност према *hERG* ензимима. Такође, није детектован хепатотоксични потенцијал хидразонских деривата, као ни потенцијал изазивања промена на кожи. Логаритам максимално толерантне дозе за људски организам одређен је у опсегу од 1–5 mg/по килограму/по дану, при чему је установљено да хидразони могу испољити токсичне ефекте према T. Pyriformis. У погледу потенцијалних биолошких мета, SwissTargetPrediction сервис предвидео је могуће дејство хидразона на различите типове киназа, лиаза, оксидоредуктаза и фосфодиестераза.

4. ЗАКЉУЧАК

У оквиру ове докторске дисертације успешно је извршена синтеза, карактеризација испитивање биолошких особина различито И функционализованих хидразонских и пиразолонских деривата. Кондензацијом ароматичних алдехида са хидразидима ароматичних карбоксилних киселина синтетисано је и изоловано педесет и четири *N*-ацилхидразона у оквиру седам производних серија. Такође, реакцијама 5-метил-2,4-дихидро-3*Н*-пиразол-3-она са различито супституисаним ароматичним алдехидима добијена је колекција од двадесет пиразолонских аналога. Применом наведених методолошких приступа добијено је укупно седамдесет и четири производа, при чему деветнаест деривата представљају новосинтетисана једињења. Структуре добијених производа потврђене су имплементацијом експерименталних спектро(фото)метријских техника (NMR, IR, UV-Vis) и метода теорије функционала густине (DFT), при чему је за новодобијена једињења одређена тачка топљења и елементални састав. Поред тога, кристална структура једног пиразолонског деривата потврђена је и рендгенском структурном анализом.

Имајући на уму раскошан и разноврстан биоактивни потенцијал *N*ацилхидразона и фенолних једињења, биолошка испитивања обухватала су процену антиоксидативних, цитотоксичних и антибактеријских својстава синтетисаних производа. У погледу антиоксидативног деловања, испитане су интеракције хидразона са DPPH радикалом, при чему је установљено да тридесет и четири аналога испољава антирадикалско дејство. Генерално, активност испитиваних хидразона зависила је од функционализације ароматичних фрагмената А и Б, при чему су изражено антирадикалско деловање манифестовали деривати са диметокси фенолним, ванилинским, катехолским и пирогалолским структурним мотивима. Експериментални резултати су додатно образложени и поткрепљени теоријским израчунавањима опсежним различитих термодинамичких дескриптора, на основу којих је остварен vвид v антиоксидативну способност хидразона, као и потенцијал појединачних група за антирадикалско деловање. Поред тога, детаљном in silico анализом антирадикалских механизама утврђено је да преферабилни пут инактивације слободних радикала зависи, како од карактеристика реактивне врсте, тако и од реакционог медијума. Генерално, на нивоу свих испитаних околности процењено је да хидразони највероватније испољавају антирадикалску активност преко НАТ или SPLET механизма.

Испитивање цитотоксичних ефеката хидразонских деривата спроведено је на MRC-5 и HCT-116 ћелијским линијама, при чему је идентификовано двадесет шест једињења која индукују смањење вијабилности ћелија. На основу одређених IC₅₀ вредности установљено је да поједини хидразони испољавају селективно дејство према ћелијама рака, што се приписује повољној функционализацији прстена Б, конкретно присуству R⁵–OH групе. Такође, испитивањем утицаја новосинтетисаних деривата на редокс статус испитаних ћелија констатовано је да ова једињења највероватније испољавају цитотоксичност нарушавањем редокс равнотеже, што се нарочито уочава код HCT-116 ћелија.

На основу одређених МИК₅₀ вредности констатовано је да већина новосинтетисаних хидразона испољава значајну активност према одабраним G⁺ и G⁻ бактеријским сојевима. Генерално, и у овим испитивањима је запажено да активност зависи од врсте бактеријског соја и структуре испитиваног једињења. У структурном погледу, изражену активност испољили су деривати 2,3дихидроксибензоеве киселине, а нарочито они деривати који поседују R⁵–OH групу на прстену Б.

На основу резултата *in silico* испитивања ADMET профила, констатовано је да новосинтетисани хидразони генерално испуњавају већину критеријума којима се процењује перспективност, безбедност и ефикасност потенцијалне примене као лека.

Са друге стране, испитивањем *in vitro* антиоксидативне активности синтетисаних пиразолона установљено је да практично сви деривати поседују одличну способност инактивације DPPH радикала. Такође, констатован је утицај броја, врсте и природе супституената прстена В на активност пиразолона, при чему су најизраженије антирадикалско дејство испољили деривати са катехолским структурним мотивом. Резултати теоријских испитивања потврдили су повољан антиоксидативни профил пиразолонских деривата, превасходно прстенова А и В. Такође, *in silico* испитивањем констатовано је да пиразолони врше неутрализацију радикалских врста преко НАТ или SPLET реакционих путева, при чему предоминантност одређеног механизма зависи од реакционог медијума, испитиваног једињења и радикалске врсте.

In silico испитивањем интеракција пиразолонских деривата са одабраним хуманим и SARS-CoV-2 протеинима, констатован је генерално повољан афинитет везивања пиразолона према спајк протеину, главној протеази, папаину сличној протеази и ACE2 рецепторима. Уопштено, највећи афинитет и најповољније модалитете интеракција испољили су деривати са нитро, хидрокси и метил групама у позицијама R² и R³. Поред тога, резултати *in silico* испитивања ADMET профила истичу да пиразолони генерално поседују добре *drug-like*" особине, као и потенцијал деловања према другим различитим протеинским метама.

5. ЛИТЕРАТУРА

- [1] R. Huisgen, *Angew Chem Int Ed Engl* **1986**, 25, 297–311.
- [2] I. Fechete, *C R Chim* **2016**, 19, 1143–1149.
- [3] H. Kunz, Angew Chem Int Ed Engl **2002**, 41, 4439–4451.
- [4] H. Grünewald, *Angew Chem* **1968**, 80, 52–52.
- [5] E. Fischer, Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **1875**, 8, 589–594.
- [6] G. B. Kauffman, R. P. Ciula, *J Chem Educ* **1977**, 54, 295.
- [7] T. Curtius, Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **1887**, 20, 1632–1634.
- [8] C. A. L. de Bruyn, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **1895**, 14, 85–88.
- [9] E. Fischer, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1894**, 27, 2486–2492.
- [10] J. Wahbeh, S. Milkowski, *SLAS Technol* **2019**, 24, 161–168.
- [11] G. Le Goff, J. Ouazzani, *Bioorg Med Chem* **2014**, 22, 6529–6544.
- [12] C. C. Nawrat, C. J. Moody, *Nat Prod Rep* **2011**, 28, 1426.
- [13] M. Khalid, A. Ali, S. Asim, M. N. Tahir, M. U. Khan, L. C. Curcino Vieira, A. F. de la Torre, M. Usman, *J Phys Chem Solids* **2021**, 148, 109679.
- [14] M. S. Abdelfattah, K. Toume, M. A. Arai, H. Masu, M. Ishibashi, *Tetrahedron Lett* **2012**, 53, 3346–3348.
- [15] M. S. Abdelfattah, K. Toume, M. Ishibashi, J Antibiot (Tokyo) **2012**, 65, 245–248.
- [16] M. Ito, N. Sakai, K. Ito, F. Mizobe, K. Hanada, K. Mizoue, R. Bhandari, T. Eguchi, K. Kakinuma, *J Antibiot* (Tokyo) **1999**, 52, 224–230.
- [17] R. Kileci-Ksoll, C. Winklhofer, W. Steglich, Synthesis (Stuttg) 2010, 2010, 2287– 2291.
- [18] I. C. Piña, J. T. Gautschi, G.-Y.-S. Wang, M. L. Sanders, F. J. Schmitz, D. France, S. Cornell-Kennon, L. C. Sambucetti, S. W. Remiszewski, L. B. Perez, K. W. Bair, P. Crews, J Org Chem 2003, 68, 3866–3873.
- [19] D. H. Miles, V. Chittawong, P. A. Hedin, U. Kokpol, *Phytochemistry* **1993**, 32, 1427– 1429.
- [20] D. Sadhukhan, M. Maiti, A. Bauzá, A. Frontera, E. Garribba, C. J. Gomez-García, *Inorganica Chim Acta* **2019**, 484, 95–103.
- [21] L.-I. Socea, S.-F. Barbuceanu, E. M. Pahontu, A.-C. Dumitru, G. M. Nitulescu, R. C. Sfetea, T.-V. Apostol, *Molecules* **2022**, 27, 8719.
- [22] M. A. Shah, A. Uddin, M. R. Shah, I. Ali, R. Ullah, P. A. Hannan, H. Hussain, *Molecules* **2022**, 27, 6770.
- [23] G. Verma, A. Marella, M. Shaquiquzzaman, M. Akhtar, M. Ali, M. Alam, *J Pharm Bioallied Sci* **2014**, 6, 69.
- [24] N. P. Belskaya, W. Dehaen, V. A. Bakulev, Arkivoc 2010, 2010, 275–332.
- [25] A. Ali, M. Khalid, M. A. Rehman, F. Anwar, H. Zain-Ul-Aabidin, M. N. Akhtar, M. U. Khan, A. A. C. Braga, M. A. Assiri, M. Imran, *ACS Omega* **2020**, *5*, 18907–18918.
- [26] X. Su, I. Aprahamian, *Chem Soc Rev* **2014**, 43, 1963.
- [27] M. Jabeen, *JOTCSA* **2022**, 9, 663–698.
- [28] S. Rollas, S. G. Küçükgüzel, *Molecules* **2007**, 12, 1910–1939.
- [29] S. N. Mali, B. R. Thorat, D. R. Gupta, A. Pandey, in *The 2nd International Electronic Conference on Applied Sciences*, MDPI, Basel Switzerland, **2021**, p. 21.
- [30] J. de Oliveira Carneiro Brum, T. C. C. França, S. R. LaPlante, J. D. F. Villar, *Mini-Rev Med Chem* **2020**, 20, 342–368.
- [31] A. P. Araujo de Oliveira, C. A. Wegermann, A. M. D. C. Ferreira, *Front Chem Biol* **2024**, 3, 1400642.
- [32] R. Munir, N. Javid, M. Zia-ur-Rehman, M. Zaheer, R. Huma, A. Roohi, M. M. Athar, *Molecules* **2021**, 26, 4908.

- [33] S. Thota, D. A. Rodrigues, P. de S. M. Pinheiro, L. M. Lima, C. A. M. Fraga, E. J. Barreiro, *Bioorg Med Chem Lett* **2018**, 28, 2797–2806.
- [34] F. R. Japp, F. Klingemann, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1887**, 20, 2942–2944.
- [35] W. Hao, S. Gao, H. Cui, D. Ding, S. Jiang, C. Zhang, Y. Ji, G. Zhang, *J Org Chem* **2024**, 89, 2605–2621.
- [36] Q. Liang, S. Gao, W. Hao, G. Zhang, *J Org Chem* **2024**, 89, 8537–8545.
- [37] A. Sharma, P. Jamwal, H. Vaid, R. Gurubrahamam, *Org Lett* **2023**, 25, 1889–1894.
- [38] D. P. Zimin, D. V. Dar'In, V. A. Rassadin, V. Y. Kukushkin, *Org Lett* **2018**, 20, 4880–4884.
- [39] U. K. Das, Y. Ben-David, Y. Diskin-Posner, D. Milstein, *Angew Chem* **2018**, 130, 2201–2204.
- [40] F. Li, C. Sun, N. Wang, *J Org Chem* **2014**, 79, 8031–8039.
- [41] I. Yavari, S. Shaabanzadeh, J Org Chem **2022**, 87, 15077–15085.
- [42] M. G. Kallitsakis, P. D. Tancini, M. Dixit, G. Mpourmpakis, I. N. Lykakis, *J Org Chem* **2018**, 83, 1176–1184.
- [43] L. Di Terlizzi, L. Nicchio, C. Callegari, S. Scaringi, L. Neuville, M. Fagnoni, S. Protti, G. Masson, *Org Lett* **2023**, 25, 9047–9052.
- [44] I. C. Barrett, J. D. Langille, M. A. Kerr, J Org Chem 2000, 65, 6268–6269.
- [45] Y. Lv, J. Meng, C. Li, X. Wang, Y. Ye, K. Sun, *Adv Synth Catal* **2021**, 363, 5235–5265.
- [46] M. Latrache, N. Hoffmann, *Chem Soc Rev* **2021**, 50, 7418–7435.
- [47] S. Dadiboyena, A. Nefzi, *Eur J Med Chem* **2011**, 46, 5258–5275.
- [48] M. de Gracia Retamosa, E. Matador, D. Monge, J. M. Lassaletta, R. Fernández, *Chem Eur J* **2016**, 22, 13430–13445.
- [49] P. Majumdar, A. Pati, M. Patra, R. K. Behera, A. K. Behera, *Chem Rev* **2014**, 114, 2942–2977.
- [50] X. Liu, Y. Zhou, Q. Song, *ChemComm* **2019**, 55, 8943–8946.
- [51] U. Mäeorg, S. Tšupova, *Heterocycles* **2014**, 88, 129.
- [52] M. Sugiura, S. Kobayashi, *Angew Chem Int Ed Engl* **2005**, 44, 5176–5186.
- [53] N. P. Belskaya, A. I. Eliseeva, V. A. Bakulev, *Russ Chem Rev* **2015**, 84, 1226–1257.
- [54] N. Bushby, C. J. Moody, D. A. Riddick, I. R. Waldron, *J Chem Soc Perkin 1* **2001**, 1, 2183–2193.
- [55] M. A. Shareef, G. P. Devi, S. Rani Routhu, C. G. Kumar, A. Kamal, B. N. Babu, *RSC Med Chem* **2020**, 11, 1178–1184.
- [56] S. Şenkardeş, N. Kaushik-Basu, İ. Durmaz, D. Manvar, A. Basu, R. Atalay, Ş. G. Küçükgüzel, *Eur J Med Chem* **2016**, 108, 301–308.
- [57] X. Li, S. Li, G. Lu, D. Wang, K. Liu, X. Qian, W. Xue, F. Meng, *Bioorg Chem* **2020**, 103, 104189.
- [58] S. Khan, M. Tariq, M. Ashraf, S. Abdullah, M. al-Rashida, M. Khalid, P. Taslimi, M. Fatima, R. Zafar, Z. Shafiq, *Bioorg Chem* **2020**, 102, 104082.
- [59] S. Tiwari, S. Kirar, U. C. Banerjee, K. B. Neerupudi, S. Singh, A. A. Wani, P. V Bharatam, I. P. Singh, *Bioorg Chem* **2020**, 99, 103787.
- [60] Y. Q. Hu, S. Zhang, F. Zhao, C. Gao, L. S. Feng, Z. S. Lv, Z. Xu, X. Wu, *Eur J Med Chem* **2017**, 133, 255–267.
- [61] E. G. Sampiron, G. F. Costacurta, V. P. Baldin, A. L. Almeida, A. L. Ieque, N. C. S. Santos,
 V. G. Alves-Olher, F. Vandresen, A. C. R. Gimenes, V. L. D. Siqueira, K. R. Caleffi-Ferracioli, R. F. Cardoso, R. B. L. Scodro, *Future Microbiol* 2019, 14, 981–994.
- [62] A. Yadav, C. P. Kaushik, M. Kumar, *J Mol Struct* **2023**, 1283, 135163.

- [63] Ł. Popiołek, A. Biernasiuk, A. Berecka, A. Gumieniczek, A. Malm, M. Wujec, *Chem Biol Drug Des* **2018**, 91, 915–923.
- [64] Ł. Popiołek, K. Tuszyńska, A. Biernasiuk, *Biomed Pharmacother* **2022**, 153, 113302.
- [65] Ł. Popiołek, B. Rysz, A. Biernasiuk, M. Wujec, *Chem Biol Drug Des* **2020**, 95, 260–269.
- [66] M. Demurtas, A. Baldisserotto, I. Lampronti, D. Moi, G. Balboni, S. Pacifico, S. Vertuani, S. Manfredini, V. Onnis, *Bioorg Chem* **2019**, 85, 568–576.
- [67] A. Baldisserotto, M. Demurtas, I. Lampronti, D. Moi, G. Balboni, S. Vertuani, S. Manfredini, V. Onnis, *Eur J Med Chem* **2018**, 156, 118–125.
- [68] C. Vanucci-Bacqué, C. Camare, C. Carayon, C. Bernis, M. Baltas, A. Nègre-Salvayre, F. Bedos-Belval, *Bioorg Med Chem* **2016**, 24, 3571–3578.
- [69] C. Vanucci-Bacqué, C. Carayon, C. Bernis, C. Camare, A. Nègre-Salvayre, F. Bedos-Belval, M. Baltas, *Bioorg Med Chem* **2014**, 22, 4269–4276.
- [70] S. M. Abou-Seri, A. A. M. Eissa, M. G. M. Behery, F. A. Omar, *Bioorg Chem* 2021, 116, 105334.
- [71] L. Guo, X. Chen, W. Chen, Q. Ma, W. Fan, J. Zhang, B. Dai, *Bioorg Chem* **2020**, 96, 103612.
- [72] N. Ribeiro, I. Correia, *Front Chem Biol* **2024**, 3, 1398873.
- [73] T. Nasr, S. Bondock, M. Youns, *Eur J Med Chem* **2014**, 76, 539–548.
- [74] M. İ. Han, P. Atalay, C. Ü. Tunç, G. Ünal, S. Dayan, Ö. Aydın, Ş. G. Küçükgüzel, *Bioorg Med Chem* **2021**, 37, 116097.
- [75] V. Gorantla, R. Gundla, S. S. Jadav, S. R. Anugu, J. Chimakurthy, S. K. Nidasanametla, R. Korupolu, *New J Chem* **2017**, 41, 13516–13532.
- [76] M. A. Ragab, W. M. Eldehna, A. Nocentini, A. Bonardi, H. E. Okda, B. Elgendy, T. S. Ibrahim, M. M. Abd-Alhaseeb, P. Gratteri, C. T. Supuran, A. A. Al-Karmalawy, M. Elagawany, *Eur J Med Chem* **2023**, 250, 115180.
- [77] M. Asif, A. Husain, *J Appl Chem* **2013**, 2013, 1–7.
- [78] T. De Melo, R. Chelucci, M. Pires, L. Dutra, K. Barbieri, P. Bosquesi, G. Trossini, M. Chung, J. Dos Santos, *Int J Mol Sci* **2014**, 15, 5821–5837.
- [79] K. Vasantha, G. Basavarajaswamy, M. Vaishali Rai, P. Boja, V. R. Pai, N. Shruthi, M. Bhat, *Bioorg Med Chem Lett* **2015**, 25, 1420–1426.
- [80] M. Fan, W. Yang, L. Liu, Z. Peng, Y. He, G. Wang, Bioorg Chem **2023**, 132, 106384.
- [81] N. Shayegan, S. Haghipour, N. Tanideh, A. Moazzam, S. Mojtabavi, M. A. Faramarzi, C. Irajie, S. Parizad, S. Ansari, B. Larijani, S. Hosseini, A. Iraji, M. Mahdavi, *Sci Rep* 2023, 13, 6304.
- [82] S. Imran, M. Taha, N. H. Ismail, S. M. Kashif, F. Rahim, W. Jamil, M. Hariono, M. Yusuf, H. Wahab, *Eur J Med Chem* **2015**, 105, 156–170.
- [83] P. Vicini, M. Incerti, P. La Colla, R. Loddo, *Eur J Med Chem* **2009**, 44, 1801–1807.
- [84] F. P. Dias Viegas, M. de Freitas Silva, M. Divino da Rocha, M. R. Castelli, M. M. Riquiel, R. P. Machado, S. M. Vaz, L. M. Simões de Lima, K. C. Mancini, P. C. Marques de Oliveira, É. P. Morais, V. S. Gontijo, F. M. R. da Silva, D. D'Alincourt da Fonseca Peçanha, N. G. Castro, G. A. Neves, A. Giusti-Paiva, F. C. Vilela, L. Orlandi, I. Camps, M. P. Veloso, L. F. Leomil Coelho, M. Ionta, G. Á. Ferreira-Silva, R. M. Pereira, L. E. Dardenne, I. A. Guedes, W. de Oliveira Carneiro Junior, P. M. Quaglio Bellozi, A. C. Pinheiro de Oliveira, F. F. Ferreira, L. Pruccoli, A. Tarozzi, C. Viegas, *Eur J Med Chem* 2018, 147, 48–65.
- [85] S. Parlar, G. Sayar, A. H. Tarikogullari, S. S. Karadagli, V. Alptuzun, E. Erciyas, U. Holzgrabe, *Bioorg Chem* **2019**, 87, 888–900.

- [86] F. Yang, J. Zhao, G. Chen, H. Han, S. Hu, N. Wang, J. Wang, Y. Chen, Z. Zhou, B. Dai, Y. Hou, Y. Liu, *Bioorg Chem* **2023**, 133, 106432.
- [87] S. Carradori, F. Ortuso, A. Petzer, D. Bagetta, C. De Monte, D. Secci, D. De Vita, P. Guglielmi, G. Zengin, A. Aktumsek, S. Alcaro, J. P. Petzer, *Eur J Med Chem* 2018, 143, 1543–1552.
- [88] 0. Ünsal-Tan, K. Özden, A. Rauk, A. Balkan, *Eur J Med Chem* **2010**, 45, 2345–2352.
- [89] U. Salgin-Goksen, G. Telli, A. Erikci, E. Dedecengiz, B. C. Tel, F. B. Kaynak, K. Yelekci, G. Ucar, N. Gokhan-Kelekci, *J Med Chem* **2021**, 64, 1989–2009.
- [90] M. Krátký, K. Svrčková, Q. A. Vu, Š. Štěpánková, J. Vinšová, *Molecules* 2021, 26, 989.
- [91] J. Gong, J. Yan, C. Forscher, A. Hendifar, *Drug Des Devel Ther* **2018**, 12, 777–786.
- [92] O. C. Danciu, M. Holdhoff, R. A. Peterson, J. H. Fischer, L. C. Liu, H. Wang, N. K. Venepalli, R. Chowdhery, M. K. Nicholas, M. J. Russell, T. M. Fan, P. J. Hergenrother, T. M. Tarasow, A. Z. Dudek, *Br J Cancer* **2023**, 128, 783–792.
- [93] K. S. Putt, G. W. Chen, J. M. Pearson, J. S. Sandhorst, M. S. Hoagland, J.-T. Kwon, S.-K. Hwang, H. Jin, M. I. Churchwell, M.-H. Cho, D. R. Doerge, W. G. Helferich, P. J. Hergenrother, *Nat Chem Biol* 2006, 2, 543–550.
- [94] W. Sneader, in *Drug Discovery*, Wiley, **2005**, 115–150.
- [95] L. Knorr, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1883**, 16, 2597–2599.
- [96] I. Ameziane El Hassani, K. Rouzi, H. Assila, K. Karrouchi, M. Ansar, *Reactions* **2023**, 4, 478–504.
- [97] H. V. Arny, Ind Eng Chem 1926, 18, 949–952.
- [98] L. Knorr, Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **1884**, 17, 2863–2870.
- [99] C. Paal, Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **1884**, 17, 2756–2767.
- [100] L. Knorr, Justus Liebigs Ann Chem 1886, 236, 69–115.
- [101] L. Knorr, Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **1884**, 17, 1635–1642.
- [102] M. D'Auria, A. Guarnaccio, R. Racioppi, S. Stoia, L. Emanuele, in *Photochemistry of Heterocycles*, Elsevier, **2023**, 297–336.
- [103] V. Kumar, K. Kaur, G. K. Gupta, A. K. Sharma, *Eur J Med Chem* 2013, 69, 735–753.
- [104] J. V. Faria, P. F. Vegi, A. G. C. Miguita, M. S. dos Santos, N. Boechat, A. M. R. Bernardino, *Bioorg Med Chem* **2017**, 25, 5891–5903.
- [105] A. Ansari, A. Ali, M. Asif, S. Shamsuzzaman, New J Chem 2017, 41, 16–41.
- [106] S. Adhikari, M. Singh, P. Sharma, S. Arora, *J Appl Pharm Sci* **2021**, 11, 26–37.
- [107] G. Mustafa, M. Zia-ur-Rehman, S. H. Sumrra, M. Ashfaq, W. Zafar, M. Ashfaq, *J Mol Struct* **2022**, 1262, 133044.
- [108] P. Chauhan, S. Mahajan, D. Enders, *ChemComms* **2015**, 51, 12890–12907.
- [109] W. Holzer, C. Kautsch, C. Laggner, R. M. Claramunt, M. Pérez-Torralba, I. Alkorta, J. Elguero, *Tetrahedron* **2004**, 60, 6791–6805.
- [110] E. A. Orabi, *RSC Adv* **2018**, 8, 30842–30850.
- [111] M. A. Metwally, S. A. Bondock, S. I. El-Desouky, M. M. Abdou, Int J Mod Org Chem 2012, 1, 19–54.
- [112] E. A. Orabi, M. A. A. Orabi, M. H. Mahross, M. Abdel-Hakim, *J Saudi Chem Soc* **2018**, 22, 705–714.
- [113] X. Bao, X. Wang, J.-M. Tian, X. Ye, B. Wang, H. Wang, *Org Biomol Chem* **2022**, 20, 2370–2386.
- [114] I. Ameziane El Hassani, K. Rouzi, H. Assila, K. Karrouchi, M. Ansar, *Reactions* **2023**, 4, 478–504.
- [115] Z. Zhao, X. Dai, C. Li, X. Wang, J. Tian, Y. Feng, J. Xie, C. Ma, Z. Nie, P. Fan, M. Qian, X. He, S. Wu, Y. Zhang, X. Zheng, *Eur J Med Chem* **2020**, 186, 111893.

- [116] A. P. Francisco, A. S. Ressurreição, M. de Jesus Perry, F. Lopes, in Comprehensive Organic Chemistry Experiments for the Laboratory Classroom, The Royal Society Of Chemistry, 2016, 366–369.
- [117] H. Fakhraian, Y. Nafari, *J Chem Sci* **2021**, 133, 40.
- [118] S. Pal, Md. N. Khan, S. Karamthulla, S. J. Abbas, L. H. Choudhury, *Tetrahedron Lett* **2013**, 54, 5434–5440.
- [119] V. L. Gein, T. M. Zamaraeva, P. A. Slepukhin, *Tetrahedron Lett* **2017**, 58, 134–136.
- [120] W. S. Hamama, H. G. El-Gohary, N. Kuhnert, H. H. Zoorob, *Curr Org Chem* **2012**, 16, 373–399.
- [121] S. Soliman, T. Eldebss, M. Eldebss, *Egypt J Chem* **2023**, 66, 453–478.
- [122] X. Bao, X. Wang, J.-M. Tian, X. Ye, B. Wang, H. Wang, *Org Biomol Chem* **2022**, 20, 2370–2386.
- [123] J. C. Flores-Reyes, V. del C. Cotlame-Salinas, I. A. Ibarra, E. González-Zamora, A. Islas-Jácome, *RSC Adv* **2023**, 13, 16091–16125.
- [124] H. Zang, Q. Su, Y. Mo, B. Cheng, *Ultrason Sonochem* **2011**, 18, 68–72.
- [125] R. Rajamanickam, S. Sivakolunthu, J. Sampathkumar, J Mol Struct **2022**, 1252, 132170.
- [126] R. I. Jaddan, A. H. Kadium, A. A. Mahmood, A. H. Shather, A. D. J. Al-Bayati, M. L. Shaghnab, H. A. Almashhadani, *Res Chem Intermediat* **2023**, 49, 4103–4126.
- [127] S. Mirani Nezhad, S. A. Pourmousavi, E. Nazarzadeh Zare, G. Heidari, H. Manoochehri, E. Sharifi, *Front Chem* **2022**, 10, 1046120.
- [128] S. S, M. A. Pasha, *Green Synth Catal* **2022**, 3, 190–193.
- [129] A. Zare, A. Kohzadian, H. Filian, M. S. G. Nezhad, A. Karami, *Res Chem Intermediat* **2022**, 48, 1631–1644.
- [130] E. Jazinizadeh, A. Zare, S. S. Sajadikhah, M. Barzegar, A. Kohzadian, *Res Chem Intermediat* **2022**, 48, 5059–5075.
- [131] G. B. Pund, S. T. Dhumal, T. R. Deshmukh, D. B. Wahul, K. R. Mandave, S. A. Gaware, S. S. Chavan, M. Farooqui, B. S. Dobhal, M. J. Hebade, *ChemistrySelect* 2023, 8, e202302500.
- [132] S. Ghorbani, D. Habibi, S. Heydari, H. Ebrahimiasl, *J Mol Struct* 2024, 1307, 137892.
- [133] A. Ghanbarpour, A. Ghorbani-Choghamarani, H. Aghavandi, A. Jafari, *Sci Rep* **2024**, 14, 7449.
- [134] A. Gupta, S. Iqbal, Roohi, Mohd. K. Hussain, Mohd. R. Zaheer, K. Shankar, *ACS Omega* **2022**, 7, 34583–34598.
- [135] S. Sadjadi, M. M. Heravi, V. Zadsirjan, V. Farzaneh, *Res Chem Intermediat* **2018**, 44, 6765–6785.
- [136] R. Ramesh, N. Nagasundaram, D. Meignanasundar, P. Vadivel, A. Lalitha, *Res Chem Intermediat* **2017**, 43, 1767–1782.
- [137] A. Vafaee, A. Davoodnia, M. Pordel, Res Chem Intermediat 2015, 41, 8343–8354.
- [138] R. Khalifeh, R. Shahimoridi, M. Rajabzadeh, Catal Letters 2019, 149, 2864–2872.
- [139] J. Safaei-Ghomi, B. Khojastehbakht-Koopaei, S. Zahedi, *Chem Heterocycl Compd* (NY) **2015**, 51, 34–38.
- [140] M. Zarghani, B. Akhlaghinia, *RSC Adv* **2015**, 5, 87769–87780.
- [141] J. Safaei-Ghomi, B. Khojastehbakht-Koopaei, H. Shahbazi-Alavi, *RSC Adv* **2014**, 4, 46106–46113.
- [142] Z. Zhou, Y. Zhang, J Chil Chem Soc **2015**, 60, 2992–2996.
- [143] G. Mohammadi Ziarani, F. Saidian, P. Gholamzadeh, A. Badiei, J. B. Ghasemi, E. Aghaee, A. Abolhasani Soorki, *J Iran Chem Soc* **2019**, 16, 1401–1409.
- [144] Z. Zhou, Y. Zhang, *Green Chem Lett Rev* **2014**, 7, 18–23.

- [145] N. G. Khaligh, S. B. A. Hamid, S. J. J. Titinchi, Chin Chem Lett 2016, 27, 104–108.
- [146] B. Chowhan, M. Gupta, N. Sharma, *Appl Organomet Chem* **2020**, 34, e6013.
- [147] R. C. Patil, S. A. Damate, D. N. Zambare, S. S. Patil, *New J Chem* **2021**, 45, 9152–9162.
- [148] H. F. Niya, N. Hazeri, M. Fatahpour, P. Roudini, M. Shirzaei, *J Mol Struct* **2021**, 1239, 130400.
- [149] G. Mohammadi Ziarani, F. Javadi, F. Mohajer, M. Anafcheh, A. Badiei, J. B. Ghasemi, *Mater Chem Phys* **2022**, 275, 125285.
- [150] P. D. Vishvanath, G. D. Vaishnav, K. H. Durgesh, C. S. Sakshi, *Res J Chem Environ* 2024, 28, 51–57.
- [151] S. S. Kamble, G. S. Shankarling, *ChemistrySelect* **2018**, 3, 2032–2036.
- [152] F. Noruzian, A. Olyaei, R. Hajinasiri, M. Sadeghpour, *Synth Commun* **2019**, 49, 2717–2724.
- [153] R. C. Kulkarni, J. M. Madar, S. L. Shastri, F. Shaikh, N. S. Naik, R. B. Chougale, L. A. Shastri, S. D. Joshi, S. R. Dixit, V. A. Sunagar, *Chemical Data Collections* 2018, 17–18, 497–506.
- [154] K. M. Vyas, R. N. Jadeja, D. Patel, R. V. Devkar, V. K. Gupta, *Polyhedron* **2013**, 65, 262–274.
- [155] A. Indrasena, Sd. Riyaz, P. L. Mallipeddi, P. Padmaja, B. Sridhar, P. K. Dubey, *Tetrahedron Lett* **2014**, 55, 5014–5018.
- [156] S. Rasapalli, Y. Fan, M. Yu, C. Rees, J. T. Harris, J. A. Golen, J. P. Jasinski, A. L. Rheingold, S. M. Kwasny, T. J. Opperman, *Bioorg Med Chem Lett* **2013**, 23, 3235–3238.
- [157] S. K. Krishnasamy, V. Namasivayam, S. Mathew, R. S. Eakambaram, I. A. Ibrahim, A. Natarajan, S. Palaniappan, *Arch Pharm* (Weinheim) **2016**, 349, 383–397.
- [158] N. Parmar, S. Teraiya, R. Patel, H. Barad, H. Jajda, V. Thakkar, *J Saudi Chem Soc* **2015**, 19, 36–41.
- [159] A. Dahal, M. Lo, S. Singh, H. Vo, D. ElHage, S. D. Jois, S. Murru, *Chem Biol Drug Des* **2022**, 99, 620–633.
- [160] F. Chaudhry, S. Naureen, S. Choudhry, R. Huma, M. Ashraf, M. al-Rashida, B. Jahan, M. Hyder Khan, F. Iqbal, M. Ali Munawar, M. Ain Khan, *Bioorg Chem* 2018, 77, 507– 514.
- [161] S. Yousuf, K. M. Khan, U. Salar, S. Chigurupati, M. T. Muhammad, A. Wadood, M. Aldubayan, V. Vijayan, M. Riaz, S. Perveen, *Eur J Med Chem* **2018**, 159, 47–58.
- [162] X.-K. Qian, J. Zhang, P.-F. Song, Y.-S. Zhao, H.-Y. Ma, Q. Jin, D.-D. Wang, X.-Q. Guan, S.-Y. Li, X. Bao, L.-W. Zou, *Bioorg Med Chem* **2021**, 40, 116187.
- [163] J. Zhang, Y. Yang, X. Qian, P. Song, Y. Zhao, X. Guan, L. Zou, X. Bao, H. Wang, *ChemMedChem* **2021**, 16, 1600–1604.
- [164] G. Mariappan, B. P. Saha, L. Sutharson, A. Singh, S. Garg, L. Pandey, D. Kumar, *Saudi Pharm J* **2011**, 19, 115–122.
- [165] N. A. Khalil, E. M. Ahmed, K. O. Mohamed, Y. M. Nissan, S. A.-B. Zaitone, *Bioorg Med Chem* **2014**, 22, 2080–2089.
- [166] Z. Zhang, M. Cheng, J. Guo, Y. Wan, R. Wang, Y. Fang, Y. Jin, S.-S. Xie, J. Liu, *J Mol Struct* **2022**, 1254, 132319.
- [167] I. Sehout, H. Boulebd, R. Boulcina, S. Nemouchi, L. Bendjeddou, A. Bramki, H. Merazig, A. Debache, *J Mol Struct* **2021**, 1229, 129586.
- [168] I. Nikolova, V. Petkova, J. Tencheva, N. Benbasat, J. Voinikov, N. Danchev, *Biotechnol Biotechnol Equip* **2013**, 27, 3605–3619.
- [169] M. Miljković, N. Rančić, R. Simić, D. Stamenković, V. Dragojević-Simić, *Hospital Pharmacology International Multidisciplinary Journal* **2018**, 5, 694–704.

- [170] Jyoti Panchal, G. Kumar, S. Dagar, M. Bhati, D. Thareja, *Sch Acad J Pharm* **2021**, 10, 24–27.
- [171] N. Uramaru, H. Shigematsu, A. Toda, R. Eyanagi, S. Kitamura, S. Ohta, *J Med Chem* **2010**, 53, 8727–8733.
- [172] R. H. Persellin, *JAMA* **1961**, 175, 971.
- [173] L. S. Zondagh, S. F. Malan, J. Joubert, *J Enzyme Inhib Med Chem* **2020**, 35, 1596–1605.
- [174] J. E. Cadena-Cruz, L. M. Guamán-Ortiz, J. C. Romero-Benavides, N. Bailon-Moscoso, K. E. Murillo-Sotomayor, N. V. Ortiz-Guamán, J. Heredia-Moya, BMC Chem 2021, 15, 38.
- [175] H. Ashtekar, N. Aggarwal, Z. Fernandes, A. Rao, N. Varghese, *Res Sq* (preprint) **2022**, 1.
- [176] V. K. Merugumolu, R. B. Chandrashekara, *Bangladesh J Pharmacol* 2016, 11, 558.
- [177] H. M. Aly, N. M. Saleh, H. A. Elhady, *Eur J Med Chem* **2011**, 46, 4566–4572.
- [178] E. A. Eno, J. I. Mbonu, H. Louis, F. S. Patrick-Inezi, T. E. Gber, T. O. Unimuke, E. E. D. Okon, I. Benjamin, O. E. Offiong, *J Indian Chem Soc* **2022**, 99, 100524.
- [179] P. Gunasekaran, S. Perumal, P. Yogeeswari, D. Sriram, *Eur J Med Chem* **2011**, 46, 4530–4536.
- [180] R. R. Ramsay, M. R. Popovic-Nikolic, K. Nikolic, E. Uliassi, M. L. Bolognesi, *Clin Transl Med* **2018**, 7, 3.
- [181] X. H. Makhoba, C. Viegas Jr., R. A. Mosa, F. P. Viegas, O. J. Pooe, *Drug Des Devel Ther* **2020**, Volume 14, 3235–3249.
- [182] S. Khatoon, A. Aroosh, A. Islam, S. Kalsoom, F. Ahmad, S. Hameed, S. W. Abbasi, M. Yasinzai, M. M. Naseer, *Bioorg Chem* **2021**, 110, 104816.
- [183] H. You, X. Su, G. Su, *Arch Pharm* (Weinheim) **2020**, 353, e2000140.
- [184] Shamsuzzaman, A. Mashrai, A. Ahmad, A. M. Dar, H. Khanam, M. Danishuddin, A. U. Khan, *Med Chem Res* **2014**, 23, 348–362.
- [185] M. S. Abbady, M. S. K. Youssef, *Med Chem Res* **2014**, 23, 3558–3568.
- [186] H. E. Gaffer, S. Abdel-Fattah, H. A. Etman, E. Abdel-Latif, *J Heterocycl Chem* **2017**, 54, 331–340.
- [187] T. Anwar, H. Nadeem, S. Sarwar, H. Naureen, S. Ahmed, A. Khan, M. Arif, *Drug Dev Res* **2020**, 81, 893–903.
- [188] R. Al-Saheb, S. Makharza, F. Al-battah, R. Abu-El-Halawa, T. Kaimari, O. S. Abu Abed, *Biosci Rep* **2020**, 40, BSR20201950.
- [189] N. M. Parekh, K. C. Maheria, *Med Chem Res* **2012**, 21, 4168–4176.
- [190] M. A. M. Abdel Reheim, S. M. Baker, *Chem Cent J* **2017**, 11, 112.
- [191] D. V. Narayana Rao, A. Raghavendra Guru Prasad, Y. N. Spoorthy, D. Raghunatha Rao, L. K. Ravindranath, *Ann Pharm Fr* **2014**, 72, 101–106.
- [192] M. Al-Abbasee, H. J. Mohammad, M. K. Mawlood, *Indian J Forensic Med Toxicol* **2020**, 14, 303–309.
- [193] I. Mohanram, J. Meshram, *ISRN Org Chem* **2014**, 2014, 1–7.
- [194] M. Manjunath, A. D. Kulkarni, G. B. Bagihalli, S. Malladi, S. A. Patil, *J Mol Struct* **2017**, 1127, 314–321.
- [195] R. Pettinari, F. Marchetti, C. Pettinari, A. Petrini, R. Scopelliti, C. M. Clavel, P. J. Dyson, *Inorg Chem* **2014**, 53, 13105–13111.
- [196] V. Marković, S. Erić, T. Stanojković, N. Gligorijević, S. Aranđelović, N. Todorović, S. Trifunović, N. Manojlović, R. Jelić, M. D. Joksović, *Bioorg Med Chem Lett* 2011, 21, 4416–4421.
- [197] X. Fan, X. Zhang, L. Zhou, K. A. Keith, E. R. Kern, P. F. Torrence, *Bioorg Med Chem Lett* **2006**, 16, 3224–3228.
- [198] R. Ramajayam, K.-P. Tan, H.-G. Liu, P.-H. Liang, *Bioorg Med Chem* **2010**, 18, 7849–7854.
- [199] V. Kumar, K.-P. Tan, Y.-M. Wang, S.-W. Lin, P.-H. Liang, *Bioorg Med Chem* **2016**, 24, 3035–3042.
- [200] V. A. Obakachi, N. D. Kushwaha, B. Kushwaha, M. C. Mahlalela, S. R. Shinde, I. Kehinde, R. Karpoormath, *J Mol Struct* **2021**, 1241, 130665.
- [201] S. Viveka, D. Dinesha, P. Shama, S. Naveen, N. K. Lokanath, G. K. Nagaraja, *RSC Adv* **2015**, 5, 94786–94795.
- [202] M. Abdel-Aziz, G. E.-D. A. Abuo-Rahma, A. A. Hassan, *Eur J Med Chem* **2009**, 44, 3480–3487.
- [203] V. K. Merugumolu, R. B. Chandrashekara, *Bangladesh J Pharmacol* **2016**, 11, 558.
- [204] M. Messaad, I. Dhouib, M. Abdelhedi, B. Khemakhem, J Mol Struct **2022**, 1263, 133105.
- [205] F. Tok, B. Koçyiğit-Kaymakçıoğlu, B. N. Sağlık, S. Levent, Y. Özkay, Z. A. Kaplancıklı, *Bioorg Chem* **2019**, 84, 41–50.
- [206] M. Haroun, *Med Chem* (Los Angeles) **2019**, 15, 624–633.
- [207] E. Çınar, E. Başaran, Ö. Erdoğan, R. Çakmak, M. Boğa, Ö. Çevik, *J Chin Chem Soc-Taip* **2021**, 68, 2355–2367.
- [208] M. T. El Sayed, M. A. M. Sh. El-Sharief, E. S. Zarie, N. M. Morsy, A. R. Elsheakh, A. Voronkov, V. Berishvili, G. S. Hassan, *Bioorg Med Chem Lett* **2018**, 28, 952–957.
- [209] V. Hadi, Y.-H. Koh, T. W. Sanchez, D. Barrios, N. Neamati, K. W. Jung, *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, 20, 6854–6857.
- [210] A. Kadam, B. Dawane, M. Pawar, H. Shegokar, K. Patil, R. Meshram, R. Gacche, *Bioorg Chem* **2014**, 53, 67–74.
- [211] R. Tripathy, R. J. McHugh, A. K. Ghose, G. R. Ott, T. S. Angeles, M. S. Albom, Z. Huang, L. D. Aimone, M. Cheng, B. D. Dorsey, *Bioorg Med Chem Lett* **2011**, 21, 7261–7264.
- [212] M. H. Norman, L. Liu, M. Lee, N. Xi, I. Fellows, N. D. D'Angelo, C. Dominguez, K. Rex, S. F. Bellon, T.-S. Kim, I. Dussault, *J Med Chem* **2012**, 55, 1858–1867.
- [213] L. Liu, M. H. Norman, M. Lee, N. Xi, A. Siegmund, A. A. Boezio, S. Booker, D. Choquette, N. D. D'Angelo, J. Germain, K. Yang, Y. Yang, Y. Zhang, S. F. Bellon, D. A. Whittington, J.-C. Harmange, C. Dominguez, T.-S. Kim, I. Dussault, J Med Chem 2012, 55, 1868– 1897.
- [214] C. Pégurier, P. Collart, P. Danhaive, S. Defays, M. Gillard, F. Gilson, T. Kogej, P. Pasau, N. Van Houtvin, M. Van Thuyne, B. van Keulen, *Bioorg Med Chem Lett* 2007, 17, 4228–4231.
- [215] H. Huang, Y. Yu, Z. Gao, Y. Zhang, C. Li, X. Xu, H. Jin, W. Yan, R. Ma, J. Zhu, X. Shen, H. Jiang, L. Chen, J. Li, *J Med Chem* **2012**, 55, 7037–7053.
- [216] R. Tripathy, A. Ghose, J. Singh, E. R. Bacon, T. S. Angeles, S. X. Yang, M. S. Albom, L. D. Aimone, J. L. Herman, J. P. Mallamo, *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, 17, 1793–1798.
- [217] K. Guckian, M. B. Carter, E. Y.-S. Lin, M. Choi, L. Sun, P. A. Boriack-Sjodin, C. Chuaqui, B. Lane, K. Cheung, L. Ling, W.-C. Lee, *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, 20, 326–329.
- [218] J. S. de Araújo, C. França da Silva, D. da G. J. Batista, A. Nefertiti, L. F. de A. Fiuza, C. R. Fonseca-Berzal, P. Bernardino da Silva, M. M. Batista, M. Sijm, T. D. Kalejaiye, H. P. de Koning, L. Maes, G. J. Sterk, R. Leurs, M. de N. C. Soeiro, *Antimicrob Agents Chemother* 2020, 64, e00414–e00420.
- [219] M. A. Shabaan, A. M. Kamal, S. I. Faggal, A. E. Elsahar, K. O. Mohamed, *Arch Pharm* (Weinheim) **2020**, 353, e1900308.
- [220] Y. Kakiuchi, N. Sasaki, M. Satoh-Masuoka, H. Murofushi, K. Murakami-Murofushi, *Biochem Biophys Res Commun* **2004**, 320, 1351–1358.

- [221] Y. Liu, C. Liang, L. Xin, X. Ren, L. Tian, X. Ju, H. Li, Y. Wang, Q. Zhao, H. Liu, W. Cao, X. Xie, D. Zhang, Y. Wang, Y. Jian, *Eur J Med Chem* **2020**, 206, 112711.
- [222] S. JS. Ahmad, K. Degiannis, J. Borucki, S. Pouwels, D. L. Rawaf, M. Head, C. H. Li, R. Archid, A. R. Ahmed, A. Lala, W. Raza, K. Mellor, D. Wichmann, A. Exadaktylos, *New Microbes New Infect* 2023, 52, 101094.
- [223] U. Rutwick Surya, N. Praveen, *Virusdisease* **2021**, 32, 46–54.
- [224] C. Wu, Y. Liu, Y. Yang, P. Zhang, W. Zhong, Y. Wang, Q. Wang, Y. Xu, M. Li, X. Li, M. Zheng, L. Chen, H. Li, *Acta Pharm Sin B* **2020**, 10, 766–788.
- [225] L. Rodrigues, R. Bento Cunha, T. Vassilevskaia, M. Viveiros, C. Cunha, *Molecules* **2022**, 27, 2723.
- [226] H. S. Hillen, G. Kokic, L. Farnung, C. Dienemann, D. Tegunov, P. Cramer, *Nature* **2020**, 584, 154–156.
- [227] K. Metzdorf, H. Jacobsen, M. C. Greweling-Pils, M. Hoffmann, T. Lüddecke, F. Miller, L. Melcher, A. M. Kempf, I. Nehlmeier, D. Bruder, M. Widera, S. Ciesek, S. Pöhlmann, L. Čičin-Šain, *Viruses* 2023, 15, 271.
- [228] Z. Jin, X. Du, Y. Xu, Y. Deng, M. Liu, Y. Zhao, B. Zhang, X. Li, L. Zhang, C. Peng, Y. Duan, J. Yu, L. Wang, K. Yang, F. Liu, R. Jiang, X. Yang, T. You, X. Liu, X. Yang, F. Bai, H. Liu, X. Liu, L. W. Guddat, W. Xu, G. Xiao, C. Qin, Z. Shi, H. Jiang, Z. Rao, H. Yang, *Nature* 2020, 582, 289–293.
- [229] D. Shin, R. Mukherjee, D. Grewe, D. Bojkova, K. Baek, A. Bhattacharya, L. Schulz, M. Widera, A. R. Mehdipour, G. Tascher, P. P. Geurink, A. Wilhelm, G. J. van der Heden van Noort, H. Ovaa, S. Müller, K.-P. Knobeloch, K. Rajalingam, B. A. Schulman, J. Cinatl, G. Hummer, S. Ciesek, I. Dikic, *Nature* 2020, 587, 657–662.
- [230] J. Lan, J. Ge, J. Yu, S. Shan, H. Zhou, S. Fan, Q. Zhang, X. Shi, Q. Wang, L. Zhang, X. Wang, *Nature* **2020**, 581, 215–220.
- [231] Y. Huang, C. Yang, X. Xu, W. Xu, S. Liu, *Acta Pharmacol Sin* **2020**, 41, 1141–1149.
- [232] M. Hosseini, W. Chen, D. Xiao, C. Wang, *Precis Clin Med* **2021**, 4, 1–16.
- [233] Z. Fu, B. Huang, J. Tang, S. Liu, M. Liu, Y. Ye, Z. Liu, Y. Xiong, W. Zhu, D. Cao, J. Li, X. Niu, H. Zhou, Y. J. Zhao, G. Zhang, H. Huang, *Nat Commun* **2021**, 12, 488.
- [234] J. Qiao, Y.-S. Li, R. Zeng, F.-L. Liu, R.-H. Luo, C. Huang, Y.-F. Wang, J. Zhang, B. Quan, C. Shen, X. Mao, X. Liu, W. Sun, W. Yang, X. Ni, K. Wang, L. Xu, Z.-L. Duan, Q.-C. Zou, H.-L. Zhang, W. Qu, Y.-H.-P. Long, M.-H. Li, R.-C. Yang, X. Liu, J. You, Y. Zhou, R. Yao, W.-P. Li, J.-M. Liu, P. Chen, Y. Liu, G.-F. Lin, X. Yang, J. Zou, L. Li, Y. Hu, G.-W. Lu, W.-M. Li, Y.-Q. Wei, Y.-T. Zheng, J. Lei, S. Yang, *Science* **2021**, 371, 1374–1378.
- [235] M. E. Sobhia, K. Ghosh, S. Sivangula, S. Kumar, H. Singh, *J Biomol Struct Dyn* **2022**, 40, 5079–5089.
- [236] D. W. Kneller, G. Phillips, H. M. O'Neill, R. Jedrzejczak, L. Stols, P. Langan, A. Joachimiak, L. Coates, A. Kovalevsky, *Nat Commun* **2020**, 11, 3202.
- [237] A. Jayk Bernal, M. M. Gomes da Silva, D. B. Musungaie, E. Kovalchuk, A. Gonzalez, V. Delos Reyes, A. Martín-Quirós, Y. Caraco, A. Williams-Diaz, M. L. Brown, J. Du, A. Pedley, C. Assaid, J. Strizki, J. A. Grobler, H. H. Shamsuddin, R. Tipping, H. Wan, A. Paschke, J. R. Butterton, M. G. Johnson, C. De Anda, New Engl J Med 2022, 386, 509–520.
- [238] S. M. R. Hashemian, A. Sheida, M. Taghizadieh, M. Y. Memar, M. R. Hamblin, H. Bannazadeh Baghi, J. Sadri Nahand, Z. Asemi, H. Mirzaei, *Biomed Pharmacother* 2023, 162, 114367.
- [239] N. M. Fountain-Jones, R. Vanhaeften, J. Williamson, J. Maskell, I.-L. J. Chua, M. Charleston, L. Cooley, *Lancet Microbe* **2024**, 5, e452–e458.
- [240] B. Halliwell, *in Adv Pharmacol* (Ed.: H. Sies), Academic Press, **1996**, 3–20.

- [241] S. Di Meo, P. Venditti, Oxid Med Cell Longev 2020, 2020, 1–32.
- [242] R. Gerschman, D. L. Gilbert, S. W. Nye, P. Dwyer, W. O. Fenn, *Science* **1954**, 119, 623–626.
- [243] D. Harman, *Mutation Research/DNAging* **1992**, 275, 257–266.
- [244] A. Woodcox, *Cahiers des études anciennes*, LV **2018**, 65–78.
- [245] K. Jin, Aging Dis **2010**, 1, 72–74.
- [246] A. P. Wickens, *Respir Physiol* **2001**, 128, 379–391.
- [247] J. Bjorksten, H. Tenhu, *Exp Gerontol* **1990**, 25, 91–95.
- [248] B. Pereira, F. P. Correia, I. A. Alves, M. Costa, M. Gameiro, A. P. Martins, J. A. Saraiva, *Ageing Res Rev* **2024**, 95, 102204.
- [249] J.-H. Yang, M. Hayano, P. T. Griffin, J. A. Amorim, M. S. Bonkowski, J. K. Apostolides, E. L. Salfati, M. Blanchette, E. M. Munding, M. Bhakta, Y. C. Chew, W. Guo, X. Yang, S. Maybury-Lewis, X. Tian, J. M. Ross, G. Coppotelli, M. V. Meer, R. Rogers-Hammond, D. L. Vera, Y. R. Lu, J. W. Pippin, M. L. Creswell, Z. Dou, C. Xu, S. J. Mitchell, A. Das, B. L. O'Connell, S. Thakur, A. E. Kane, Q. Su, Y. Mohri, E. K. Nishimura, L. Schaevitz, N. Garg, A.-M. Balta, M. A. Rego, M. Gregory-Ksander, T. C. Jakobs, L. Zhong, H. Wakimoto, J. El Andari, D. Grimm, R. Mostoslavsky, A. J. Wagers, K. Tsubota, S. J. Bonasera, C. M. Palmeira, J. G. Seidman, C. E. Seidman, N. S. Wolf, J. A. Kreiling, J. M. Sedivy, G. F. Murphy, R. E. Green, B. A. Garcia, S. L. Berger, P. Oberdoerffer, S. J. Shankland, V. N. Gladyshev, B. R. Ksander, A. R. Pfenning, L. A. Rajman, D. A. Sinclair, *Cell* 2023, 186, 305–326.
- [250] J. Yang, J. Luo, X. Tian, Y. Zhao, Y. Li, X. Wu, Antioxidants 2024, 13, 394.
- [251] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, *Int J Biochem Cell Biol* **2007**, 39, 44–84.
- [252] J. P. da Costa, R. Vitorino, G. M. Silva, C. Vogel, A. C. Duarte, T. Rocha-Santos, *Ageing Res Rev* **2016**, 29, 90–112.
- [253] B. K. Kennedy, S. L. Berger, A. Brunet, J. Campisi, A. M. Cuervo, E. S. Epel, C. Franceschi, G. J. Lithgow, R. I. Morimoto, J. E. Pessin, T. A. Rando, A. Richardson, E. E. Schadt, T. Wyss-Coray, F. Sierra, *Cell* **2014**, 159, 709–713.
- [254] Á. Belenguer-Varea, F. J. Tarazona-Santabalbina, J. A. Avellana-Zaragoza, M. Martínez-Reig, C. Mas-Bargues, M. Inglés, Free Radic Biol Med 2020, 149, 51–63.
- [255] M. T. Lin, M. Flint Beal, *Clin Neurosci Res* **2003**, 2, 305–315.
- [256] A. M. Abdelazim, M. M. Abomughaid, *All Life* **2024**, 17, 2316092.
- [257] K. Krumova, G. Cosa, in *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences*, **2016**, 1–21.
- [258] M. Lagouge, N. G. Larsson, J Intern Med **2013**, 273, 529–543.
- [259] J. Luo, K. Mills, S. le Cessie, R. Noordam, D. van Heemst, *Ageing Res Rev* **2020**, 57, 100982.
- [260] V. N. Gladyshev, Antioxid Redox Signal **2014**, 20, 727–731.
- [261] B. A. Buehler, J Evid Based Complementary Altern Med 2012, 17, 218–220.
- [262] W. Dröge, *Physiol Rev* **2002**, 82, 47–95.
- [263] P. Ghezzi, V. Jaquet, F. Marcucci, H. H. H. W. Schmidt, *Br J Pharmacol* **2017**, 174, 1784–1796.
- [264] M. Azmanova, A. Pitto-Barry, *ChemBioChem* **2022**, 23, e202100641.
- [265] J. Qi, F. Dong, J Drug Target **2021**, 29, 677–686.
- [266] A. Bast, G. R. M. M. Haenen, *Trends Pharmacol Sci* **2013**, 34, 430–436.
- [267] M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C. J. Rhodes, J. Telser, *Mol Cell Biochem* **2004**, 266, 37–56.
- [268] H. Zhu, A. Santo, M. Trush, Y. R. Li, *React Oxyg Species* **2016**, 1, 1–8.

- [269] G. Martemucci, C. Costagliola, M. Mariano, L. D'andrea, P. Napolitano, A. G. D'Alessandro, *Oxygen* **2022**, *2*, 48–78.
- [270] G. Zubieta-Calleja, N. Zubieta-DeUrioste, BLDE Univ J Health Sci 2017, 2, 80.
- [271] M. Herb, M. Schramm, *Antioxidants* **2021**, 10, 313.
- [272] K. J. A. Davies, *Biochem Soc Symp* **1995**, 61, 1–31.
- [273] A. Mandal, Asian J Chem **2023**, 35, 1539–1562.
- [274] O. I. Aruoma, J Am Oil Chem Soc **1998**, 75, 199–212.
- [275] B. L. Zaric, M. T. Macvanin, E. R. Isenovic, Int J Biochem Cell Biol **2023**, 154, 106346.
- [276] A. S. Ziada, M.-S. R. Smith, H. C. F. Côté, Front Cell Dev Biol 2020, 8, 575645.
- [277] A. J. P. O. de Almeida, J. C. P. L. de Oliveira, L. V. da Silva Pontes, J. F. de Souza Júnior, T. A. F. Gonçalves, S. H. Dantas, M. S. de Almeida Feitosa, A. O. Silva, I. A. de Medeiros, *Oxid Med Cell Longev* 2022, 2022, 1–23.
- [278] K. Jomova, R. Raptova, S. Y. Alomar, S. H. Alwasel, E. Nepovimova, K. Kuca, M. Valko, *Arch Toxicol* **2023**, 97, 2499–2574.
- [279] B. Halliwell, J Neurochem 2006, 97, 1634–1658.
- [280] S. K. Bardaweel, M. Gul, M. Alzweiri, A. Ishaqat, H. A. ALSalamat, R. M. Bashatwah, *Eurasian J Med* **2018**, 50, 193–201.
- [281] J. F. Turrens, J Physiol **2003**, 552, 335–344.
- [282] A. Phaniendra, D. B. Jestadi, L. Periyasamy, Indian J Clin Bioche 2015, 30, 11–26.
- [283] K. Murotomi, A. Umeno, M. Shichiri, M. Tanito, Y. Yoshida, *Int J Mol Sci* **2023**, 24, 2739.
- [284] G. R. Buettner, *Arch Biochem Biophys* **1993**, 300, 535–543.
- [285] C. M. C. Andrés, J. M. Pérez de la Lastra, C. Andrés Juan, F. J. Plou, E. Pérez-Lebeña, Int J Mol Sci **2023**, 24, 1841.
- [286] F. Collin, Int J Mol Sci **2019**, 20, 2407.
- [287] B. Halliwell, M. V. Clement, L. H. Long, *FEBS Lett* **2000**, 486, 10–13.
- [288] D. B. Medinas, G. Cerchiaro, D. F. Trindade, O. Augusto, *IUBMB Life* **2007**, 59, 255–262.
- [289] R. Radi, *Proc Natl Acad Sci* **2018**, 115, 5839–5848.
- [290] R. Radi, *J Biol Chem* **2013**, 288, 26464–26472.
- [291] S. G. Tumilaar, A. Hardianto, H. Dohi, D. Kurnia, *J Chem* **2024**, 2024, 1–21.
- [292] C. A. Juan, J. M. Pérez de la Lastra, F. J. Plou, E. Pérez-Lebeña, *Int J Mol Sci* **2021**, 22, 4642.
- [293] M. Carocho, I. C. F. R. Ferreira, *Food Chem Toxicol* **2013**, 51, 15–25.
- [294] S. S. Ali, H. Ahsan, M. K. Zia, T. Siddiqui, F. H. Khan, *J Food Biochem* **2020**, 44, e13145.
- [295] S. Kumar, S. Sharma, N. Vasudeva, Chin J Integr Med 2017, 1–12.
- [296] I. Pérez-Torres, M. E. Soto, V. Guarner-Lans, L. Manzano-Pech, E. Soria-Castro, *Cells* **2022**, 11, 1982.
- [297] S. B. Nimse, D. Pal, *RSC Adv* **2015**, 5, 27986–28006.
- [298] K. K. A. C. Monteiro, M. E. Shiroma, L. L. Damous, M. de J. Simões, R. dos S. Simões, J. Cipolla-Neto, E. C. Baracat, J. M. Soares-Jr., *Antioxidants* **2024**, 13, 439.
- [299] L. Packer, E. H. Witt, H. J. Tritschler, *Free Radic Biol Med* **1995**, 19, 227–250.
- [300] K. Ulrich, U. Jakob, *Free Radic Biol Med* **2019**, 140, 14–27.
- [301] G. Genchi, G. Lauria, A. Catalano, M. S. Sinicropi, A. Carocci, *Int J Mol Sci* **2023**, 24, 2633.
- [302] K. Neha, M. R. Haider, A. Pathak, M. S. Yar, *Eur J Med Chem* **2019**, 178, 687–704.
- [303] D. Šamec, E. Karalija, I. Šola, V. Vujčić Bok, B. Salopek-Sondi, *Plants* **2021**, 10, 118.
- [304] H. Cory, S. Passarelli, J. Szeto, M. Tamez, J. Mattei, Front Nutr 2018, 5, 87.

- [305] S. I. Arzola-Rodríguez, L.-N. Muñoz-Castellanos, C. López-Camarillo, E. Salas, *Biomolecules* **2022**, 12, 1897.
- [306] G. Rocchetti, R. P. Gregorio, J. M. Lorenzo, F. J. Barba, P. G. Oliveira, M. A. Prieto, J. Simal-Gandara, J. I. Mosele, M. Motilva, M. Tomas, V. Patrone, E. Capanoglu, L. Lucini, *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2022, 21, 811–842.
- [307] M. A. Soobrattee, V. S. Neergheen, A. Luximon-Ramma, O. I. Aruoma, T. Bahorun, *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen* **2005**, 579, 200–213.
- [308] B. R. Albuquerque, S. A. Heleno, M. B. P. P. Oliveira, L. Barros, I. C. F. R. Ferreira, *Food Funct* **2021**, 12, 14–29.
- [309] M. Leopoldini, N. Russo, M. Toscano, *Food Chem* **2011**, 125, 288–306.
- [310] F. Shahidi, P. Ambigaipalan, *J Funct Foods* **2015**, 18, 820–897.
- [311] N. Singh, S. S. Yadav, *Curr Res Food Sci* **2022**, *5*, 1508–1523.
- [312] A. Zeb, *J Food Biochem* **2020**, 44, e13394.
- [313] P. Mucha, A. Skoczyńska, M. Małecka, P. Hikisz, E. Budzisz, *Molecules* **2021**, 26, 4886.
- [314] N. V Kupaeva, E. A. Kotenkova, *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* **2021**, 854, 012048.
- [315] J. Dai, R. J. Mumper, *Molecules* **2010**, 15, 7313–7352.
- [316] V. E. Atalay, I. S. Atish, K. F. Shahin, E. S. Kashikchi, M. Karahan, *UNEC JEAS* **2022**, 2, 33–40.
- [317] J. Chen, J. Yang, L. Ma, J. Li, N. Shahzad, C. K. Kim, *Sci Rep* **2020**, 10, 2611.
- [318] K. Bakhouche, Z. Dhaouadi, N. Jaidane, D. Hammoutène, *Comput Theor Chem* **2015**, 1060, 58–65.
- [319] M. Yamauchi, Y. Kitamura, H. Nagano, J. Kawatsu, H. Gotoh, *Antioxidants* **2024**, 13, 309.
- [320] M. Laguerre, J. Lecomte, P. Villeneuve, *Lipid Technol* **2014**, 26, 59–62.
- [321] İ. Gulcin, Arch Toxicol **2020**, 94, 651–715.
- [322] Md. M. Rahman, Md. S. Rahaman, Md. R. Islam, F. Rahman, F. M. Mithi, T. Alqahtani, M. A. Almikhlafi, S. Q. Alghamdi, A. S. Alruwaili, Md. S. Hossain, M. Ahmed, R. Das, T. Bin Emran, Md. S. Uddin, *Molecules* 2021, 27, 233.
- [323] G. Pizzino, N. Irrera, M. Cucinotta, G. Pallio, F. Mannino, V. Arcoraci, F. Squadrito, D. Altavilla, A. Bitto, *Oxid Med Cell Longev* **2017**, 2017, 8416763.
- [324] A. Shinde, J. Ganu, P. Naik, *Journal of Dental and Allied Sciences* **2012**, 1, 63.
- [325] M. Ristow, K. Schmeisser, *Dose-Response* **2014**, 12, 288–341.
- [326] C. Simioni, G. Zauli, A. M. Martelli, M. Vitale, G. Sacchetti, A. Gonelli, L. M. Neri, *Oncotarget* **2018**, 9, 17181–17198.
- [327] Y. F. Mustafa, Indian J Clin Bioche **2024**, 39, 154–167.
- [328] M. Sharifi-Rad, N. V Anil Kumar, P. Zucca, E. M. Varoni, L. Dini, E. Panzarini, J. Rajkovic, P. V. Tsouh Fokou, E. Azzini, I. Peluso, A. Prakash Mishra, M. Nigam, Y. El Rayess, M. El Beyrouthy, L. Polito, M. Iriti, N. Martins, M. Martorell, A. O. Docea, W. N. Setzer, D. Calina, W. C. Cho, J. Sharifi-Rad, *Front Physiol* **2020**, 11, 694.
- [329] I. M. C. M. Rietjens, M. G. Boersma, L. de Haan, B. Spenkelink, H. M. Awad, N. H. P. Cnubben, J. J. van Zanden, H. van der Woude, G. M. Alink, J. H. Koeman, *Environ Toxicol Pharmacol* 2002, 11, 321–333.
- [330] Q. Lv, J. Long, Z. Gong, K. Nong, X. Liang, T. Qin, W. Huang, L. Yang, *Nat Prod Commun* **2021**, 16, 1–13.
- [331] N. Francenia Santos-Sánchez, R. Salas-Coronado, C. Villanueva-Cañongo, B. Hernández-Carlos, in *Antioxidants*, IntechOpen, **2019**.
- [332] H. J. Forman, H. Zhang, *Nat Rev Drug Discov* **2021**, 20, 689–709.
- [333] H. Sies, Antioxidants **2020**, 9, 852.

- [334] S. Reuter, S. C. Gupta, M. M. Chaturvedi, B. B. Aggarwal, *Free Radic Biol Med* **2010**, 49, 1603–1616.
- [335] R. Vona, L. Pallotta, M. Cappelletti, C. Severi, P. Matarrese, *Antioxidants* **2021**, 10, 201.
- [336] M. J. Iqbal, A. Kabeer, Z. Abbas, H. A. Siddiqui, D. Calina, J. Sharifi-Rad, W. C. Cho, *Cell Commun Signal* **2024**, 22, 7.
- [337] L. A. Pham-Huy, H. He, C. Pham-Huyc, Int J Biomed Sci 2008, 4, 89–96.
- [338] T. Rahman, I. Hosen, M. M. T. Islam, H. U. Shekhar, *Adv Biosci Biotechnol* **2012**, 03, 997–1019.
- [339] N. S. Aboelella, C. Brandle, T. Kim, Z.-C. Ding, G. Zhou, *Cancers* (Basel) **2021**, 13, 986.
- [340] S. Arfin, N. K. Jha, S. K. Jha, K. K. Kesari, J. Ruokolainen, S. Roychoudhury, B. Rathi, D. Kumar, *Antioxidants* **2021**, 10, 642.
- [341] J. D. Hayes, A. T. Dinkova-Kostova, K. D. Tew, *Cancer Cell* **2020**, 38, 167–197.
- [342] E. A. M. Saleh, F. Al-dolaimy, Y. Qasim almajidi, S. Baymakov, M. A. kader M, M. I. Ullah, A. hussien R. Abbas, I. H. Khlewee, Y. S. Bisht, A. H. Alsaalamy, *Pathol Res Pract* 2023, 249, 154664.
- [343] C.-L. Kuo, A. Ponneri Babuharisankar, Y.-C. Lin, H.-W. Lien, Y. K. Lo, H.-Y. Chou, V. Tangeda, L.-C. Cheng, A. N. Cheng, A. Y.-L. Lee, *J Biomed Sci* **2022**, 29, 74.
- [344] P. Chaudhary, P. Janmeda, A. O. Docea, B. Yeskaliyeva, A. F. Abdull Razis, B. Modu, D. Calina, J. Sharifi-Rad, *Front Chem* **2023**, 11, 1158198.
- [345] CBS News, *"Finding The Fountain Of Youth,"* can be found under https://www.cbsnews.com/news/finding-the-fountain-of-youth/, **2003**.
- [346] J. Branković, V. Matejić, D. Simijonović, M. D. Vukić, M. Kačaniova, M. Živanović, A. Mirić, J. Košarić, M. Branković, V. P. Petrović, *Arch Pharm* (Weinheim) 2024, 357, e2300725.
- [347] J. Branković, N. Milivojević, V. Milovanović, D. Simijonović, Z. D. Petrović, Z. Marković, D. S. Šeklić, M. N. Živanović, M. D. Vukić, V. P. Petrović, *R Soc Open Sci* 2022, 9, 211853.
- [348] J. Branković, V. M. Milovanović, D. Simijonović, S. Novaković, Z. D. Petrović, S. S. Trifunović, G. A. Bogdanović, V. P. Petrović, *RSC Adv* **2022**, 12, 16054–16070.
- [349] J. Branković, V. M. Milovanović, Z. D. Petrović, D. Simijonović, V. P. Petrović, *RSC Adv* **2023**, 13, 2884–2895.

ПРИЛОГ А



Слика П1. ¹Н NMR и ¹³С NMR спектар једињења **5**а.



Слика П2. ¹Н NMR и ¹³С NMR спектар једињења **56**.



Слика ПЗ. ¹Н NMR и ¹³С NMR спектар једињења 5в.



Слика П4. ¹Н NMR и ¹³С NMR спектар једињења **5г**.



Слика П5. ¹Н NMR и ¹³С NMR спектар једињења 5д.



Слика Пб. ¹Н NMR и ¹³С NMR спектар једињења **5ђ**.



Слика П7. ¹Н NMR и ¹³С NMR спектар једињења **5**е.











Слика П10. ¹Н NMR и ¹³С NMR спектар једињења **6г**.











Слика П13. ¹Н NMR и ¹³С NMR спектар једињења **6е**.



Слика П14. ¹Н NMR и ¹³С NMR спектар једињења **6ж**.



Слика П15. ¹Н NMR и ¹³С NMR спектар једињења 20.



Слика П16. ¹Н NMR и ¹³С NMR спектар једињења **22**.



Слика П17. ¹Н NMR и ¹³С NMR спектар једињења 24.



Слика П18. ¹Н NMR и ¹³С NMR спектар једињења 25.



Слика П19. ¹Н NMR и ¹³С NMR спектар једињења 27.



Слика П20. IR и UV-Vis спектри једињења 5а-в.



Слика П21. IR и UV-Vis спектри једињења 5г-ђ.



Слика П22. IR и UV-Vis спектри једињења 5е и 5ж.



Слика П23. IR и UV-Vis спектри једињења 6а, 6г и 6д.



Слика П24. IR и UV-Vis спектри једињења 6ђ-ж.



Слика П25. IR и UV-Vis спектри једињења 20, 22 и 24.



Слика П26. IR и UV-Vis спектри једињења 25 и 27.



Слика П27. Оптимизоване структуре новосинтетисаних хидразона **5а-ж** у гасној фази .



Слика П28. Оптимизоване структуре новосинтетисаних хидразона 6а и 6г-ж у гасној фази.



Слика П29. Оптимизоване структуре новосинтетисаних пиразолона 20, 22, 24, 25 и 27 у гасној фази.
5a		56		5в	
прелаз	λ(nm)	прелаз	λ(nm)	прелаз	λ(nm)
HOMO→LUMO	201	HOMO→LUMO	220	HOMO→LUMO	210
HOMO-1→LUMO	501	HOMO-1→LUMO	529	HOMO-1→LUMO	519
HOMO-1→LUMO+2	210	HOMO-2→LUMO	298	HOMO-3→LUMO	210 5
HOMO→LUMO+2	210	HOMO-1→LUMO+1	287,5	HOMO-3→LUMO+1	- 219,5
HOMO-3→LUMO+1		HOMO-1→LUMO+7	210	HOMO-3→LUMO+1	
HOMO-1→LUMO+2	-	HOMO→LUMO+2	210	HOMO-2→LUMO+2	-
HOMO→LUMO+3	200,5	HOMO-1→LUMO+3	200 5	HOMO-2→LUMO+1	200 5
HOMO-2→LUMO+2	_	HOMO→LUMO+3	200,5	HOMO-1→LUMO+3	200,5
HOMO-1→LUMO+7	_			HOMO→LUMO+8	
				HOMO-4→LUMO+1	
5г		5д	-	5ħ	
HOMO→LUMO	340	HOMO→LUMO	330,5	HOMO→LUMO	332
HOMO-1→LUMO	- 302	HOMO-2→LUMO	- 300 5	HOMO-3→LUMO	- 242
HOMO-2→LUMO	502	HOMO→LUMO+2	500,5	HOMO→LUMO+1	
HOMO-6→LUMO	_	HOMO-2→LUMO	- 288 5	HOMO→LUMO+3	218
HOMO-4→LUMO	_	HOMO→LUMO+1	200,5	HOMO-2→LUMO+3	-
HOMO→LUMO+3	_	HOMO-4→LUMO	216,5	HOMO→LUMO+8	_
HOMO→LUMO+8	202	HOMO-3→LUMO+1		HOMO-1→LUMO+6	201
HOMO-3→LUMO+1	_	HOMO-1→LUMO+3		HOMO→LUMO+9	201
HOMO-1→LUMO+2	_	HOMO-1→LUMO+3	_	HOMO-4→LUMO+1	_
HOMO-2→LUMO+3		HOMO→LUMO+9	_	HOMO-1→LUMO+2	
		HOMO-5→LUMO+1	200 5		
		HOMO-4→LUMO+1	200,5		
		HOMO-2→LUMO+2	_		
		HOMO-2→LUMO+3			
	-	_			
<u> </u>		5ж	004		
<u>HOMO→LUMO</u>	334,5	HOMO→LUMO	331		
HOMO-2→LUMO	302,5	HOMO-2→LUMO	302,5		
HOMO-3→LUMO	-	HOMO-4→LUMO	- 223		
HOMO→LUMO+1	- 244.5	HOMO-2→LUMO+1			
HOMO-3→LUMO+3	-	HOMO-3→LUMO+1	- 203		
HOMO-1→LUMO+1		HOMO-1 \rightarrow LUMO+3	-00		
HOMO-4→LUMO	- 220.5				_
HUMU-2→LUMU+1	0,0				_
$\frac{\text{HOMO-3} \rightarrow \text{LUMO+1}}{\text{HOMO-4}}$	_				
HOMO-1→LUMO+3	- 200.5				
HOMO-4→LUMO+1			-		
HOMO-2→LUMO+2					

Табела П1. Електронски прелази одговорни за појаву трака у UV-Vis спектрима хидразона серије **5**.

ба		бг		6д	
прелаз	λ(nm)	прелаз	λ(nm)	прелаз	λ(nm)
HOMO→LUMO	212	HOMO→LUMO	349	HOMO→LUMO	332
HOMO-1→LUMO	- 515	HOMO-1→LUMO	214 5	HOMO-2→LUMO	302,5
HOMO-1→LUMO+2		HOMO-2→LUMO	- 314,5	HOMO-4→LUMO	
HOMO→LUMO+2	228	HOMO-4→LUMO	-	HOMO→LUMO+2	-
HOMO-5→LUMO		HOMO-1→LUMO+3	-	HOMO→LUMO+3	- 235
HOMO-1→LUMO+1	-	HOMO→LUMO+3	-	HOMO-3→LUMO+1	-
HOMO-2→LUMO+3		HOMO-2→LUMO+2	2075	HOMO-3→LUMO+1	
HOMO-1→LUMO+3	-	HOMO-1→LUMO+2	- 207,5	HOMO-1→LUMO+3	-
HOMO-3→LUMO+1	208	HOMO-3→LUMO+2	-	HOMO-2→LUMO+2	-
HOMO-2→LUMO+2	-	HOMO-2→LUMO+3	-	HOMO→LUMO+8	208
HOMO→LUMO+7	-	HOMO→LUMO+8	-	HOMO-2→LUMO+3	-
				HOMO-4→LUMO+1	_
				HOMO-3→LUMO+2	-
			_		
<u> </u>		<u>6e</u>		бж	
HOMO→LUMO	- 333 5	HOMO→LUMO	334,5	HOMO→LUMO	333
HOMO-3→LUMO	555,5	HOMO-3→LUMO	303 5	HOMO-2→LUMO	- 305
HOMO-4→LUMO	- 238	HOMO-2→LUMO	303,5	HOMO→LUMO+2	303
HOMO→LUMO+4	250	HOMO-3→LUMO	-	HOMO-3→LUMO	_
HOMO-3→LUMO+1	_	HOMO→LUMO+2	_	HOMO→LUMO+2	- 236
HOMO-1→LUMO+2	2075	HOMO-2→LUMO+1	235	HOMO-4→LUMO	230
HOMO-4→LUMO+1	- 207,5	HOMO-4→LUMO	_	HOMO→LUMO+3	
HOMO-3→LUMO+2		HOMO-3→LUMO+1		HOMO-2→LUMO+2	_
		HOMO-2→LUMO+1	_	HOMO-1→LUMO+3	208
		HOMO-1→LUMO+3	_	HOMO-2→LUMO+3	
		HOMO-2→LUMO+2	207		
		HOMO→LUMO+8	207		
		HOMO-3→LUMO+2	_		
		HOMO-2→LUMO+3	-		

Табела П2. Електронски прелази одговорни за појаву трака у UV-Vis спектрима хидразона серије **6**.

		22		24	
20	1()	22	1()	24	<u> </u>
прелаз	λ(nm)	прелаз	<u>λ(nm)</u>	прелаз	λ(nm)
HOMO-1→LUMO	- 249	HOMO→LUMO	282	HOMO-1→LUMO	- 248
HOMO-3→LUMO		HOMO→LUMO		HOMO-4→LUMO	210
HOMO-3→LUMO	_	HOMO-1→LUMO	249	HOMO-4→LUMO	_
HOMO→LUMO+3	- 226	HOMO→LUMO+1		HOMO→LUMO+2	_
HOMO→LUMO+4	220	HOMO-3→LUMO		HOMO→LUMO+1	230
HOMO-3→LUMO+1		HOMO-1→LUMO+1		HOMO→LUMO+4	
HOMO→LUMO+7		HOMO-2→LUMO	227	HOMO→LUMO+3	_
HOMO-2→LUMO+3	-	HOMO-1→LUMO+3	- 221	HOMO→LUMO+7	
HOMO-2→LUMO+5	202	HOMO→LUMO+3		HOMO-2→LUMO+2	-
HOMO-2→LUMO+4	-	HOMO-2→LUMO+1		HOMO-2→LUMO+4	-
HOMO-2→LUMO+6	-	HOMO-2→LUMO+5		HOMO-1→LUMO+6	201,5
		HOMO-2→LUMO+6		HOMO-3→LUMO+4	
		HOMO-4→LUMO+1	202	HOMO-2→LUMO+1	
		HOMO-6→LUMO		HOMO-2→LUMO+3	
		HOMO-1→LUMO+6	•		
		L			
25		27			<u> </u>
HOMO→LUMO		HOMO→LUMO			
HOMO-1→LUMO	252	HOMO-1→LUMO	252		
HOMO-1→LUMO+1	-	HOMO-4→LUMO+2	•		
HOMO-3→LUMO	221	HOMO-1→LUMO+1	1 11		
HOMO-2→LUMO	- 231	HOMO-4→LUMO+2	232		
HOMO-4→LUMO+2		HOMO-4→LUMO+1			
HOMO-4→LUMO+1	-	HOMO-4→LUMO			
HOMO-1→LUMO+1	203	HOMO-5→LUMO	•		
HOMO-3→LUMO+3	-	HOMO-5→LUMO+1	202		
HOMO-3→LUMO+2	-	HOMO-6→LUMO+1	202		
		HOMO-2→LUMO+2			
		HOMO-4→LUMO+1			
		HOMO-6→LUMO			
				1	

Табела ПЗ. Електронски прелази одговорни за појаву трака у UV-Vis спектрима новосинтетисаних пиразолона 20, 22, 24, 25 и 27.

ПРИЛОГ Б

		инхибиција (%)						
	100 ((µM)	50 (50 (µM)		μM)		
једињење	20 min	60 min	20 min	60 min	20 min	60 min		
5a	92,2	94,4	89,5	90,1	86,1	86,7		
56	97,5	98,2	96,1	96,5	95,9	96,1		
5в	96,3	97,2	94,1	96,3	92,9	93,6		
5г	96,1	97,0	95,9	96,1	94,6	95,1		
5д	96,8	97,6	94,7	95,7	93,3	94,1		
5ђ	96,4	96,7	96,1	96,4	94,5	95,5		
5e	96,1	98,8	92,3	93,9	87,5	91,8		
5ж	95,4	96,0	94,4	94,5	93,7	94,0		
6a	93,0	93,5	92,8	93,4	92,3	92,4		
6г	93,5	94,4	92,9	93,0	92,3	92,4		
6д	90,3	91,5	89,3	89,4	87,9	88,6		
6ђ	94,1	94,9	92,5	92,8	87,9	90,4		
6e	92,5	94,9	91,8	92,5	90,9	91,3		
6ж	92,7	93,0	92,3	92,6	91,5	92,2		
20	96,7	97,2	95,8	96,4	94,4	94,9		
22	91,6	91,7	89,7	90,4	89,4	89,6		
24	92,1	93,9	90,9	91,7	89,9	90,7		
25	95,1	95,2	94,4	94,9	90,5	94,7		
27	88,5	89,8	88,1	89,6	84,2	89,6		
NDGA	94,5	94,1	94,2	94,2	94,6	94,6		
Q	95,1	95,4	96,8	96,5	95,3	95,1		

Табела П4. Интеракција DPPH радикала са новосинтетисаним хидразонима и пиразолонима при концентрацијама од 100, 50 и 25 µM .

једињење	позиција	HOMO(eV)	LUMO(eV)	Еномо-Егимо разлика (eV)	$\Delta E_{\rm iso}$ (kJ mol ⁻¹)
вода					
1a	NH	-0,235	-0,074	0,161	36,366
16	R⁵-ОН (Б)	0 222	0.070		24,086
10	NH	-0,233	-0,078	0,133	20,699
15	R ⁷ -ОН (Б)	0 226	0.072	0.152	-16,441
18	NH	-0,220	-0,073	0,155	18,048
1 г	R5-ОН (Б)	-0.225	-0.078	0 147	-6,545
	NH	-0,225	-0,078	0,147	18,048
1π	R ⁷ -ОН (Б)	-0 221	-0.073	0 148	-24,239
тд	NH	-0,221	-0,073	0,140	16,084
1ħ	R ⁷ -ОН (Б)	-0.216	-0.073	0 143	-41,675
	NH	0,210	0,075	0,145	13,319
	R ⁵ -ОН (Б)				22,424
1e	R ⁷ -ОН (Б)	-0,225	-0,074	0,151	-9,948
	NH				10,709
	R6-ОН (Б)	-0,223	-0,073	0,149	-33,013
1ж	R ⁷ -ОН (Б)				-43,896
	NH				18,100
бензен					
1 a	NH	-0,231	-0,070	0,161	28,093
16	R ⁵ -ОН (Б)	-0.230	-0.077	0 152	40,876
10	NH	-0,230	-0,077	0,155	14,934
1 p	R ⁷ -ОН (Б)	-0.224	-0.070	0 154	-12,542
18	NH	-0,224	-0,070	0,134	18,147
1r	R ⁵ -ОН (Б)	-0 219	-0.075	0 144	-3,169
	NH	0,217	0,075	0,144	11,907
1π	R ⁷ -ОН (Б)	-0.218	-0.070	0 148	-14,813
тд	NH	0,210	0,070	0,140	13,521
1ħ	R ⁷ -ОН (Б)	-0.211	-0.069	0 142	-31,327
	NH	0,211	0,007	0,142	10,127
	R ⁵ -ОН (Б)				39,942
1e	R ⁷ -ОН (Б)	-0,222	-0,072	0,150	-2,610
	NH				6,608
	R ⁶ -ОН (Б)				-34,105
1ж	R ⁷ -ОН (Б)	-0,221	-0,070	0,151	-44,384
	NH				18,914

Табела П5. Израчунате вредности *Е*номо, *Е*LUMO, *Е*НОМО-*Е*LUMO разлике и Δ*E*_{iso} у води и бензену за хидразоне **1а-ж**.

једињење	позиција	HOMO (eV)	LUMO (eV)	Еномо-Ецимо разлика (eV)	Δ <i>E</i> iso (kJ mol ⁻¹)
	R1-OH (A)				1,720
5a	R ² -OH (A)	-0,234	-0,083	0,151	-7,183
	NH				28,216
	R1-OH (A)				1,625
56	R ² -OH (A)	0.224	0.002	0 150	-6,490
50	R ⁵ -ОН (Б)	-0,234	-0,065	0,150	30,913
	NH				20,739
	R1-OH (A)				1,917
5.0	R ² -OH (A)	0 220	0.079	0 1 / 0	-7,485
38	R ⁷ -ОН (Б)	-0,220	-0,078	0,149	-10,245
	NH				20,776
	R1-OH (A)				1,714
50	R ² -OH (A)	-0.226	-0.083	0 1 4 3	-6,776
51	R ⁵ -ОН (Б)	-0,220	-0,005	0,143	8,543
	NH				20,615
	R1-OH (A)	-0,222	-0,078		1,922
5 л	R ² -OH (A)			0 144	-7,606
54	R ⁷ -ОН (Б)			0,111	-18,720
	NH				18,029
	R1-OH (A)		-0,078	0 139	1,628
5ħ	R ² -OH (A)	-0.217			-7,753
51)	R ⁷ -ОН (Б)	0,217		0,137	-36,605
	NH				14,627
	R1-OH (A)				2,053
	R ² -OH (A)				-7,091
5e	R⁵-OН (Б)	-0,226	-0,079	0,147	27,749
	R ⁷ -ОН (Б)				-3,602
	NH				10,158
	R1-OH (A)				1,581
	R ² -OH (A)				-7,480
5ж	R ⁶ -ОН (Б)	-0,224	-0,079	0,145	-10,119
	R ⁷ -ОН (Б)				-38,317
	NH				20,644

Табела Пб. Израчунате вредности *Е*номо, *Е*номо-*Е*номо-*Е*номо разлике и Δ*E*_{iso} у води за хидразоне **5а-ж**.

једињење	позиција	HOMO (eV)	LUMO (eV)	Еномо-Ецимо разлика (eV)	ΔE _{iso} (kJ mol ⁻¹)
	R ¹ -OH (A)				9,877
5a	R ² -OH (A)	-0,232	-0,082	0,150	-1,331
	NH				21,225
	R1-OH (A)				9,930
56	R ² -OH (A)	-0.233	-0.084	0 1/0	2,190
50	R5-ОН (Б)	-0,233	-0,004	0,149	35,471
	NH				11,978
	R1-OH (A)				10,090
5 B	R ² -OH (A)	-0 228	-0.077	0 151	-1,738
56	R ⁷ -ОН (Б)	0,220	0,077	0,151	-9,938
	NH				15,753
	R1-OH (A)				12,660
5г	R ² -OH (A)	-0.223	-0.082	0 1 4 1	4,524
51	R ⁵ -ОН (Б)	0,220	0,002	0,111	21,936
	NH				13,899
	R ¹ -OH (A)	-0,222	-0,077		9,822
5л	R ² -OH (A)			0.145	0,585
54	R ⁷ -ОН (Б)			0)210	-12,933
	NH				12,749
	R ¹ -OH (A)				9,557
5ħ	R ² -OH (A)	-0.215	-0,077	0.139	0,407
	R ⁷ -ОН (Б)	-,		-,	-30,096
	NH				8,809
	R^1 -OH (A)				10,200
_	R ² -OH (A)			o 4 4 -	1,749
5e	R ⁵ -ОН (Б)	-0,226	-0,079	0,147	35,182
	R ⁷ -ОН (Б)				-0,202
	NH				3,327
	K [⊥] -OH (A)				9,538
_	R ² -OH (A)				-2,224
5ж	К₀-ОН (Б)	-0,225	-0,077	0,147	-7,987
	R ⁷ -ОН (Б)				-45,232
	NH				16,081

Табела П7. Израчунате вредности *Е*номо, *Е*цимо, *Е*номо-*Е*цимо разлике и ∆*E*_{iso} у бензену за хидразоне **5а-ж**.

једињење	позиција	HOMO (eV)	LUMO (eV)	EHOMO-ELUMO	$\Delta E_{\rm iso}$
	R ¹ -OH (A)			разлика (еv)	<u>(KJ MOI - J</u> -14 553
	R^2 -OH (A)				-29 689
6a	R^3 -OH (A)	-0,234	-0,079	0,155	-10 455
	NH				24.002
	R ¹ -OH (A)				-10,715
	R ² -OH (A)				-29,064
6г	R ³ -OH (A)	-0,225	-0,079	0,146	-9,688
	R ⁵ -ОН (Б)				8,433
	NH				19,402
	R ¹ -OH (A)				-11,510
	R ² -OH (A)		-0,075	0,146	-32,485
6д	R ³ -OH (A)	-0,220			-11,232
	R ⁷ -ОН (Б)				-19,539
	NH				15,144
	R1-OH (A)				-14,545
	R ² -OH (A)				-29,986
6ђ	R ³ -OH (A)	-0,216	-0,075	0,141	-14,141
	R ⁷ -ОН (Б)				-37,408
	NH				9,444
	R ¹ -OH (A)				-12,944
	R ² -OH (A)				-29,411
6e	R ³ -OH (A)	-0.224	-0.075	0.149	-10,694
	R ⁵ -ОН (Б)	- ,	-,	-, -	29,230
	R ⁷ -ОН (Б)				-5,227
	NH D1 OU (A)				6,979
	$R^{1}-OH(A)$				-11,704
	R^2 -OH (A)				-29,715
6ж	$R^{3}-OH(A)$	-0.222	-0,075	0,147	-11,203
	К°-UH (Б)			0,±17	-26,2025
	к ⁷ -ОН (Б)				-37,0169
	NH				17,297

Табела П8. Израчунате вредности *Е*номо, *Е*номо-*Е*номо-*Е*номо разлике и Δ*E*_{iso} у води за хидразоне **6а и 6г-ж**.

једињење	позиција	HOMO (eV)	LUMO (eV)	Еномо-Ецимо разлика (eV)	ΔE _{iso} (kI mol ⁻¹)
	R1-OH (A)		0.070		-12,035
6a	R ² -OH (A)	0.222		0155	-27,620
	R ³ -OH (A)	-0,233	-0,078	0,155	-10,056
	NH				17,139
	R1-OH (A)				-11,594
	R ² -OH (A)				-24,312
6г	R ³ -OH (A)	-0,221	-0,078	0,143	-6,910
	R⁵-ОН (Б)				18,951
	NH				9,977
	R1-OH (A)				-9,565
	R ² -OH (A)		-0,073		-23,244
6д	R ³ -OH (A)	-0,219		0,146	-8,675
	R ⁷ -ОН (Б)				-13,860
	NH				11,993
	R1-OH (A)		-0,073		-10,022
	R ² -OH (A)				-23,055
6ђ	R ³ -OH (A)	-0,213		0,141	-8,777
	R ⁷ -ОН (Б)				-30,813
	NH				5,926
	R ¹ -OH (A)				-13,936
	R ² -OH (A)				-27,066
6e	R ³ -OH (A)	-0.224	-0.075	0.149	-10,029
	R ⁵ -ОН (Б)	- ,	-,	-, -	36,959
	К ⁷ -ОН (Б)				-1,507
	NH D1 OU (A)				-0,123
	$R^{1}-OH(A)$				-9,145
	R^2 -OH (A)				-22,705
бж	R ³ -OH (A)	-0,222	-0,073	0,149	-8,30971
	К⁰-ОН (Б)		,	0,117	-30,8864
	К′-ОН (Б)				-43,4284
	NH				13,112

Табела П9. Израчунате вредности *Е*номо, *Е*номо, *Е*номо-*Е*номо разлике и Δ*E*_{iso} у бензену за хидразоне **ба и бг-ж**.

једињење	позиција	HOMO (eV)	LUMO (eV)	EHOMO-ELUMO	$\Delta E_{\rm iso}$
	$R^2-OH(A)$			разлика (еу)	<u>-5 002</u>
	R^3 -OH (A)				-45 038
7a	R ⁴ -OH (A)	-0,233	-0,076	0,157	-22,438
	NH				23.002
	R ² -OH (A)				-4.663
	R ³ -OH (A)				-44.164
7б	R ⁴ -OH (A)	-0.230	-0.077	0.154	-21.526
	R⁵-OH (Б)	-,	- , -	-, -	26,279
	NH				16,336
	R ² -OH (A)				-5,485
	R ³ -OH (A)				-45,841
7в	R4-OH (A)	-0,224	-0,071	0,153	-23,010
	R ⁷ -ОН (Б)				-17,423
	NH				14,627
	R ² -OH (A)				-4,521
	R ³ -OH (A)				-44,227
7г	R4-OH (A)	-0,224	-0,076	0,149	-19,064
	R5-ОН (Б)				-3,904
	NH				16,682
	R ² -OH (A)	-0,220			-5,676
	R ³ -OH (A)				-45,734
7д	R4-OH (A)		-0,071	0,149	-22,766
	R ⁷ -ОН (Б)				-24,890
	NH				12,484
	R ² -OH (A)		-0,071	0,144	-5,532
	R ³ -OH (A)				-45,781
7ħ	R4-OH (A)	-0,215			-22,548
	R ⁷ -ОН (Б)				-42,234
	NH				10,066
	R ² -OH (A)				-4,910
	R ³ -OH (A)				-44,930
7e	R4-OH (A)	-0.223	-0.071	0 1 5 2	-21,931
70	R ⁵ -ОН (Б)	0,225	0,071	0,152	24,703
	R ⁷ -ОН (Б)				-10,851
	NH				7,175
	R ² -OH (A)				-5,437
	R ³ -OH (A)				-45,584
7ж	R4-OH (A)	-0 222	-0.071	0 1 5 0	-23,023
/ //	R6-ОН (Б)	0,222	0,071	0,100	-33,352
	R ⁷ -ОН (Б)				-44,542
	NH				14,750

Табела П10. Израчунате вредности *Е*номо, *Е*номо, *Е*номо-*Е*номо разлике и Δ*E*_{iso} у води за хидразоне **7а-ж**.

једињење	позиција	HOMO (eV)	LUMO (eV)	Еномо-Егимо разлика (eV)	ΔE _{iso} (kl mol ⁻¹)
	R ² -OH (A)				5.579
_	R ³ -OH (A)				-49.533
7a	R ⁴ -OH (A)	-0,232	-0,073	0,160	-25,512
	NH				20,702
	R ² -OH (A)				6,417
	R ³ -OH (A)				-48,601
7б	R4-OH (A)	-0,228	-0,075	0,154	-24,688
	R ⁵ -ОН (Б)				38,120
	NH				9,538
	R ² -OH (A)				5,083
	R ³ -OH (A)				-50,270
7в	R4-OH (A)	-0,223	-0,068	0,155	-25,998
	R ⁷ -ОН (Б)				-13,096
	NH				11,379
	R ² -OH (A)				6,380
	R ³ -OH (A)			o 4 4 -	-48,858
7г	R4-OH (A)	-0,219	-0,073	0,147	-24,816
	R ⁵ -ОН (Б)				-3,841
	NH				6,874
	R ² -OH (A)	-0,217			4,925
	R ³ -OH (A)				-50,339
7д	R ⁴ -OH (A)		-0,067	0,150	-25,956
	R ⁷ -ОН (Б)				-15,225
	NH				8,704
	R ² -OH (A)		-0,067	0,144	2,337
	R ³ -OH (A)				-50,586
7 ђ	R ⁴ -OH (A)	-0,211			-26,0423
	R ⁷ -ОН (Б)				-31,632
	NH				5,747
	R ² -OH (A)				6,117
	R^3 -OH (A)				-49,365
7e	R ⁴ -OH (A)	-0,221	-0,069	0,152	-25,021
	R ⁵ -ОН (Б)	,	,	,	39,753
	R ⁷ -ОН (Б)				-3,145
	NH D2 OU (A)				1,896
	K^2 -UH (A)				4,897
	R^3 -OH (A)				-50,076
7ж	K⁴-OH (A)	-0,220	-0,068	0,152	-25,908
	К⁰-ОН (Б)	, -	,	, -	-34,447
	R ⁷ -ОН (Б)				-44,849
	NH				11,991

Табела П11. Израчунате вредности *Е*номо, *Е*номо, *Е*номо-*Е*номо разлике и Δ*E*_{iso} у бензену за хидразоне **7а-ж**.

		HAT	SE	T-PT	SP	SPLET	
једињење	позиција	BDE	IP	PDE	PA	ETE	
	R1-OH (A)	348		39	158	345	
5a	R ² -OH (A)	340	464	30	165	329	
	NH	375		65	151	379	
	R1-OH (A)	348		19	155	347	
56	R ² -OH (A)	340	1.9.1	10	163	331	
50	R ⁵ -ОН (Б)	378	404	48	178	354	
	NH	368		38	135	387	
	R1-OH (A)	349		37	159	344	
5.0	R ² -OH (A)	339	467	27	166	328	
38	R ⁷ -ОН (Б)	337	407	24	142	349	
	NH	368		55	154	368	
	R1-OH (A)	348		46	155	348	
50	R ² -OH (A)	340	457	37	166	329	
51	R ⁵ -ОН (Б)	355	ч Ј 7	53	179	331	
	NH	367		65	136	386	
	R1-OH (A)	349	453	50	159	344	
5 л	R ² -OH (A)	339		41	168	326	
эд	R ⁷ -ОН (Б)	328	455	30	152	331	
	NH	365		66	154	365	
	R1-OH (A)	348		63	159	344	
5ħ	R ² -OH (A)	339	440	54	168	326	
51)	R ⁷ -ОН (Б)	310	110	25	153	312	
	NH	361		76	153	363	
	R1-OH (A)	349		40	157	346	
	R ² -OH (A)	340		31	164	330	
5e	R ⁵ -ОН (Б)	375	463	66	175	354	
	R ⁷ -ОН (Б)	343		35	142	356	
	NH	357		48	138	373	
	R ¹ -OH (A)	348		44	159	344	
	R ² -OH (A)	339		35	168	325	
5ж	R ⁶ -ОН (Б)	337	459	33	162	329	
	R ⁷ -ОН (Б)	308		4	125	337	
	NH	367		63	153	369	

Табела П12. Вредности израчунатих термодинамичких параметара (kJ mol⁻¹) за деривате **5а-ж** у води.

		НАТ	SE	T-PT	SPLET	
једињење	позиција	BDE	IP	PDE	PA	ETE
	R1-OH (A)	359		133	399	349
5a	R ² -OH (A)	348	615	122	417	320
	NH	370		145	372	388
	R1-OH (A)	359		116	392	357
56	R ² -OH (A)	351	622	108	409	332
30	R ⁵ -ОН (Б)	384	052	142	419	355
	NH	361		118	350	400
	R1-OH (A)	359		131	402	347
5 p	R ² -OH (A)	347	617	119	419	318
ЭВ	R ⁷ -ОН (Б)	339	017	111	370	359
	NH	365		137	376	378
	R1-OH (A)	362	600	142	396	355
5.0	R ² -OH (A)	353		134	416	327
51	R ⁵ -ОН (Б)	371	009	151	424	336
	NH	363		143	355	397
	R1-OH (A)	359		146	400	348
5 л	R ² -OH (A)	349	602	137	418	321
эд	R ⁷ -ОН (Б)	336	002	123	384	341
	NH	362		149	375	376
	R1-OH (A)	358		164	400	348
5ħ	R ² -OH (A)	349	584	155	417	321
51)	R ⁷ -ОН (Б)	319	504	124	387	321
	NH	358		163	374	373
	R1-OH (A)	359		134	394	354
	R ² -OH (A)	351		125	411	329
5e	R ⁵ -ОН (Б)	384	615	159	415	359
	R ⁷ -ОН (Б)	349		123	367	371
	NH	352		127	353	388
	R1-OH (A)	358		138	401	347
	R ² -OH (A)	347		126	419	317
5ж	R ⁶ -ОН (Б)	341	610	120	401	330
	R ⁷ -ОН (Б)	304		83	344	349
	NH	365		144	376	379

Табела П13. Вредности израчунатих термодинамичких параметара (kJ mol⁻¹) за деривате **5а-ж** у бензену.

	•	НАТ	SET	Г-РТ	SPLET	
једињење	позиција	BDE	IP	PDE	PA	ETE
	R1-OH (A)	332		0	118	369
60	R ² -OH (A)	317	107	-15	144	327
Ua	R ³ -OH (A)	336	407	4	131	360
	NH	371		38	154	372
	R1-OH (A)	336		35	116	375
	R ² -OH (A)	318		16	148	324
бг	R ³ -OH (A)	337	456	36	130	362
	R⁵-ОН (Б)	355		54	182	327
	NH	366		65	142	379
	R1-OH (A)	335		41	120	370
6д	R ² -OH (A)	314		20	145	324
	R ³ -OH (A)	336	449	41	133	357
	R ⁷ -ОН (Б)	327		33	153	328
	NH	362		68	157	359
	R1-OH (A)	332		53	119	367
	R ² -OH (A)	317	434	38	147	324
6ђ	R ³ -OH (A)	333		53	130	357
	R ⁷ -ОН (Б)	309		30	151	312
	NH	356		77	154	357
	R1-OH (A)	334		33	116	373
	R ² -OH (A)	317		17	146	326
60	R ³ -OH (A)	336	455	36	131	360
Ue	R ⁵ -ОН (Б)	376	455	76	177	353
	R ⁷ -ОН (Б)	342		41	144	352
	NH	354		53	141	367
	R1-OH (A)	335		33	122	368
	R ² -OH (A)	317		15	150	322
6170	R ³ -OH (A)	336	157	33	132	358
UX	R ⁶ -ОН (Б)	321	437	18	140	335
	R ⁷ -ОН (Б)	310		8	126	338
	NH	364		62	156	362

Табела П14. Вредности израчунатих термодинамичких параметара (kJ mol⁻¹) за деривате **ба** и **бг-ж** у води.

		НАТ	SET	Г-РТ	SPLET	
једињење	позиција	BDE	IP	PDE	PA	ETE
	R1-OH (A)	337		93	339	387
60	R ² -OH (A)	321	(22	78	388	322
oa	R ³ -OH (A)	339	033	95	363	365
	NH	366		122	375	381
бг	R1-OH (A)	337		125	333	393
	R ² -OH (A)	325		112	387	327
	R ³ -OH (A)	342	602	129	362	370
	R⁵-ОН (Б)	368		155	423	334
	NH	359		146	358	390
	R1-OH (A)	339		132	344	385
6д	R ² -OH (A)	326		118	392	323
	R ³ -OH (A)	340	597	133	368	362
	R ⁷ -ОН (Б)	335		128	386	338
	NH	361		153	381	369
	R1-OH (A)	339		148	341	388
	R ² -OH (A)	326	581	135	391	324
6ђ	R ³ -OH (A)	340		149	367	362
	R ⁷ -ОН (Б)	318		127	389	318
	NH	355		163	378	367
	R1-OH (A)	335		119	332	393
	R ² -OH (A)	322		106	385	326
60	R ³ -OH (A)	339	606	123	360	369
Ue	R ⁵ -ОН (Б)	386	000	170	417	358
	R ⁷ -ОН (Б)	347		131	369	367
	NH	349		133	356	382
	R1-OH (A)	340		124	345	384
	R ² -OH (A)	326		111	393	323
6110	R ³ -OH (A)	341	605	125	368	362
UX	R ⁶ -ОН (Б)	318	005	102	361	346
	R ⁷ -ОН (Б)	305		90	346	348
	NH	362		146	379	373

Табела П15. Вредности израчунатих термодинамичких параметара (kJ mol⁻¹) за деривате **6а** и **6г-ж** у бензену.

		НАТ	SF	SET-PT		SPLET	
једињење	позиција	BDE	IP	PDE	PA	ЕТЕ	
	R ² -OH (A)	345		17	160	340	
70	R ³ -OH (A)	305	102	-23	112	348	
/a	R ⁴ -OH (A)	328	483	0	132	350	
	NH	373		45	172	356	
	R ² -OH (A)	346		25	159	341	
	R ³ -OH (A)	306		-14	110	351	
7б	R4-OH (A)	329	475	8	132	352	
	R⁵-ОН (Б)	377		56	185	346	
	NH	367		46	155	366	
	R ² -OH (A)	345		45	161	339	
	R ³ -OH (A)	305		5	113	346	
7в	R4-OH (A)	327	454	28	133	349	
	R ⁷ -ОН (Б)	333		33	147	340	
	NH	365		65	176	344	
	R ² -OH (A)	346		44	162	339	
	R ³ -OH (A)	306		4	113	348	
7г	R4-OH (A)	331	456	29	134	352	
	R⁵-ОН (Б)	346		45	171	330	
	NH	367		65	156	366	
	R ² -OH (A)	345		54	161	339	
	R ³ -OH (A)	305		14	113	346	
7д	R4-OH (A)	328	445	37	133	349	
	R ⁷ -ОН (Б)	325		35	156	324	
	NH	363		72	174	344	
	R ² -OH (A)	345		66	161	339	
	R ³ -OH (A)	305		26	113	346	
7ħ	R4-OH (A)	328	433	49	133	349	
	R ⁷ -ОН (Б)	308		29	154	309	
	NH	360		82	175	339	
	R ² -OH (A)	345		45	160	340	
	R ³ -OH (A)	305		5	111	349	
70	R4-OH (A)	328	455	28	132	351	
78	R ⁵ -ОН (Б)	375	455	75	182	347	
	R ⁷ -ОН (Б)	340		39	145	349	
	NH	358		57	159	353	
	R ² -OH (A)	345		49	161	339	
	R ³ -OH (A)	305		9	112	347	
_	R ⁴ -OH (A)	327		31	133	349	
7ж	R ⁶ -ОН (Б)	317	450	21	138	333	
	R ⁷ -ОН (Б)	306		10	128	332	
	NH	365		69	175	345	

Табела П16. Вредности израчунатих термодинамичких параметара (kJ mol⁻¹) за деривате **7а-ж** у води.

		НАТ	SET	г-РТ	SP	SPLET	
једињење	позиција	BDE	IP	PDE	PA	ЕТЕ	
	R ² -OH (A)	354		116	405	338	
70	R ³ -OH (A)	299	620	60	329	359	
/ d	R ⁴ -OH (A)	323	028	84	354	358	
	NH	369		131	399	359	
	R ² -OH (A)	355		125	400	344	
	R ³ -OH (A)	300		70	323	366	
7б	R4-OH (A)	324	619	94	348	364	
	R ⁵ -ОН (Б)	386		156	434	342	
	NH	358		128	375	372	
	R ² -OH (A)	353		141	407	336	
7в	R ³ -OH (A)	298		86	331	356	
	R4-OH (A)	322	601	110	356	356	
	R ⁷ -ОН (Б)	335		123	379	346	
	NH	360		148	404	345	
	R ² -OH (A)	355		148	402	342	
7г	R ³ -OH (A)	299		93	325	364	
	R4-OH (A)	323	596	117	350	363	
	R ⁵ -ОН (Б)	344		138	404	330	
	NH	355		149	379	366	
7д	R ² -OH (A)	353		155	406	336	
	R ³ -OH (A)	298		100	331	357	
	R ⁴ -OH (A)	322	588	124	355	356	
	R ⁷ -ОН (Б)	333		135	394	328	
	NH D2 OU (A)	357		159	401	345	
	R^2 -OH (A)	351		168	406	334	
7 1	R^3 -OH (A)	298	F7 0	115	330	357	
7 ŋ	R ⁴ -OH (A)	322	572	140	355	357	
	R ⁷ -ОН (Б)	31/		134	395	311	
	NH D ² OU (A)	354		1/1	403	341	
	R^2 -OH (A)	354		144	402	342	
	R^3 -OH (A)	299		89	325	363	
7e	R^4 -OH (A)	323	599	113	350	362	
	К ³ -ОН (Б)	388		1/8	429	348	
	R ⁷ -ОН (Б)	345		135	379	355	
	NH D ² OU (A)	350		140	379	360	
	K^2 -OH (A)	353		147	407	335	
	R^3 -OH (A)	298		92	331	356	
7ж	K⁴-OH (A)	322	596	116	356	355	
	R⁰-ОН (Б)	314		108	366	337	
	R ⁷ -ОН (Б)	303		97	353	340	
	NH	360		154	404	346	

Табела П17. Вредности израчунатих термодинамичких параметара (kJ mol⁻¹) за деривате **7а-ж** у бензену.

		HAT	SET-PT		SPLET	
радикал	позиција	$\Delta H_{\rm BDE}$	$\Delta H_{\rm IP}$	$\Delta H_{\rm PDE}$	$\Delta H_{\rm PA}$	$\Delta H_{\rm ETE}$
	R ² -OH (A)	-74		-197	-85	11
	R ³ -OH (A)	-114		-237	-133	19
•OCH2	R4-OH (A)	-92	122	-214	-113	21
00115	R6-ОН (Б)	-102	144	-225	-108	5
	R ⁷ -ОН (Б)	-113		-236	-118	4
	NH	-54		-176	-71	17
	R^2 -OH (A)	-82		-205	-93	11
	R^3 -OH (A)	-122		-245	-141	19
•OC(CH ₃) ₃	R ⁴ -OH (A)	-100	123	-222	-121	21
	К⁰-ОН (Б) В7-ОН (Б)	-110		-233	-116	6
	К ⁷ -ОН (Б)	-121		-244	-126	4
	$\frac{\text{NH}}{\text{D}^2 \text{OU}(\Lambda)}$	-62		-185	-/9	1/
	R^2 -OH (A)	-144		-193	-81	-63
	R^{3} -OH (A)	-184		-233	-129	-55
•OH	K ⁴ -OH (A)	-162	48	-210	-109	-53
	К ^о -ОН (Б) Р7 ОЦ (Г)	-1/2		-221	-104	-69
		-183		-232	-113	-70
·		-124		<u>-172</u> 152	-07	-57
	$R^{-}OH(A)$	-0		-132	-41	12 12
•00H	$R^{4}-OH(A)$	-40		-192	-69	42
		-24	146	-170	-00	20
	$R^{\circ}-OH(D)$	-34		-100	-03	29
	К′-ОН (Б)	-45		-191	-/3	28
	$\frac{NH}{D^2 OU(\Lambda)}$	14		$\frac{-132}{102}$	-26	40
	R^2 -OH (A)	-37		-193	-/4	38 52
	$R^3-OH(A)$	-30 1E		-194 171	-90	52 E4
•00CH3		-15	156	-1/1 101	-09	20
		-23		-101	-04	20
	NH	-37		-193	-74	50
	$\frac{1}{R^2}$	23		-135	-20	16
	R^{3} -OH (A)	-39		-120	-62	24
	R^4 -OH (A)	-16		-143	-42	26
•00-CH=CH ₂	R ⁶ -OH (F)	-26	127	-154	-37	10
	R ⁷ -OH (5)	-37		-165	-47	9
	NH	22		-105	0	22
	R ² -OH (A)	26		-60	51	-25
	R^3 -OH (A)	-14		-100	3	-17
DDDU	R^4 -OH (A)	9	07	-78	24	-15
DPPH	R ⁶ -OH (́Б)́	-1	87	-88	29	-30
	R ⁷ -О́Н (̀Б)́	-13		-99	19	-32
	NH	47		-40	66	-19
	R ² -OH (A)	77		-286	43	34
	R ³ -OH (Ă)	37		-326	-5	42
0	R ⁴ -OH (Ă)	60	262	-304	15	44
U_2^{*-}	R6-ОН (̀Б)́	49	303	-314	20	29
	R ⁷ -ОН (̀Б)́	38		-325	10	28
	NH	97		-266	57	40

Табела П18. Вредности израчунатих енталпија реакција (kJ mol⁻¹) за дериват **7ж** у води.

		HAT	SET-PT		SPI	LET
радикал	позиција	$\Delta H_{\rm BDE}$	$\Delta H_{\rm IP}$	$\Delta H_{\rm PDE}$	$\Delta H_{\rm PA}$	$\Delta H_{\rm ETE}$
	R ² -OH (A)	-65		-373	-113	48
	R ³ -OH (A)	-120		-428	-189	69
•OCH2	R4-OH (A)	-96	308	-404	-164	68
00113	R6-ОН (Б)	-104	500	-413	-154	50
	R ⁷ -ОН (Б)	-115		-423	-167	53
	NH	-58		-366	-117	59
	R^2 -OH (A)	-73		-370	-110	37
	R^3 -OH (A)	-128		-425	-186	58
•OC(CH ₃) ₃	R ⁴ -OH (A)	-104	297	-401	-161	5/
		-112		-409	-151	39
		-123		-420	-104 112	41
		-00 122		-303	-115	47
	$R^{-}OH(A)$	-133		-300	-120	-/
	$R^{4}-OH(A)$	-163		-441	-202	17
•OH	R6-OH (F)	-103	254	-417	-177	-5
	R7-OH (D)	-172		-420	-107	-3
	NH	-125		-379	-130	4
	R ² -OH (A)	4		-335	-75	79
	R^3 -OH (A)	-51		-390	-151	100
•ООН	R ⁴ -OH (A)	-27		-366	-126	99
	R ⁶ -OH (Б)	-35	339	-375	-116	81
	R ⁷ -OH (5)	-46		-385	-129	83
	NH	11		-328	-79	90
	R ² -OH (A)	12		-332	-71	84
	R ³ -OH (A)	-43		-387	-148	105
.00011	R ⁴ -OH (A)	-19	244	-363	-123	104
•00CH3	R6-ОН (̀Б)́	-27	344	-371	-113	85
	R ⁷ -ОН (̀Б)́	-38		-382	-126	88
	NH	19		-325	-75	94
	R ² -OH (A)	11		-291	-30	41
	R ³ -OH (A)	-44		-346	-107	63
•00-CH-CH2	R4-OH (A)	-20	302	-322	-82	62
	R6-ОН (Б)	-28	502	-330	-72	43
	R ⁷ -ОН (Б)	-39		-341	-85	46
	NH	18		-284	-34	52
	R^2 -OH (A)	36		-173	87	-51
	R^{3} -OH (A)	-19		-228	11	-30
DPPH	R ⁴ -OH (A)	5	209	-204	36	-31
		-4 1 /		-215	40	-50
	к ⁷ -Оп (D) NH	-14		-225	03 22	-47
	R^2 -OH(Δ)	96		-702	18	79
	R ³ -OH (A)	41		-757	-59	100
	R ⁴ -OH (A)	66		-733	-34	99
02•-	R6-OH (K)	57	798	-741	-24	81
	R ⁷ -OH (B)	47		-752	-37	83
	NH	103		-695	14	90

Табела П19. Вредности израчунатих енталпија реакција (kJ mol⁻¹) за дериват **7ж** у бензену.

	E	НОМО	EL	UMO	EHOMO-ELU	мо разлика
једињење	вода	бензен	вода	бензен	вода	бензен
8	-0,226	-0,217	-0,026	-0,035	0,200	0,182
9	-0,225	-0,214	-0,026	-0,031	0,198	0,183
10	-0,226	-0,216	-0,026	-0,034	0,200	0,182
11	-0,226	-0,217	-0,026	-0,034	0,199	0,183
12	-0,227	-0,220	-0,028	-0,037	0,199	0,183
13	-0,227	-0,220	-0,029	-0,038	0,198	0,183
14	-0,226	-0,219	-0,028	-0,037	0,198	0,183
15	-0,228	-0,220	-0,107	-0,100	0,120	0,121
16	-0,228	-0,224	-0,114	-0,102	0,114	0,122
17	-0,228	-0,224	-0,113	-0,100	0,115	0,125
18	-0,228	-0,220	-0,025	-0,034	0,203	0,187
19	-0,226	-0,217	-0,026	-0,034	0,200	0,183
20	-0,223	-0,214	-0,025	-0,032	0,198	0,182
21	-0,220	-0,215	-0,026	-0,034	0,195	0,181
22	-0,220	-0,212	-0,024	-0,029	0,196	0,184
23	-0,217	-0,210	-0,025	-0,034	0,192	0,176
24	-0,214	-0,203	-0,025	-0,035	0,189	0,168
25	-0,227	-0,219	-0,026	-0,034	0,201	0,185
26	-0,226	-0,215	-0,026	-0,035	0,200	0,180
27	-0,227	-0,219	-0,037	-0,041	0,191	0,178

Табела П20. Израчунате вредности *Еномо, Ецимо* и *Еномо-Ецимо* разлике (eV) за деривате **8–27** у води и бензену.

	прс	тен А	прст	ген Б		прстен В			
једињење	N1	N2	01	N2	01	02	03		
вода									
8	-7,95	-21,60	0,29	26,91	/	/	/		
9	-7,10	-22,46	-3,53	26,19	-7,78				
10	-8,15	-22,01	-1,23	26,60	/	-2,63			
11	-8,05	-21,70	0,91	27,16	/	/	-9,76		
12	-7,44	-20,46	0,81	27,07	/	/	/		
13	-7,26	-20,47	1,19	27,66	/	/	/		
14	-7,53	-20,88	-1,54	27,46	/	/	/		
15	-3,00	-15,21	0,20	31,57	/	/	/		
16	-6,42	-19,38	2,26	27,85	/	/	/		
17	-6,17	-18,90	1,55	29,00	/	/	/		
18	-5,60	-18,20	-1,98	31,77	/	/	/		
19	-5,57	-19,94	3,39	28,93	/	/	/		
20	-6,56	-19,50	-4,30	27,55	-34,76	-30,78	/		
21	-7,64	-21,27	0,71	26,41	/	-35,18	-35,44		
22	-7,20	-23,79	-3,10	26,44	-25,51	/	/		
23	-8,78	-22,33	0,84	25,52	/	/	-28,27		
24	-7,57	-21,26	1,58	27,19	/	/	-43,93		
25	-8,09	-21,05	1,29	26,88	/	-16,48	/		
26	-7,57	-21,19	1,35	26,70	/	/	/		
27	-6,06	-19,79	-1,83	27,85	-12,23	/	/		
бензен									
8	-7,98	-35,72	-4,55	31,36	/	/	/		
9	-7,37	-35,50	-8,02	29,77	-13,82	/	/		
10	-8,23	-36,20	-5,43	31,06	/	-1,35	/		
11	-8,12	-35,98	-3,49	30,90	/	/	-7,92		
12	-6,49	-33,74	-2,71	32,35	/	/	/		
13	-7,19	-34,52	-3,99	32,42	/	/	/		
14	-7,43	-34,86	12,89	32,13	/	/	/		
15	-5,53	-29,04	16,55	33,13	/	/	/		
16	-2,75	-29,33	-3,55	38,83	/	/	/		
17	-5,99	-32,55	-3,21	34,47	/	/	/		
18	-7,41	-34,42	-9,60	31,49	/	/	/		
19	-8,31	-36,47	-4,26	30,78	/	/	/		
20	-6,65	-33,73	11,86	32,72	-44,08	-37,39	/		
21	-8,58	-36,12	-6,07	31,15	/	-37,44	-41,59		
22	-7,89	-35,50	-6,87	29,25	-19,03	/	/		
23	-7,88	-35,77	20,93	30,80	/	/	-14,03		
24	-8,81	-36,85	-5,95	30,76	/	/	-30,31		
25	-7,14	-34,82	20,29	28,57	/	-18,55	/		
26	-8,15	-36,52	-5,56	30,48	/	/	/		
27	-5,71	-32,82	-7,51	32,94	-13,19	/	/		

Табела П21. Израчунате вредности енергија стабилизације ΔE_{iso} (kJ mol⁻¹) различитих О• и № радикала за деривате **8–27** у води и бензену.

енталпија дисоцијације везе BDE (kJ mol ⁻¹)									
једињење	N1(A)	N2(A)	01(Б)	N2(Б)	01(B)	02(B)	03(B)		
вода									
8	342	329	351	377	/	/	/		
9	343	328	347	377	343	/	/		
10	342	328	349	377	/	348	/		
11	342	329	351	378	1	/	341		
12	343	330	351	377	/	/	/		
13	343	330	352	378	/	/	/		
14	343	329	349	378	/	/	/		
15	347	335	351	382	/	/	/		
16	344	331	353	378	/	/	/		
17	344	331	352	379	/	/	/		
18	345	332	348	382	/	/	/		
19	345	330	354	379	/	/	/		
20	344	331	346	378	316	320	/		
21	343	329	351	377	/	315	315		
22	343	327	347	377	325	/	/		
23	342	328	351	376	/	/	322		
24	343	329	352	378	/	/	306		
25	342	329	352	377	/	334	/		
26	343	329	352	377	/	/	/		
27	344	331	349	378	338	/	/		
бензен									
8	340	313	344	380	/	/	/		
9	341	313	340	378	334	/	/		
10	340	312	343	379	/	347	/		
11	340	312	345	379	/	/	345		
12	342	315	346	381	/	/	/		
13	341	314	344	381	/	/	/		
14	341	313	361	380	/	/	/		
15	343	319	365	381	/	/	/		
16	364	319	345	387	/	/	/		
17	342	316	345	383	/	/	/		
18	341	314	339	380	/	/	/		
19	340	312	344	379	/	/	/		
20	342	315	360	381	304	311	/		
21	340	312	342	379	/	311	307		
22	340	313	314	378	329	/	/		
23	340	312	369	379	/	/	334		
24	339	311	342	379	/	/	318		
25	341	313	369	377	/	330	/		
26	340	312	343	379	/	/	/		
27	343	315	341	381	335	/	/		

Табела П22. Израчунате вредности BDE (kJ mol⁻¹) за деривате **8–27** у води и бензену.

	IP				PDE			
једињење		N1(A)	N2(A)	01(Б)	N2(Б)	01(B)	02(B)	03(B)
вода								
8	435	62	49	71	97	/	/	/
9	433	65	49	68	98	64	/	/
10	435	62	48	68	96	/	67	/
11	443	54	40	63	89	/	/	52
12	437	60	47	69	95	/	/	/
13	437	61	48	69	96	/	/	/
14	436	41	48	67	96	/	/	/
15	441	60	48	64	95	/	/	/
16	439	59	46	68	94	/	/	/
17	440	58	49	66	93	/	/	/
18	437	63	50	66	100	/	/	/
19	436	63	49	72	97	/	/	/
20	438	60	47	62	94	32	36	/
21	428	69	55	77	103	/	41	41
22	431	66	50	70	100	48	/	/
23	421	75	61	84	109	/	/	55
24	416	81	68	91	116	/	/	45
25	435	61	48	71	96	/	53	/
26	418	80	66	89	114	/	/	/
27	410	89	75	93	123	83	/	/
бензен								
8	551	178	151	182	218	/	/	/
9	544	186	158	186	223	180	/	/
10	549	180	152	183	220	/	187	/
11	550	179	151	184	218	/	/	179
12	557	174	147	178	213	/	/	/
13	557	173	146	176	213	/	/	/
14	556	174	146	194	213	/	/	/
15	558	174	150	196	212	/	/	/
16	567	167	141	167	209	/	/	/
17	568	164	137	167	204	/	/	/
18	553	178	151	175	216	/	/	/
19	550	179	151	183	219	/	/	1
20	543	187	160	206	227	150	157	/
21	547	182	154	184	221	/	153	149
22	540	190	162	191	227	179	/	/
23	573	157	129	186	196	/	1	151
24	558	171	143	174	210	1	/	149
25	553	177	150	205	213	/	166	/
26	549	180	152	183	219	/	1	1
27	555	177	150	175	216	170	/	/

Табела П23. Израчунате вредности IP и PDE (kJ mol⁻¹) за деривате 8–27 у води и бензену.

PA ETE PA	3)
вода 8 144 353 140 343 181 324 203 329 /	ETE
8 144 353 140 343 181 324 203 329 / / / / 9 143 355 138 344 174 327 202 329 159 338 / / / 10 144 353 139 343 181 322 203 328 / / 161 341 / 11 145 352 140 343 181 322 203 329 / / / 161 341 / 12 142 355 138 346 180 326 201 330 / / / / 162 12 142 355 138 346 180 326 201 330 / / / / 162 13 141 357 139 345 180 323 202 330 / / / / 14 141 356 139 345 180 <th></th>	
9 143 355 138 344 174 327 202 329 159 338 / / / 10 144 353 139 343 181 322 203 328 / / 161 341 / 11 145 352 140 343 181 324 203 329 / / / 161 341 / 12 142 355 138 346 180 326 201 330 / / / / 162 12 142 355 138 346 180 326 201 330 / / / / / 13 141 357 139 345 180 323 202 330 / / / / / 14 141 356 139 345 180 323 202 330 / / / / / 15 141 360 136	/
10 144 353 139 343 181 322 203 328 / / 161 341 / 11 145 352 140 343 181 324 203 329 / / / 161 341 / 12 142 355 138 346 180 326 201 330 / / / / / 162 13 141 357 139 345 180 326 199 333 /	/
11 145 352 140 343 181 324 203 329 / / / / 162 12 142 355 138 346 180 326 201 330 / <th>/</th>	/
12 142 355 138 346 180 326 201 330 / / / / / 13 141 357 139 345 180 326 199 333 / / / / / / 14 141 356 139 345 180 323 202 330 / / / / / 14 141 356 139 345 180 323 202 330 / / / / / 15 141 360 136 353 174 331 201 335 / / / / / 16 142 357 137 348 179 328 201 332 / <td< th=""><th>333</th></td<>	333
13 141 357 139 345 180 326 199 333 / / / / / 14 141 356 139 345 180 323 202 330 / / / / / 15 141 360 136 353 174 331 201 335 / / / / 16 142 357 137 348 179 328 201 332 / / / / / 17 141 357 137 349 177 329 200 334 / / / / /	/
14 141 356 139 345 180 323 202 330 / / / / / 15 141 360 136 353 174 331 201 335 / / / / / 16 142 357 137 348 179 328 201 332 / / / / / 17 141 357 137 349 177 329 200 334 / / / / /	/
15 141 360 136 353 174 331 201 335 / / / / 16 142 357 137 348 179 328 201 332 / / / / / 17 141 357 137 349 177 329 200 334 / / / /	/
16 142 357 137 348 179 328 201 332 / / / / 17 141 357 137 349 177 329 200 334 / / / / /	/
17 141 357 137 349 177 329 200 334 / / / / /	/
	/
18 147 352 142 344 179 323 205 332 / / / / /	/
19 147 352 142 343 184 324 206 328 / / / / /	/
20 145 354 139 347 178 323 203 330 143 327 144 330 /	/
21 144 353 140 344 182 324 203 328 / / 146 324 147	323
22 144 354 139 342 175 327 203 329 162 318 / / /	/
23 144 352 140 343 182 324 203 328 / / / / 162	314
24 144 353 140 343 184 322 203 329 / / / / 162	299
25 142 355 139 344 181 325 202 330 / / 152 336 /	/
26 144 354 139 344 181 325 202 329 / / / / /	/
27 141 358 136 349 172 331 200 332 136 356 / / /	/
бензен	
8 393 337 363 338 495 238 463 306 / / / / /	/
9 395 335 368 334 450 279 467 301 408 316 / / /	/
10 393 336 364 338 446 286 465 304 / / 431 305 /	/
11 393 336 364 337 495 239 463 306 / / / / 436	294
12 388 343 358 345 488 247 457 313 / / / / /	/
13 386 344 355 348 487 246 457 313 / / / /	1
14 388 342 359 344 489 262 458 311 / / / /	1
15 385 347 360 348 442 312 454 317 / / / /	1
16 380 355 351 357 479 255 458 318 / / / /	1
	1
18 392 338 362 341 487 241 463 306 / / / / /	1
19 394 335 365 336 496 238 463 305 / / / / /	1
20 394 337 365 339 454 295 475 296 384 309 394 306 /	/
21 393 336 363 338 447 284 466 302 / / 403 297 403	292
44 57/ 552 5/1 551 45/ 2/4 407 278 428 271 / / /	/
43 307 341 303 337 473 400 437 307 / / / 455 34 200 240 260 241 420 202 461 200 / / / / 450	200 210
24 307 340 300 341 437 473 401 300 / / / 439 75 200 340 362 340 401 267 450 200 / / 427 202 /	40 /
26 390 340 360 341 494 238 450 300 / / 427 292 /	/
27 385 347 357 347 439 291 457 313 377 348 / / /	/

Табела П24. Израчунате вредности РА и ЕТЕ (kJ mol⁻¹) за деривате **8–27** у води и бензену.

		HAT SE		Т-РТ	SPLET	
радикал	позиција	$\Delta H_{\rm BDE}$	$\Delta H_{\rm IP}$	$\Delta H_{\rm PDE}$	$\Delta H_{\rm PA}$	$\Delta H_{\rm ETE}$
	N1 (A)	-80		-156	-72	-8
	N2 (A)	-93		-169	-77	-15
•OCH2	N2 (Б)	-46	76	-122	-13	-32
ОСП3	01 (Б)	-78	70	-154	-38	-39
	01 (B)	-108		-185	-73	-35
	O2 (B)	-104		-181	-72	-32
	N1 (A)	-89		-166	-81	-8
	N2 (A)	-102		-179	-87	-15
•OC(CH ₂) ₂	N2 (Б)	-55	77	-132	-23	-32
06(6113)3	01 (Б)	-87	,,	-163	-47	-39
	01 (B)	-117		-194	-82	-35
	O2 (B)	-113		-190	-81	-32
	N1 (A)	-150		-146	-61	-88
	N2 (A)	-163		-159	-67	-96
•OH	N2 (Б)	-116	-4	-112	-3	-113
on	01 (Б)	-148	I	-144	-28	-120
	01 (B)	-178		-174	-62	-116
	<u>02 (B)</u>	-174		-170	-62	-112
	N1 (A)	-12		-109	-25	12
	N2 (A)	-25		-122	-30	5
•00H	N2 (B)	22	97	-75	34	-12
0011	01 (Б)	-10		-107	9	-19
	01 (B)	-40		-137	-26	-15
	<u>02 (B)</u>	-36		-133	-25	-11
	NI (A)	-5		-112	-27	22
	NZ (A)	-18		-125	-33	15
•OOCH3	NZ (D)	29	107	-/8	31	-2
	UI (Б) 01 (В)	-3 22		-109	0	-9
	OI(B)	-33		-140	-28	-5
	U2 (B)	-29		-130	-27	-2
	N1(A) N2(A)	-5 17		-09	-5 11	0
	N2(A) N2(E)	-17		-102	-11	-/
•OO-CH=CH ₂	$N_{2}(D)$	30	85	-33	20	-24
	01(D)	-33		-07	-6	-27
	01(D) 02(B)	-33		-110	-0	-27
	$\frac{02(D)}{N1(\Delta)}$	24		-114	30	-24
	$N2(\Delta)$	12		-67	24	-0 -13
	N2 (F)	59	79	-20	89	-30
DPPH	01(5)	27		-52	64	-37
	01(B)	-4		-83	29	-33
	02(B)	0		-79	30	-30
	<u>N1 (A)</u>	59	251	-193	46	12
	N2(A)	46		-206	41	5
-	N2 (5)	93		-159	105	-12
02*-	01 (5)	61		-191	80	-19
	01(B)	31		_221	45	-15
	01 (D) 02 (D)	37		_217	45 46	_11
	02 (D)	JT		-21/	υT	-11

Табела П25. Израчунате вредности енталпија реакција (kJ mol⁻¹) за дериват **20** у води.

$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $			НАТ	SET-PT		SPLET	
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	радикал	позиција	$\Delta H_{\rm BDE}$	$\Delta H_{\rm IP}$	$\Delta H_{\rm PDE}$	$\Delta H_{\rm PA}$	$\Delta H_{\rm ETE}$
$\begin{array}{c ccccc} & & & & & & & & & & & & & & & & &$		N1 (A)	-74		-349	-143	69
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		N2 (Ă)	-101		-377	-172	71
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	•೧೧೪	N2 (́Б)́	-35	275	-310	-62	27
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	0013	01 (Б)	-56	275	-331	-83	27
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $		01 (B)	-112		-387	-152	41
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		02 (B)	-105		-380	-143	38
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		N1 (A)	-84		-346	-140	57
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		N2 (A)	-111		-374	-169	59
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	•OC(CH2)2	N2 (Б)	-44	262	-307	-59	15
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	00(0113)3	01 (Б)	-65	205	-328	-80	15
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $		01 (B)	-121		-384	-150	29
$ \begin{tabular}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		02 (B)	-114		-377	-140	25
$ \begin{tabular}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		N1 (A)	-143		-370	-164	21
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		N2 (A)	-170		-397	-193	23
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	•OH	N2 (Б)	-104	227	-331	-83	-21
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	011	01 (Б)	-125		-352	-104	-21
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		01 (B)	-181		-408	-173	-7
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		<u>02 (B)</u>	-174		-401	-164	-10
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		N1 (A)	-6		-318	-112	105
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		N2 (A)	-34		-345	-141	107
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	•00H	N2 (6)	33	312	-279	-31	64
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	0011	01 (Б)	12		-300	-52	64
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		01 (B)	-44		-356	-121	77
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		<u>02 (B)</u>	-37		-349	-111	74
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		NI (A)	2		-313	-106	109
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		NZ (A)	-25		-340	-136	
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	•00CH3	NZ (b)	42	315	-2/3	-26	67
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	•	01 (Б) 01 (В)	21		-294	-46	6/
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		01 (B)	-35		-350	-116	81
$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		$\frac{02(B)}{11(A)}$	-28		-343	-106	/8
$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		NI (A)	1		-266	-60	61
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		NZ (A) N2 (E)	-20	267	-293	-89	03
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	•00-CH=CH2	NZ (D) 01 (E)	40		-227	21	19
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		01(D)	19		-240	60	19
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		01(D)	-37		-304	-09	20
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		$\frac{02}{N1}$	-30		-147	60	-38
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		N2(A)	-6		-147	30	-36
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		N2 (F)	61	168	-107	140	-30
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	DPPH	01(5)	40		-128	120	-80
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		01(B)	-16		-184	50	-66
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		02(B)	-10		-178	60	-70
$0_{2} - \begin{array}{c} N12 (H) & 70 & 700 & 10 & 100 \\ N2 (A) & 63 & -735 & -45 & 107 \\ N2 (B) & 129 & 798 & -669 & 65 & 64 \\ 01 (B) & 52 & -746 & -25 & 77 \\ 02 (B) & 59 & -739 & -15 & 74 \end{array}$		N1 (A)	90		-708	-15	105
$0_{2} - \begin{array}{c} N2 (B) \\ 0_{2} - \end{array} \begin{array}{c} N2 (B) \\ 01 (B) \\ 02 (B) \end{array} \begin{array}{c} 00 \\ 00 \\ 01 \\ 01 \\ 01 \\ 01 \\ 01 \\ 01 $		N2(A)	63		-735	-45	107
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	_	N2 (F)	129	798	-669	65	64
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	02*-	01 (5)	108		-690	45	64
02(B) 59 -739 -15 74		01 (B)	52		-746	-25	77
		02 (B)	59		-739	-15	74

Табела П26. Израчунате вредности енталпија реакција (kJ mol⁻¹) за дериват **20** у бензену.



Слика ПЗО. Прескрининг цитотоксичних ефеката новосинтетисаних деривата хидразона на НСТ-116 ћелијску линију.



Слика ПЗ1. Вијабилност НСТ-116 ћелија након третмана од 24 и 72 часа.





Слика П32. Вијабилност MRC-5 ћелија након третмана од 24 и 72 часа.



Слика ПЗЗ. Концентрација О2^{•-} у НСТ-116 ћелијама након третмана од 24 и 72 часа.



Слика П34. Концентрација О2•- у MRC-5 ћелијама након третмана од 24 и 72 часа.



Слика ПЗ5. Концентрација NO2- у HCT-116 ћелијама након третмана од 24 и 72 часа.



Слика ПЗ6. Концентрација NO2- у MRC-5 ћелијама након третмана од 24 и 72 часа.



Слика П37. Концентрација GSH у НСТ-116 ћелијама након третмана од 24 и 72 часа.



Слика П38. Концентрација GSH у MRC-5 ћелијама након третмана од 24 и 72 часа.

	спајк	спајк	Mpro	M ^{pro}	PLpro	RBD-ACE2	RBD-ACE2	ACE2
		реф[348]		реф[348]			реф[348]	
8	-8,2		-8,1		-7,3	-8,6		-8,8
9	-8,5		-7,7		-7,1	-8,5		-8,8
10	-8,4		-7,7		-7,6	-8,8		-9,1
11	-8,5		-8,4		-7,3	-8,3		-9,1
12	-8,0		-7,7		-7,6	-8,8		-9,0
13	-8,5		-7,5		-7,4	-8,0		-9,0
14	-8,5		-8,2		-7,4	-8,5		-9,1
15	-8,6		-7,6		-6,5	-8,0		-8,7
16	-9,0		-8,1		-7,6	-8,9		-9,9
17	-9,3		-7,7		-7,4	-7,7		-9,3
18	-8,6		-8,3		-7,2	-8,6		-8,5
19	-8,6		-8,0		-7,7	-8,9		-8,2
20	-8,8		-7,4		-7,0	-8,8		-8,4
21	-7,2		-7,7		-7,4	-8,5		-9,4
22	-8,3		-7,3		-7,0	-8,9		-7,9
23	-8,6		-8,0		-7,4	-8,5		-9,2
24	-8,6		-7,3		-7,2	-8,2		-8,6
25	-8,6		-7,7		-7,2	-8,3		-7,6
26	-8,4		-7,4		-7,2	-7,8		-8,7
27	-8,6		-7,5		-7,2	-8,7		-8,6
Χ	-7,1	-6,0	-6,2	-5,4	-6,1	-7,4	-5,5	-7,2
Л	-9,7	-9,5	-8,1	-7,7	-7,5	-8,0	-7,6	-11,2
Р	-8,6	-7,6	-8,1	-6,5	-7,4	-8,6	-8,3	-10,8
Φ	-5,8	-5,3	-5,8	-5,7	-5,5	-6,7	-5,0	-5,8

Табела П27. Израчунате вредности афинитета везивања деривата **8–27** и одабраних лекова према изабраним протеинима (Х-хлорокин; Л-лопинавир; Р-ремдесивир; Ф-фавипиравир).

ПРИЛОГ В

Списак објављених радова који су коришћени за израду ове докторске дисертације:

- 1. <u>J. Branković</u>, V. Matejić, D. Simijonović, M. D. Vukić, M. Kačaniova, M. Živanović, A. Mirić, J. Košarić, M. Branković, V. P. Petrović, *Arch Pharm* (Weinheim) **2024**, 357, e2300725.
- 2. **J. Branković**, V. M. Milovanović, Z. D. Petrović, D. Simijonović, V. P. Petrović, *RSC Adv* **2023**, 13, 2884–2895.
- 3. **J. Branković**, V. M. Milovanović, D. Simijonović, S. Novaković, Z. D. Petrović, S. S. Trifunović, G. A. Bogdanović, V. P. Petrović, *RSC Adv* **2022**, 12, 16054–16070.
- 4. J. Branković, N. Milivojević, V. Milovanović, D. Simijonović, Z. D. Petrović, Z. Marković, D. S. Šeklić, M. N. Živanović, M. D. Vukić, V. P. Petrović, *R Soc Open Sci* **2022**, 9, 211853.

 Received: 11 December 2023
 Revised: 16 January 2024
 Accepted: 18 January 2024

 DOI: 10.1002/ardb.202300725
 DOI: 10.1002/ardb.202300725
 DOI: 10.1002/ardb.202300725

FULL PAPER

ARCH PHARM DPhG

Novel *N*-pyrocatechoyl and *N*-pyrogalloyl hydrazone antioxidants endowed with cytotoxic and antibacterial activity

Jovica Branković¹ | Vesna Matejić² | Dušica Simijonović³ | Milena D. Vukić^{1,4} | Miroslava Kačaniova⁴ | Marko Živanović³ | Ana Mirić³ | Jelena Košarić³ | Marija Branković^{3,5} | Vladimir P. Petrović¹ ⁽³⁾

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

²Department of Chemistry and Chemical Engineering, Faculty of Agronomy, University of Kragujevac, Čačak, Serbia

³Institute for Information Technologies Kragujevac, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

⁴Institute of Horticulture, Faculty of Horticulture and Landscape Engineering, Slovak University of Agriculture, Nitra, Slovakia

⁵Faculty of Engineering, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

Correspondence

Vladimir P. Petrović, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia. Email: vladimir.petrovic@pmf.kg.ac.rs

Funding information

Ministarstvo Prosvete, Nauke i Tehnološkog Razvoja; Serbian Ministry of Science, Technological Development, and Innovations, Grant/Award Numbers: 451-03-47/2023-01/ 200122, 451-03-47/2023-01/200378, 451-03-47/2023-01/200107, 451-03-47/2023-01/200088

Abstract

Over the years, pharmacological agents bearing antioxidant merits arose as beneficial in the prophylaxis and treatment of various health conditions. Hazardous effects of radical species hyperproduction disrupt normal cell functioning, thus increasing the possibility for the development of various oxidative stress-associated disorders, such as cancer. Contributing to the efforts for efficient antioxidant drug discovery, a thorough in vitro and in silico assessment of antioxidant properties of 14 newly synthesized N-pyrocatechoyl and N-pyrogalloyl hydrazones (N-PYRs) was accomplished. All compounds exhibited excellent antioxidant potency against the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical. The extensive in silico analysis revealed multiple favorable features of N-PYRs to inactivate harmful radical species, which supported the obtained in vitro results. Also, in silico experiments provided insights into the preferable antioxidant pathways. Prompted by these findings, the cytotoxicity effects and the influence on the redox status of cancer HCT-116 cells and healthy fibroblasts MRC-5 were evaluated. These investigations exposed four analogs exhibiting both cytotoxicity and selectivity toward cancer cells. Furthermore, the frequently uncovered antimicrobial potency of hydrazone-type hybrids encouraged investigations on G^+ and G^- bacterial strains, which revealed the antibacterial potency of several N-PYRs. These findings highlighted the N-PYRs as excellent antioxidant agents endowed with cytotoxic and antibacterial features.

KEYWORDS

antibacterial activity, antioxidants, cytotoxicity, DFT, polyphenolic hydrazones

1 | INTRODUCTION

Natural and synthetic chemical entities empowered with antioxidant features ascended as valuable pharmacological agents in both prophylaxis and therapy.^[1] Over the years, such a trend progressed

with the discovery of the involvement of reactive radical species in the pathologies of various health disorders.^[2] Oxidation processes are vital for cell homeostasis and function. Namely, in moderate amounts, generated reactive oxygen species (ROS) support normal cell function and biological responses.^[3] However, excessive build-up

© 2024 Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft.

Arch. Pharm. 2024;e2300725. https://doi.org/10.1002/ardp.202300725 wileyonlinelibrary.com/journal/ardp 1 of 18
ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY **RSC** Advances PAPER Pyrazolone-type compounds (part II): in vitro and in Check for updates silico evaluation of antioxidant potential; Cite this: RSC Adv., 2023, 13, 2884 structure-activity relationship* Jovica Branković, 💿 a Vesna M. Milovanović, 💿 b Zorica D. Petrović, 💿 a Dušica Simijonović [©] and Vladimir P. Petrović [©] The pyrazolone class comprises a variety of hybrid compounds displaying diverse biological actions. Although studied for decades, these compounds are still of interest due to their facile chemical transformations. In our previous work, we presented the synthetic route of functionalised pyrazolone derivatives. The presence of pyrazolone structural motif in many drugs, such as edaravone, prompted us to investigate the antioxidant features of the selected compounds. In this paper, we provide an extensive in vitro and in silico description of the antioxidant properties of selected pyrazolone analogues. The obtained in vitro results revealed their great antiradical potency against the DPPH radical (IC50 values in the 2.6-7.8 µM range), where the best results were obtained for analogues bearing a catechol moiety. Density functional theory (DFT) was used to assess their antioxidant capacity from the thermodynamic aspect. Here, good agreement with in vitro results was achieved. DFT was employed for the prediction of the most preferable radical scavenging pathway, also. In polar solvents, the SPLET mechanism is a favourable scavenging route, whereas in nonpolar solvents the HAT is slightly predominant. Furthermore, antioxidant mechanisms were studied in the presence of relevant reactive oxygen species. Received 28th December 2022 The obtained values of the reaction enthalpies with the selected radicals revealed that HAT is slightly Accepted 12th January 2023 prevailing in polar solvents, while the SPLET mechanism is dominant in nonpolar solvents. Regarding the DOI: 10.1039/d2ra08280b well-known antioxidant features of the drug edaravone, these findings represent valuable data for this rsc.li/rsc-advances pyrazolone class and could be used as the basis for further investigations. reliever used in various acute/chronic conditions.6 Also, the Introduction pyrazolone skeleton is frequently embedded in many drugs Biological exploration of pyrazolone-endowed compounds has (and drug candidates) for the treatment of various illnesses, continued for more than a century. Ever since its introduction such as eltrombopag, piperylone, nifenazone, morazone, propyphenazone, aminophenazone, etc (Fig. 1).4 Such an outcome by Ludwig Knorr in 1883,1 the pyrazolone nucleus evolved into one of the most studied pharmacophores in medicinal chemwas triggered by the diversity of pyrazolone-based compounds and their richness in beneficial biological virtues.2,7 Pyrazoloneistry.2 Such fruitful investigations uncovered diverse biological cored derivatives mostly wield antimicrobial,⁸⁻¹³ anti-cancer,^{7,12,14,15} antiproliferative,^{14,16} and antiinflammatory and therapeutical traits of pyrazolone-based compounds, where a number of them found multiple pharmaceutical roles potency,17-22 but they were also identified as analgesics, 18,22,23 (Fig. 1).3,4 Antipyrine (also known as phenazone) as one of the antivirals,24-26 hypoglycaemics,27 and antioxidants.11,28,29 The first synthetic drugs, alongside salicylate derivatives, i.e., utilisation of pyrazolone synthon produced numerous hybrid aspirin, revolutionised the era of antipyretics and fever molecules acting as multitarget agents.11,12,17,22,30,31 Biosuppressants.5 Furthermore, the ampyrone sulfonate family modelling of pyrazolone structural unit emerged compounds representative, the drug metamizole, is a well-known pain with inhibitory activity on many enzymes as well, such as acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE),^{30,32} α-amylase,³³ α-glucosidase,³⁴ cyclooxygenases "University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, R. Domanovića (COXs),^{17,19,21,28,35} HIV-1 integrase,³⁶ and even towards human 12, 34000 Kragujevac, Serbia. E-mail: vladimir.petrovic@pmf.kg.ac.rs ^bUniversity of Kragujevac, Faculty of Agronomy, Department of Chemistry and telomerase.37 These accomplishments have enabled pyrazolone-Chemical Engineering, Cara Dušana 34, 32000 Čačak, Serbia type compounds to be considered in the treatment of complex University of Kragujevac, Institute for Information Technologies, Department of illnesses, particularly in neurodegenerative diseases (NDDs), Science, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: https://doi.org/10.1039/d2ra08280b

2884 | RSC Adv., 2023, 13, 2884-2895

© 2023 The Author(s). Published by the Royal Society of Chemistry

such as Alzheimer's and Parkinson's. 30,32,38 Here, it is important to reference the FDA-approved pyrazolone drug edaravone.39

PAPER		View Article Online View Journal View Issue
Check for updates Cite this: <i>RSC Adv.</i> , 2022, 12 , 16054	Pyrazolone-type silico assessmen viral proteins of	compounds: synthesis and <i>in</i> t of antiviral potential against key SARS-CoV-2†
	Jovica Branković, ^a Vesna M Slađana Novaković, ^d Zorica Goran A. Bogdanović 📴 ^d ar	. Milovanović, 😰 ^b Dušica Simijonović, 🔞 ^c D. Petrović, 🕲 ^a Snežana S. Trifunović, ^e nd Vladimir P. Petrović 🕲 *ª
Received 21st April 2022 Accepted 20th May 2022 DOI: 10.1039/d2ra02542f rsc.li/rsc-advances	Coronavirus outbreak is still a ma periodically delivers more transmis inexpensive antiviral agent is un characterised using spectroscopic of SARS-CoV-2 responsible for hu and PL _{pro} . Five of twenty comp a pyrazolone derivative bearing a a more favourable binding affinity drugs lopinavir, remdesivir, chlore exerted higher binding affinity. Al ACE2 complex. The obtained resu antiviral properties by blocking th derivatives expressed multitarget Additionally, <i>in silico</i> ADME/T calc <i>i.e.</i> , drug-likeness, oral bioavailabil metabolism, and toxicity. The obt multitarget agents against SARS investigations.	ajor public health concern. The high mutation ability of SARS-CoV- ssible and dangerous variants. Hence, the necessity for an efficient ar gent. In this work, pyrazolone-type compounds were synthesise methods and theoretical tools, and evaluated <i>in silico</i> against proteii ost cell entry and reproduction processes, <i>i.e.</i> , spike protein (S), M ^P bounds are newly synthesised. In addition, the crystal structure vanillin moiety is determined. The obtained <i>in silico</i> results indicar y of pyrazolone analogues towards M ^{pro} , and PL _{pro} in comparison oquine, and favipiravir, while in the case of S protein only lopinar iso, the investigations were performed on ACE2 and the spike RBI lits for these proteins suggest that selected compounds could expre e binding to the host cell and viral spreading, also. Moreover, sever antiviral action, blocking both binding and reproduction processes fulations predicted favourable features of the synthesised compound ity, as well as good pharmacokinetic parameters related to absorptic tained results imply the great potential of synthesised pyrazolones -CoV-2 and represent a valuable background for further <i>in vit</i>
Introduction The viral strain SARS-CoV- disease remains a major put the statistical data acquired (WHO), up to this point, a to have been confirmed, inc	2 causing severe acute respiratory iblic health concern. According to 1 from World Health Organization tal of 520 million cases of COVID-19 luding approximately 6.3 million	deaths reported worldwide. New viral forms are periodical emerging, which are feared to be more contagious, trar missible, and dangerous than previous strains. The WHO at U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) declar the Delta (B.1.617.2) and Omicron (B.1.1.529) strains as "va ants of concern". The risk for hospitalisation was doubled f the patients infected with delta variant, in comparison wi those infected with alpha. ¹ Furthermore, the omicron varia

"University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia. E-mail: vladimir.petrovic@pmf.kg.ac.rs

^bUniversity of Kragujevac, Faculty of Agronomy, Department of Chemistry and Chemical Engineering, Cara Dušana 34, 32000 Čačak, Serbia ^cUniversity of Kragujevac, Institute for Information Technologies Kragujevac,

Department of Science, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia

⁴University of Belgrade, "VINCA" Institute of Nuclear Sciences-National Institute of the Republic of Serbia, Department of Theoretical Physics and Condensed Matter Physics, 11001 Belgrade, Serbia

^cUniversity of Belgrade, Faculty of Chemistry, Studentski trg 12–16, 11000 Belgrade, Serbia

 \dagger Electronic supplementary information (ESI) available. CCDC 2132092. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see https://doi.org/10.1039/d2ra02542f

16054 | RSC Adv., 2022, 12, 16054-16070

deaths reported worldwide. New viral forms are periodically emerging, which are feared to be more contagious, transmissible, and dangerous than previous strains. The WHO and U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) declared the Delta (B.1.617.2) and Omicron (B.1.1.529) strains as "variants of concern". The risk for hospitalisation was doubled for the patients infected with delta variant, in comparison with those infected with alpha.¹ Furthermore, the omicron variant possesses the ability to evade immunity from prior infection.^{2,3} Recent findings indicate that omicron can dodge the neutralizing antibodies in vaccinated individuals.⁴⁻⁷ Enormous efforts were made in vaccine development to repress the coronavirus outbreak. Even with more than 11.6 billion vaccine doses administered globally, the COVID-19 situation is still complicated. As an aggravating circumstance, the SARS-CoV-2 high mutation ability could influence vaccine effectiveness.⁸ Regarding this, the potent antiviral compound may overcome this challenge and contribute to the fight against coronavirus.⁸ Different strategies were employed to face the COVID-19 emergency, including the prevention of synthesis of viral RNA.⁹ The SARS-CoV-2 comprises two overlapping polyproteins (pp1a and

© 2022 The Author(s). Published by the Royal Society of Chemistry

ROYAL SOCIETY OPEN SCIENCE

royalsocietypublishing.org/journal/rsos

Research



Cite this article: Branković J *et al.* 2022 Evaluation of antioxidant and cytotoxic properties of phenolic *N*-acylhydrazones: structure–activity relationship. *R. Soc. Open Sci.* **9**: 211853. https://doi.org/10.1098/rsos.211853

Received: 26 November 2021 Accepted: 6 May 2022

Subject Category: Chemistry

Subject Areas:

medicinal chemistry/computational chemistry/ molecular biology

Keywords:

phenolic *N*-acylhydrazones, antioxidant activity, cytotoxic activity, structure–activity relationship, density functional theory

Author for correspondence:

Vladimir P. Petrović e-mail: vladimir.petrovic@pmf.kg.ac.rs

This article has been edited by the Royal Society of Chemistry, including the commissioning, peer review process and editorial aspects up to the point of acceptance.

Electronic supplementary material is available online at https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c. 6011585.



THE ROYAL SOCIETY PUBLISHING

Evaluation of antioxidant and cytotoxic properties of phenolic *N*-acylhydrazones: structure—activity relationship

Jovica Branković¹, Nevena Milivojević², Vesna Milovanović³, Dušica Simijonović², Zorica D. Petrović¹, Zoran Marković², Dragana S. Šeklić², Marko N. Živanović², Milena D. Vukić¹ and Vladimir P. Petrović¹

¹University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

²University of Kragujevac, Institute for Information Technologies, Kragujevac, Department of Science, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia

³University of Kragujevac, Faculty of Agronomy in Čačak, Ljubićska 30, Čačak, Serbia

JB, 0000-0003-1635-4519; ZDP, 0000-0003-0451-2006; MDV, 0000-0001-7222-7245

Cancer is still a relentless public health issue. Particularly, colorectal cancer is the third most prevalent cancer in men and the second in women. Moreover, cancer development and growth are associated with various cell disorders, such as oxidative stress and inflammation. The quest for efficient therapeutics is a challenging task, especially when it comes to achieving both cytotoxicity and selectivity. Herein, five series of phenolic N-acylhydrazones were synthesized and evaluated for their antioxidant potency, as well as their influence on HCT-116 and MRC-5 cells viability. Among 40 examined analogues, 20 of them expressed antioxidant activity against the DPPH radical. Furthermore, density functional theory was employed to estimate the antioxidant potency of the selected analogues from the thermodynamical aspect, as well as the preferable free-radical scavenging pathway. Cytotoxicity assay exposed enhanced selectivity of a number of analogues toward cancer cells. The structure-activity analysis revealed the impact of the type and position of the functional groups on both cell viability and selectivity toward cancer cells.

© 2022 The Authors. Published by the Royal Society under the terms of the Creative Commons Attribution License http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/, which permits unrestricted use, provided the original author and source are credited.

БИОГРАФИЈА



Јовица Бранковић рођен је 24. јануара 1994. године у Јагодини. Основну школу "Вук Караџић" у Дубокој завршио је као носилац дипломе "Вук Караџић", а Средњу Медицинску школу у Ћуприји са одличним успехом. Основне академске студије Хемије на Природноматематичком факултету у Крагујевцу уписао је школске 2014/2015 године. Дипломирао је 13. септембра 2018. године са просечном оценом 9,54 и оценом 10 на дипломском раду. На истом Факултету завршио је мастер академске студије хемије са просечном оценом 10,00. Мастер рад "Инклузиони комплекси деривата фенолних киселина са β-циклодекстрином" под менторством проф.

др Зорице Петровић, успешно је одбранио 2019. године са оценом 10. Докторске академске студије у области Органске хемије уписао је 2019. године под менторством др Владимира Петровића.

У звање истраживач-приправник у Институту за хемију Природноматематичког факултета у Крагујевцу изабран је 2019. године, а у звање истраживач-сарадник 2022. године. У звање асистент за ужу научну област Органска хемија изабран је 2024. године у Институту за хемију Природноматематичког факултета у Крагујевцу.

За постигнуте резултате на такмичењима у току основног образовања награђен је Плакетом града Јагодине, док је за изузетан успех у току студија награђен специјалним признањем Српског хемијског друштва.

У току студија учествовао је бројним активностима од значаја за популаризацију науке и Факултета, раду студентског парламента, као и у раду органа Факултета. Члан је Српског хемијског друштва.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Синтеза, карактеризација и испитивање антиоксидативних и биолошких особина различито функционализованих хидразона и пиразолона

представља оригинално ауторско дело настало као резултат сопственог истраживачког рада.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам једини аутор наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 16.05.2025. године,

hanvabat

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

Синтеза, карактеризација и испитивање антиоксидативних и биолошких особина различито функционализованих хидразона и пиразолона

истоветне.

У Крагујевцу, 16.05.2025. године,

haundout

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Јовица Б. Бранковић,



дозвољавам

не дозвољавам

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

Синтеза, карактеризација и испитивање антиоксидативних и биолошких особина различито функционализованих хидразона и пиразолона

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

Овом Изјавом такође



дозвољавам

не дозвољавам¹

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

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

1) Ауторство

2) Ауторство - делити под истим условима

3) Ауторство - без прерада

4) Ауторство - некомерцијално

(5))Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима

6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 16.05.2025. године,

Mr. Shattleblet

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