

УНИВЕРЗИТЕТ У ПРИШТИНИ СА ПРИВРЕМЕНИМ
СЕДИШТЕМ У КОСОВСКОЈ МИТРОВИЦИ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Миленко Н. Ристић

**МЕШОВИТИ АЗИНИ 3-АЦЕТИЛ-4-
ХИДРОКСИКУМАРИНА И
(ХЕТЕРО)АРИЛ-АЛДЕХИДА: СИНТЕЗА,
СПЕКТРАЛНА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И
ФАРМАКОЛОШКА АКТИВНОСТ**

Докторска дисертација

Косовска Митровица, 2021.

UNIVERSITY OF PRIŠTINA TEMPORARILY SETTLED IN
KOSOVSKA MITROVICA
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS

Milenko N. Ristić

**MIXED AZINES OF 3-ACETYL-4-
HYDROXYCOUMARIN AND
(HETERO)ARYL-ALDEHYDES:
SYNTHESIS, SPECTRAL
CHARACTERIZATION AND
PHARMACOLOGICAL ACTIVITY**

Doctoral Dissertation

Kosovska Mitrovica, 2021

Ментор:

Др Биљана Декић, редовни професор
Универзитет у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици,
Природно-математички факултет

Чланови комисије:

Датум одбране:

Ова докторска дисертација урађена је у оквиру пројекта „Комбинаторне библиотеке хетерогених катализатора, природних производа, модификованих природних производа и њихових аналога: пут ка новим биолошки активним агенсима“ бр. ОИ 172061 финансираног средствима Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Неизмерну захвалност дугујем својој драгој професорици и ментору проф. др Биљани Декић, која ми је свих ових година указивала поверење, пружала подршку, разумевање и несебичну помоћ, како у свим фазама израде ове дисертације, тако и током целокупног студирања.

Велику захвалност дугујем проф. др Нику Радуловићу, руководиоцу Пројекта у оквиру кога је и реализован рад на овој дисертацији. Хвала на прилици да радим и будем део његовог истраживачког тима, на великодушности, срдачности, интересовању, као и сугестијама током израде овог рада, које су ми биле од изузетно велике помоћи.

Захваљујем се и ванр. проф. др Данијели Илић-Коматини на корисним саветима у завршној фази овог рада.

Посебну захвалност изражавам свом професору др Видославу Декићу са којим сам начинио своје прве истраживачке кораке. Велико хвала за мотивацију, оптимизам и предусретљивост, не само приликом израде ове дисертације, већ и у свим сегментима живота. Хвала на неизмерној и свестраној професионалној помоћи, искреном пријатељству и правим речима.

Редовном професору у пензији др Радосаву Палићу такође дугујем велику захвалност на указаном поверењу и спремности да ми изађе у сусрет увек када је то било потребно.

Напоследку, захваљујем се својој породици за све тренутке подршке, разумевања и стрпљења које су ми пружили приликом израде овог рада.

Мешовити азини 3-ацетил-4-хидроксикумарина и (хетеро)арил-алдехида: синтеза, спектрална карактеризација и фармаколошка активност

Сажетак: У потрази за фармаколошки активним једињењима у оквиру ове дисертације дизајнирана је и синтетисана серија мешовитих азина са кумаринским језгром. Ацетиловањем полазног 4-хидроксикумарина добијен је 3-ацетил-4-хидроксикумарин, који је потом у реакцији са хидразин-хидратом наградио одговарајући хидразон. Циљни деривати добијени су кондензовањем хидразона 3-ацетил-4-хидроксикумарина са еквивалентном количином различито супституисаних арил- и хетероарил-алдехида. На овај начин остварена је оптимизована, једноставна и веома ефикасна метода за синтезу кумарин-азин хибрида. Синтетисана једињења су детаљно спектрално окарактерисана комбиновањем 1D и 2D NMR, HRMS(EI), UV-Vis и FTIR спектралних података, као и елементалном анализом, а једно једињење је било подесно и за рендгенску структурну анализу. Испитивањем антимикуробне активности добијених азина утврђен је значајан антимикуробни потенцијал, а посебно су се по својој инхибиторној активности према сојевима *Acinetobacter baumannii* и *Staphylococcus aureus* истакли деривати са *p*-хидроксифенил фармакофором, као и деривати са пироловим фрагментом према соју *Escherichia coli*. Акутна токсичност испитивана је *in vivo* према слановодним рачићима *Artemia salina*, при чему се показало да тестирана једињења поседују ниску токсичност. Изузетну способност неутрализације DPPH радикала показали су азини са пироловим и хинолинским фрагментом, док је из групе азина са арил-супституентом најактивнији био дериват са *p*-хидроксифенил групом и две додатне OMe-групе.

Кључне речи: органска синтеза, несиметрични азини, кумарини, 3-ацетил-4-хидроксикумарин, спектрална карактеризација, антимикуробна активност, акутна токсичност, антиоксидативна активност

Научна област: Хемија

Ужа научна област: Органска хемија и биохемија

Mixed azines of 3-acetyl-4-hydroxycoumarin and (hetero)aryl-aldehydes: synthesis, spectral characterization and pharmacological activity

Summary: With an aim to search for new pharmacologically active compounds, the goal of this doctoral dissertation was the design and synthesis of a series of mixed azines with a coumarin moiety. The reaction sequence included the acetylation of 4-hydroxycoumarin, and afterward, 3-acetyl-4-hydroxycoumarin afforded the corresponding hydrazone in reaction with hydrazine hydrate. The target derivatives were obtained by condensing the hydrazone of 3-acetyl-4-hydroxycoumarin with one equivalent of differently substituted aryl- and heteroaryl-aldehydes. In this way, an optimized, simple, and very efficient method for the synthesis of coumarin-azine hybrids was achieved. The synthesized compounds were fully spectrally characterized by combining 1D and 2D NMR, HRMS(EI), UV-Vis, and FTIR spectral data, as well as elemental analysis, and one compound was suitable for X-ray analysis. Evaluation of their antimicrobial activity confirmed a significant inhibitory effect, and, specifically, the derivatives with the *p*-hydroxyphenyl pharmacophore stood out for their inhibitory activity against strains *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus*, as well as the derivatives with a pyrrole fragment against *Escherichia coli*. Acute toxicity was investigated *in vivo* in the brine shrimp *Artemia salina* model, and the tested compounds were shown to have low toxicity. Azines with a pyrrole and quinoline fragment showed an exceptional ability to neutralize DPPH radical, while from the group of azines with an aryl substituent the most active was a derivative with a *p*-hydroxyphenyl group and two additional OMe groups.

Keywords: organic synthesis, asymmetric azines, coumarin, 3-acetyl-4-hydroxycoumarin, spectral characterization, antimicrobial activity, acute toxicity, antioxidant activity

Scientific field: Chemistry

Scientific discipline: Organic Chemistry and Biochemistry

Садржај

1. УВОД	1
2. ОПШТИ ДЕО	5
2.1. Азини	6
2.1.1. Особине азина	7
2.1.2. Синтеза деривата азина	9
2.1.2.1. Синтеза симетричних деривата азина	9
2.1.2.1.1. Синтеза из карбазола и хидразина	9
2.1.2.1.2. Синтеза из хомоаленилалдехида и хидразина	10
2.1.2.1.3. Синтеза из оксима	10
2.1.2.1.4. Синтеза из <i>N</i> -тозилхидразона	11
2.1.2.2. Синтеза несиметричних деривата азина	11
2.1.2.2.1. Синтеза из дитиолијумове соли и алдехида	11
2.1.2.2.2. Синтеза из диазоједињења и <i>N</i> -хетероцикличних карбена	12
2.1.2.2.3. Синтеза електрохемијском оксидацијом	12
2.1.2.2.4. Синтеза из хидразона и другог карбонилног једињења	13
2.1.2.2.5. Синтеза из фeroценкарбалдехида и хидразона	14
2.1.2.2.6. Синтеза из хидразолотиазола и α -нафтола	14
2.1.3. Биолошка активност деривата азина	15
2.2. Кумарини	18
2.2.1. Подела кумарина	19
2.2.2. Особине кумарина	26
2.2.3. Биосинтеза кумарина	28
2.2.4. Синтеза деривата кумарина	30
2.2.4.1. Синтеза из фенола	30
2.2.4.1.1. Пекманова реакција	30
2.2.4.2. Синтеза из алдехида и кетона	31
2.2.4.2.1. Перкинова реакција	31
2.2.4.2.2. Невенагелова реакција	32
2.2.4.2.3. Клајзенова кондензација	33
2.2.5. 3-Ацетил-4-хидроксикумарин – синтеза, реактивност и примена	33
2.2.5.1. Синтеза 3-ацетил-4-хидроксикумарина	34
2.2.5.2. Реакције 3-ацетил-4-хидроксикумарина	35
2.2.5.2.1. Реакција ацетиловања	35
2.2.5.2.2. Реакција редукције	35
2.2.5.2.3. Реакција кондензовања са алдехидима	36
2.2.5.2.4. Реакција са хидразинима	36
2.2.5.3. Примена 3-ацетил-4-хидроксикумарина	37
2.2.6. Биолошка активност деривата кумарина	38
2.2.6.1. Антиоксидативна активност	38
2.2.6.2. Антипролиферативна активност	42
2.2.6.3. Антимикробна активност	45
2.2.6.4. Антивирална активност	49

2.2.6.5. Антиинфламаторна активност	52
2.2.6.6. Антиконвулзивна активност	55
2.2.6.7. Антикоагулантна активност	56
2.2.6.8. Антидијабетска активност	59
2.3. Акутна токсичност на рачиће <i>Artemia salina</i>	60
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	62
3.1. Хемикалије и растварачи	63
3.2. Методе раздвајања и анализе	63
3.2.1. Танкослојна хроматографија (TLC)	63
3.2.2. Хроматографија на колони	63
3.2.3. Ултраљубичаста и видљива спектроскопија (UV-Vis)	64
3.2.4. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (FTIR)	64
3.2.5. Одређивање тачке топљења	64
3.2.6. Масена спектрометрија високе резолуције (HRMS)	64
3.2.7. Елементална микроанализа	65
3.2.8. Нуклеарно-магнетно-резонантна (NMR) спектроскопија	65
3.2.9. Рендгенска структурна анализа	65
3.3. Синтезе	66
3.3.1. Синтеза 3-ацетил-4-хидрокси-2 <i>H</i> -хромен-2-она [60]	66
3.3.2. Синтеза 3-(1-хидразоноетил)-4-хидрокси-2 <i>H</i> -хромен-2-она [199]	66
3.3.3. Општа процедура за синтезу мешовитих азина	67
3.3.3.1. Синтеза азина из ароматичних алдехида [200-209]	67
3.3.3.2. Синтеза азина из хетероцикличних алдехида [210-216]	74
3.3.4. Синтеза аква-bis(3-ацетил-4-хидрокси-2 <i>H</i> -хромен-4-олато-к ² О,О') цинк(II)-монохидрата [217]	78
3.4. Испитивање биолошке/фармаколошке активности синтетисаних азина	80
3.4.1. Испитивање <i>in vitro</i> активности	80
3.4.1.1. Коришћени микроорганизми	80
3.4.1.2. Испитивање антимикуробне активности	81
3.4.1.3. Испитивање антиоксидативне активности DPPH методом	82
3.4.2. Испитивање <i>in vivo</i> активности	83
3.4.2.1. Испитивање акутне токсичности у моделу рачића <i>Artemia salina</i>	83
3.5. Статистичка анализа	84
3.6. Молекулско моделовање	84
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	85
4.1. Синтеза	86
4.1.1. Синтеза 3-ацетил-4-хидрокси-2 <i>H</i> -хромен-2-она [60]	87
4.1.2. Синтеза и спектрална карактеризација 3-(1-хидразоноетил)-4- хидрокси-2 <i>H</i> -хромен-2-она [199]	88
4.1.3. Синтеза и спектрална карактеризација мешовитих азина	90
4.1.3.1. Азини добијени из ароматичних алдехида [200-209]	90

4.1.3.1.1. Спектрална карактеризација 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2 <i>H</i> -хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метоксибензилиден) хидразина [200]	91
4.1.3.1.2. Спектрална карактеризација 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2 <i>H</i> -хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-етокси-3-метоксибензилиден)хидразина [209]	95
4.1.3.1.3. NMR спектрална карактеризација азина [201-208]	99
4.1.3.2. Азини добијени из хетероцикличних алдехида [210-216]	106
4.1.3.2.1. Спектрална карактеризација 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2 <i>H</i> -хромен-3-ил)етилиден]-2-(индол-3-ил-3-метилен) хидразина [215]	106
4.1.3.2.2. Спектрална карактеризација 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2 <i>H</i> -хромен-3-ил)етилиден]-2-(хинолин-2-ил-2-метилен) хидразина [216]	110
4.1.3.2.3. NMR спектрална карактеризација азина [210-214]	113
4.1.4. Синтеза и кристалографска анализа аква-bis(3-ацетил-4-хидрокси-2 <i>H</i> -хромен-4-олато-к ² <i>O,O'</i>)цинк(II)-монохидрата [217]	117
4.2. Биолошка/фармаколошка активност синтетисаних једињења	119
4.2.1. Антимикробна активност	119
4.2.1.1. Одређивање антимикробне активности азина [200-208]	119
4.2.1.2. Одређивање антимикробне активности азина [210-216]	123
4.2.2. Акутна токсичност у моделу рачића <i>A. salina</i>	126
4.2.2.1. Одређивање акутне токсичности азина [200-208] и [210-216]	126
4.2.3. Антиоксидативна активност	129
4.2.3.1. Одређивање антиоксидативне активности азина DPPH методом	129
5. ЗАКЉУЧАК	132
6. ЛИТЕРАТУРА	135
7. ПРИЛОЗИ	155
8. БИОГРАФИЈА АУТОРА	223
9. ИЗЈАВЕ АУТОРА	225

Листа скраћеница

Реагенси и растварачи

ABTS	2,2'-Азино-bis(3-етилбензотијазолин-6-сулфонска киселина)
AcOH	Сирћетна киселина
Boc ₂ O	Ди- <i>tert</i> -бутил-дикарбонат
CDCl ₃	Деутерисани хлороформ
Et ₃ N	Триетиламин
Et ₂ O	Диетил-етар
EtOH	Етанол
DCE	1,2-Дихлоретан
DMSO	Диметилсулфоксид
DMSO- <i>d</i> ₆	Деутерисани диметилсулфоксид
DPPH	1,1-Дифенил-2-пикрилхидразил радикал
MeCN	Ацетонитрил
MeOH	Метанол
NaOAc	Натријум-ацетат
NaOMe	Натријум-метоксид
<i>p</i> -TSA	<i>p</i> -Толуенсулфонска киселина
THF	Тетрахидрофуран
TMS	Тетраметилсилан
TTC	2,3,5-Трифенилтетразолијум-хлорид

Номенклатура

Ar	Арил
Bn	Бензил
CCoAOMT	Кафеоил-коензим А-О-метилтрансфераза
C2H	Цинамат-2-хидроксилаза
C2'H	Кумароил-коензим А-2'-хидроксилаза
C4H	Цинамат-4-хидроксилаза
4CL	4-Кумарат: коензим А лигаза
DG12	2'-Дезоксигванозин-5'-монофосфат
DNK	Дезоксирибонуклеинска киселина

<i>E</i>	<i>Entgegen</i> (стереодескриптор)
Et	Етил
F6'H	Ферулоил-коензим А-6'-хидроксилаза
GBA	β -Глукозидаза
2GT	2-Кумарат- <i>O</i> - β -глукозилтрансфераза
4HRA3H	4-Хидроксифенил-ацетат-3-хидроксилаза
<i>i</i> -Pr	Изопропил
Me	Метил
<i>m</i>	<i>meta</i>
<i>o</i>	<i>orto</i>
<i>p</i>	<i>para</i>
PAL	Фенилаланин-амонијум-лијаза
Ph	Фенил
RNK	Рибонуклеинска киселина
TAL	Тирозин-амонијум-лијаза
<i>Z</i>	<i>Zusammen</i> (стереодескриптор)

Биолошка/фармаколошка активност

ATCC	Америчка колекција култура сојева (енгл. <i>American Type Culture Collection</i>)
A549	Ћелијска линија хуманог аденокарцинома плућа
CCRF	Ћелијска линија хумане акутне лимфобластне леукемије
COX-1	Циклооксигеназа-1 (енгл. <i>Cyclooxygenase-1</i>)
COX-2	Циклооксигеназа-2 (енгл. <i>Cyclooxygenase-2</i>)
CRL-1439	Ћелијска линија хуманог карцинома јетре
CRL-1548	Здрава хумана ћелијска линија јетре
GABA _A	GABA (γ -Аминобутерна киселина) рецептор типа А
GLUT4	Транспортер глукозе тип 4 (енгл. <i>Glucose transporter type 4</i>)
HCT-116	Ћелијска линија хуманог колоректалног карцинома
HCV	Вирус хепатитиса В (енгл. <i>Hepatitis B virus</i>)
hCES2	Хумана карбоксилестераза 2 (енгл. <i>Human carboxylesterase 2</i>)
HCV	Вирус хепатитиса С (енгл. <i>Hepatitis C virus</i>)
HEP-G2	Ћелијска линија хуманог карцинома јетре

HIV	Вирус хумане имунодефицијенције (енгл. <i>Human immunodeficiency virus</i>)
HIV-1	Вирус хумане имунодефицијенције-1 (енгл. <i>Human immunodeficiency virus-1</i>)
KB-3-1	Ћелијска линија хуманог карцинома грлића материце
LDL	Липопротеин мале густине (енгл. <i>Low-density lipoprotein</i>)
5-LOX	5-Липоксигеназа (енгл. <i>5-Lipoxygenase</i>)
MDCK	Ћелијска култура бубрежних ћелија паса (енгл. <i>Madin-Darby canine kidney</i>)
MDR	Отпорност на више лекова (енгл. <i>Multiple drug resistance</i>)
MFC-7	Ћелијска линија хуманог карцинома дојке
MIC	Минимална инхибиторна концентрација (енгл. <i>Minimum inhibitory concentration</i>)
NA	Хранљиви агар (енгл. <i>Nutrient agar</i>)
iNOS	Индуцибилна азот-моноксид синтаза (енгл. <i>Inducible nitric oxide synthase</i>)
PPAR- γ	Пероксизом пролифераторни-активирајући рецептор- γ (енгл. <i>Peroxisome proliferator-activated receptor-γ</i>)
PANC-1	Ћелијска линија хуманог карцинома панкреаса
SDA	Сабуро декстрозни агар (енгл. <i>Sabouraud dextrose agar</i>)
SW480	Ћелијска линија хуманог аденокарцинома дебелог црева
TNF- α	Фактор некрозе тумора- α (енгл. <i>Tumor necrosis factor-α</i>)
VKORC-1	Витамин К-епоксид редуктаза комплекс 1 (енгл. <i>Vitamin K epoxide reductase complex</i>)

Ултраљубичаста и видљива спектроскопија; Инфрацрвена спектроскопија; Нуклеарно-магнетно-резонантна спектроскопија; Масена спектрометрија; Хроматографија

UV-Vis	Ултраљубичаста и видљива спектроскопија (енгл. <i>Ultraviolet-visible spectroscopy</i>)
FTIR	Фуријеова трансформисана инфрацрвена спектроскопија (енгл. <i>Fourier transformed infrared spectroscopy</i>)
IR	Инфрацрвена спектроскопија (енгл. <i>Infrared spectroscopy</i>)
1D	Једнодимензионална
2D	Дводимензионална
br s	Широки синглет

^{13}C -NMR	Нуклеарно-магнетно-резонантна спектроскопија угљеника-13 (енгл. <i>Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>)
δ	Хемијско померање у NMR спектру
d	Дублет
dd	Дублет дублета
ddd	Дублет дублета дублета
DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
dt	Дублет триплета
^1H - ^1H COSY	^1H - ^1H <i>Correlation spectroscopy</i>
HMBC	Хетеронуклеарна корелација преко више веза (енгл. <i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>)
^1H -NMR	Протонска нуклеарно-магнетно-резонантна спектроскопија (енгл. <i>Hydrogen-1 nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>)
HSQC	Хетеронуклеарна корелација преко једноструких квантних прелаза (енгл. <i>Heteronuclear single quantum coherence</i>)
J	Константа купловања (спрезања)
m	Мултиплет
NMR	Нуклеарно-магнетно-резонантна спектроскопија (енгл. <i>Nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>)
NOESY	Спектроскопија нуклеарног Оуверхаузеровог ефекта (енгл. <i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>)
q	Квартет
ROESY	<i>Rotating-frame nuclear Overhauser effect correlation spectroscopy</i>
s	Синглет
t	Триплет
td	Триплет дублета
HRMS	Масена спектрометрија високе резолуције (енгл. <i>High resolution mass spectrometry</i>)
M^+	Молекулски јон
m/z	Однос масе и наелектрисања
TLC	Танкослојна хроматографија (енгл. <i>Thin-layer chromatography</i>)
<i>Остало</i>	
AHC	Агломеративна хијерархијска кластер анализа (енгл. <i>Agglomerative hierarchical clustering</i>)
ANOVA	Једнофакторска анализа варијансе (енгл. <i>Analysis of variance</i>)

aq.	Водени раствор
EC ₅₀	Концентрација при којој једињење испољава 50% од максималног могућег мереног ефекта
<i>et al.</i>	и други
IC ₅₀	Концентрација при којој једињење инхибира 50% испитиваног узорка/популације у односу на контролни узорак
LC ₅₀	Концентрација једињења која убија 50% испитиваног узорка/популације у односу на контролни узорак
т.т.	Тачка топљења

1. УВОД

Модификовањем постојећих структура биоактивних једињења, њиховим комбиновањем са различитим фармакофорама, тежи се побољшању фармаколошких активности и смањењу токсичности насталих производа. Између осталих, данас велико интересовање влада и за деривате азина, имајући у виду њихове физичко-хемијске особине и широк спектар фармаколошких активности (Chourasiya *et al.*, 2019). Један од најпознатијих синтетских азина, гванабенз, веома је ефикасан антихипертензив и већ дуже време присутан је на тржишту лекова. Његово откриће покренуло је експанзију синтезе нових једињења са азинском функцијом, а све са циљем добијања биолошки активнијих производа. Поред тога што су важни синтони у синтези хетероцикличних једињења, азини имају значајну примену и у индустрији као нелинеарни оптички материјали (Safari и Gandomi-Ravandi, 2014), а интензивно се ради и на синтези нових деривата са унапређеним дејством у смислу побољшане селективности или активности.

Посебно истраживачко интересовање изазивају хетероцикличне структуре које, поред тога што улазе у састав природних производа и фармацеутских препарата, могу представљати и водећа једињења (енгл. *lead compound*) у модерном дизајнирању нових лекова (Taylor *et al.*, 2016; Jampilek, 2019). Управо оваквој групи једињења припадају кумарини, природни хетероциклични молекули са кисеоником, који поседују запажену способност интеракције са различитим ензимима и рецепторима у живим организмима. Показало се да је кумаринско језго релативно лако синтетисати и „хибридизовати“, што отвара пут за дизајнирање нових једињења на бази кумарина и истраживање њиховог потенцијала у лечењу различитих болести. Важност кумаринског језгра није потврђена само у фармацији и медицини, већ и у агрохемијској и козметичкој индустрији (Annunziata *et al.*, 2020). Посебно место у овим истраживањима имају деривати кумарина са хидроксилном групом у положају 4, који су познати као антагонисти витамина К. Активност 3-супституисаних-4-хидроксикумарина зависи од природе супституента у положају 3 (Kirkiacharian *et al.*, 2002; Jung и Park, 2009).

На основу наведеног може се очекивати и значајно фармаколошко деловање групе једињења у којима азински мост повезује два кумаринска

језгра или кумаринско језро са неким другим остатком, као и евентуално синергистичко деловање ова два дела молекула. Овој групи синтетисаних хибрида припадала би једињења настала реакцијом 3-ацетил-4-хидроксикумарина, хидразина и различитих (хетеро)арил-алдехида. За структуре сличне овим доказано је да инхибирају циклин-зависну киназу, међутим оне још увек нису детаљно испитане (Abdel Latif *et al.*, 2016). Подаци у литератури о једињењима овог типа су веома ограничени. Њихова спектрална карактеризација се још ређе сусреће, а нарочито у области NMR спектроскопије, где спектри углавном нису асигнирани у потпуности. На пољу биолошког деловања ових једињења, такође није направљен значајан помак.

Имајући у виду наведене чињенице, циљ ове докторске дисертације је био синтеза мешовитих деривата азина са кумаринским и још једним (хетеро)арил-остатком, њихова спектрална карактеризација и испитивање фармаколошких активности. Конкретно, истраживања везана за израду ове докторске дисертације обухватила су следеће:

1. Синтезу серије мешовитих азина 3-ацетил-4-хидроксикумарина и арил- или хетероарил-алдехида, полазећи од 4-хидроксикумарина, у неколико реакционих корака, и то:
 - синтезу 3-ацетил-4-хидроксикумарина, реакцијом ацетиловања комерцијалног 4-хидроксикумарина,
 - синтезу хидразона 3-ацетил-4-хидроксикумарина, реакцијом 3-ацетил-4-хидроксикумарина и хидразин-хидрата и
 - синтезу серије мешовитих азина реакцијом хидразона 3-ацетил-4-хидроксикумарина са одабраним арил- или хетероарил-алдехидима;
2. Синтезу комплекса 3-ацетил-4-хидроксикумарина;
3. Спектроскопску и структурну карактеризацију синтетисаних производа, са детаљном интерпретацијом NMR спектра;
4. Испитивање биолошких и фармаколошких активности добијених производа, и то:
 - антиоксидативне активности,
 - антимицробне активности и

– акутне токсичности.

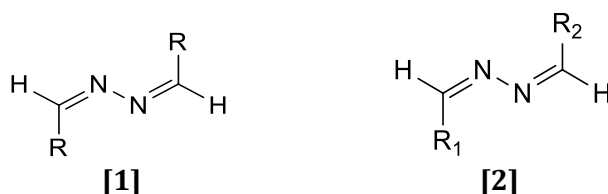
На основу постављених циљева, предвиђена истраживања вршена су следећим методама:

1. Синтеза производа хемијским трансформацијама полазећи од 4-хидроксикумарина, уз употребу одговарајућих реагенаса и растварача;
2. Праћење тока реакције танкослојном хроматографијом (TLC) на SiO₂;
3. Пречишћавање сирових производа прекристализацијом и гравитационом колонском хроматографијом на SiO₂;
4. Потврда структуре спектроскопским и спектрометријским методама и то:
 - ¹H- и ¹³C-NMR спектроскопијом, укључујући 2D NMR технике (¹H-¹H COSY, NOESY/ROESY, HSQC и HMBC),
 - инфрацрвеном спектроскопијом (IR),
 - ултраљубичастом-видљивом спектроскопијом (UV-Vis),
 - масеном спектрометријом високе резолуције (HR-MS(EI)),
 - рендгенском структурном анализом;
5. Одређивање антимицробне активности на одабраним сојевима Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија и гљива методом микродилуције;
6. Одређивање акутне токсичности у моделу слановодних рачића *Artemia salina*;
7. Одређивање антиоксидативне активности спектрофотометријски методом хватања радикала DPPH;
8. Молекулско моделовање и оптимизација геометрије молекула.

2. ОПШТИ ДЕО

2.1. Азини

У хемији хетероцикличних једињења азини представљају шесточлане ароматичне прстенове који у свом саставу садрже један до шест атома азота, док код алицикличних структура су то 2,3-диаза аналози 1,3-бутадиена и формално се означавају као N–N везани диимини (C=N–N=C) (Safari и Gandomi-Ravandi, 2014). Ова једињења настају реакцијом хидразина са алдехидима и кетонима. Азини добијени кондензацијом алдехида са хидразином називају се алдазини, а производи кондензације кетона са хидразином кетазини (Moss *et al.*, 1995). У зависности од тога да ли у реакцији са хидразином учествују два молекула истог или различитих карбонилних једињења, азине можемо поделити на симетричне [1] и несиметричне (мешовите) [2] (слика 1).



Слика 1. Структуре симетричних и несиметричних (мешовитих) азина

Азини, као једињења са широким спектром занимљивих хемијских особина, нашли су се у фокусу интересовања органских хемичара из два разлога. Први је стабилност добијених деривата, а други њихове базне особине, због чега формирају соли, што доприноси испољавању многобројних биолошких, односно физиолошких и терапеутских деловања (Chourasiya *et al.*, 2019). Азини су веома погодна и захвална група једињења у смислу изоловања, пречишћавања и карактеризације (Lewis *et al.*, 1998; Shah и Chudgar, 2000).

Несиметрична једињења овог типа су нарочито занимљива због способности азинске функције да на користан начин повеже две различите групе једињења. На пример, они могу формирати стероидне деривате опијата, који показују веома изражену активност опијатних антагониста или посебну класу несиметричних азина са гванидино-групом. Ово сазнање сугерише да се новим, али и стандардним методама за синтезу несиметричних азина може у великој мери допринети потенцијалном проширењу примене једињења ове

групе (Kolb и Hua, 1984).

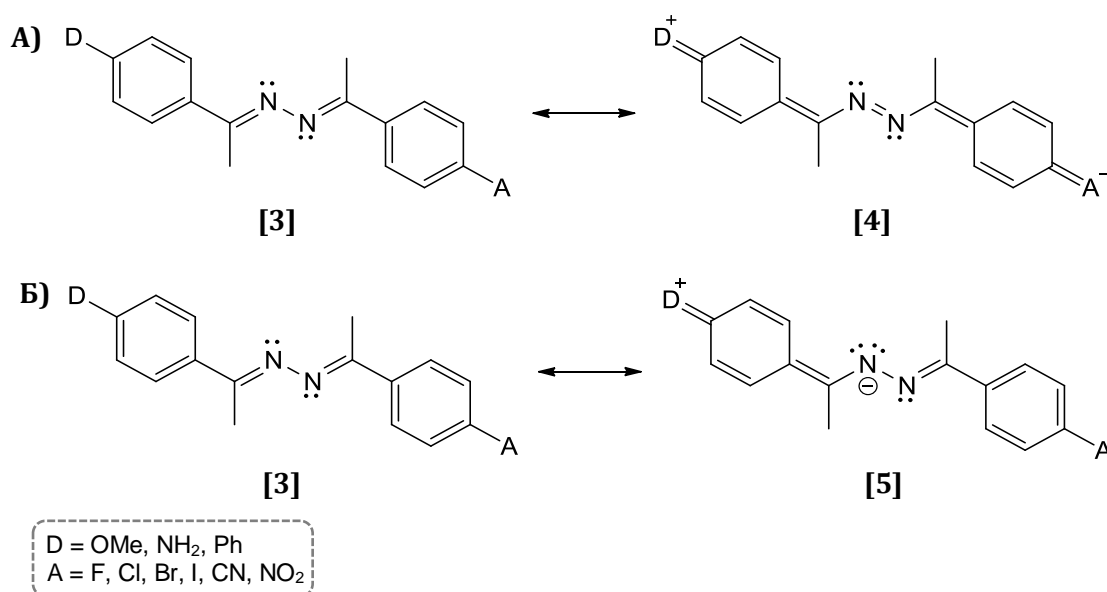
2.1.1. Особине азина

Чињеница да азини представљају велику групу једињења условила је експанзију испитивања њихових физичких и хемијских особина. Њихове хемијске особине последица су супротне оријентације две електрон-акцепторске групе повезане N–N везом, што резултира настајање разноврсних деривата азина (Kolb *et al.*, 1987; Abelt и Pleier, 1989). Делокализација електрона код азина била је предмет проучавања многих студија. Познато је да је један од услова за максималну коњугацију у неком систему планарност (March, 1992).

Разматрајући могућу делокализацију код симетричних и несиметричних ацетофенонских азина (Chen *et al.*, 1995a; Lewis и Glaser, 2002) замисливе су две резонантне структуре [3] и [4], када се на ароматичном прстену налазе електрон-донорска и акцепторска група (шема 1A). Међутим, на основу података добијених из детаљних кристалографских анализа, NMR спектроскопије, као и других теоријских испитивања, утврђено је минимално учешће, односно скоро потпуно одсуство коњугације која би била представљена структуром [4]. На основу наведеног, закључено је да иако азинска јединица има све потребне елементе да функционише као добар коњугацијски мост, она у ствари представља „чеп коњугације“ код ацетофенонских азина, спречавајући делокализацију, односно код азина резонантна структура [5] (шема 1B) је она којом се најбоље приказује делокализација. Подаци из других студија такође наводе минималну делокализацију типа [4] (Nakano *et al.*, 2006). Концепт „чеп коњугације“ подржан је и електрохемијским студијама (Sauro и Workentin, 2001; Zuman и Ludvík, 2000).

Две иминске везе које сачињавају азинску јединицу могу се посматрати као поларне акцепторске групе које су супротно оријентисане. Ова карактеристика азинске јединице, која повезује два арил прстена који садрже електрон-донорску и акцепторску групу, сврстава несиметричне азине у ред идеалних кандидата за нелинеарне оптичке материјале и течне кристале (Glaser и Chen, 1998; Van Deun *et al.*, 2003), који имају широку примену у

производњи ласерских боја, соларних ћелија, проводних материјала, електрохемијских сензора и оптичких уређаја.



Шема 1. А) Могућа резонантна структура ацетофенонских азина [4], Б)

Потврђена делокализација ацетофенонских азина

Због структурне разноликости, азини показују конфигурациону изомерију, а захваљујући присуству N–N везе и две граничне конформације. Симетрични азини (алдазини и кетазини) могу се јавити у облику три конфигурациона изомера: *E,E*, *E,Z* и *Z,Z* (Alkorta *et al.*, 2008). Највећу тенденцију показују за формирањем *E,E*- и *E,Z*-изомера при чему је *E,E*-изомер енергетски најповољнији (Karmakar *et al.*, 2007; Safari и Gandomi-Ravandi, 2014). Конформација азина је одређена низом од четири атома: C=N–N=C. Када су две групе распоређене са супротне стране N–N равни са диедарским углом од 180°, азини су у *s-trans*, односно када су те групе распоређене са исте стране N–N равни са диедарским углом од 0°, они су у *s-cis* конформацији. Већина азина је постојана у *s-trans* конформацији при чему је установљено да је код оваквих азина коњугација максимална (Grzegorzek *et al.*, 2010; Tighadouini *et al.*, 2015). Азини се сматрају добрим синтонима у бројним синтетским трансформацијама, а посебно оним које воде грађењу хетероцикличних система (Reddy *et al.*, 2016; Reddy *et al.*, 2018). Треба споменути да азини имају особину донора електрона (слободни електронски парови на азотовим

атомима), због чега показују способност координације са металним јонима, што их сврстава у групу органских лигананда (Singh *et al.*, 2005; Kulaksizoglu и Gur, 2012).

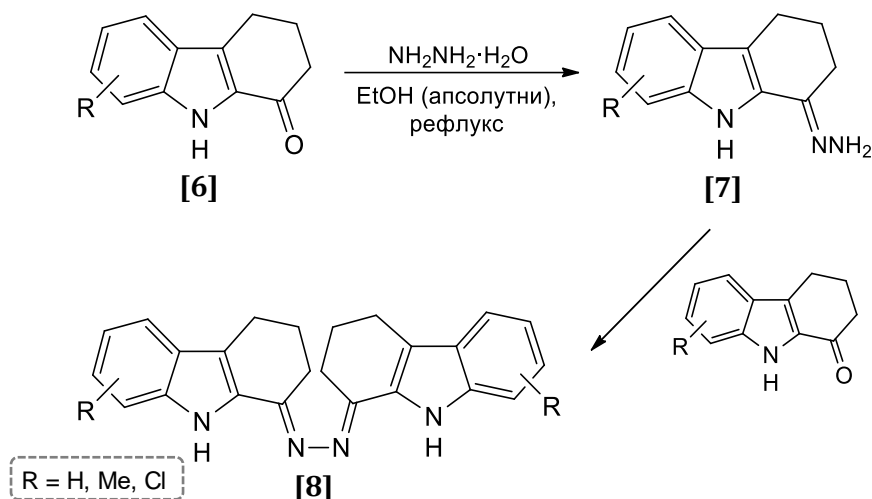
2.1.2. Синтеза деривата азина

Због све већег интересовања за супституисане азине, развијен је велики број нових синтетских поступака за њихово добијање. Први азин, диметилкетазин, синтетисан је давне 1891. године реакцијом два молекула ацетона и хидразина (Curtius и Thun, 1891), док је најпростији, формалдазин, синтетисан 1959. године (Neureiter, 1959). Од тада, па до данас остварен је велики напредак на пољу њихове синтезе. Симетрични азини се могу лако добити, реакцијом хидразина и вишка алдехида или кетона (Safari и Gandomi-Ravandi, 2011; Bondock *et al.*, 2016), док је синтеза несиметричних азина нешто захтевнија. Брзина реакције хидразина са различитим карбонилним једињењима опада следећим редом: алдехид > диалкил кетон > диарил кетон, при чему се алдазини формирају знатно брже од кетазина. У ствари, реакција хидразина алдехида са другим молекулом алдехида је бржа од реакције са самим хидразином, па је према томе алдазин очекивани производ. Са друге стране кетазини захтевају присуство вишка кетона заједно са сирћетном или мрављом киселином као катализатором (Safari и Gandomi-Ravandi, 2014). Од бројних метода за синтезу азина, овде су наведене само неке, при чему је акценат стављен на методе за синтезу несиметричних азина.

2.1.2.1. Синтеза симетричних деривата азина

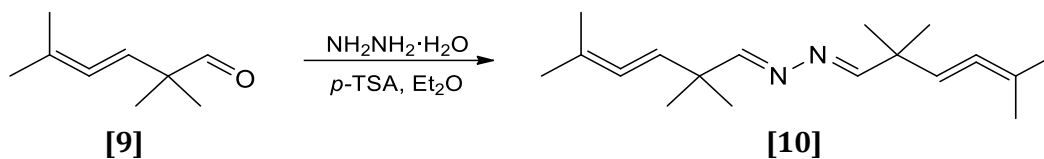
2.1.2.1.1. Синтеза из карбазола и хидразина

Реакцијом 1-оксо-1,2,3,4-тетрахидрокарбазола [6] и хидразин-хидрата у апсолутном етанолу добијени су деривати *N,N*-bis-карбазоилазина [8] (шема 2). Настајање поменутих деривата азина одвија се *in situ* преко награвљеног хидразона [7], односно реакцијом кондензације једињења [7] и [6]. Утврђено је да сви добијени азини имају антибактеријско и антифунгално дејство, управо због формиране азинске функције, а изузетно високу активност показао је дериват са хлором као супституентом (Danish и Prasad, 2004).

Шема 2. Синтеза *N,N*-bis-карбазоилазина

2.1.2.1.2. Синтеза из хомоаленилалдехида и хидразина

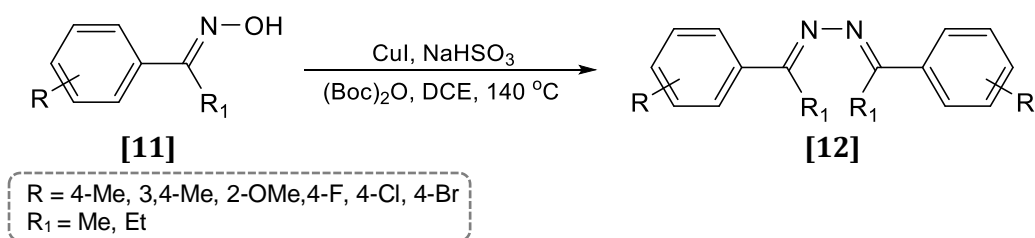
У реакцији хомоаленилалдехида [9] са еквивалентном количином хидразин-монохидрата уз присуство каталитичке количине *p*-TSA (*p*-толуенсулфонска киселина) у диетил-етру, добијен је одговарајући азин [10] (шема 3) (Marek, 1997).



Шема 3. Синтеза азина из хомоаленилалдехида

2.1.2.1.3. Синтеза из оксима

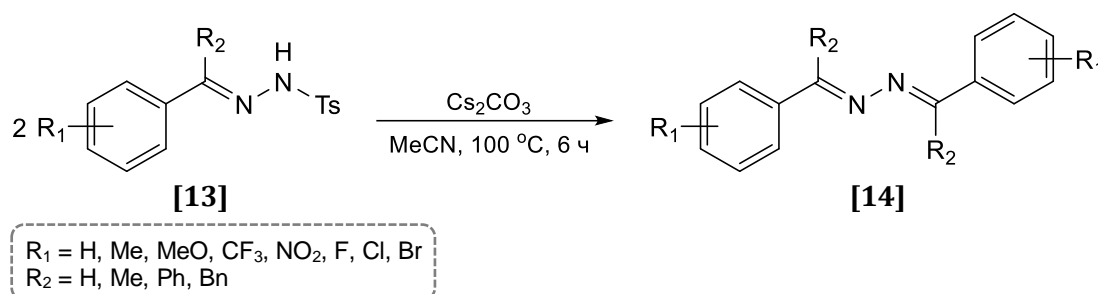
Добијање симетричних азина [12] може се извести хомокупловањем кетоксима [11] уз помоћ бакра(I) као катализатора (шема 4). Предност ове методе је у високој толеранцији на присуство различитих функционалних група, употреби лако доступних оксима, благим реакционим условима и добром приносу (Zhao *et al.*, 2012).



Шема 4. Добијање азина из кетоксима

2.1.2.1.4. Синтеза из *N*-тозилхидразона

Разлагањем *N*-тозилхидразона настају продукти као што су *N*-супституисани хидразони или азини. Трансформација *N*-тозилхидразона [13] у симетричне азине [14] могућа је употребом базе (Cs_2CO_3), без коришћења металних катализатора (шема 5) (Luo *et al.*, 2017). Ова, модификована метода, за разлику од раније објављене (Sha и Wei, 2013) је еколошки бенигна, јер омогућава употребу слабије уместо јаче базе (NaOH). Такође, ова метода нуди и друге предности као што су: велики опсег различитих супстрата, благи реакциони услови, изостављање додатних адитива и употреба лако доступних реактаната.



Шема 5. Синтеза азина разлагањем *N*-тозилхидразона

2.1.2.2. Синтеза несиметричних деривата азина

2.1.2.2.1. Синтеза из дитиолијумове соли и алдехида

У реакцији 2-метилтио-1,3-дитиолијумових соли [15] и хидразона ароматичних и хетероцикличних алдехида у присуству пиридина, добијени су одговарајући несиметрични азини [16] (шема 6) (Moreno-Mañas *et al.*, 2001).



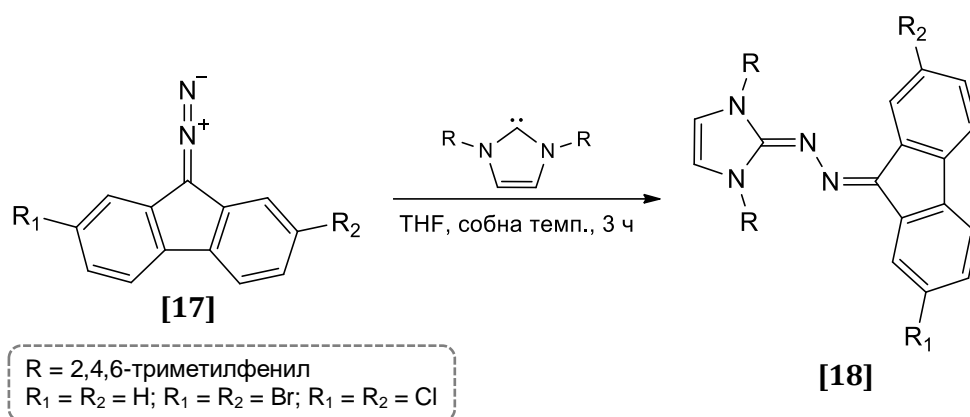
Шема 6. Синтеза азина реакцијом дитиолијумове соли и хидразона

Ова метода за синтезу азина укључује нуклеофилни напад хидразона алдехида на хетероцикличне соли, које имају добро одлазећу групу као $-\text{OR}$,

–SR или халоген на положају 2 дитиолијумове соли.

2.1.2.2.2. Синтеза из диазоједињења и *N*-хетероцикличних карбена

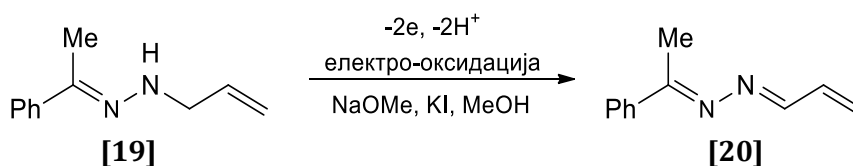
Једноставан и чест начин за добијање несиметричних азина [18] заснива се на реакцији диазофлуорена [17] са *N*-хетероцикличним карбеном, 1,3-димезитилимидазол-2-илиденом (шема 7) (Hopkins *et al.*, 2001). Ова реакција сматра се једноставном из разлога што се одговарајући производ добија у једном кораку, што се одвија несметано на собној температури и даје добре приносе. Такође, супституент на диазоједињењу и карбену може да варира дајући различито супституисане азине.



Шема 7. Настајање азина из диазоједињења и карбена

2.1.2.2.3. Синтеза електрохемијском оксидацијом

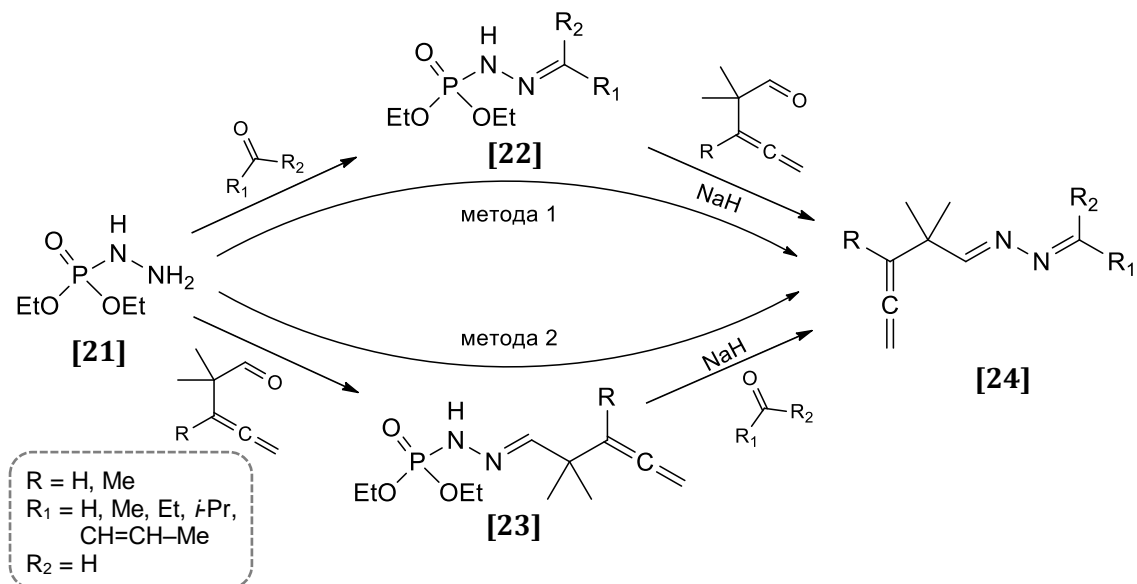
Азини се могу синтетисати и електрохемијском оксидацијом *N*-алилхидразона [19] у присуству калијум-јодида и натријум-метоксида (шема 8) (Okimoto *et al.*, 2008). Електро-оксидација доводи до формирања C=N везе између угљеника алил-групе и азота хидразона, при чему настаје азин [20]. Предности ове методе су благи реакциони услови, лако доступни супстрати и одсуство оксиданата. Најбољи принос ове двоелектронске оксидације остварен је на собној температури.



Шема 8. Синтеза азина електрохемијском оксидацијом

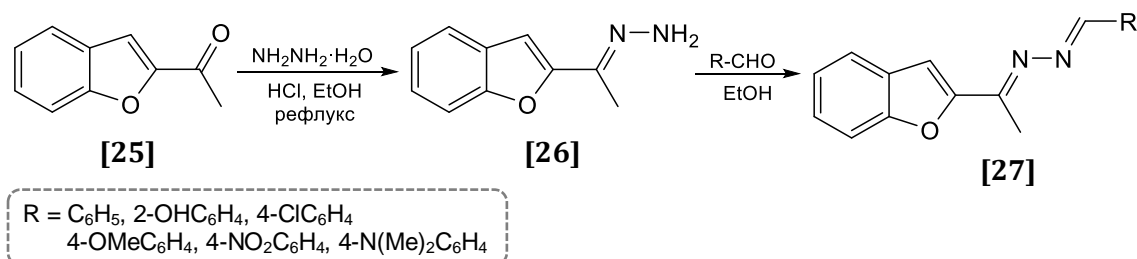
2.1.2.2.4. Синтеза из хидразона и другог карбонилног једињења

У реакцији диетил-хидразидфосфата [21] са карбонилним једињењима настају хидразони [22] и [23], који у присуству натријум-хидрида и другог карбонилног једињења дају аленил азине [24] (шема 9) (Galeta *et al.*, 2009).



Шема 9. Синтеза аленил азина из хидразона и карбонилног једињења

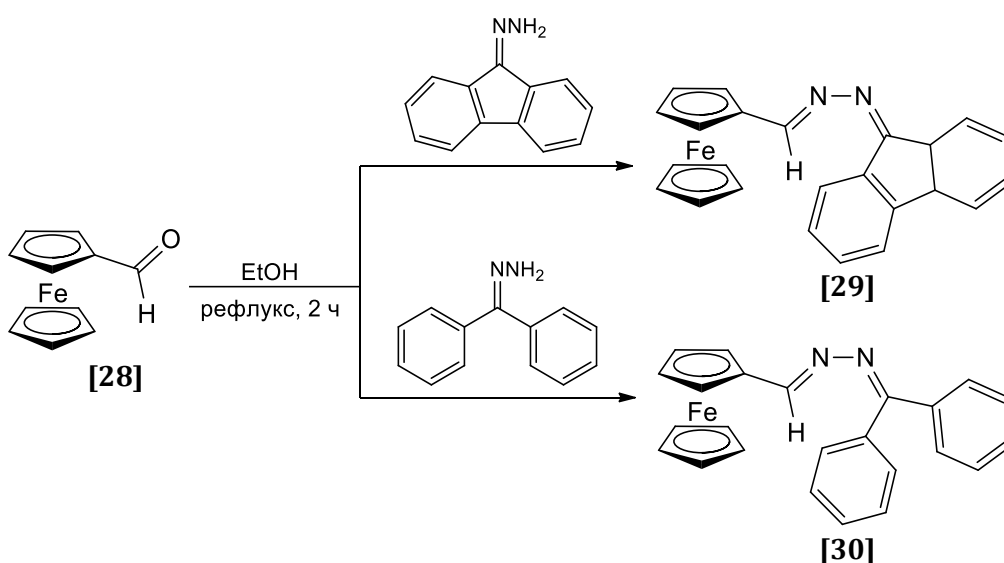
Реакцијом ацетил-групе неког једињења са хидразин-монохидратом настаје одговарајући хидразон, који са карбонилним једињењима даје азине. Пример је синтеза 2-ацетилбензофуран-хидразона [26] реакцијом 2-ацетилбензофурана [25] и хидразин-монохидрата у етанолу, у присуству хлороводоничне киселине као катализатора. Реакцијом кондензације насталог хидразона са различито супституисаним ароматичним алдехидима, добијена је серија несиметричних азина [27] (шема 10) (Ujjinamatada и Agasimundin, 2007). Предност ове методе је у лако доступним реактантима и кратком временском периоду за извођење синтеза.



Шема 10. Синтеза азина из 2-ацетилбензофуран-хидразона и алдехида

2.1.2.2.5. Синтеза из фeroценкарбалдехида и хидразона

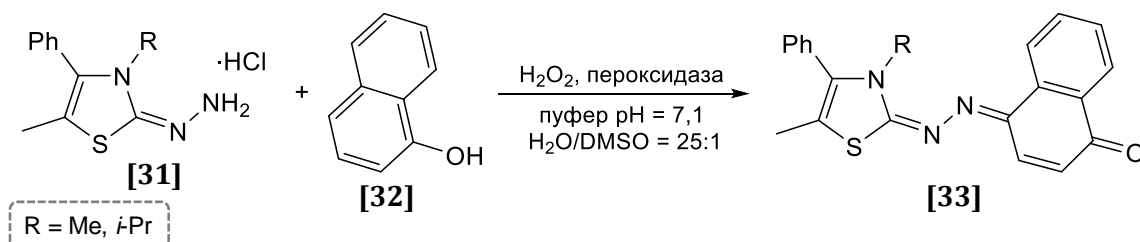
Реакцијом фeroценкарбалдехида [28] са хидразоном 9-флуоренона и хидразоном бензофенона настају фeroценски азини [29] и [30] у веома добрим приносима, без употребе киселог катализатора (шема 11) (Lasri *et al.*, 2018). Синтетисани азини показали су се нетоксичним према слановодним рачићима *Artemia salina*, а испољили су добру антибактеријску активност. Значајно је деловање азина [29] према соју *Acinetobacter baumannii*, као и његово антипролиферативно дејство.



Шема 11. Настајање азина реакцијом фeroценакарбалдехида и хидразона

2.1.2.2.6. Синтеза из хидразолотиазола и α -нафтола

У реакцији катализованој пероксидазом рена између 3-алкил-2-хидразоно-4-тиазол-хидрохлорида [31] и α -нафтола [32], у присуству водоник-пероксида, добијени су азински пигменти [33] у одличном приносу (шема 12) (Vodtke *et al.*, 2005). Ова реакција представља еколошки погодан поступак за синтезу азина под благим условима.



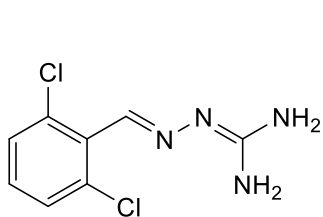
Шема 12. Синтеза азина катализована пероксидазом рена

2.1.3. Биолошка активност деривата азина

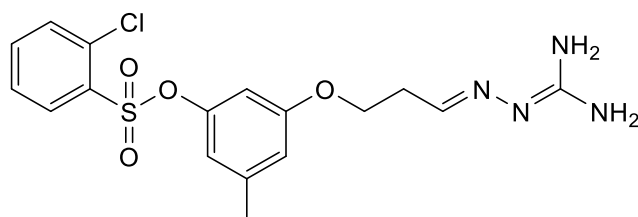
Још од самог открића, многи деривати азина привлачили су пажњу због потенцијалне примене у медицини. Захваљујући значајним биолошким и фармаколошким активностима, које су између осталог и последица присуства азинске функције, све више напора се улаже на пољу синтезе нових деривата са жељеном биолошком активношћу. Ово потврђује и чињеница да се гванабенз [34], дериват азина са 1,1-диамино структурним фрагментом (Diamant *et al.*, 1985), користи у медицини као антихипертензивни агенс (Holmes *et al.*, 1983) и да је одавно присутан на тржишту лекова. Поред њега, треба поменути и још неколико важних деривата азина (слика 2) који се користе за терапеутску примену. Диаминоазини су јако базна једињења и као таква у физиолошким условима постоје у протонваном облику. За овакве протонване диаминоазине наводи се да су водећа једињења у откривању лекова, а важни примери су: антикоагулантни инхибитор тромбина [35] са арилсулфонил-групом у бочном ланцу (Soll *et al.*, 2000), антибактеријски агенс [36] са бифенилним системом (Cavallini *et al.*, 1961), антимальарични агенс [37] изведен из бензофенона (French *et al.*, 1971), антисептични агенс познат под именом амбазон [38], трипаноцидни агенс [39] чија је азинска јединица везана за имидазопиридин (Sundberg *et al.*, 1990) и једињења са антипролиферативним деловањем [40], [41] и [42] (Krezel *et al.*, 1999; Qian *et al.*, 2010; Andrew *et al.*, 2007).

Неки деривати, који не спадају у групу диаминоазина, такође показују значајне биолошке активности (слика 3). Иако су довољно базног карактера, истраживања показују да своју активност испољавају као неутрални молекули. Несиметрични азини нафто[2,1-*b*]фурана [43] показали су одличну антибактеријску активност (Veena *et al.*, 2011), азини добијени из нафталена [44] су добри антифунгални агенси (Kurteva *et al.*, 2011), bis-изатински азин [45] испољио је значајну антипролиферативну активност (Liang *et al.*, 2014), док су се азински деривати монотерпенских индолних алкалоида показали као MDR (енгл. *multiple drug resistance*) агенси за преокрет, односно агенси којима се, када се користе истовремено са леком, превазилази резистенција на

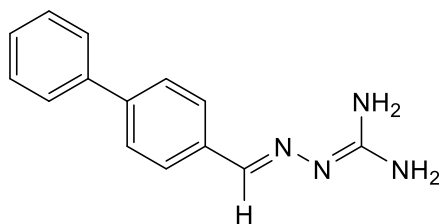
тај лек (Paterna *et al.*, 2018). Азински дисулфидни димер дериват показао је изражену антипролиферативну активност (Kalinowski *et al.*, 2007), док су се азини [46] настали хибридизацијом између естрога и налоксона показали као опијатни антагонисти (Kolb *et al.*, 1987). Активност опијатних антагониста показали су и налтрексон азин, азински дериват морфина и азини настали из опијатних антагониста и стероидних кетона (Urbanczyk-Lipkowska *et al.*, 1987; Hahn *et al.*, 1982; Koman *et al.*, 1986).



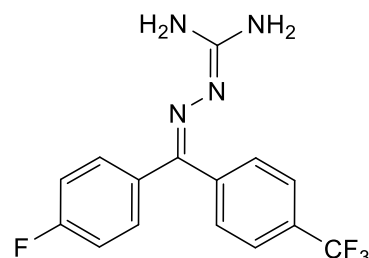
Антихипертензивни агенс [34]



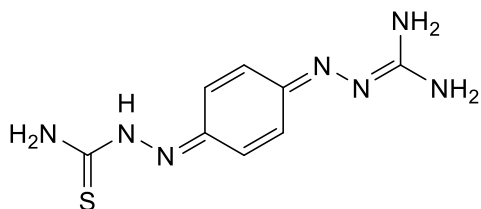
Инхибитор тромбина [35]



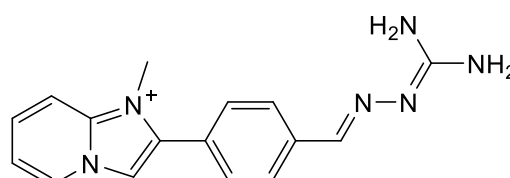
Антибактеријски агенс [36]



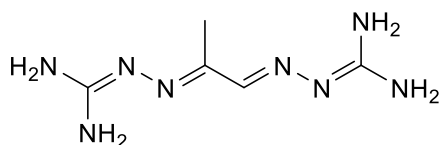
Антималаријски агенс [37]



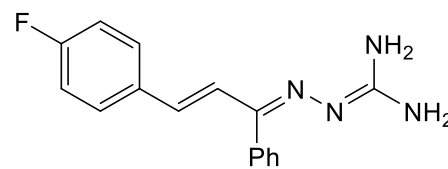
Антисептик [38]



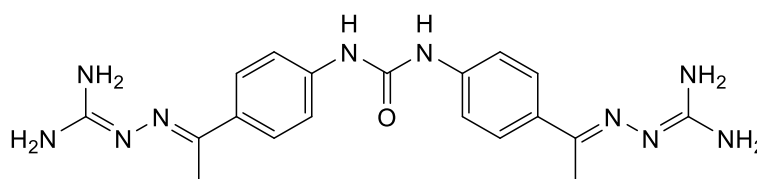
Трипаноцидни агенс [39]



Антипролиферативни агенс [40]



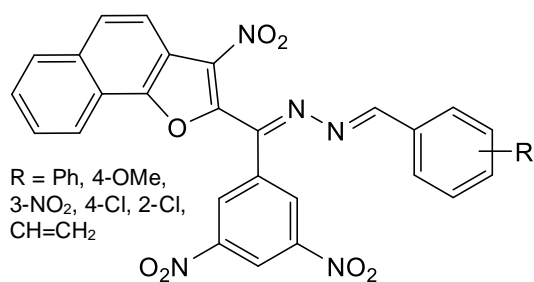
Антитубулински агенс [41]



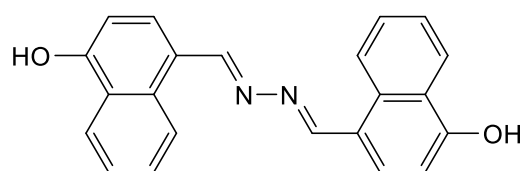
Chk инхибитор [42]

Слика 2. Биолошки активни диаминоазини и њихов терапеутски ефекат

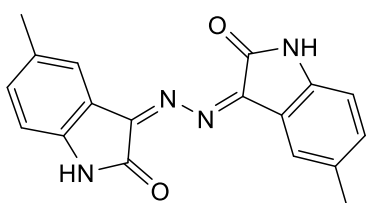
Поред широког спектра наведених *in vitro* и *in vivo* биолошких активности, неки азини *p*-бензохинона су токсични за мекушце (Latif и Fathy, 1960; Halawani и Latif, 1954). Азин добијен из ванилина и хидразинијум-карбоксилата има изразиту анти-неуроинфламаторну активност (Subedi *et al.*, 2017), док су азини добијени из моно-Манихових база, 3-амино-1-арил-1-пропанон-хидрохлорида, показали антиконвулзивно дејство (Gul *et al.*, 2004). Антимикробна и антифунгална активност тиопиранских деривата азина испитана на пет сојева бактерија и четири соја гљива је добро позната (Jayabharathi *et al.*, 2007). Биолошки потенцијал једне групе бензотијазолових несиметричних азина испитан је на Грам-негативној бактерији *Chromobacterium violaceum* (Chourasiya *et al.*, 2015). Ова бактерија, која се иначе налази у земљишту и стајаћој води тропских и субтропских области, ретко изазива инфекције код људи, али када изазове доводи до сепсе или тешке инфекције уринарног тракта и често смртог исхода (Kaniyarakkal *et al.*, 2016). Познато је да је та бактерија веома резистентна на већину антибиотика, па поменуто испитивање даје обећавајуће резултате, јер је неколико азина из ове групе показало значајну инхибиторну активност. Азин салицилалдехида показао је јако антиоксидативно дејство (Li *et al.*, 2011).



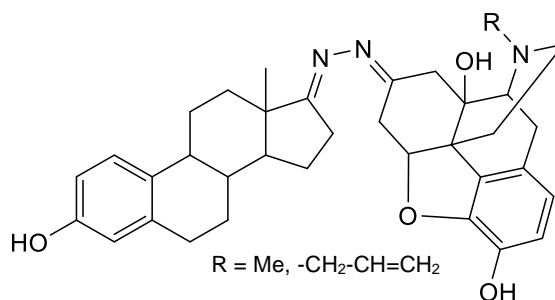
Антибактеријски агенси [43]



Антифунгални агенс [44]



Антипролиферативни генс [45]

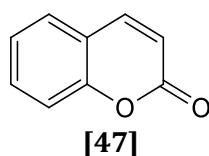


Опијатни антагонисти [46]

Слика 3. Биолошка активност различитих азина

2.2. Кумарини

Кумарини представљају велику класу једињења која се налазе у биљкама и састоје се од кондензованог бензеновог и α -пироновог прстена. Они представљају важну групу природних хетероцикличних једињења која садрже кисеоник. Кумарини носе име по првом, најједноставнијем једињењу из ове групе, кумарину, чије име потиче од назива за зрно тонке, јужноамеричког дрвета *Dipteryx odorata*, одакле је и изолован 1820. године (Borges *et al.*, 2005; Murray *et al.*, 1982). Кумарин је по хемијском саставу 2H-хромен-2-он [47] (слика 4), односно лактон о-хидроксициметне киселине. Ово једињење горког укуса, препознаје се по мирису покошене траве, па се од 1882. године кумарин почео користити у индустрији парфема (Aslam *et al.*, 2010). Претпоставља се да га биљке производе као одбрамбени метаболит (Borges *et al.*, 2009; Matos *et al.*, 2017).



Слика 4. Структура кумарина (2H-хромен-2-она)

Поред тога што су кумарини распрострањени као секундарни метаболити биљака и то у око 30 различитих фамилија, од којих су најважније Rutaceae, Umbelliferae, Oleaceae и Gutiferae, они се још јављају и код гљива и бактерија (Venugopala *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2016). Од гљива које имају способност да синтетишу кумарине најпознатији су родови *Agaricus*, *Aspergillus*, *Penicillium* и *Ganoderma* (Mogland и Saadabi, 2012; Rohini и Srikumar, 2014; Islam *et al.*, 2015), док од бактерија род *Streptomyces* (Steffensky *et al.*, 2000). Идентификовано је више од 1300 деривата кумарина изолованих из различитих извора (Hwang *et al.*, 2013; Venugopala *et al.*, 2013). Понекад изоловање и пречишћавање кумарина може бити веома тешко и скупо. Услови у животној средини и сезонске промене могу утицати на акумулацију и дистрибуцију кумарина у биљним органима (Jain и Joshi, 2012; Venugopala *et al.*, 2013). Иако су нађени у свим деловима биљака, кумарини се у већој количини јављају у плодовима (*Aegle marmelos* и *Tetrapleura tetraptera*), затим

корену (*Ferulago campestris*) и на крају лишћу (*Murraya paniculata*, *Phellodendron amurense*) (Evans, 2009; Rosselli *et al.*, 2009; Rahman *et al.*, 1997; Cohen, 1979).

Захваљујући примени у фармацеутској, козметичкој и агрохемијској индустрији, кумарини заузимају важно место у природној и синтетској органској хемији. Неке од њихових предности су мала молекулска маса, једноставна структура, висока растворљивост у већини органских растварача и ниска токсичност. Како кумарини показују значајну биолошку активност, то је условило употребу биљака које их садрже у традиционалној медицини (Aslam *et al.*, 2010). Биолошка активност природних кумарина зависи од врсте супституената и положаја супституције. Скоро сви природни кумарини имају неки кисеоников супституент у положају 7 кумаринског језгра (Matos *et al.*, 2015). Поред многобројних деривата кумарина изолованих из природних извора, значајан је и број оних који су добијени синтетски. Синтеза кумарина и његових деривата већ дужи низ година привлачи пажњу органских и медицинских хемичара, првенствено због разноликости у биолошким активностима коју ова једињења показују (Lake, 1999; Peng *et al.*, 2013). Како се супституција може извршити на било ком од шест расположивих места основног кумаринског језгра, добијени деривати кумарина осим по структури, разликују се и по фармаколошкој активности. Ова разноликост доводи до тога да деривати кумарина испољавају читав спектар биолошких својстава која доприносе смањењу ризика од различитих врста болести (Ćavar *et al.*, 2009).

2.2.1. Подела кумарина

У зависности од критеријума, природни кумарини се могу поделити на различите начине. Најједноставнија и најпростија подела је на једноставне и сложене кумарине. Међутим, како природни кумарини представљају велику класу једињења, према структури, можемо их поделити на: једноставне кумарине, фуранокумарине, пиранокумарине, фенилкумарине и бискумарине (слика 5) (Venugopala *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2016).



Слика 5. Подела кумарина на основу структуре

У групу једноставних кумарина спадају они деривати који у основи садрже молекул кумарина углавном супституисан хидрокси-, алкокси- и алкил-групама на једном или више положаја. Широко су распрострањени у биљном свету, посебно у фамилијама Rutaceae и Umbelliferae.

Фуранокумарини садрже фуранов прстен кондензован за бензенски део кумаринског молекула. На основу положаја фурановог прстена, фуранокумарини се могу поделити на линеарне и ангуларне.

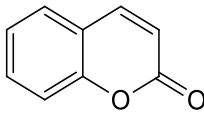
Пиранокумарини се могу сматрати аналозима фуранокумарина, с тим што уместо петочланог садрже шесточлани прстен, односно 2,2-диметилпирански прстен. На основу положаја пиранског прстена, као и код фуранокумарина, могу се поделити на линеарне и ангуларне.

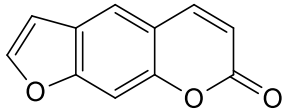
Сви природни фенилкумарини садрже фенил групу на положају 3 или 4 кумаринског молекула (Olmedo *et al.*, 2012).

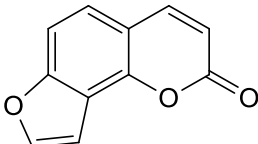
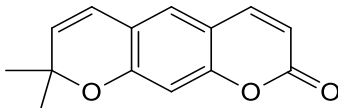
Бискумарини се састоје из две кумаринске јединице које су међусобно повезане на више различитих начина.

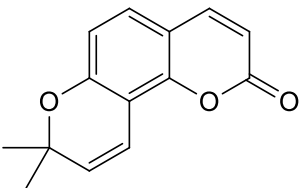
У табели 1 налазе се опште структуре сваке групе кумарина, одабрани природни представници из сваке групе, њихове фармаколошке активности и биљне врсте из којих су изоловани.

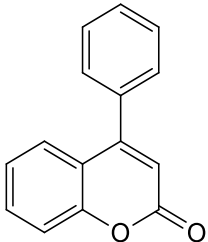
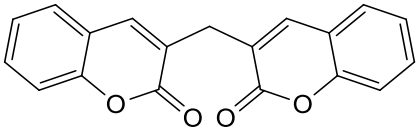
Табела 1. Тип кумарина и њихове опште структуре, одабрани природни представници из сваке групе кумарина, њихове фармаколошке активности и биљне врсте из којих су изоловани

Тип кумарина	Основна структура	Одабрани представници	Фармаколошка активност	Биљна врста из које су изоловани
Једноставни кумарини		Ескулетин	Антиоксидативна Антитуморска Антиинфламаторна Неуропротективна	<i>Euphorbia lathyris</i> (Masamoto <i>et al.</i> , 2003) <i>Alchemilla speciosa</i> (Schimmer и Eschelbach, 1997)
		Аморезинол	Антибактеријска	<i>Dorema ammoniacum</i> (Adhami <i>et al.</i> , 2013)
		Остол	Антиинфламаторна Антиконвулзивна Антитуморска Антифунгална	<i>Cnidium monnieri</i> (Chou <i>et al.</i> , 2007) <i>Peucedanum ostruthium</i> (Vogl <i>et al.</i> , 2011)
		Фраксин	Антиоксидативна Антипролиферативна	<i>Aesculus hippocastanum</i> (Stanić <i>et al.</i> , 1999) <i>Cortex fraxinus</i> (Liu <i>et al.</i> , 2005)
		Умбелиферон	Антиоксидативна Антиинфламаторна Антимикробна	<i>Peucedanum praeruptorum</i> (Kong <i>et al.</i> , 1996) <i>Fatoua pilosa</i> (Chiang <i>et al.</i> , 2010) <i>Justicia pectoralis</i> (Chanfrau и Ferrada, 2014)
		Фраксидин	Антиадипогена Антихипергликемска	<i>Artemisia scotina</i> (Yusupov и Sidyakin, 1975) <i>Fraxinus pennsylvanica</i> (Eyles <i>et al.</i> , 2007)

		Фелоденол А, В и С	Антитуберкулозна	<i>Phellodendron amurense</i> (Wu et al., 2003)
		Ескулин	Антиоксидативна Антиинфламаторна Аналгетска	<i>Fraxinus rhynchophylla</i> (Shin et al., 2010; Wang et al., 2010)
		Аураптен	Антиоксидативна Антихипертензивна Антипротозална Неуропротективна Имуномодулаторна	<i>Citrus hassaku</i> (Takahashi et al., 2002) <i>Ferula szowitsiana</i> (Soltani et al., 2010) <i>Aegle marmelos</i> (Mustahil et al., 2013)
		Фраксетин	Антиоксидативна Антибактеријска Антипролиферативна Неуропротективна	<i>Fraxinus rhynchophylla</i> (Thuong et al., 2009) <i>Fraxinus bungeana</i> (Sarfraz et al., 2017)
Фуранокумарини	 Линеарни тип	Псорален	Антибактеријска Антифунгална Антиинфламаторна Антипролиферативна	<i>Foeniculum vulgare</i> (Nassar et al., 2010) <i>Psoralea corylifolia</i> (Parast et al., 2011)
		Императорин	Антиоксидативна Антибактеријска Антифунгална Антиконвулзивна Антиинфламаторна Антипролиферативна	<i>Ostericum koreanum</i> (Lee et al., 2008) <i>Cnidium monnieri</i> (Wang et al., 2008) <i>Angelica dahurica</i> (Cao et al., 2014)
		Бергаптен	Антиоксидативна Антиконвулзивна Антиинфламаторна	<i>Angelica pubescens</i> (Chen et al., 1995b) <i>Ammi majus</i> (Hermann et al., 2004)

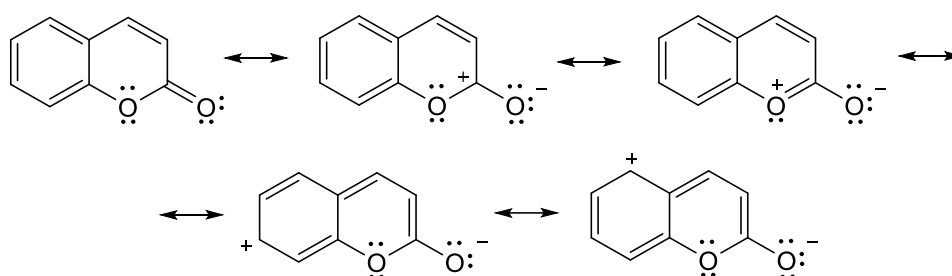
			Антипролиферативна Аналгетска	<i>Ficus carica</i> (Chunyan et al., 2009)
		Метоксален	Антибактеријска Антиконвулзивна	<i>Ammi majus</i> (Aldulaimi, 2017) <i>Pastinaca sativa</i> (Kviesis et al., 2019)
		Нотоптерол	Антиинфламаторна Аналгетска	<i>Notopterygium incisum</i> (Qian et al., 2007)
	 Ангуларни тип	Ангелицин	Антифунгална Антиинфламаторна Антиканцерогена Антивирална	<i>Psoralea canescens</i> (Innocenti et al., 1997) <i>Ficus carica</i> (Marrelli et al., 2012) <i>Angelica shikokiana</i> (Mira и Shimizu, 2015)
		Колумбианадин	Антиоксидативна Антиинфламаторна Аналгетска	<i>Peucedanum palustre</i> (Törnquist и Vuorela, 1990) <i>Angelica decursiva</i> (Lim et al., 2014)
		Пимпинелин	Антиоксидативна	<i>Heracleum persicum</i> (Souri et al., 2004) <i>Peucedanum palustre</i> (Eeva et al., 2004)
Пиранокумарини	 Линеарни тип	Ксантоксилетин	Антибактеријска Антипролиферативна	<i>Zanthoxylum americanum</i> (Ju et al., 2000) <i>Erythrina variegata</i> (Rasul et al., 2011)
		Агасилин	Антибактеријска	<i>Ferulago campestris</i> (Rosselli et al., 2009)

 <p>Ангуларни тип</p>	Грандивитин	Антибактеријска	<i>Ferulago campestris</i> (Basile et al., 2009) <i>Ferulago macrocarpa</i> (Ahmadi et al., 2016)
	Агелинол-бензоат	Антибактеријска	<i>Ferulago campestris</i> (Rosselli et al., 2009)
	Ксантилетин	Антифунгална Антиинфламаторна	<i>Piper carniconnectivum</i> (Facundo et al., 2004) <i>Citrus sinensis</i> (Cazal et al., 2009) <i>Zanthoxylum ailanthoides</i> (Chung et al., 2013)
	Инофилум А, В, С, Е, Р, G ₁ и G ₂	Антивирална	<i>Calophyllum inophyllum</i> (Patil et al., 1993)
	Каланолид А	Антивирална	<i>Calophyllum lanigerum</i> (Kashman et al., 1992)
	Каланолид В	Антивирална	<i>Calophyllum lanigerum</i> (Kashman et al., 1992) <i>Calophyllum teysmannii</i> var. <i>inophylloide</i> (Lin et al., 1999)
	Сеселин	Антиноцицептивна Антипролиферативна Цитотоксична Спазмолитичка	<i>Sigmatanthus trifolius</i> (Lima et al., 2006) <i>Seseli diffusum</i> (Abbaskhan et al., 2012) <i>Clausena anisata</i> (Mukandiwa et al., 2013)
	Алоксантоксилетин	Антибактеријска Антипролиферативна	<i>Zanthoxylum americanum</i> (Ju et al., 2000)

Фенилкумарини		Изодиспар В	Антифунгална Антивирална Антипролиферативна	<i>Marila pluricostata</i> (Bedoya et al., 2005) <i>Pedilanthus tithymaloides</i> (Sandjo et al., 2012) <i>Calophyllum sclerophyllum</i> (Lim et al., 2016)
		Диспардиол В	Цитотоксична	<i>Calophyllum dispar</i> (Guilet et al., 2001)
		Мамеа А/АА	Антиоксидативна Антибактеријска Цитотоксична	<i>Mesua ferrea</i> (Verotta et al., 2004) <i>Mammea africana</i> (Canning et al., 2013)
		Мамеа А/ВВ	Антиоксидативна	<i>Calophyllum verticillatum</i> (Ravelonjato et al., 1992) <i>Calophyllum brasiliense</i> (Brenzan et al., 2012)
		Ексистемин	Цитотоксична	<i>Chiococca alba</i> (El-Hafiz et al., 1991) <i>Exostema acuminatum</i> (Ito et al., 2000)
		Мезуол	Антиоксидативна Антиинфламаторна Имуномодулаторна	<i>Mesua ferrea</i> (Chahar et al., 2012)
Бискумарини		Дикумарол	Антикоагулантна	<i>Melilotus officinalis</i> (Hroboňová et al., 2018)
		Герберинол	Антимикробна	<i>Diospyros crassiflora</i> (Tangmouo et al., 2006) <i>Gerbera lanuginosa</i> (Brahmachari et al., 2017)

2.2.2. Особине кумарина

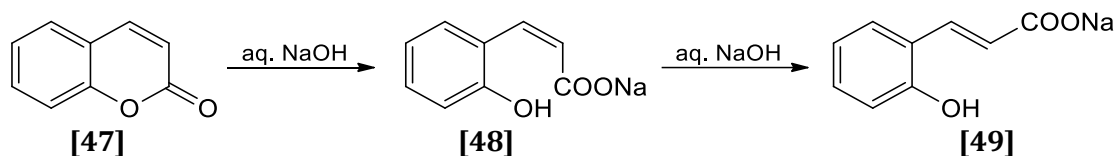
Кумарин и деривати поседују хемијске особине које потичу од присуства лактонске структуре, ароматичног прстена и 3,4-двоструке везе α -пирона. Постојање ароматичног карактера код кумарина доводи до тога да они ступају у реакције електрофилне супституције. Нитровање и сулфоновање се одвија на бензенском делу молекула кумарина и то на угљениковим атомима у положајима 6 и 8, што се може очекивати на основу резонанционих структура кумарина (шема 13). Неки други електрофилни агенси везују се за α -пиронски прстен и то за угљеников атом у положају 3, при чему настају 3,6-дисупституисани деривати. Ово се може објаснити електронакцепторским карактером карбонилне групе која доводи до смањења електронске густине на угљениковом атому у положају 4, чинећи угљеников атом у положају 3 нуклеофилнијим центром (Sukdolak *et al.*, 2007). Протоновањем кисеоника карбонилне групе долази до настајања бензопирилијумове соли (Joule и Millis, 2010).



Шема 13. Неке резонанционе структуре кумарина

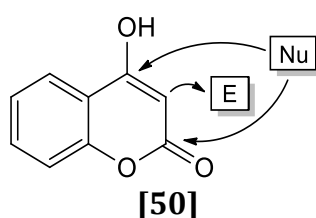
Поред реакција електрофилне супституције, кумарин учествује и у нуклеофилним супституцијама. Имајући у виду да поседује лактонски прстен кумарини су слични са естрима. Један пример овакве реактивности јесте базна хидролиза, током које долази до отварања прстена на лактонском делу и настајања соли *cis*-циметне киселине (кумаринске киселине), тј. натријум-кумарата [48] (шема 14). Ова со се не може изоловати јер закишељавање води до поновне лактонизације. Даљи третман базама доводи до изомеризације и стварања стабилније соли *trans*-циметне киселине, односно натријум-кумарата [49] (Joule и Millis, 2010). Меки нуклеофили везују се у положај 4

кумаринског језгра, док реакцијом кумарина са Грињаровим реагенсима долази до стварања смеше производа настале отварањем прстена и везивањем за угљеников атом карбонилне групе.



Шема 14. Базно катализована хидролиза кумарина

Кумарини који садрже хидроксилну групу смештену на бензеновом и/или пиронском прстену називају се хидроксикумарини. Једињења на бази 4-хидроксикумарина имају велики значај због својих биолошких и фармаколошких активности и представљају важне прекурсоре на пољу органске синтезе. Присуство хидроксилне групе, односно енолизованог β -кетоестарског система, знатно утиче на стабилизацију кумаринског молекула што доводи до повећања ароматичности. Ово условљава да се 4-хидроксикумарин [50] разликује по хемијским особинама од самог кумарина и да поседује и електрофилна и нуклеофилна својства. Најзначајнија реактивност 4-хидроксикумарина потиче од нуклеофилног атома угљеника у положају 3, па се тако купловањем, халогеновањем и Маниховом реакцијом добијају многобројни 3-супституисани деривати 4-хидроксикумарина. Кисеоник хидроксилне групе 4-хидроксикумарина остаје главно место напада ацетирајућих и алкилирајућих агенаса. Код реакција нуклеофилне супституције тврди нуклеофили нападају положај 2, док меки нуклеофили првенствено нападају угљеников атом у положају 4 (слика 6) (Abdou *et al.*, 2019).



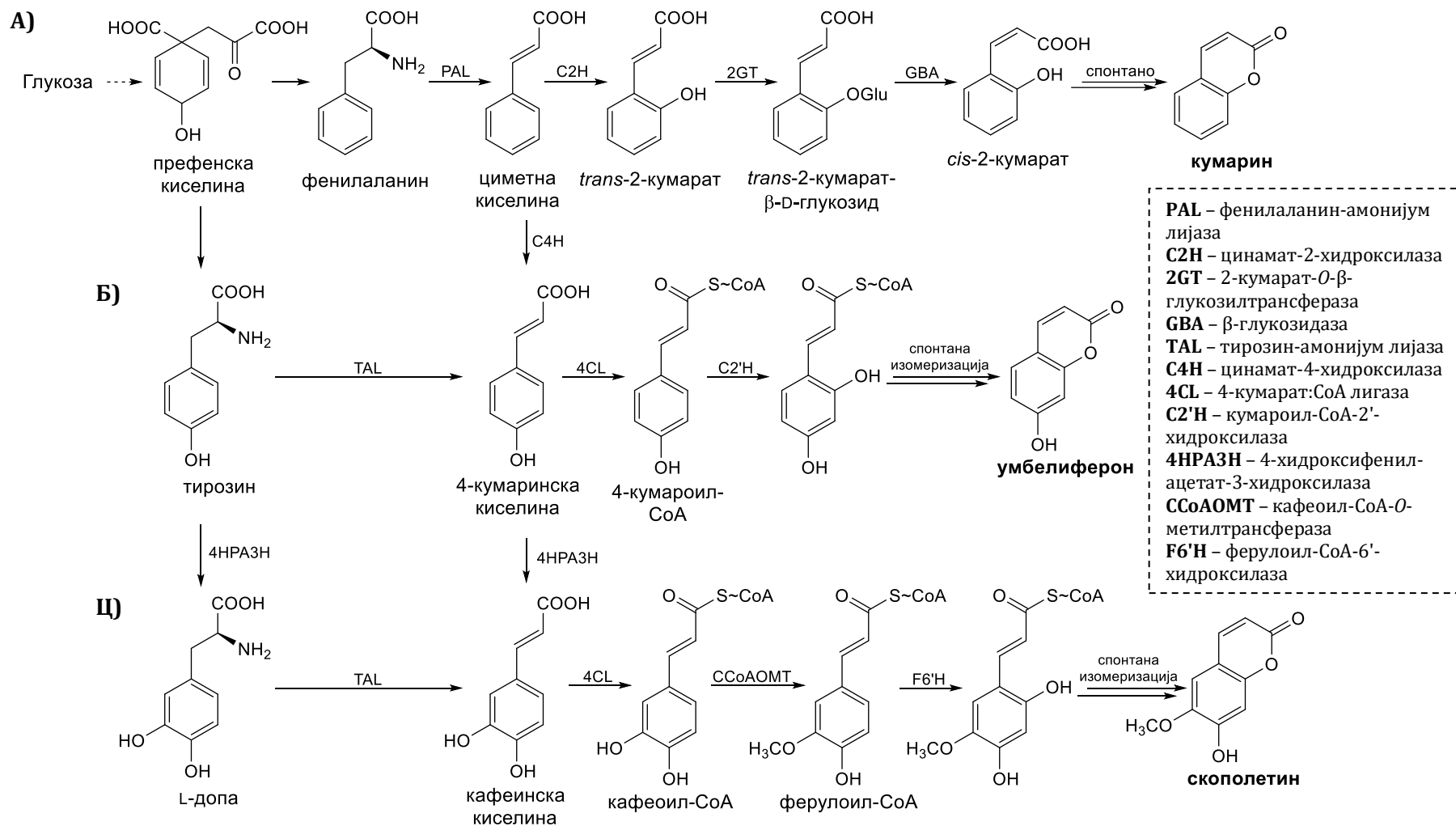
Слика 6. Реактивна места код 4-хидроксикумарина (Nu-нуклеофил, E-електрофил)

2.2.3. Биосинтеза кумарина

У шеми 15 приказана је биосинтеза кумарина, умбелиферона и скополетина. Кумарин настаје полазећи од L-фенилаланина, при чему фенилаланин амонијум-лијаза (PAL) уклања (*pro-3S*)-водоник и амонијум јон из L-фенилаланина и настаје *trans*-циметна киселина (Koukol и Conn, 1961; Vannelli *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2016). У следећем кораку цитохром P₄₅₀ цинамат 2-хидроксилаза (C2H) катализује хидроксилацију у положају 2 *trans*-цинамата и формира *trans*-2-кумарат (Gestetner и Conn, 1974; Lin *et al.*, 2013). Идући даље, 2-кумарат-O-β-глюкозилтрансфераза (2GT) преноси глюкозил-групу из UDP-глюкозе до *trans*-2-кумарата дајући *trans*-2-кумарат-β-D-глюкозид. Настали молекул затим подлеже *cis/trans*-изомеризацији при чему настаје *cis*-2-кумарат-β-D-глюкозид, који потом помоћу β-глюкозидазе (GBA) прелази у *cis*-2-кумарат. Последњи корак јесте спонтана лактонизација *cis*-2-кумарата, који прелази у кумарин (шема 15A) (Kleinhofs *et al.*, 1967; Oba *et al.*, 1981).

Биолошко добијање *p*-хидроксициметне киселине (познате као 4-кумаринска киселина) почиње дезаминацијом ароматичних аминокиселина L-фенилаланина или L-тирозина. Полазећи од L-фенилаланина, ензим цитохром P₄₅₀ цинамат 4-хидроксилаза (C4H) врши хидроксилацију циметне киселине у *para* положају при чему настаје 4-кумаринска киселина. Уколико се L-тирозин употреби као супстрат, 4-кумаринска киселина настаје у једном кораку уз помоћ ензима тирозин амонијум-лијазе (TAL), (Vannelli *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2015).

Биосинтеза умбелиферона (шема 15Б) и скополетина (шема 15Ц) може се одвијати и помоћу ензима TAL, ако се као супстрат употреби L-тирозин. Поред поменутог ензима у синтези умбелиферона учествује 4-кумарат-CoA лигаза (4CL) и кумароил-CoA-2'-хидроксилаза (C2'H). Биосинтеза скополетина започиње хидроксилацијом 4-кумаринске киселине помоћу ензима 4-хидроксифенилацетат 3-хидроксилазе (4HРА3H), при чему настаје кафеинска киселина. Хидроксилацијом L-тирозина са 4HРА3H настаје L-допа, који се помоћу TAL-а конвертује у кафеинску киселину.



Шема 15. А) Биосинтетски пут кумарина у биљкама, Б) Биосинтетски пут умбелиферона, Ц) Биосинтетски пут скополетина

Да би се процес синтезе скополетина завршио до краја неопходни су ензими 4CL, кафеоил-СоА-О-метилтрансфераза (ССоАОМТ) и ферулоил-СоА 6'-хидроксилаза (F6'H) (Lin *et al.*, 2013).

2.2.4. Синтеза деривата кумарина

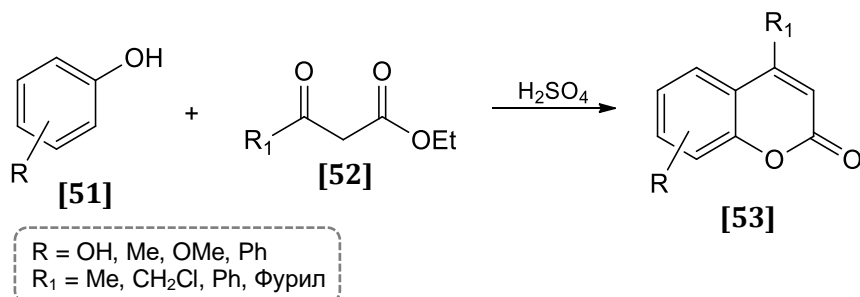
Многи деривати кумарина изоловани из различитих биљних врста показали су значајну биолошку активност. Како је изоловање оваквих биоактивних састојака из биљка често захтевно, дуготрајно и изискује превише корака до коначног производа (Sasidharan *et al.*, 2011), постоји све већа потреба за њиховом синтезом. Историја синтезе кумарина почиње средином 19. века, када су за добијање кумарина коришћене многобројне методе које укључују различите полазне материјале и реакционе услове. Данас можемо рећи да постоје конвенционалне методе за синтезу кумарина попут Перкинове, Невенагелове, Пекманове, Витигове, Клајзенове, Сузукијеве, Бејлис-Хилманове и Вилсмајер-Хекове реакције (Vekariya и Patel, 2014; He *et al.*, 2014). И поред тога, свакодневно се улажу напори у проналажење нових путева за синтезу, како би се деривати кумарина добили на бржи и ефикаснији начин.

2.2.4.1. Синтеза из фенола

2.2.4.1.1. Пекманова реакција

Једна од најчешћих метода за синтезу кумарина је Пекманова синтеза која се заснива на реакцији кондензације деривата фенола [51] са β -кетоестрима [52] у присуству киселине као катализатора (шема 16) (Borges *et al.*, 2005; Rezaei *et al.*, 2014; Pornsatitworakul *et al.*, 2017). Најчешће се као катализатор користи сумпорна киселина, а у зависности од супституената на фенолу и β -кетоестру добијају се и различито супституисани деривати кумарина. Механизам Пекманове реакције састоји се у трансестерификацији и итрамолекуларској адицији на кето-групу при чему долази до формирања кумаринског скелета, а након кисело катализоване елиминације молекула воде као крајњи производ настаје одговарајући дериват кумарина [53]. У циљу побољшања синтезе и добијања бољих приноса, многе реакције врше се

помоћу микроталаса, без присуства растварача. У овим реакцијама користе се различити катализатори, попут меглумин-сулфата и зеолита (Moradi *et al.*, 2016; Bouasla *et al.*, 2017).

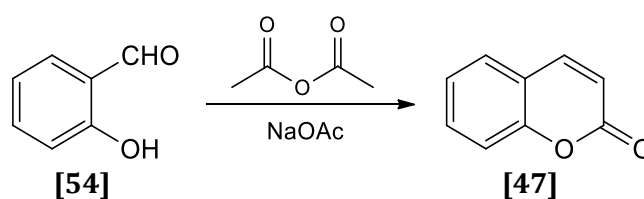


Шема 16. Синтеза деривата кумарина Пекмановом реакцијом

2.2.4.2. Синтеза из алдехида и кетона

2.2.4.2.1. Перкинова реакција

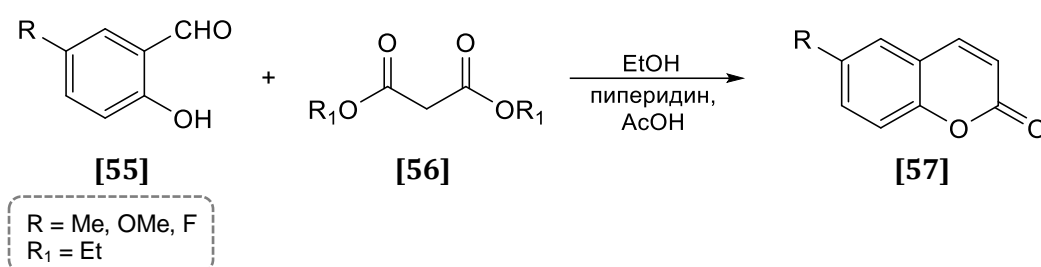
Перкинова синтеза представља реакцију алдолне кондензације ароматичног алдехида и анхидрида киселина уз присуство алкалних соли органских киселина као базних катализатора. Ова реакција подразумева енолизацију анхидрида киселине и кондензацију алдехида при чему као интермедијер настаје хидроксициметна киселина, која у присуству базних соли затвара прстен и спонтано прелази у лактон. На овај начин добијен је велики број различитих деривата кумарина (Trkovnik и Ivezić, 2000; Wang, 2010). Прва Перкинова синтеза кумарина [47] изведена је реакцијом салицилалдехида [54] и анхидрида сирћетне киселине у присуству натријум-ацетата као катализатора (шема 17). Поменути класична синтеза кумарина је данас побољшана употребом различитих киселина попут фенилацетатне и цијаноацетатне уз коришћење триетиламина и анхидрида пропилфосфонске киселине, при чему су добијени различити деривати 3-арилкумарина и 3-цијанокумарина (Augustine *et al.*, 2012; Pu *et al.*, 2014).



Шема 17. Синтеза кумарина Перкиновом реакцијом

2.2.4.2.2. Невенагелова реакција

Невенагелова синтеза се темељи на реакцији алдехида или кетона са активираним метиленским једињењима попут ацетоацетата, малоната или цијаноацетата у присуству базе, пиридина или пиперидина, као катализатора у неком органском растварачу (Phadtare и Shankarling, 2012). Механизам реакције се одвија преко нуклеофилне адиције енолата или енамина естра на карбонилну групу алдехида или кетона у присуству базе при чему долази до стварања алдола. Елиминацијом воде долази до затварања прстена и настанка кумаринског молекула. Типичан пример Невенагелове реакције је кондензација деривата салицилалдехида [55] и диетил-малоната [56] у етанолу уз употребу пиперидина и сирћене киселине као катализатора, при чему су добијени 3-супституисани деривати кумарина [57] у добром приносу (шема 18) (Suljić и Pietruszka, 2014).



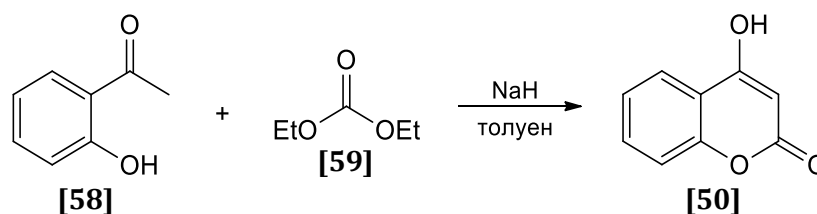
Шема 18. Синтеза деривата кумарина Невенагеловом реакцијом

Како би се Невенагелова синтеза унапредила, значајна пажња протеклих година посвећена је употреби јонских течности као растварача, због њихових погодних физичких и хемијских својстава као што су неиспарљивост, незапаљивост и термичка стабилност (Poole, 2004). Њихова употреба уместо испарљивих органских растварача чини органску синтезу нешкодљивом по животну средину (Wasserscheid и Welton, 2007). Употребом јонских супстанци попут 1-етил-3-метилимидазолијум-тетрафлуорбората и 1-бутил-3-метилимидазолијум-хидроксида у сврху катализатора или растварача током Невенагелове синтезе, синтетисан је велики број различитих 3-супституисаних деривата кумарина (Бао *et al.*, 2003; Рапу и Јана, 2006). Поред наведеног, познате су и реакције добијања кумаринских деривата из салицилалдехида катализоване јонима метала, најчешће бакра и

гвожђа (Reddy *et al.*, 2013; He *et al.*, 2015). Приликом Невенагелове синтезе поред базних катализатора могу се употребити и Луисове киселине као катализатори.

2.2.4.2.3. Клајзенова кондензација

Клајзенова кондензација има значајну улогу у синтези различитих β -дикарбонилних једињења и припада типу алдолних реакција. Она се заснива на реакцији између два иста или различита карбоксилна естра или између естара и кетона, при чему настају одговарајући β -кетоестри, β -дикетони или β -кетоеалдеhide (Jukić *et al.*, 2012). Различити кетони и естри реагују интер- и интрамолекулски, при чему под базним условима могу настати циклични β -кетоестри (Ragavan *et al.*, 2015). Реакција Клајзенове кондензације почиње формирањем енолата естра, а адиционо-елиминационом реакцијом ове реакционе врсте са карбонилном групом другог молекула естра добија се β -кетоестар. Један од најпознатијих хидрокси-деривата кумарина, 4-хидроксикумарин [50], добијен је Клајзеновом кондензацијом 2-хидроксиацетофенона [58] и диетил-карбоната [59] у присуству натријум-хидрида у толуену (шема 19) (Sahoo *et al.*, 2015).

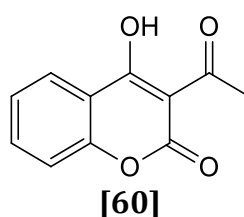


Шема 19. Синтеза кумарина Клајзеновом реакцијом

2.2.5. 3-Ацетил-4-хидроксикумарин – синтеза, реактивност и примена

3-Ацетил-4-хидроксикумарин [60] (слика 7) представља основну структуру неких природних производа и често је централна фармакофора у једињењима са израженим антиоксидативним, антимикуробним и антифунгалним дејством (Mladenović *et al.*, 2009; Al-Ayed, 2011). То га чини веома интересантним за истраживања у органској и медицинској хемији. На основу структуре 3-ацетил-4-хидроксикумарина може се закључити да хемијске особине потичу

од електрофилних и нуклеофилних својстава самог молекула, тачније од ацетил-групе на положају 3. Ова својства чине положај 3 у кумаринском прстену веома погодним за многе реакције, а сам молекул добрим прекурсором за добијање кондензованих структура кроз процес циклизације. Развијено је и више метода за синтезу 3-ацетил-4-хидроксикумарина које укључују ацетиловање, бромовање, метиловање и Клајзен-Шмитову кондензацију (Abdou, 2017).

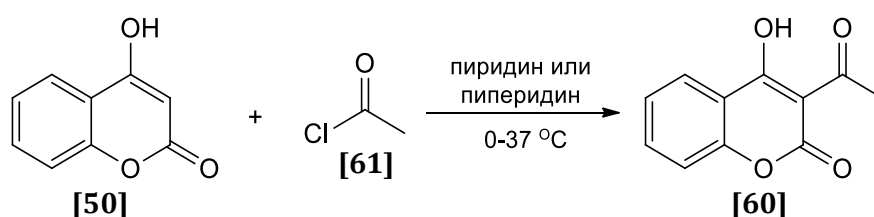


Слика 7. Молекул 3-ацетил-4-хидроксикумарина

2.2.5.1. Синтеза 3-ацетил-4-хидроксикумарина

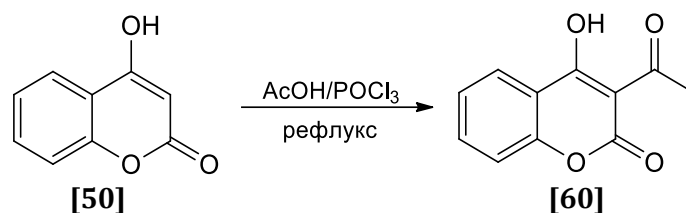
Постоји неколико приступа у добијању 3-ацетил-4-хидроксикумарина који се углавном заснивају на коришћењу 4-хидроксикумарина или фенола као полазног материјала.

Директним ацетиловањем 4-хидроксикумарина **[50]** са ацетил-хлоридом **[61]** користећи пиридин или пиперидин као катализатор настаје 3-ацетил-4-хидроксикумарин **[60]** (шема 20) (Stadlbauer и Hojas, 2004).



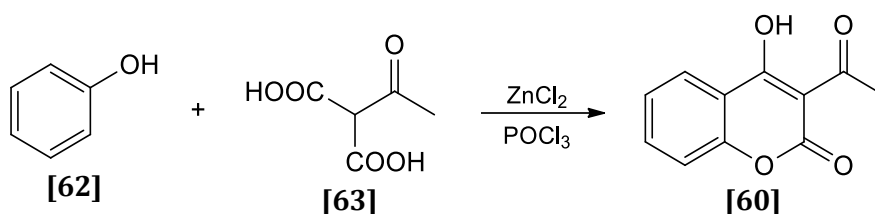
Шема 20. Синтеза 3-ацетил-4-хидроксикумарина реакцијом ацетиловања 4-хидроксикумарина са ацетил-хлоридом

Ацетиловање 4-хидроксикумарина **[50]** се може вршити и помоћу сирћетне киселине или њеног анхидрида уз употребу фосфор-оксихлорида, при чему се реакциона смеша загрева уз настајање 3-ацетил-4-хидроксикумарина **[60]** (шема 21) (Mulwad и Hegde, 2009; Li *et al.*, 2012).



Шема 21. Реакција ацетиловања 4-хидроксикумарина са сирћетном киселином у присуству фосфор-оксихлорида

Третирањем фенола [62] са еквимоларном количином 2-ацетил малонске киселине [63] у присуству двоструке или троструке количине анхидрованог цинк-хлорида и фосфор-оксихлорида добија се 3-ацетил-4-хидроксикумарин [60] (шема 22) (Shah *et al.*, 1960).

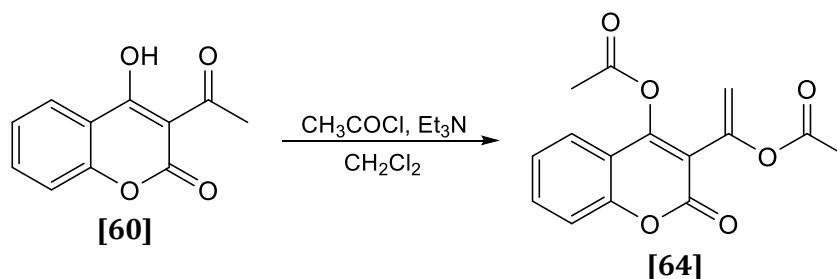


Шема 22. Синтеза 3-ацетил-4-хидроксикумарина реакцијом фенола и 2-ацетилмалонске киселине

2.2.5.2. Реакције 3-ацетил-4-хидроксикумарина

2.2.5.2.1. Реакција ацетиловања

Ацетиловањем 3-ацетил-4-хидроксикумарина [60] са ацетил-хлоридом у базним условима на собној температури настаје ацетиловани дериват 3-ацетил-4-хидроксикумарина [64] (шема 23) (Kuo *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2006).

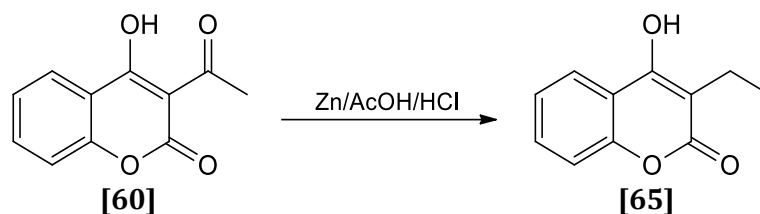


Шема 23. Производ ацетиловања 3-ацетил-4-хидроксикумарина

2.2.5.2.2. Реакција редукције

Веома ефикасна метода редукције 3-ацетил-4-хидроксикумарина [60]

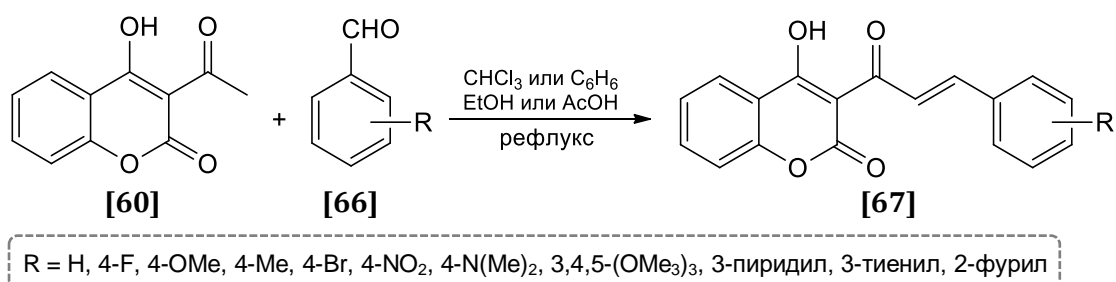
до 3-етил-4-хидроксикумарина [65] постигнута је коришћењем цинка у праху, који се у малим порцијама додаје раствору сирћетне и хлороводоничне киселине, као редукционог средства (шема 24) (Карпе *et al.*, 1995).



Шема 24. Редукција 3-ацетил-4-хидроксикумарина

2.2.5.2.3. Реакција кондензовања са алдехидима

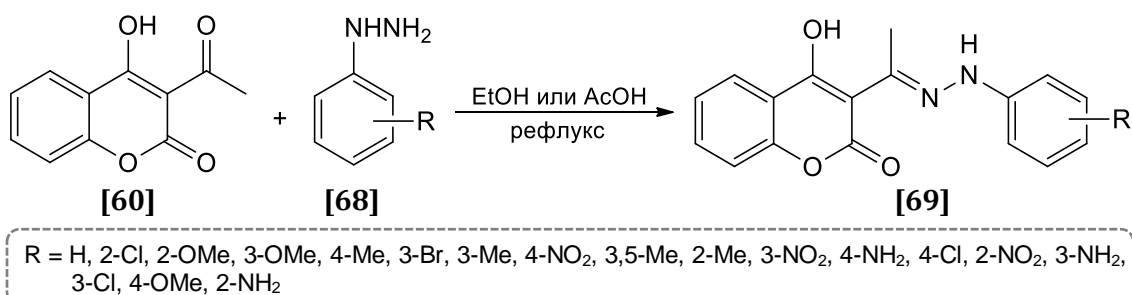
Серија кумаринских халкона [67] синтетисана је реакцијом алдолне кондензације 3-ацетил-4-хидроксикумарина [60] са различитим арил- и хетероарил алдехидима [66] у присуству пиперидина у хлороформу (Patel *et al.*, 2011; Naceur *et al.*, 2011), бензену (Lin *et al.*, 2005), етанолу (Abdelhafez *et al.*, 2010; Vazquez-Rodriguez *et al.*, 2013) или сирћетној киселини (Li *et al.*, 2012) (шема 25), чиме су развијене једноставне методе за синтезу кумаринских халкона, са веома добрим приносима. Антиоксидативна активност појединих једињења из ове групе халкона, у виду хватања DPPH радикала, показала је њихов потенцијал да допринесу повећању укупног антиоксидативног капацитета организма.



Шема 25. Кондензовање 3-ацетил-4-хидроксикумарина са алдехидима

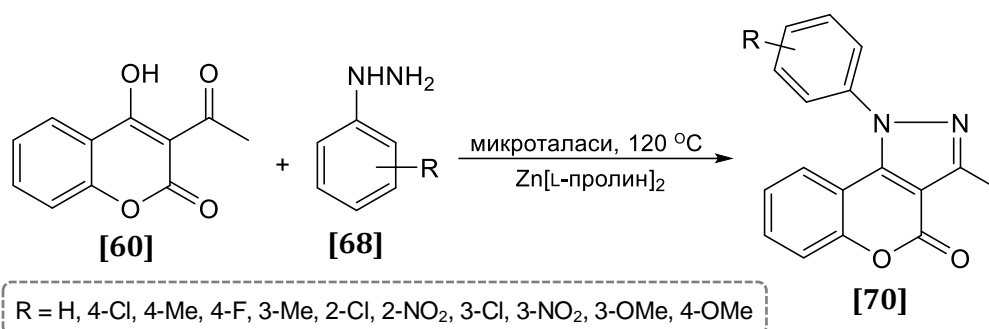
2.2.5.2.4. Реакција са хидразинима

Реакцијом кондензације арилхидразина [68] са 3-ацетил-4-хидроксикумарином [60] у сирћетној киселини (Stadlbauer и Hojas, 2004) или етанолу (Catarzi *et al.*, 1995; Colotta *et al.*, 1988) добијени су одговарајући хидразони [69] (шема 26).



Шема 26. Реакција настајања хидразона

Реакцијом 3-ацетил-4-хидроксикумарина **[60]** са различитим фенилхидразинима **[68]** под утицајем микроталаса уз употребу $\text{Zn}[\text{L-пролин}]_2$ као веома ефикасног катализатора, добијени су кондензовани хетероциклични деривати кумарина **[70]** (шема 27) (Manvar *et al.*, 2007).



Шема 27. Настајање кондензованих хетероцикличних деривата кумарина

2.2.5.3. Примена 3-ацетил-4-хидроксикумарина

3-Ацетил-4-хидроксикумарин је важан као производ и међупроизвод у органској, аналитичкој и фармацеутској хемији. Он је користан за екстракцију и одвајање уранијума од торијума, а одређивање ових елемената, чак у присуству десет пута веће количине церијума и лантана, може се лако постићи употребом 3-ацетил-4-хидроксикумарина као средства за комплексирање (Bhat и Jain, 1960). Доказано је да 3-ацетил-4-хидроксикумарин инхибира раст појединих сојева бактерија (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Bacillus subtilis* и *Klebsiella pneumoniae*) и квасца *Candida albicans* (Mladenović *et al.*, 2009). Установљено је и јако антиоксидативно дејство 3-ацетил-4-хидроксикумарина у неутрализацији DPPH радикала у односу на тролокс, са изузетно малом вредношћу инхибиторне концентрације, која је у овом случају мања од тролокса (Al-Ayed, 2011). У органској синтези 3-ацетил-

4-хидроксикумарин представља погодан синтон за многобројне реакције (Sukdolak *et al.*, 2004).

2.2.6. Биолошка активност деривата кумарина

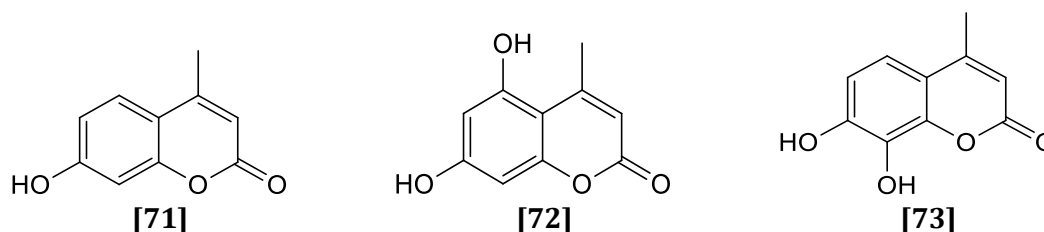
Присуство кумаринских деривата као секундарних матаболита у различитим биљкама је веома често и захваљујући томе многе биљне врсте се употребљавају у традиционалној медицини. Једноставна структура, велика биорасположивост, ниска токсичност и вишеструка биолошка активност деривата кумарина, условили су њихову важну улогу у истраживању и развоју лекова (Hoult и Payá, 1996; Zhu и Jiang, 2018). Деривати кумарина показују многобројне фармаколошке активности које укључују антикоагулантно, антимикробно, аналгетско, антиоксидативно, антипролиферативно, антиинфламаторно, антидијабетско, антиконвулзивно и неуропротективно дејство (Srikrishna *et al.*, 2018; Annunziata *et al.*, 2020). Њихов значај се све више потенцира у прехранбеној индустрији где се користе њихове фунгицидне и антиоксидативне активности (Mark *et al.*, 2019). Поред тога што имају изражене и многобројне биолошке активности, кумарини поседују и флуоресцентна својства (Pereira *et al.*, 2018).

2.2.6.1. Антиоксидативна активност

У здравом људском организму нормални метаболички процеси доводе до настајања слободних радикала и других високо реактивних врста као што су јони, молекули са неспареним електронима, реактивне кисеоничне (ROS), угљеничне (RCS), азотне (RNS) и сумпорне (RSS) врсте. Када се ове врсте прекомерно производе, оксидативни процеси могу проузроковати оштећење ћелија, утичући на ћелијске структуре и узрокујући јонску неравнотежу или митохондријску дисфункцију (Traykova и Kostova, 2005). Ово се дешава делимично због њихове велике реактивности, нарочито према DNK и липидима, односно због ланчаних реакција које могу иницирати. Последице оксидативног стреса код живих организама су добро познате. Оксидативни стрес изазива различите упалне процесе, кардиоваскуларна обољења, канцер, дијабетес, па чак и неуродегенеративне поремећаје (Birben *et al.*, 2012; Pizzino

et al., 2017). Стога би егзогени антиоксиданси могли бити корисни у смањењу количине слободних радикала и избегавању оксидативног стреса (*Galano et al.*, 2016).

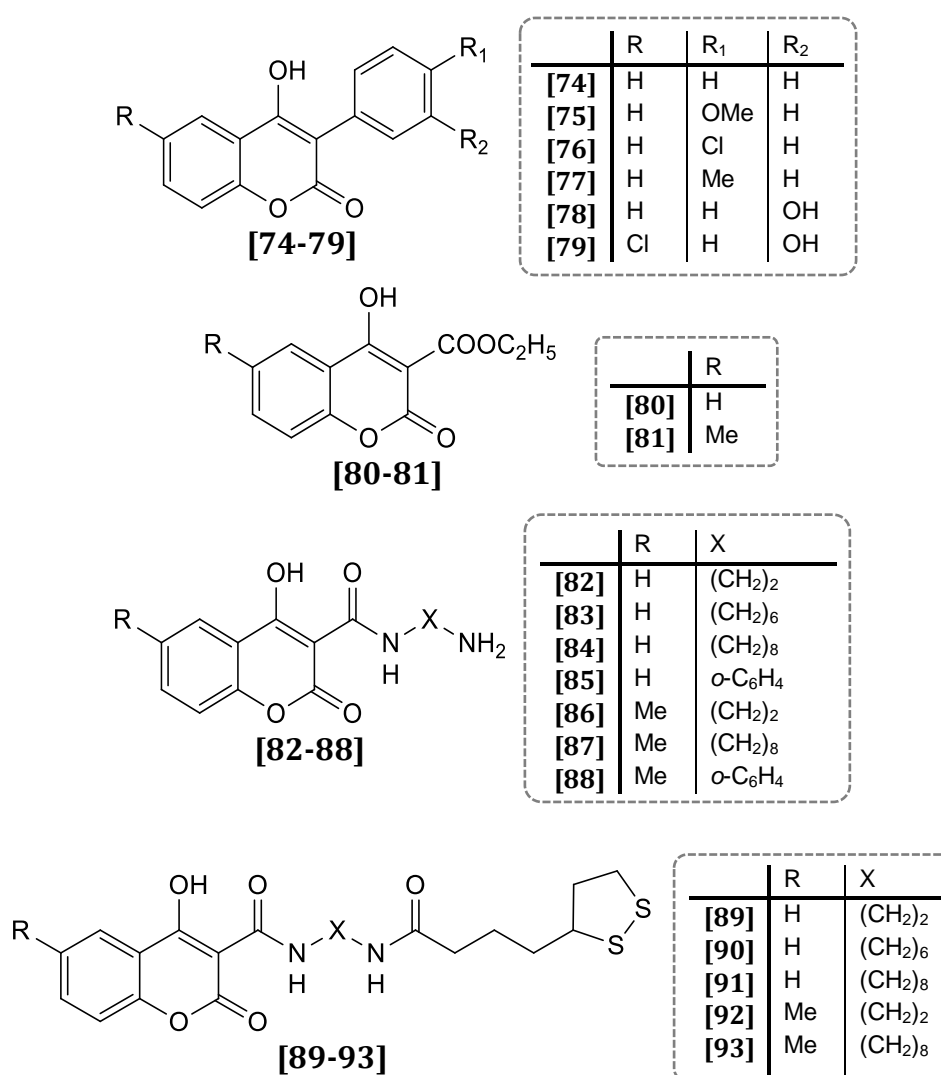
Антиоксидативни потенцијал природних и синтетских деривата кумарина последњих година привлачи велику пажњу истраживача. Уочено је да су полихидрокси деривати веома ефикасни антиоксиданси у биолошким системима. Експериментално испитивање способности неколико хидрокси-деривата кумарина, 7-хидрокси-4-метилкумарина [71], 5,6-дихидрокси-4-метилкумарина [72] и 7,8-дихидрокси-4-метилкумарина [73] (слика 8) ка неутрализацији АВТС, DPPH и галвиноксил радикала дало је одличне резултате (*Couttolenc et al.*, 2020). Једињење [72] показало је већу антиоксидативну активност од тролокса у случају АВТС радикала, са вредношћу ефективне концентрације $EC_{50}=30,83 \mu M$, док је једињење [73] дало још боље резултате у неутрализацији АВТС, DPPH и галвиноксил радикала (EC_{50} вредности од 39,98, 150,99 и 13,19 μM). Затим је једињење [73] додатно тестирано и разматрана су три реакциона механизма: пренос једног електрона, пренос водоника и стварање радикалског производа, који укључује хидропероксил ($HO_2\cdot$) и метилпероксил ($CH_3OO\cdot$) радикал. Ови експерименти изведени су у липидном и воденом медијуму, како би имитирали мембрану и унутарћелијско окружење (*Medina et al.*, 2014). Резултати су показали да постоје различити механизми у зависности од медијума и да су положаји 4, 7 и 8 код једињења [73] вероватно укључени у пренос водоника.



Слика 8. Хидрокси деривати 4-метилкумарина са израженим антиоксидативним дејством

Деривати 4-хидроксикумарина показују добру антиоксидативну активност, а посебно они који у положају 3 кумаринског језгра имају

различите супституенте (слика 9). Испитивање антиоксидативне активности 3-арил-4-хидроксикумаринских деривата [74-79] дало је добре резултате (Pérez-Cruz *et al.*, 2012). Сви добијени деривати испољили су значајну антиоксидативну активност за хватање хидроксил радикала (HO•), при чему је најбољу показало једињење [79]. Синтетисани су различити деривати 3-(етоксикарбонил)-4-хидроксикумарина [80-81], кумарин-3-карбоксамиди [82-88], њихови аналози засновани на липоинској киселини [89-93] и испитана је њихова антиоксидативна активност (Melagraki *et al.*, 2009). Већина деривата показала се веома активним у интеракцији са DPPH радикалом.

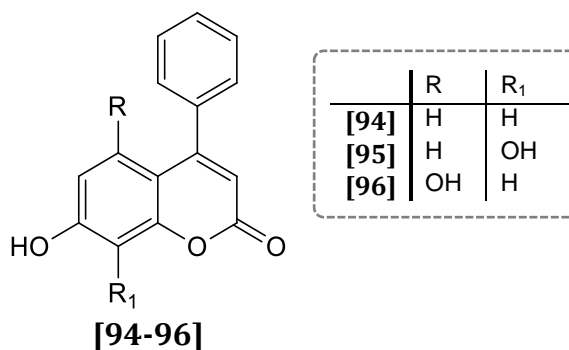


Слика 9. Структуре 3-супституисаних деривата 4-хидроксикумарина са антиоксидативном активношћу

Као најактивније, показало се једињење [85] које је при концентрацији

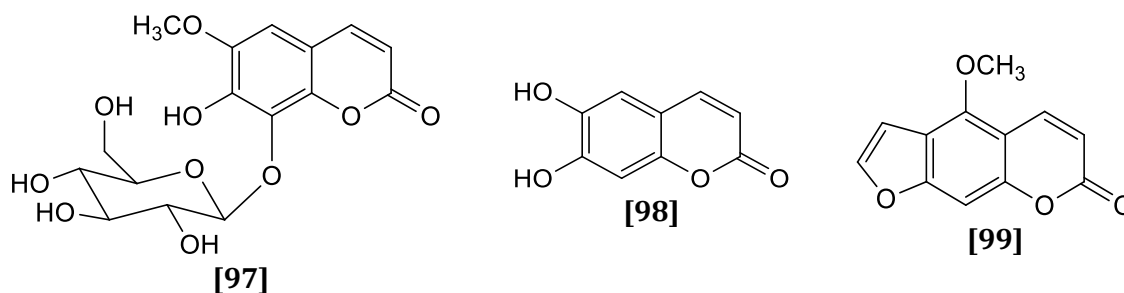
од 0,1 mM неутралисало 90% DPPH радикала (концентрације 0,05 mM), а затим по активности следе једињења [86-88] и [93]. Увођење остатка липоинске киселине код већине једињења резултовало је бољом антиоксидативном активношћу.

Антиоксидативне особине одабраних 4-фенилкумарина [94-96] (слика 10) испитиване су различитим методама које укључују редокс реакцију са оксидансом (DPPH, ABTS, FRAP и CUPRAC) (Veselinović *et al.*, 2014). Сва једињења показала су добру антиоксидативну активност, а једињење [95] дало је најбоље резултате у свим примењеним методама. Овим је потврђена важност постојања катехолног дела у молекулу кумарина код ове групе једињења.



Слика 10. Хидрокси-деривати 4-фенилкумарина

Поред синтетски добијених, значајан је и број природних деривата кумарина који имају изражено антиоксидативно дејство (слика 11). Фраксин [97] је успешно хватао слободне радикале при концентрацији од 0,5 mM и штитио ћелије од оксидативног стреса насталог услед присуства водоник-пероксида (Whang *et al.*, 2005). Ескулетин [98] поседује велику моћ неутрализације различитих радикалских врста што резултира заштитом ћелије од липидне пероксидације, оксидације протеина и оштећења молекула DNK (Lin *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008). Бергаптен [99] је при 10 μM испољавао способност инхибиције насталих радикала у систему липопротеина ниске густине LDL (енгл. *low-density lipoprotein*) и β-каротен – линоленске киселине (Yu *et al.*, 2005). Мезуол, аураптен и остол показали су одличну антиоксидативну активност у различитим тестовима хватања радикала (Chahar *et al.*, 2012; Etemad *et al.*, 2019; Zafar *et al.*, 2020).



Слика 11. Природни деривати кумарина са потврђеним антиоксидативним дејством

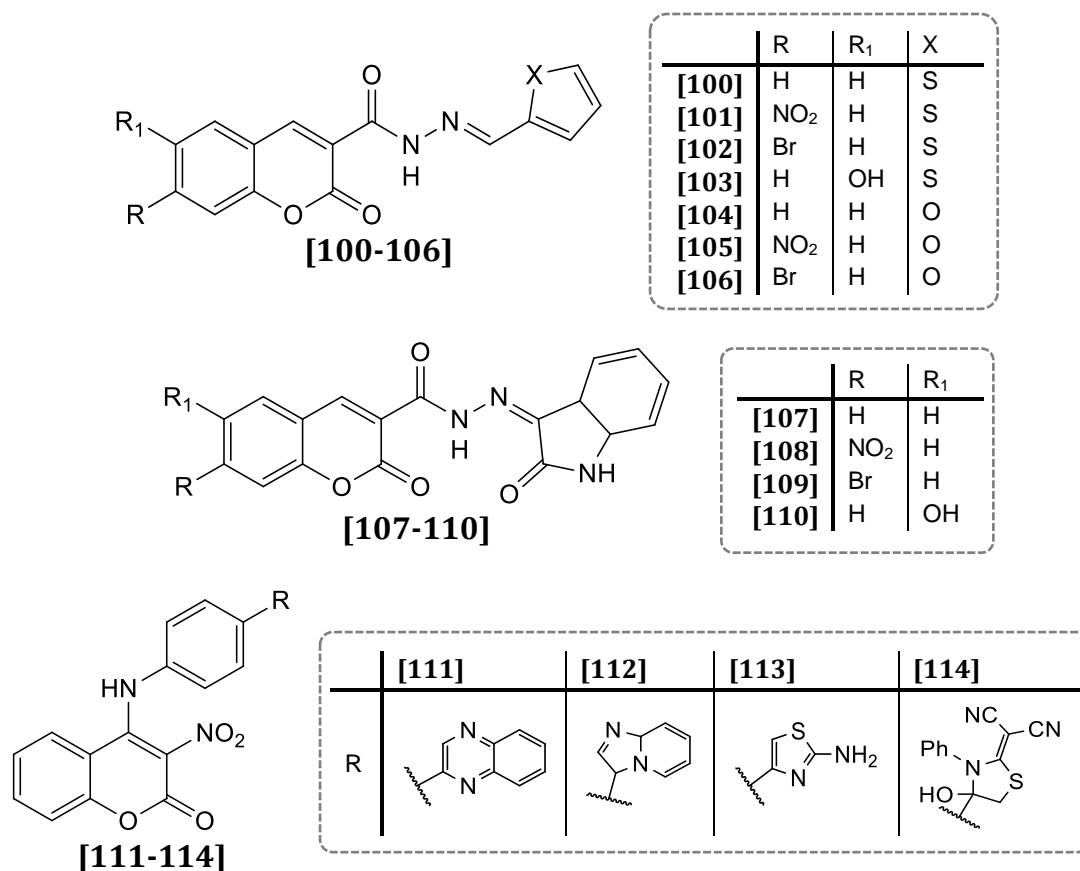
2.2.6.2. Антипролиферативна активност

Термин „канцер“ подразумева широк спектар болести узрокованих различитим мутацијама, које карактерише вишестепени процес, укључујући много различитих фактора који можда не могу сами проузроковати канцер, али могу повећати шансе за генетске мутације (Hanahan и Weinberg, 2000). Постоји значајан број кумаринских деривата који показују пролиферативну активност због могућности регулације различитих ћелијских путева, који укључују инхибицију киназа, инхибицију ангиогенезе, стимулацију ћелијског циклуса и инхибицију митозе. Протеин-киназе имају важну улогу у контроли деобе, раста и диференцијацији ћелија (Cheng *et al.*, 2011). Активирани облици киназа могу проузроковати повећање ћелијске пролиферације, спречити апоптозу и убрзати ангиогенезу, што доводи до активирања протеин-киназе, а као резултат таквог деловања настају тумори.

Серији различитих хидразид-хидразон кумаринских деривата [100-106] и [107-110] (слика 12) испитана је *in vitro* цитотоксична активност на три типа ћелијских линија, PANC-1 (карцином панкреаса), Hep-G2 (хепатоцелуларни карцином) и CCRF (акутна лимфобластна леукемија) (Nasr *et al.*, 2014). Активност ових једињења упоређивана је са активношћу хемотерапијског лека доксорубицина. Једињења [106] са вредношћу инхибиторне концентрације $IC_{50}=2,02 \mu M$ и [109] ($IC_{50}=2,15 \mu M$), испољила су изузетно високу цитотоксичност према PANC-1 ћелијским линијама која је три пута већа од доксорубицина. Једињења [101], [102] и [104] показала су за нијансу нижу активност од поменутог цитостатика. Према Hep-G2 ћелијским

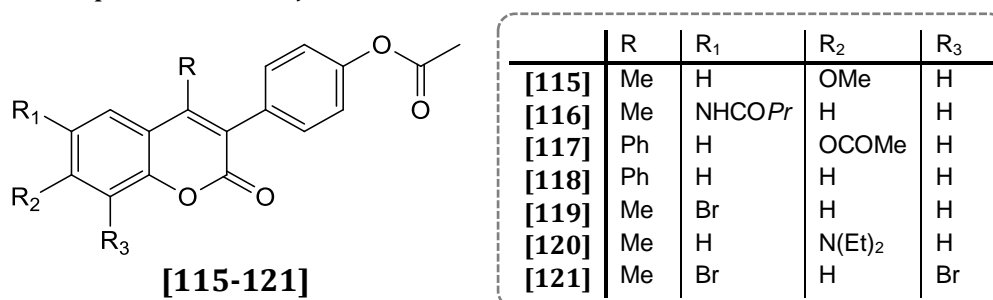
линијама сва једињења показала су добру цитотоксичност, међу којима се као најактивније показало једињење **[102]** ($IC_{50}=3,60 \mu M$). Активност ових једињења према CCRF ћелијским линијама је нешто слабија у поређењу са доксорубицином, са изузетком једињења **[102]** ($IC_{50}=5,15 \mu M$) које је било најактивније.

Деривати 4-ариламино-3-нитрокумарина **[111-114]** добијени из 4-хидроксикумарина тестирани су на ћелијским линијама карцинома грлића материце KB-3-1 (слика 12) (Halawa *et al.*, 2020). Утврђено је да ова једињења циљају DNK-топоизомеразе 1, при чему блокирају репликацију ћелија и доводе до њене смрти. Од тестираних једињења најбољу активност показао је тиазолидински дериват са малонитрилом **[114]** ($IC_{50}=21 \mu M$) у односу на гризеофулвин, који је коришћен као позитивна контрола. Цитотоксична активност допуњена је докинг-студијом, где је утврђено да ово једињење интерагује путем водоничних веза са Arg364, Asp533, Gln633 и 2'-дезоксигванозин-5'-монофосфатом (DG12) из скелета DNK.



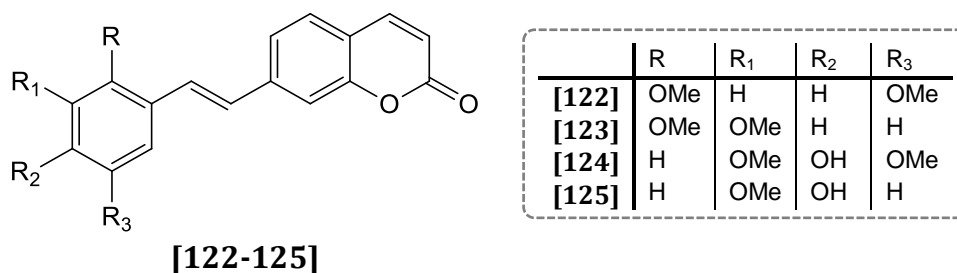
Слика 12. Деривати кумарина са цитотоксичним дејством

Серија ацетоксикумаринских деривата **[115-121]** (слика 13) тестирана је у *in vitro* условима на ћелије A549 (канцер плућа), CRL-1548 (канцер јетре) и CRL-1439 (нормалне ћелије јетре) (Musa *et al.*, 2011). Једињење **[120]** испољило је најјачу цитотоксичну активност према свим тестираним ћелијским линијама, док је једињење **[118]** дало одличне резултате према ћелијској линији A549. Оба поменута једињења су изазвала заустављање ћелијског циклуса у различитим фазама код канцерске ћелијске линије A549, али и код нормалних ћелија CRL-1548.



Слика 13. Структуре ацетокумаринских деривата

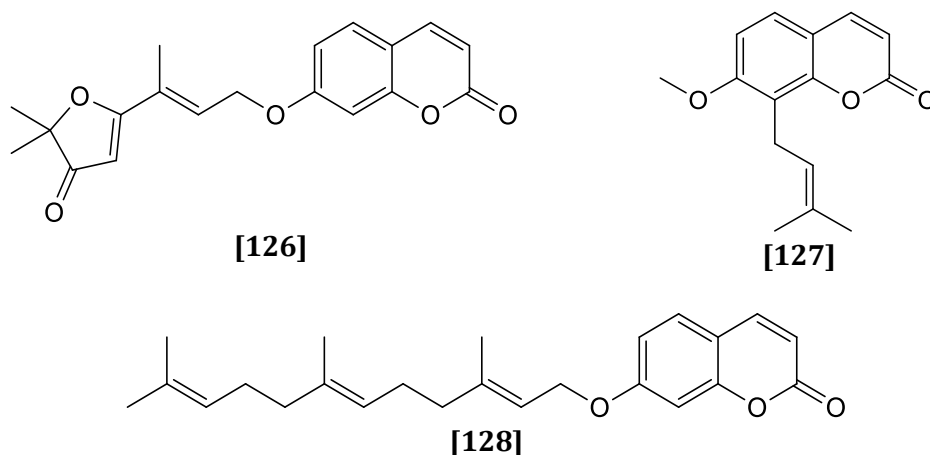
Различно супституисани стирилкумарини **[122-125]** (слика 14) показали су одличну антипролиферативну активност ка ћелијама аденокарцинома дебелог црева (SW480) (Herrera-R *et al.*, 2018). Међу њима најјачу активност су показали 7-(4-хидрокси-3,5-диметоксистирил)-2H-хромен-2-он **[124]** (IC₅₀=1,01 μM) и 7-(4-хидрокси-3-метоксистирил)-2H-хромен-2-он **[125]** (IC₅₀=5,33 μM) услед способности да индукују апоптозу SW480 ћелија, највероватније интеракцијом са туморским протеином p53. Једињење **[124]** је тестирано и на мишевима соја BALB/c, при чему је установљено да оно може инхибирати рано напредовање аденокарцинома дебелог црева (Herrera-R *et al.*, 2020).



Слика 14. Структуре супституисаних стирилкумарина са значајним антипролиферативним дејством

Значајну цитостатичку активност против ћелијских линија MFC-7 (карцином дојке), HCT-116 (колоректални карцином), HepG2 и A549 показали су деривати кумарина са пиридинским супституентом у положају 3 кумаринског језгра (Fayed *et al.*, 2019). Установљено је да ова једињења изазивају заустављање ћелијског циклуса у G2 фази који је праћен апоптозом, што их сврстава у ред потенцијалних антипролиферативних агенаса.

Гејпарварин [126] (слика 15), природни дериват кумарина изолован из биљне врсте *Geijera parviflora* познат је по својој израженој цитостатичкој активности (Miglietta *et al.*, 2001; El-Ansary *et al.*, 2017). Остол [127] инхибира миграцију ћелија карцинома дојке тако што смањује активност металопротеиназе матрикса и доводи до смањења пролиферације (Dapeng *et al.*, 2010). Природни кумарински дериват изолован из биљака рода *Ferula*, умбелипренин [128] показује цитотоксичку активност према ћелијама карцинома желуца и индукује апоптозу (Ziai *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2019). Добру инхибиторну активност показали су и други природни деривати кумарина изоловани из биљака (Guilet *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2002).



Слика 15. Природни деривати кумарина са антипролиферативним дејством

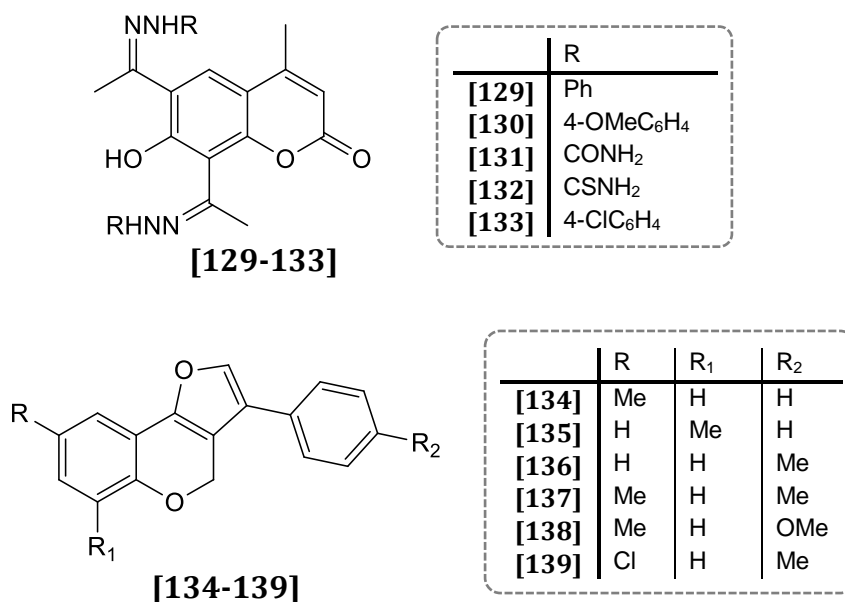
2.2.6.3. Антимикробна активност

Одређени сојеви бактерија и гљива развијају резистенцију према појединим антимикробним агенсима, који се већ дуже време користе у клиничке сврхе. Као последица поменутог, постоји стална потреба за развојем нових, бољих и сигурнијих антимикробних једињења. Многи кумарински

деривати, како природни тако и синтетички, показују веома добру антимикробну активност.

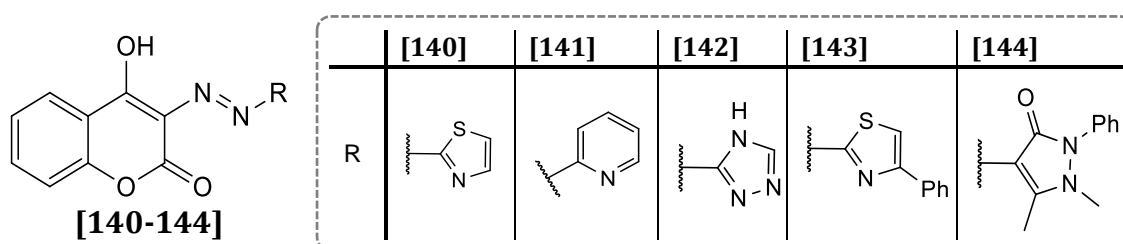
Кумарински bis-хидразони, семикарбазони и тиосемикарбазони [129-133] (слика 16) испитани су на *in vitro* антимикробну активност према три соја бактерија, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* и три соја гљива *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* и *Candida albicans* (Nagamallu *et al.*, 2016). Једињења [130-132] показала су одличну антибактеријску и антифунгалну активност са вредностима минималних инхибиторних концентрација које су мање или једнаке вредностима референтног антибиотика ципрофлоксацина и антимикотика флуконазола.

Серија 3-арилфуоро[3,2-с]кумарина [134-139] (слика 16) тестирана је агар-дифузионом методом на антимикробну активност према бактеријама *E. coli*, *Bacillus subtilis* и *C. albicans* у односу на стрептомицин и клотримазол (Kaneria *et al.*, 2017). Добијени резултати указују да скоро сва једињења инхибирају раст бактерије *E. coli* у поређењу са стрептомицином, при чему је најбољу активност показало једињење [139], а затим следе једињења [134-136]. Антимикробна активност свих тестираних једињења према сојевима *B. subtilis* и *C. albicans* била је умерена.



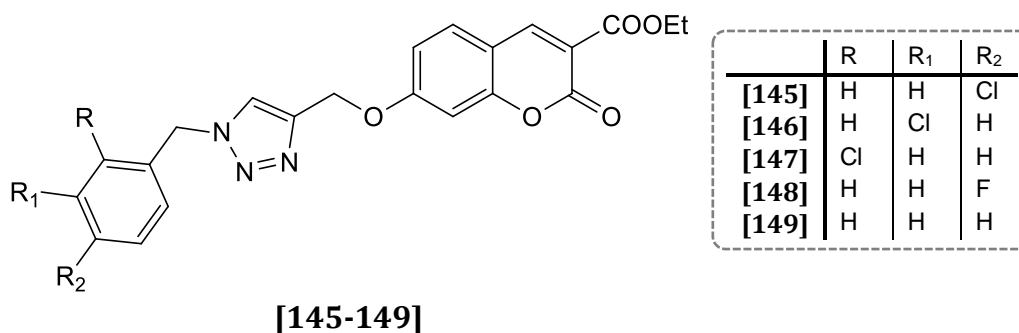
Слика 16. Структуре кумаринских bis-хидразона, семикарбазона, тиосемикарбазона и 3-арилфуорокумарина са антимикробним дејством

Деривати 3-(хетероарилазо)-4-хидроксикумарина [140-144] (слика 17) тестирани су на антибактеријску активност агар-дифузионом и микродилуционом методом на сојеве бактерија *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *B. subtilis* (Sahoo *et al.*, 2015). Већина синтетисаних једињења показала је изузетно инхибиторно дејство на раст бактерија *S. aureus* и *P. aeruginosa*. Дериват са пиразолским фрагментом [144] је показао огроман антибактеријски ефекат у случају свих тестираних сојева бактерија, а затим следе једињења [140] и [141] чије се вредности минималних инхибиторних концентрација могу поредити са примењеним антибиотиком ампицилином.



Слика 17. Деривати 3-(хетероарилазо)-4-хидроксикумарина

Антифунгална активност кумаринских деривата са 1,2,3-триазолским језгром [145-149] (слика 18) испитана је на пет хуманих патогених сојева гљива *C. albicans*, *Fusarium oxysporum*, *A. flavus*, *A. niger* и *Cryptococcus neoformans* (Shaikh *et al.*, 2016). Методом микродилуције утврђено је да једињења [145-147] и [149] испољавају јаку инхибиторну активност једнаку примењеном референтном антимицотику миконазолу против квасца *C. albicans*, док је једињење [148] показало двоструко већу активност од миконазола и једнаку активност као флуконазол.



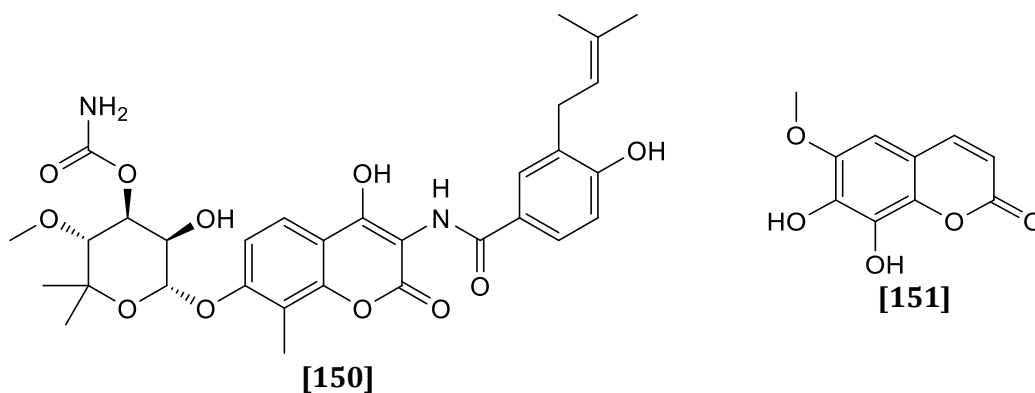
Слика 18. Структуре кумаринских деривата са 1,2,3-триазолским фрагментом

Једињења [146] и [147] показала су изражено антифунгално дејство према соју *F. oxysporum*. Докинг-студијом је утврђено да сва тестирана једињења овог типа имају висок афинитет према активном месту ензима ланостерол-14 α -деметилазе (ензима из групе цитохрома P₄₅₀).

Антимикробна активност серије 4-(алкиламино)-3-нитрокумарина испитана је на 24 соја микроорганизама, који представљају лабораторијске сојеве и клиничке изолате бактерија и гљива (Radulović *et al.*, 2015). Сва једињења показала су одређени степен селективне активности, која је у неким случајевима била врло изражена, са вредношћу минималне инхибиторне концентрације од 0,04 nmol/ml према квасцу *C. albicans*. Сва једињења су показала већу активност према Грам-негативним сојевима, док је најосетљивији сој био *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis*. Добијени резултати указују на потенцијалну употребу ових деривата кумарина у третману инфекција гастроинтестиналног система изазваних резистентним сојевима микроорганизама. Показано је да серија бискумаринских деривата изражено инхибира раст одређених сојева Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија (Chougala *et al.*, 2018). Утврђено је да већина синтетисаних једињења показује снажнију антибактеријску активност од референтног антибиотика цiproфлоксацина против сојева *E. coli*, *S. aureus* и *Enterococcus faecalis*.

Новобиоцин [150] (слика 19) је антибиотик природног порекла са кумаринским језгром, изолован из гљиве *Streptomyces niveus* (Kominek, 1972). Ово једињење показује широк спектар активности према великом броју Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија, а утврђено је његово дејство путем инхибиције DNK-гиразе (Burlison *et al.*, 2006). Кумермицин који је структурно сличан новобиоцину, показује јачу антимикробну активност и инхибира DNK-гиразу (Bisacchi и Manchester, 2015). Фраксетин [151] (слика 19) је један од главних састојака биљне врсте *Fraxinus rhynchophylla*, за који је доказано да изражено инхибира раст *S. aureus* тако што спречава везивање топоизомеразе за DNK (Wang *et al.*, 2014). Природни кумарини аморезинол и острутин, који као супституенте имају полипренил ланце, показују антибактеријско

деловање у случају сојева *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus* и *S. aureus* (Mokdad-Bzeouich *et al.*, 2015).



Слика 19. Природни деривати кумарина са антимикуробном активношћу

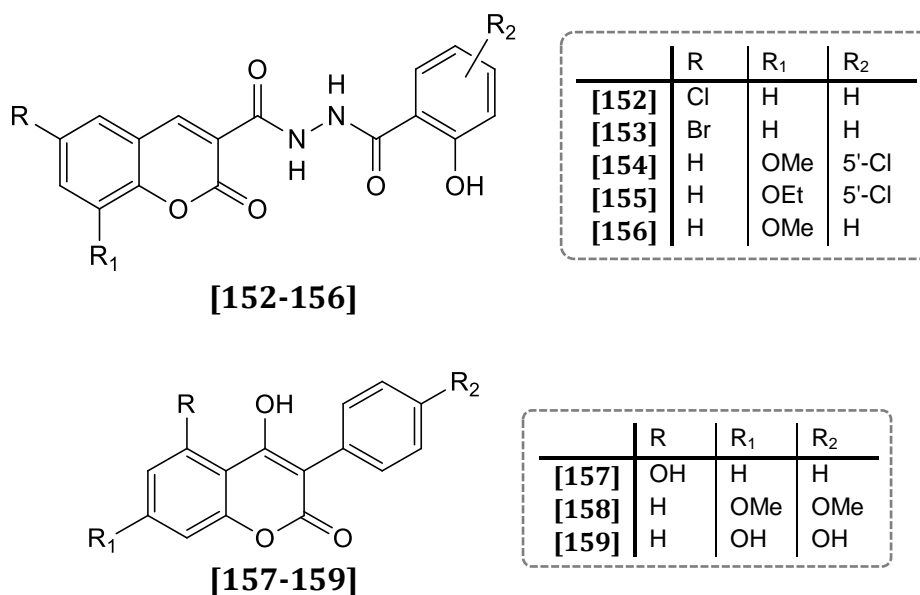
2.2.6.4. Антивирална активност

Већина антивирусних лекова блокира унутарћелијске процесе везане за синтезу протеина и нуклеинских киселина код вируса, а вирусне полимеразе су главна мета ових лекова (Menéndez-Arias и Gago, 2013). Циклус репликације вируса обично се састоји од реверзне транскрипције, транслације, протеолизе и гликозилације. У овим процесима учествује низ ензима који су повезани са синтезом ДНК, РНК и гликопротеина. Деривати кумарина активни су према многим вирусима, као што су вирус грипа, HIV-а, хепатитиса, денга и чикунгуња (Mishra *et al.*, 2020). Познато је да у случају неких вируса механизам антивиралног дејства кумаринских деривата се заснива на инхибицији неких ензима као што су HIV-реверзне транскриптазе, HIV-интегразе, HIV-протеазе, херпес-вирусне ДНК-полимеразе и вирусне неураминидазе (Hassan *et al.*, 2016).

Дериватима кумарин-3-карбохидразида **[152-156]** (слика 20) *in vitro* је тестирано инхибиторно дејство према HIV-1-интегрази у односу на цихорну киселину као референтно једињење (Jesumoroti *et al.*, 2019). Испитивани деривати били су нетоксични за људске ћелије и дали су одличне резултате као анти-HIV агенси, са врло ниским IC₅₀ вредностима. Једињења **[152]** (IC₅₀=13 nM) и **[153]** (IC₅₀=14 nM) су показала изузетан инхибиторни ефекат у поређењу са цихорном киселином (IC₅₀=10 nM), због чега она могу послужити

као основа за развој инхибитора интегразе. Такође, докинг-студијом је утврђено да се једињења ова врсте веома добро везују за активно место ензима водоничним везама које настају интеракцијом атома кисеоника у пирановом прстену, кисеоника карбонилне групе и кисеоника из метокси-групе са просторно блиским активним аминокиселинским остацима (Glu152, Gln148, Gly149, Asn155, Thr66, His67, Lys159 и Asp64).

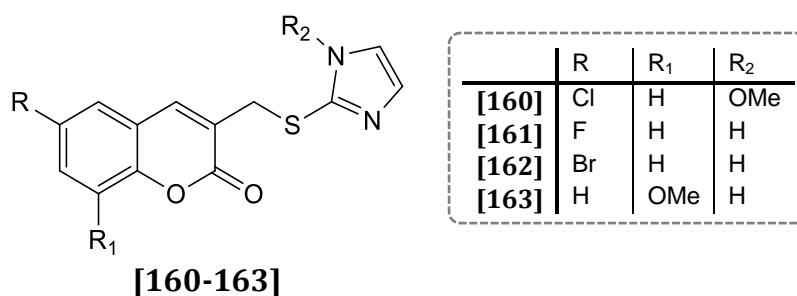
Активност групе 3-супституисаних-4-хидроксикумарина [157-159] (слика 20) испитивана је према HIV-1-протеази (Kirkiacharian *et al.*, 2002). Утврђено је да хидроксилна група која је блиска хидроксилној групи у положају 4 кумаринског језгра смањује јачину водоничне везе између ове групе и остатка Asp25/Asp25' из HIV-1-протеазе. На основу овога, као најактивније се показало једињење [159] ($IC_{50}=2 \mu M$) које садржи хидроксилну групу у положају 7 кумаринског језгра и једињење [158] ($IC_{50}=3,5 \mu M$) са метокси-групом у поменутом положају.



Слика 20. Структуре 3-супституисаних деривата кумарина са инхибиторним дејством према HIV-1-интегрази и HIV-1-протеази

Утврђено је да и други деривати 3-супституисаних кумарина и 3-супституисаних-4-хидроксикумарина изражено инхибирају HIV-1-реверзну транскриптазу и HIV-1-протеазу са веома ниским IC_{50} вредностима (Stanchev *et al.*, 2011; Olomola *et al.*, 2013).

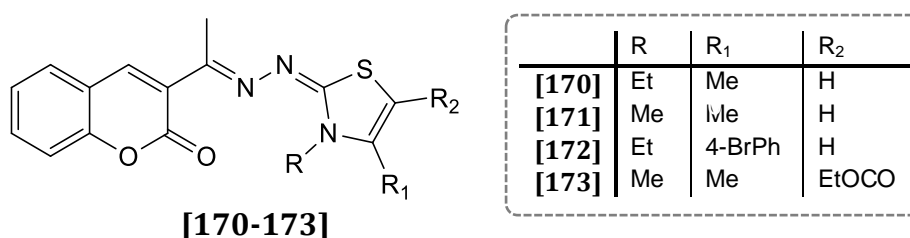
Тестирано је дејство серије имидазол-кумаринских деривата **[160-163]** (слика 21) на вирус хепатитиса С (HCV) (Tsay *et al.*, 2016). На основу добијених резултата установљено је да једињења **[161-163]** поседују одличну анти-HCV активност са вредностима EC_{50} од 5,1 до 8,4 μM и значајан индекс селективности. Њихова активност и селективност огледа се у присуству имидазоловог језгра и кумаринског језгра са супституентима као што су F, Cl и Br. Слично претходном, серија бензимидазол-кумаринских деривата показала је изражено инхибиторно дејство на вирус хепатитиса С (Hwu *et al.*, 2008).



Слика 21. Структуре имидазол-кумаринских деривата

Хибриди тиазолил-кумарина **[164-167]** (слика 22) тестирани су на вирус грипа типа А, односно на његове подтипове H1N1 и H3N2, користећи MDCK ћелијске културе (Osman *et al.*, 2018). Потврђена је одлична антивирусна активност једињења **[164]**, **[166]** и **[167]** у случају вируса H1N1 у поређењу са амантадином као референтним једињењем. Једињење **[164]** је испољило изражено дејство према поменутом вирусу (веома ниска IC_{50} вредност од 4,84 $\mu\text{g/ml}$). Студије молекуларног доковања показале су да је активност овог једињења против H1N1 вируса последица инхибиције неураминидазе из вирусне овојнице, где оно формира четири водоничне везе са активним местом неураминидазе и то преко карбонилног кисеоника са кумаринског дела и терцијарног атома азота из тиазоловог прстена. Једињење **[166]** показало је добро инхибиторно дејство према вирусу H3N2. За групу bis-(триазолотиадиазинил-кумарин) деривата такође је потврђено њихово инхибиторно дејство на неураминидазу вируса H1N1 (Pavurala *et al.*, 2018).

Серија 3-супституисаних тиазолин-деривата кумарина [170-173] (слика 24) испитана је да ли поседује *in vivo* антиинфламаторну активност коришћењем модела карагенином изазване инфламације у шапи пацова и *in vitro* инхибиторну активност према хуманим циклооксигеназама 1 и 2 (COX-1 и COX-2) (Dawood *et al.*, 2015). Једињења [171-173] показала су високу *in vivo* антиинфламаторну активност, понашајући се као снажни селективни инхибитори циклооксигеназе 2 у поређењу са целекоксибом, нестероидним антиинфламаторним леком, са веома ниским вредностима IC₅₀.



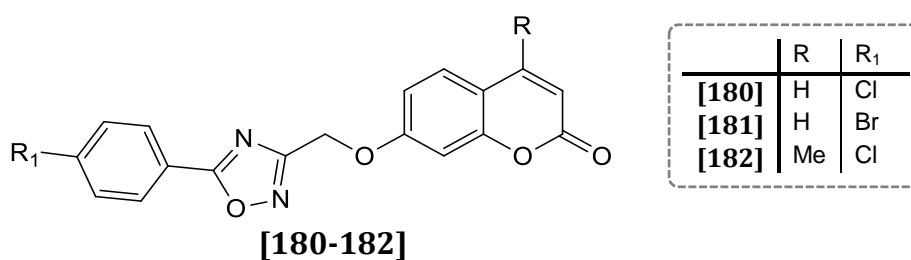
Слика 24. Структуре 3-супституисаних тиазолин деривата кумарина

Циклооксигеназе нису једини ензими који учествују у инфламаторном процесу. Заправо, 5-липоксигеназа (5-LOX) катализује два различита корака у метаболизму арахидонске киселине што доводи до стварања леукотриена A₄, а затим се сукцесивно метаболише у леукотриен B₄, који директно учествује у инфламаторним процесима (Ford-Hutchinson *et al.*, 1994). Аналгетски, антиинфламаторни и улцерозни ефекат 7-супституисаних деривата кумарина са бензотиазолилним делом структуре [174-176] (слика 25) испитан је у *in vivo* и *in vitro* условима (Srivastava *et al.*, 2016). Најактивнија једињења су даље испитана као инхибитори ензима 5-липоксигеназе. Једињења [175] и [176] су показала најизраженије антиинфламаторне активности са врло високим степеном инхибиције 5-липоксигеназе. Докинг-студија је потврдила да ова једињења поседују висок афинитет везивања за активно место ензима 5-липоксигеназе, а посебно једињење [176] се показало као некомпетитивни инхибитор поменутог ензима. Утврђено је и да присуство различитог супституента у положају 6 бензотиазоловог прстена утиче на повећање активности ове групе једињења.

2.2.6.6. Антиконвулзивна активност

Антиконвулзиви припадају групи лекова који се користе у спречавању епилептичних напада. Епилепсија је неуролошки поремећај који се карактерише периодичним и непредвидивим нападима. Познато је да патогенеза ове болести укључује оштећење ексцитаторне и инхибиторне неуротрансмисије (McNamara, 1994).

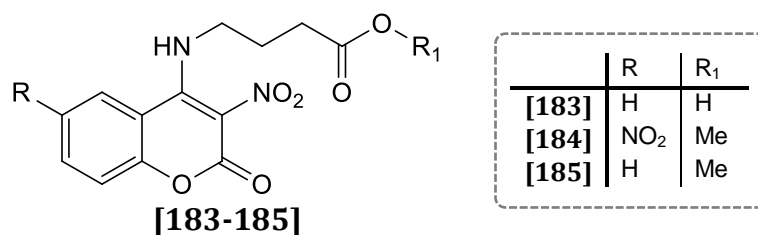
Антиконвулзивна активност 1,2,4-оксадиазол-кумаринских деривата **[180-182]** (слика 27) испитивана је на мишевима применом два модела напада изазвана пентилентетразолом и електро шокovima у односу на диазепам као референтно једињење (Mohammadi-Khanaposhtani *et al.*, 2019). Сва три једињења показала су одличну активност, при чему су активнија била једињења **[180]** и **[182]**, која су показала потпуну заштиту од напада индукованих електро шокovima у дози од 7 и 20 mg/kg, без неуротоксичног дејства. Да би се утврдио механизам њиховог деловања испитан је ефекат флумазенила (антагониста бензодиазепин рецептора) на њихову активност. Дошло се до сазнања да флумазенил редукује њихову активност, чиме је потврђено да ова једињења делују као агонисти бензодиазепинског рецептора. Докинг-студија је такође показала да поменута једињења поседују афинитет везивања за GABA_A (γ-аминобутерна киселина) рецептор.



Слика 27. 1,2,4-Оксадиазол-кумарински деривати као антиконвулзиви

Серији 4-амино-3-нитрокумаринских деривата **[183-185]** (слика 28) испитивана је антиконвулзивна активност на мишевима (Mokrov *et al.*, 2019). Најбоље дејство показало је једињење **[183]**, које садржи једну нитро-групу на кумаринском језгру и фрагмент γ-аминобутерне киселине, и једињење **[184]**, које садржи две нитро-групе и фрагмент метил-естра γ-аминобутерне

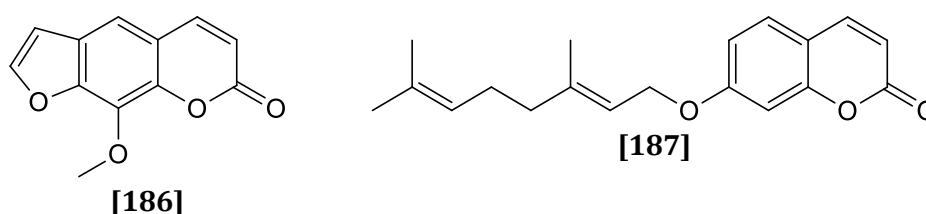
киселине. Утврђено је да ова једињења делују различитим антиконвулзивним механизмима.



Слика 28. Структуре 4-амино-3-нитрокумаринских деривата

Запажену антиконвулзивну активност показали су и деривати кумарин-3-тиазолил-семикарбазона и кумарин-3-триазола (Siddiqui *et al.*, 2009; Bhat и Al-Omar, 2011).

Природни линеарни фуранокумарин ксантотоксин (метоксален) [186] (слика 29) изолован из биљне врсте *Pastinaca sativa*, показао је изражено антиконвулзивно дејство у моделу на мишевима са ефективним дозама између 219 и 252 mg/kg (Skalicka-Woźniak *et al.*, 2014). Испитивањем антиконвулзивне активности аураптена [187] закључено је да он утиче на повећање количине редукованог глутатиона у мозгу, што за последицу има повећање осетљивости мозга на допамин (Etemad *et al.*, 2019). Ескулетин, остол и оксипеucedанин су познати по својој антиконвулзивној активности (Woo *et al.*, 2011; Singhuber *et al.*, 2011).

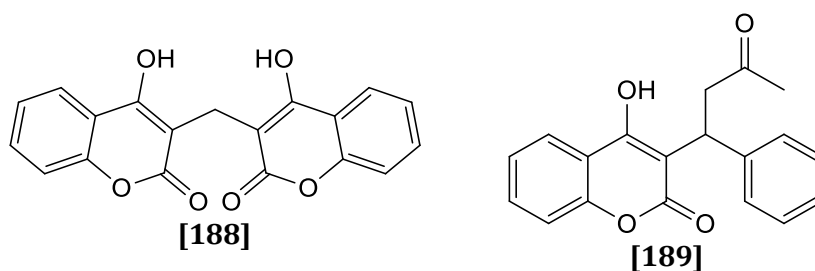


Слика 29. Природни деривати кумарина са антиконвулзивним дејством

2.2.6.7. Антикоагулантна активност

Антикоагулантна активност кумарина била је први пут уочена и приписана кумаринима још почетком двадесетих година прошлог века. Наиме, наизглед здрава стока у Канади почела да умире од унутрашњег крварења (Norn *et al.*, 2014), а главни узрок оваквог стања био је повезан са

исхраном стоке буђавим сеном слатке детелине, где је из кумарина настао дикумарол **[188]** (слика 30), дериват 4-хидроксикумарина са антикоагулантним дејством. Овим је започето истраживање нових потенцијалних антикоагулантних деривата 4-хидроксикумарина, што је недуго затим довело до открића варфарина **[189]** који је првобитно коришћен као родентицид, а затим и као лек код тромбоемболијских болести људи, под именом кумадин (Wardrop и Keeling, 2008). Тренутно је варфарин један од најпознатијих и најчешће коришћених антикоагулантних лекова.

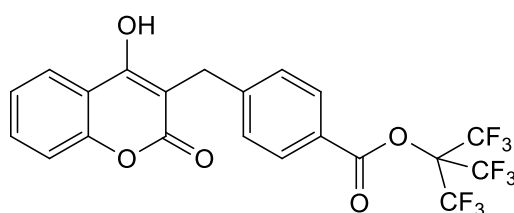


Слика 30. Структуре најпознатијих антикоагулантних кумаринских лекова

Дикумарол, варфарин и други деривати кумарина су антагонисти витамина К, који остварују свој антикоагулантни ефекат ометајући метаболизам витамина К и његовог 2,3-епоксида (витамин К-епоксид) (Hirsh *et al.*, 2001). Витамин К је кофактор посттранслационе карбоксилације остатка глутамата до γ -карбоксиглутамата на *N*-терминалним регионима витамин К-зависних протеина (Choonaga *et al.*, 1988; Vermeer, 1990). Фактори коагулације (фактори II, VII, IX и X) захтевају γ -карбоксилацију за своју биолошку активност. Кумарини испољавају свој антикоагулантни ефекат инхибирајући циклус конверзије витамина К, узрокујући тако хепатичну производњу делимично карбоксиллованих и декарбоксиллованих протеина са смањеном прокоагулантном активношћу.

Истраживање нових антикоагулантних 4-хидрокси-деривата кумарина довело је до открића текарфарина **[190]** (слика 31), антагониста витамина К (Ellis *et al.*, 2009). У другој фази клиничког испитивања текарфарина (на болесницима), упоређивањем са варфарином, установљено је да нема разлике у антикоагулантном дејству, а и да нема нежељених ефекта након његове употребе (Whitlock *et al.*, 2016). Текарфарин је активан након оралне примене

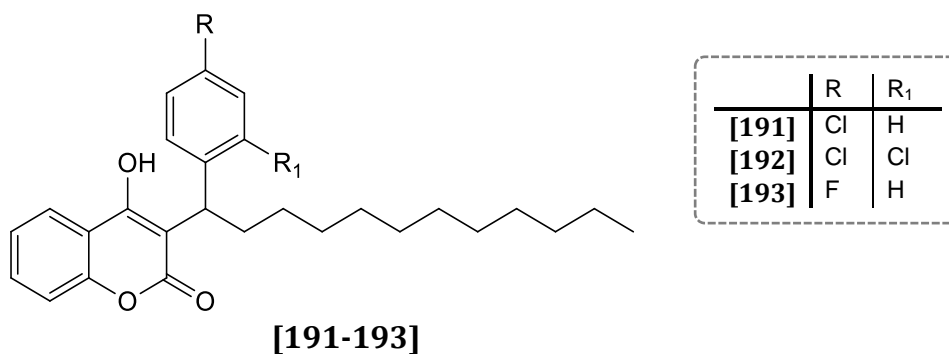
и делује као инхибитор витамин К-епоксид редуктазе (VKORC1), а за разлику од варфарина, он се не метаболише цитохромом P₄₅₀, већ хуманом карбоксилестеразом 2 (hCES2) у хепатичким микрозомима. Ово указује на смањену могућност интеракције текарфарина са другим лековима, пружајући стабилнији антикоагулациони ефекат у поређењу са варфарином (Bavisotto *et al.*, 2011). На основу поменутог закључује се да текарфарин може бити ваљана замена за варфарин у оралној терапији тромбоемболијских болести.



[190]

Слика 31. Текарфарин – орални антагонист витамина К

Серија 3-алкил-4-хидроксикумарина [191-193] (слика 32) испитивана је *in vitro* и *in vivo* на антикоагулантну активност (Montagut-Romans *et al.*, 2017). Истраживања су показала да једињења [191] и [192] имају значајну способност инхибиције VKORC1 у микрозомима јетре пацова при ниским концентрацијама, превазилазећи активност референтног једињења фенпрокумона. Поред наведеног, оба једињења су значајно утицала на повећање протромбинског времена, што додатно потврђује њихову активност као антикоагуланата.



[191-193]

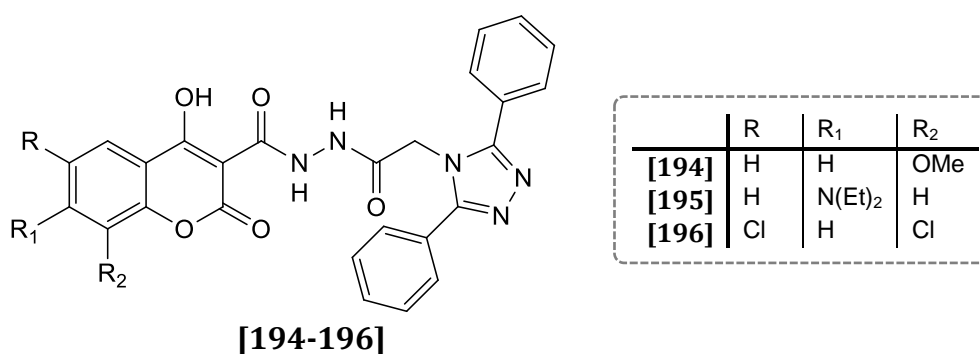
Слика 32. Структуре 3-алкил-4-хидроксикумарина

Природни деривати кумарина суберосин и суберенол изоловани из биљне врсте *Ferulago carduchorum* показали су изражено антикоагулантно дејство (Golfakhrabadi *et al.*, 2014).

2.2.6.8. Антидијабетска активност

Дијабетес је хронична метаболичка болест коју карактерише висок ниво шећера у крви услед недовољне производње инсулина од стране панкреаса или немогућност инсулина да испољи своје дејство. Поред широког спектра фармаколошких активности, установљено је да кумарин поседује и антидијабетско дејство стимулишући производњу инсулина (Pari и Rajarajeswari, 2009).

Серији 1,2,4-триазол-кумаринских деривата [194-196] (слика 33) испитана је способност инхибиције ензима α -глукозидазе (Menteşe *et al.*, 2019). α -Глукозидаза је један од важнијих ензима класе хидролаза који је неопходан за хидролизу глукозидних веза полисахарида и дисахарида. Употреба лекова који делују као инхибитори α -глукозидазе може бити важна код смањења хипергликемије након оброка. Утврђено је да једињења [194] и [195] инхибирају овај ензим, са ниским IC_{50} вредностима. Једињење [194] са метокси-групом у положају 8 кумаринског прстена показало је значајну активност. Према кинетичким студијама тестирана једињења компетитивно инхибирају α -глукозидазу и спадају у ред потенцијалних антидијабетских агенаса.

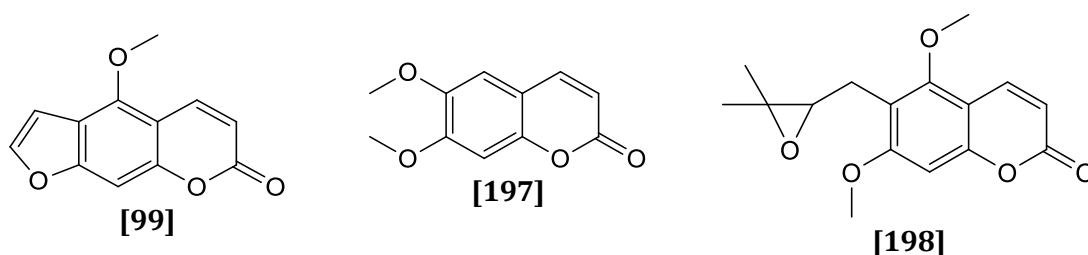


Слика 33. Структуре 1,2,4-триазол-кумаринских деривата

Испитивања спроведена на мишевима потврдила су да неки 4-арил- и 3-арилкумарински деривати имају сјајну антидијабетску активност путем стимулације секреције инсулина (Wang *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2019).

Једноставни природни кумарински дериват, умбелиферон, поред низа других биолошких активности испољава и антихипергликемијску активност

(Ramesh и Pugalendi, 2006). Истраживања су показала да умбелиферон побољшава осетљивост на инсулин појачавајући дејство транспортера глукозе типа 4 (GLUT4) активацијом пероксизом-пролиферативно-активирајућег рецептора- γ (PPAR- γ) (Naowaboot *et al.*, 2015). PPAR- γ је један од важних нуклеарних рецептора који стимулише диференцијацију ћелија масног ткива (Larsen *et al.*, 2003). На овај начин долази до регулације нивоа глукозе у крви код различитих типова дијабетеса. Линеарни фуранокумарин бергаптен [99] (слика 34), изолован из етанолног екстракта биљне врсте *Ducrosia anethifolia*, показано је да инхибира α -амилазу, α -глукозидазу и β -галактозидазу (Shalaby *et al.*, 2014). Скопарон [197] и акулеатин [198] смањују експресију инфламаторних гена и повећавају липолизу масног ткива, што их чини антидијабетицима (Yang *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2014).



Слика 34. Природни деривати кумарина са антидијабетским дејством

2.3. Акутна токсичност на рачиће *Artemia salina*

Artemia salina (тип Arthropoda, класа Crustacea) је врста рачића која насељава слане мочваре и слана језера. Како концентрација соли може да варира, оно што карактерише ову врсту јесте толеранција на висок ниво салинитета, где одрасле јединке могу поднети садржај соли од чак 50%. Њихов животни циклус започиње излегањем успаваних циста које заправо представљају метаболички неактивне ембрионе (Pelka *et al.*, 2000). Цисте могу остати успаване дуги низ година све док се одржавају сувим, а након повратка у слану воду оне се рехидрирају и настављају свој развој. Врста *A. salina* одликује се карактеристикама као што су прилагодљивост широком опсегу салинитета (5-250 g/L) и температуре (6-35 °C), кратак животни циклус, прилагодљивост неповољним условима околине, мала величина тела, партеногенетска репродукција, неселективност у одабиру хранљивих ресурса

и осетљивост на токсичне супстанце (Lu *et al.*, 2013). Сходно наведеном, особине ове врсте чине је погодном и одговарајућом за прелиминарно испитивање токсичности.

Од почетка развоја теста токсичности на рачиће *A. salina* (1959. године), па све до сада, овај тест је био коришћен за одређивање токсичности тешких метала (Zulkifli *et al.*, 2014), биљних екстраката (Parra *et al.*, 2001), органских једињења (Barahona и Sánchez-Fortún, 1999; Xu *et al.*, 2015), наночестица (Rajabi *et al.*, 2015) и цијанобактерија (Beattie *et al.*, 2003). Утврђено је да постоји значајна корелација између резултата добијених за леталну концентрацију која изазива смртност половине изложене популације (LC₅₀) рачића *A. salina* и LC₅₀ вредности за акутну оралну токсичност код мишева (Parra *et al.*, 2001). Поред тога што тест токсичности на рачиће *A. salina* може бити добра алтернатива тестовима који захтевају употребу животиња или њиховог серума, остале главне предности овог теста су (Hamidi *et al.*, 2014; Libralato *et al.*, 2016):

- економска приступачност (количина цисти по тесту је врло мала, тако да је цена биолошког материјала занемарљива),
- доступност (цисте су доступне на тржишту током целе године без потребе узгоја),
- брзина (потребни подаци за израчунавање LC₅₀ вредности добијају се у периоду од 24 до 48 часова),
- мали захтеви (лака манипулација и одржавање у лабораторијским условима без потребе за асептичним техникама и опремом),
- мала количина узорка потребна за испитивање,
- висока прилагодљивост различитим условима испитивања и
- висок степен поновљивости (кратко време добијања великог броја поновљивих резултата).

Поред наведених предности које ова метода има, потребно је испунити и експерименталне услове који подразумевају оптималну температуру, салинитет, аерацију, светлост и рН средине како би се постигла максимална применљивости овог теста.

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. Хемикалије и растварачи

Пре употребе растварачи (ацетон, метанол, апсолутни етанол, диметил-сулфоксид, етил-ацетат, угљен-тетрахлорид, хексан, хлороформ) су предестиловани, док су остале хемикалије коришћене без претходног пречишћавања. За синтезу азина коришћени су следећи алдехиди: 4-метоксибензалдехид, 3,4-диметоксибензалдехид, 4-(диметиламино)бензалдехид, 3,5-диметокси-4-хидроксибензалдехид, 3-метокси-4-хидроксибензалдехид, 4-хидроксибензалдехид, 2-метоксибензалдехид, 4-етокси-3-метоксибензалдехид, 4-метилбензалдехид, 4-изопропилбензалдехид, 5-метил-2-тиофенкарбалдехид, пирол-2-карбалдехид, индол-3-карбалдехид, 1-метилпирол-2-карбалдехид, 2-хлор-3-пиридинкарбалдехид, 2-тиофенкарбалдехид, 2-хинолинкарбалдехид. Супстанце коришћене у синтезама набављене су из комерцијалних извора, од следећих произвођача: Acros Organics (Гил, Белгија), Sigma-Aldrich (Сент Луис, Мизури, САД), Merck (Дармштат, Немачка), Fluka (Ној-Улм, Немачка), J. T. Baker (Девентер, Холандија), Fisher Chemical (Велика Британија) и Zorka Pharma (Шабац, Србија).

3.2. Методе раздвајања и анализе

3.2.1. Танкослојна хроматографија (TLC)

Танкослојна хроматографија (TLC – *Thin-layer chromatography*) вршена је на алуминијумским плочама са претходно нанесеним слојем силика-гела 60 F₂₅₄ (дебљина слоја 0,2 mm) произвођача Merck (Дармштат, Немачка). За елуирање су коришћене смеше етил-ацетат/хексан и етил-ацетат/угљен-тетрахлорид у различитим односима, док је визуализација мрља вршена помоћу UV лампе (254 nm) или изазивањем мрља прскањем TLC плоча разблаженом сумпорном киселином (1:1, v/v) и њиховим загревањем до појаве мрља.

3.2.2. Хроматографија на колони

Препаративно раздвајање вршено је гравитационом хроматографијом употребом колоне димензија 500×150 mm, која је напакована силика-гелом 60

(величина зрна 40-63 μm Fluka, Немачка и 63-200 μm Fisher Chemical, Велика Британија). За елуирање су коришћене смеше етил-ацетат/хексан (1:1, v/v) и етил-ацетат/угљен-тетрахлорид (1,5:1, v/v) под изократским условима.

3.2.3. Ултразубичаста и видљива спектроскопија (UV-Vis)

UV спектри синтетисаних једињења снимани су у метанолу на *UV-1800 Shimadzu* (Токио, Јапан) и *LLG UniSPEC2* (Мекенхајм, Немачка) спектрофотометрима.

3.2.4. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (FTIR)

IR спектри синтетисаних једињења снимани су на спектрофотометру *Thermo Nicolet 6700 FT-IR* (Волтам, САД).

3.2.5. Одређивање тачке топљења

Тачке топљења синтетисаних једињења одређене су на уређају за мерење тачке топљења *MPM-HV2* (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Лауда-Кенигсхофен, Немачка).

3.2.6. Масена спектрометрија високе резолуције (HRMS)

HRMS анализа синтетисаних једињења вршена је на масеном спектрометру *JOEL MStation JMS-700* (JEOL, Токио, Јапан). Енергија јонизације износила је 70 eV, а температура јонског извора 230 °C. Као интерни стандард за тачно одређивање масе, коришћен је перфлуоркерозин, а калибрација је вршена аутоматски, помоћу *MStation* софтвера. Опсег маса је био изабран тако да се пик који потиче од непознатог једињења налази између два пика који потичу од интерног стандарда. Анализа је вршена при резолуцији од 30.000 (10% тзв. „долине“) и брзини скенирања од 60 s/декада. Тачна маса је израчуната као средња вредност 5 до 10 скенирања, а свака појединачна вредност је одређена као центроида M^{+} јона и осталих јона. Грешка добијеног елементарног састава је дата у mтu јединицама и израчуната је помоћу *MStation* софтвера.

3.2.7. Елементална микроанализа

Елементална микроанализа угљеника, водоника, азота и сумпора синтетисаних једињења извршена је на уређају *Carlo Erba 1106 microanalyser* (Милано, Италија), при чему су се добијене вредности добро слагале са предвиђеним вредностима.

3.2.8. Нуклеарно-магнетно-резонантна (NMR) спектроскопија

NMR спектри су снимани на *Bruker Avance III 400 MHz NMR* (Фаланден, Швајцарска) спектрометру, ^1H -NMR спектри на 400 MHz, а ^{13}C -NMR спектри на 100,6 MHz на температури од 25 °C. Као растварачи коришћени су деутерисани хлороформ (CDCl_3) и деутерисани диметил-сулфоксид ($\text{DMSO-}d_6$), док је тетраметилсилан (TMS) употребљен као унутрашњи стандард. Вредности хемијских поремања су дате у δ (ppm) јединицама у односу на TMS ($\delta_{\text{H}} = 0,00$ ppm) за ^1H -NMR спектре или у односу на сигнале резидуалних растварача хлороформа ($\delta_{\text{H}} = 7,26$ ppm и $\delta_{\text{C}} = 77,16$ ppm) и DMSO-а ($\delta_{\text{H}} = 2,50$ ppm и $\delta_{\text{C}} = 40,45$ ppm) за ^{13}C -NMR и хетеронуклеарне 2D NMR спектре. За снимање 2D NMR спектра (^1H - ^1H COSY, NOESY/ROESY, HSQC и HMBC), као и за вишепулсне DEPT95 и DEPT135 спектре примењиване су уобичајне пулсне секвенце доступне у софтверу (*Topspin*) инструмента. Скаларна купловања (J) изражена су у херцима (Hz). Добијени спектри обрађени су у софтверу *MestReNova* (ver. 6.0.2-5475, Mestrelab research, Шпанија).

3.2.9. Рендгенска структурна анализа

Рендгенска структурна анализа рађена је на *Oxford Diffraction Xcalibur Sapphire3 Gemini* дифрактометру користећи $\text{Cu K}\alpha$ зрачење ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) на собној температури. Подаци су обрађени у софтверу *CrysAlis* коришћењем SCALE3 ABSPACK (Oxford Diffraction, 2008). Анализа кристалне структуре је извршена коришћењем програма *SHELXT*, *SHELXL* и *PLATON*. Сви Н-атоми постављени на геометријски дефинисане положаје са константним C–H растојањима од 0,93 Å када је Н-атом везан за sp^2 -хибридизован угљеник, 0,96 Å када је везан за sp^3 -хибридизован угљеник и 0,97 Å када је Н-атом везан за sp^3 -хибридизован угљеник који је везан за sp^2 -хибридизован угљеник.

3.3. Синтезе

3.3.1. Синтеза 3-ацетил-4-хидрокси-2*H*-хромен-2-она [60]

Раствору 4-хидрокси-2*H*-хромен-2-она [50] (3 g, 18,6 mmol) у глацијалној сирћетној киселини (16 ml) лагано се додаје фосфор-оксихлорид (5,6 ml, 60 mmol). Смеша се загрева уз рефлукс на уљаном купатилу наредних 35 минута, а након тога се постепено хлади на собној температури или на леденом купатилу. Настали талог од раствора се одваја цеђењем, а прекристализацијом из етанола добијају се бели игличасти кристали 3-ацетил-4-хидрокси-2*H*-хромен-2-она [60] (принос 90%, т.т. 135-136 °C).

3.3.2. Синтеза 3-(1-хидразоноетил)-4-хидрокси-2*H*-хромен-2-она [199]

3-Ацетил-4-хидрокси-2*H*-хромен-2-он [60] (4,1 g, 20 mmol) суспендује се у метанолу (20 ml) и након 10 минута мешања на собној температури дода се хидразин-хидрат (1 g, 20 mmol). Овако добијена смеша рефлуктује се на воденом купатилу у времену од 5 часова. Ток реакције прати се танкослојном хроматографијом (TLC), при чему се као елуент користи смеша етил-ацетат/хексан (2:1, v/v). Након завршетка реакције, смеша се охлади до собне температуре, а настали талог се филтрира под сниженим притиском и испере метанолом. Након сушења на ваздуху, талог се прекристалише из етанола при чему се добија чист 3-(1-хидразоноетил)-4-хидрокси-2*H*-хромен-2-он [199] (табела 2) у облику праха зелено-жуте боје.

Табела 2. Ознака, назив, физичке карактеристике, принос, спектрални подаци и структура синтетисаног хидразона [199]

Ознака једињења	[199]
Структурна формула	
Назив једињења	3-(1-хидразоноетил)-4-хидрокси-2 <i>H</i> -хромен-2-он
Изглед	прах зелено-жуте боје
Тачка топљења	222-224 °C
Принос	89%
IR (KBr)	1102, 1172, 1552, 1605, 1688, 3190, 3281, 3458 cm ⁻¹

¹ H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 15,17 (<i>br s</i> , HO-C(4)); 7,94 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0, 1,6, H-C(5)); 7,60, (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,4, 8,0, 1,6, H-C(7)); 7,34 (<i>td</i> , <i>J</i> = 8,0, 0,8, H-C(6)); 7,25 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,4, 0,8, H-C(8)); 6,16 (<i>br s</i> , NH ₂); 2,64 (<i>s</i> , Me)
¹³ C-NMR (100,6 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 178,3 (C(4)); 166,4 (C=N); 162,2 (C(2)); 153,4 (C(8a)); 133,8 (C(7)); 125,8 (C(5)); 123,9 (C(6)); 120,7 (C(4a)); 116,6 (C(8)); 94,1 (C(3)); 16,5 (Me)
HRMS(EI)	(M ⁺) 218,0673 (C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O ₃); израчунато 218,0691 (Δ = -1,8 mmu)
Елементална анализа	израчунато за C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O ₃ : C 60,55, H 4,62, N 12,83, O 22,00; нађено: C 60,76, H 4,73, N 12,78, O 21,73

3.3.3. Општа процедура за синтезу мешовитих азина

3.3.3.1. Синтеза азина из ароматичних алдехида [200-209]

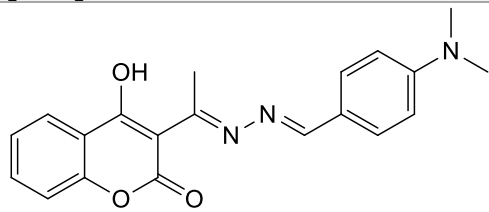
Раствор 3-(1-хидразоетил)-4-хидрокси-2*H*-хромен-2-она [199] (1,1 g, 5 mmol) и одговарајућег ароматичног алдехида (5 mmol) у апсолутном етанолу (10 ml) рефлуктује се на воденом купатилу 3-4 сата. Ток реакције прати се танкослојном хроматографијом (TLC), коришћењем смеше етил-ацетат/хексан (3:2, *v/v*) као елуента. Након завршетка реакције, реакциона смеша се охлади до собне температуре. Добијени талог се филтрира и испере смешом хлороформ/метанол (1:1, *v/v*). Пречишћавање добијених производа врши се хроматографијом на колони (силика-гел 60, величина зрна 40-63 μm, елуент етил-ацетат/хексан (1:1, *v/v*)). Ознаке, називи, физичке карактеристике, приноси, спектрални подаци и структуре синтетисаних азина [200-209] представљени су у табели 3.

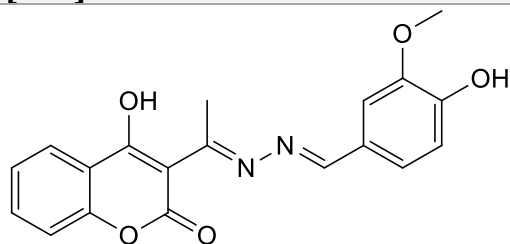
Табела 3. Ознаке, називи, физичке карактеристике, приноси, спектрални подаци и структуре синтетисаних несиметричних азина [200-209]

Ознака једињења	[200]
Структурна формула	
Назив једињења	1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2 <i>H</i> -хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метоксибензилиден)хидразин
Изглед	кристали светло жуте боје
Тачка топљења	190-193 °C

Принос	85%
IR (KBr)	1113, 1170, 1568, 1602, 1697, 2817, 3085, 3434 cm ⁻¹
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 16,44 (<i>br s</i> , HO-C(4)); 8,71 (<i>s</i> , N=CH); 7,98 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0, 1,6, H-C(5)); 7,86-7,81 (<i>m</i> , H-C(2'/6')); 7,68, (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,8, 8,0, 1,6, H-C(7)); 7,34 (<i>td</i> , <i>J</i> = 8,0, 0,8, H-C(6)); 7,31 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,8, 0,8, H-C(8)); 7,11-7,06 (<i>m</i> , H-C(3'/5')); 3,84 (<i>s</i> , OMe-C(4')); 2,95 (<i>s</i> , Me)
¹³ C-NMR (100,6 MHz, DMSO-d ₆)	δ 180,4 (C(4)); 171,9 (C=N); 162,8 (C(4')); 161,9 (C(2)); 156,8 (N=CH); 153,7 (C(8a)); 134,9 (C(7)); 130,9 (C(2'/6')); 126,1 (C(5)); 125,7 (C(1')); 124,4 (C(6)); 120,2 (C(4a)); 116,9 (C(8)); 115,1 (C(3'/5')); 95,9 (C(3)); 55,9 (OMe); 17,8 (Me)
HRMS(EI)	(M ⁺) 336,1121 (C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₄); израчунато 336,1110 (Δ = +1,1 mmu)
Елементална анализа	израчунато за C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₄ : C 67,85, H 4,79, N 8,33, O 19,03; нађено: C 67,98, H 4,72, N 8,41, O 18,89

Ознака једињења	[201]
Структурна формула	
Назив једињења	1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3,4-диметоксибензилиден)хидразин
Изглед	прах жуте боје
Тачка топљења	220-222 °C
Принос	81%
IR (KBr)	1104, 1134, 1574, 1608, 1695, 2841, 3065, 3443 cm ⁻¹
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 16,45 (<i>br s</i> , HO-C(4)); 8,64 (<i>s</i> , N=CH); 7,99 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,6, 1,6, H-C(5)); 7,68, (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,4, 7,6, 1,6, H-C(7)); 7,48 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0, H-C(2')); 7,39-7,28 (<i>m</i> , H-C(6/8/6')); 7,08 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,4, H-C(5')); 3,84 (<i>s</i> , OMe-C(4')); 3,83 (<i>s</i> , OMe-C(3')); 2,98 (<i>s</i> , Me)
¹³ C-NMR (100,6 MHz, DMSO-d ₆)	δ 180,4 (C(4)); 171,8 (C=N); 161,9 (C(2)); 157,0 (N=CH); 153,7 (C(8a)); 152,1 (C(4')); 149,6 (C(3')); 135,0 (C(7)); 127,1 (C(1')); 126,1 (C(5)); 124,4 (C(6)); 124,0 (C(6')); 120,2 (C(4a)); 116,9 (C(8)); 111,9 (C(5')); 109,5 (C(2')); 95,9 (C(3)); 56,0 (OMe-C(4')); 55,9 (OMe-C(3')); 17,8 (Me)
HRMS(EI)	(M ⁺) 366,1234 (C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₅); израчунато 366,1216 (Δ = +1,8 mmu)
Елементална анализа	израчунато за C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₅ : C 65,57, H 4,95, N 7,65, O 21,83; нађено: C 65,03, H 5,02, N 7,83, O 22,12

Ознака једињења	[202]
Структурна формула	
Назив једињења	1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-[4-(диметиламино)бензилиден]хидразин
Изглед	прах цигла црвене боје
Тачка топљења	268-270 °C
Принос	89%
IR (KBr)	1106, 1179, 1591, 1612, 1697, 2812, 3100, 3451 cm ⁻¹
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ 16,40 (<i>br s</i> , HO-C(4)); 8,23 (<i>s</i> , N=CH); 8,07 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,6, 1,6, H-C(5)); 7,67-7,63 (<i>m</i> , H-C(2'/6')); 7,56, (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,0, 7,2, 2,0, H-C(7)); 7,27-7,23 (<i>m</i> , H-C(6/8)); 6,73-6,68 (<i>m</i> , H-C(3'/5')); 3,06 (<i>s</i> , NMe ₂ -C(4')); 2,80 (<i>s</i> , Me)
¹³ C-NMR (100,6 MHz, CDCl ₃)	δ 181,1 (C(4)); 171,2 (C=N); 162,2 (C(2)); 155,3 (N=CH); 153,8 (C(8a)); 152,8 (C(4')); 133,8 (C(7)); 130,3 (C(2'/6')); 125,9 (C(5)); 123,5 (C(6)); 120,3 (C(4a)); 119,9 (C(1')); 116,6 (C(8)); 111,7 (C(3'/5')); 96,1 (C(3)); 40,1 (NMe ₂ -C(4')); 17,5 (Me)
HRMS(EI)	(M ⁺) 349,1417 (C ₂₀ H ₁₉ N ₃ O ₃); израчунато 349,1426 (Δ = -0,9 mmu)
Елементална анализа	израчунато за C ₂₀ H ₁₉ N ₃ O ₃ : C 68,75, H 5,48, N 12,03, O 13,74; нађено: C 68,59, H 5,52, N 12,18, O 13,71

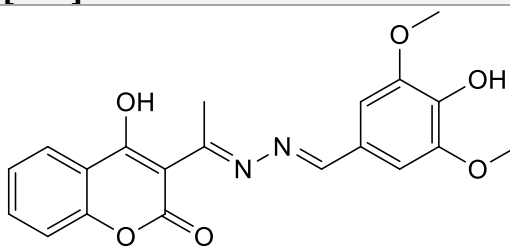
Ознака једињења	[203]
Структурна формула	
Назив једињења	1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3-метокси-4-хидроксибензилиден)хидразин
Изглед	прах тамно жуте боје
Тачка топљења	232-234 °C
Принос	83%
IR (KBr)	1083, 1162, 1599, 1610, 1710, 2832, 3078, 3431 cm ⁻¹
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 16,46 (<i>br s</i> , HO-C(4)); 10,01 (<i>s</i> , HO-C(4')); 8,61 (<i>s</i> , N=CH); 7,96 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,6, 1,6, H-C(5)); 7,66, (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,8, 7,6, 1,6, H-C(7)); 7,43 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1,6, H-C(2')); 7,34-7,26 (<i>m</i> , H-C(6/8/6')); 6,90 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,4, H-C(5')); 3,84 (<i>s</i> , OMe-C(3')); 2,94 (<i>s</i> , Me)

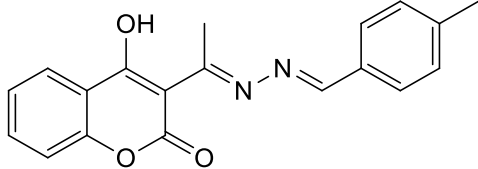
¹³ C-NMR (100,6 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 180,3 (C(4)); 171,5 (C=N); 161,9 (C(2)); 157,2 (N=CH); 153,6 (C(8a)); 151,4 (C(4')); 148,5 (C(3')); 134,9 (C(7)); 126,1 (C(5)); 124,7 (C(6')); 124,4 (C(1')); 124,3 (C(6)); 120,2 (C(4a)); 116,8 (C(8)); 116,1 (C(5')); 110,7 (C(2')); 95,8 (C(3)); 56,0 (OMe); 17,8 (Me)
HRMS(EI)	(M ⁺) 352,1050 (C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₅); израчунато 352,1059 (Δ = -0,9 mmu)
Елементална анализа	израчунато за C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₅ : C 64,77, H 4,58, N 7,95, O 22,70; нађено: C 64,65, H 4,61, N 7,92, O 22,82

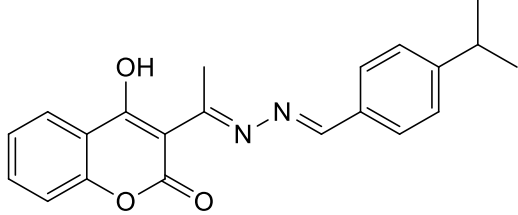
Ознака једињења	[204]
Структурна формула	
Назив једињења	1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(2-метоксибензилиден)хидразин
Изглед	игличасти кристали жуте боје
Тачка топљења	204-206 °C
Принос	80%
IR (KBr)	1105, 1168, 1557, 1609, 1705, 2840, 3053, 3450 cm ⁻¹
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 16,39 (<i>br s</i> , HO-C(4)); 8,83 (<i>s</i> , N=CH); 7,99 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,6, 1,6, H-C(5)); 7,95 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,6, 1,6, H-C(6')); 7,69, (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,4, 7,6, 1,6, H-C(7)); 7,56, (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,0, 7,6, 1,6, H-C(4')); 7,35 (<i>td</i> , <i>J</i> = 7,6, 0,8, H-C(6)); 7,31 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,4, 0,8, H-C(8)); 7,19 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0, H-C(3')); 7,08 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,6, H-C(5')); 3,93 (<i>s</i> , OMe); 2,97 (<i>s</i> , Me)
¹³ C-NMR (100,6 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 180,5 (C(4)); 172,3 (C=N); 161,9 (C(2)); 159,4 (C(2')); 153,7 (C(8a)); 151,9 (N=CH); 135,0 (C(7)); 134,4 (C(4')); 127,1 (C(6')); 126,2 (C(5)); 124,4 (C(6)); 121,4 (C(5')); 120,9 (C(1')); 120,2 (C(4a)); 116,9 (C(8)); 112,7 (C(3')); 96,1 (C(3)); 56,4 (OMe-C(2')); 17,9 (Me)
HRMS(EI)	(M ⁺) 336,1097 (C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₄); израчунато 336,1110 (Δ = -1,3 mmu)
Елементална анализа	израчунато за C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₄ : C 67,85, H 4,79, N 8,33, O 19,03; нађено: C 67,93, H 4,72, N 8,29, O 19,06

Ознака једињења	[205]
Структурна формула	

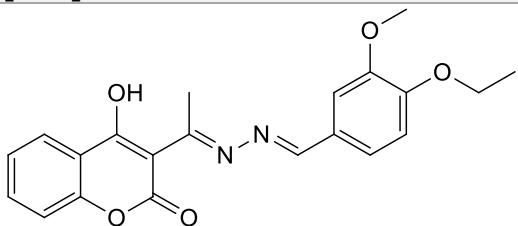
Назив једињења	1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-хидроксибензилиден)хидразин
Изглед	прах жуте боје
Тачка топљења	> 300 °C
Принос	87%
IR (KBr)	1110, 1136, 1572, 1603, 1696, 3197, 3471 cm ⁻¹
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 16,40 (<i>br s</i> , HO-C(4)); 10,31 (<i>s</i> , HO-C(4')); 8,58 (<i>s</i> , N=CH); 7,94 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,6, 1,6, H-C(5)); 7,73-7,69 (<i>m</i> , H-C(2'/6')); 7,63, (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,4, 7,6, 1,6, H-C(7)); 7,29 (<i>td</i> , <i>J</i> = 7,6, 0,8, H-C(6)); 7,25 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,4, 0,8, H-C(8)); 6,91-6,86 (<i>m</i> , H-C(3'/5')); 2,90 (<i>s</i> , Me)
¹³ C-NMR (100,6 MHz, DMSO-d ₆)	δ 181,3 (C(4)); 171,5 (C=N); 161,8 (C(2)); 161,7 (C(4')); 156,9 (N=CH); 153,6 (C(8a)); 134,8 (C(7)); 131,1 (C(2'/6')); 126,1 (C(5)); 124,1 (C(6/1')); 120,2 (C(4a)); 116,8 (C(8)); 116,5 (C(3'/5')); 95,8 (C(3)); 17,7 (Me)
HRMS(EI)	(M ⁺) 322,0970 (C ₁₈ H ₁₄ N ₂ O ₄); израчунато 322,0954 (Δ = +1,6 mmu)
Елементална анализа	израчунато за C ₁₈ H ₁₄ N ₂ O ₄ : C 67,07, H 4,38, N 8,69, O 19,86; нађено: C 67,01, H 4,32, N 8,73, O 19,94

Ознака једињења	[206]
Структурна формула	
Назив једињења	1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3,5-диметокси-4-хидроксибензилиден)хидразин
Изглед	прах жуте боје
Тачка топљења	228-230 °C
Принос	88%
IR (KBr)	1114, 1163, 1595, 1619, 1707, 2842, 3115, 3465 cm ⁻¹
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 16,45 (<i>br s</i> , HO-C(4)); 9,30 (<i>s</i> , HO-C(4')); 8,50 (<i>s</i> , N=CH); 7,92 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,6, 1,6, H-C(5)); 7,61 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,4, 7,6, 1,6, H-C(7)); 7,27 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,6, H-C(6)); 7,22, (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,4, H-C(8)); 7,12 (<i>s</i> , H-C(2'/6')); 3,81 (<i>s</i> , OMe-C(3'/5')); 2,90 (<i>s</i> , Me)
¹³ C-NMR (100,6 MHz, DMSO-d ₆)	δ 180,3 (C(4)); 171,4 (C=N); 161,8 (C(2)); 157,1 (N=CH); 153,6 (C(8a)); 148,6 (C(3'/5')); 140,4 (C(4')); 134,7 (C(7)); 126,0 (C(5)); 124,2 (C(6)); 123,1 (C(1')); 120,1 (C(4a)); 116,7 (C(8)); 106,6 (C(2'/6')); 95,8 (C(3)); 56,4 (OMe-C(3'/5')); 17,7 (Me)
HRMS(EI)	(M ⁺) 382,1150 (C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₆); израчунато 382,1165 (Δ = -1,5 mmu)

Елементална анализа	израчунато за C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₆ : C 62,82, H 4,74, N 7,33, O 25,11; нађено: C 62,93, H 4,83, N 7,25, O 24,99
Ознака једињења	[207]
Структурна формула	
Назив једињења	1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метилбензилиден)хидразин
Изглед	игличасти кристали светло жуте боје
Тачка топљења	194-196 °C
Принос	85%
IR (KBr)	1101, 1173, 1555, 1605, 1695, 2922, 3115, 3468 cm ⁻¹
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 16,41 (<i>br s</i> , HO-C(4)); 8,74 (<i>s</i> , N=CH); 7,99 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,2, 1,6, H-C(5)); 7,80-7,76 (<i>m</i> , H-C(2'/6')); 7,68 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,4, 7,2, 1,6, H-C(7)); 7,37-7,29 (<i>m</i> , H-C(6/8/3'/5')); 2,97 (<i>s</i> , Me); 2,38 (<i>s</i> , Me-C(4'))
¹³ C-NMR (100,6 MHz, DMSO-d ₆)	δ 180,5 (C(4)); 172,4 (C=N); 161,9 (C(2)); 157,0 (N=CH); 153,7 (C(8a)); 142,8 (C(4')); 135,0 (C(7)); 130,5 (C(1')); 130,2 (C(3'/5')); 129,0 (C(2'/6')); 126,2 (C(5)); 124,4 (C(6)); 120,2 (C(4a)); 116,9 (C(8)); 96,1 (C(3)); 21,7 (Me-C(4')); 17,8 (Me)
HRMS(EI)	(M ⁺) 320,1149 (C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₃); израчунато 320,1161 (Δ = -1,2 mmu)
Елементална анализа	израчунато за C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₃ : C 71,24, H 5,03, N 8,47, O 14,98; нађено: C 71,36, H 5,11, N 8,62, O 14,91

Ознака једињења	[208]
Структурна формула	
Назив једињења	1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-изопропилбензилиден)хидразин
Изглед	игличасти кристали светло жуте боје
Тачка топљења	197-199 °C
Принос	82%
IR (KBr)	1110, 1176, 1566, 1605, 1698, 2958, 3150, 3472 cm ⁻¹
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 16,41 (<i>br s</i> , HO-C(4)); 8,74 (<i>s</i> , N=CH); 7,99 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,6, 1,6, H-C(5)); 7,82-7,78 (<i>m</i> , H-C(2'/6')); 7,68 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,4, 7,6, 1,6, H-C(7)); 7,43-7,39 (<i>m</i> , H-C(3'/5')); 7,34 (<i>td</i> , <i>J</i> = 7,6, 0,8, H-C(6));

	7,30 (<i>dd</i> , $J = 8,4, 0,8$, H-C(8)); 2,98-2,93 (<i>m</i> , Me, HC-C(4')); 1,23 (<i>d</i> , $J = 6,8$, Me ₂ -C-C(4'))
¹³ C-NMR (100,6 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 180,5 (C(4)); 172,4 (C=N); 161,9 (C(2)); 157,1 (N=CH); 153,7 (C(8a/4')); 135,0 (C(7)); 130,9 (C(1')); 129,1 (C(2'/6')); 127,6 (C(3'/5')); 126,2 (C(5)); 124,4 (C(6)); 120,2 (C(4a)); 116,9 (C(8)); 96,1 (C(3)); 34,0 (CH-C(4')); 24,0 (Me ₂ -C-C(4')); 17,8 (Me)
HRMS(EI)	(M ⁺) 348,1489 (C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₃); израчунато 348,1474 (Δ = +1,5 mmu)
Елементална анализа	израчунато за C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₃ : C 72,40, H 5,79, N 8,04, O 13,78; нађено: C 72,25, H 5,88, N 8,12, O 13,75

Ознака једињења	[209]
Структурна формула	
Назив једињења	1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-етокси-3-метоксибензилиден)хидразин
Изглед	прах светло жуте боје
Тачка топљења	186-188 °C
Принос	83%
IR (KBr)	1111, 1176, 1555, 1601, 1697, 2975, 3092, 3389 cm ⁻¹
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 16,39 (<i>br s</i> , HO-C(4)); 8,38 (<i>s</i> , N=CH); 7,95 (<i>dd</i> , $J = 7,2, 1,6$, H-C(5)); 7,61 (<i>ddd</i> , $J = 8,4, 7,2, 1,6$, H-C(7)); 7,48 (<i>d</i> , $J = 1,6$, H-C(2')); 7,41 (<i>d</i> , $J = 8,2$, H-C(6')); 7,29 (<i>ddd</i> , $J = 8,4, 7,2, 0,8$, H-C(6)); 7,25 (<i>dd</i> , $J = 8,4, 0,8$, H-C(8)); 7,10 (<i>d</i> , $J = 8,2$, H-C(5')) 4,11 (<i>q</i> , $J = 6,8$, CH ₃ CH ₂ O-C(4')), 3,85 (<i>s</i> , OMe-C(3')); 2,96 (<i>s</i> , Me); 1,37 (<i>t</i> , $J = 6,8$, CH ₃ CH ₂ O-C(4'))
¹³ C-NMR (100,6 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 178,3 (C(4)); 171,8 (C=N); 161,3 (C(2)); 157,1 (N=CH); 153,4 (C(8a)); 152,1 (C(4')); 149,6 (C(3')); 133,8 (C(7)); 126,1 (C(1')); 125,8 (C(5)); 124,7 (C(6')); 123,9 (C(6)); 120,7 (C(4a)); 116,6 (C(8)); 112,8 (C(5')); 109,7 (C(2')); 94,1 (C(3)); 64,4 (CH ₃ CH ₂ O-C(4')); 55,9 (OMe-C(3')); 17,9 (Me); 15,0 (CH ₃ CH ₂ O-C(4'))
HRMS(EI)	(M ⁺) 380,1384 (C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₅); израчунато 380,1372 (Δ = +1,2 mmu)
Елементална анализа	израчунато за C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₅ : C 66,31, H 5,30, N 7,36, O 21,03; нађено: C 66,12, H 5,48, N 7,47, O 20,93

3.3.3.2. Синтеза азина из хетероцикличних алдехида [210-216]

Раствор 3-(1-хидразоноетил)-4-хидрокси-2*H*-хромен-2-она [199] (1,1 g, 5 mmol) и одговарајућег хетероцикличног алдехида (5 mmol) у апсолутном етанолу (10 ml) рефлуктује се на воденом купатилу 2-3 сата. Ток реакције прати се танкослојном хроматографијом (TLC) коришћењем смеше етил-ацетат/угљен-тетрахлорид (2:1, *v/v*) као елуента. Након завршетка реакције, реакциона смеша се хлади до собне температуре, а добијени талог филтрира и испира смешом хлороформ/етанол (2:1, *v/v*). Пречишћавање добијених производа врши се хроматографијом на колони (силика-гел 60, величина зрна 63-200 μm , елуент етил-ацетат/угљен-тетрахлорид (1,5:1, *v/v*)). Ознаке, називи, физичке карактеристике, приноси, спектрални подаци и структуре синтетисаних азина [210-216] представљени су у табели 4.

Табела 4. Ознаке, називи, физичке карактеристике, приноси, спектрални подаци и структуре синтетисаних несиметричних азина [210-216]

Ознака једињења	[210]
Структурна формула	
Назив једињења	1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2 <i>H</i> -хромен-3-ил)етилиден]-2-(тиофен-2-ил-2-метилен)хидразин
Изглед	игличасти кристали жуте боје
Тачка топљења	208-211 °C
Принос	83%
IR (KBr)	1103, 1165, 1337, 1552, 1607, 1699, 3098 cm^{-1}
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ 17,12 (<i>br s</i> , HO-C(4)); 8,54 (<i>s</i> , N=CH); 8,08 (<i>dd</i> , $J = 8,0, 1,6$, H-C(5)); 7,62-7,57 (<i>m</i> , H-C(7/5')); 7,49 (<i>dd</i> , $J = 4,0, 1,2$, H-C(3')); 7,27-7,25 (<i>m</i> , H-C(6/8)); 7,17 (<i>dd</i> , $J = 4,0, 1,2$, H-C(4')); 3,06 (<i>s</i> , Me)
¹³ C-NMR (100,6 MHz, CDCl ₃)	δ 181,7 (C(4)); 173,2 (C=N); 162,2 (C(2)); 153,9 (C(8a)); 148,6 (N=CH); 137,3 (C(2')); 134,3 (C(7)); 133,3 (C(3')); 131,4 (C(5')); 128,2 (C(4')); 126,0 (C(5)); 123,7 (C(6)); 120,0 (C(4a)); 116,8 (C(8)); 96,7 (C(3)); 17,6 (Me)
HRMS(EI)	(M ⁺) 312,0583 (C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₃ S); израчунато 312,0569 ($\Delta = +1,4$ mmu)
Елементална анализа	израчунато за C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₃ S: C 61,53, H 3,87, N 8,97, O 15,37, S 10,26; нађено: C 61,31, H 3,99, N 9,11, O 15,22, S 10,37

Ознака једињења	[211]
Структурна формула	
Назив једињења	1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(5-метилтиофен-2-ил-2-метилен)хидразин
Изглед	игличасти кристали тамно жуте боје
Тачка топљења	205-207 °C
Принос	81%
IR (KBr)	1105, 1159, 1339, 1556, 1698, 3056, 3646, 3674 cm ⁻¹
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ 17,06 (<i>br s</i> , HO-C(4)); 8,43 (<i>s</i> , N=CH); 8,06 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0, 1,6, H-C(5)); 7,58 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,0, 7,6, 1,6, H-C(7)); 7,28-7,23 (<i>m</i> , H-C(6/8/3')); 6,82 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 4,0, 1,2, H-C(4')); 3,03 (<i>s</i> , Me); 2,57 (<i>s</i> , Me-C(5'))
¹³ C-NMR (100,6 MHz, CDCl ₃)	δ 181,5 (C(4)); 172,6 (C=N); 162,2 (C(2)); 153,9 (C(8a)); 148,8 (N=CH); 147,5 (C(5')); 135,1 (C(2')); 134,2 (C(7)); 134,1 (C(3')); 126,7 (C(4')); 125,9 (C(5)); 123,7 (C(6)); 120,0 (C(4a)); 116,7 (C(8)); 96,5 (C(3)); 17,5 (Me); 16,0 (Me-C(5'))
HRMS(EI)	(M ⁺) 326,0741 (C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₃ S); израчунато 326,0725 (Δ = +1,6 mmu)
Елементална анализа	израчунато за C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₃ S: C 62,56, H 4,32, N 8,58, O 14,72, S 9,82; нађено: C 62,72, H 4,12, N 8,89, O 14,60, S 9,67

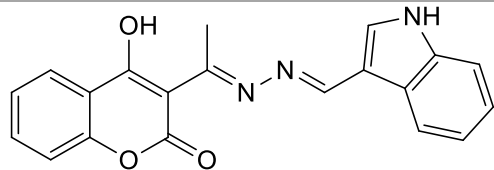
Ознака једињења	[212]
Структурна формула	
Назив једињења	1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(пирол-2-ил-2-метилен)хидразин
Изглед	прах тамно жуте боје
Тачка топљења	238-240 °C
Принос	89%
IR (KBr)	1030, 1123, 1164, 1558, 1609, 1686, 3244 cm ⁻¹
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ 17,09 (<i>br s</i> , HO-C(4)); 9,22 (<i>brs</i> , N-H); 8,22 (<i>s</i> , N=CH); 8,07 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,6, 1,6, H-C(5)); 7,58 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,4, 7,6, 1,6, H-C(7)); 7,28-7,23 (<i>m</i> , H-C(6/8)); 7,09 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 2,4, 1,6, 0,8, H-C(5')); 6,73 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 4,0, 2,4, 1,6, H-C(3')); 6,38 (<i>dt</i> , <i>J</i> = 4,0, 2,4, H-C(4')); 3,03 (<i>s</i> , Me)

¹³ C-NMR (100,6 MHz, CDCl ₃)	δ 181,3 (C(4)); 171,5 (C=N); 162,4 (C(2)); 153,8 (C(8a)); 145,3 (N=CH); 134,1 (C(7)); 126,2 (C(2')); 125,9 (C(5)); 124,4 (C(5')); 123,7 (C(6)); 120,1 (C(4a)); 118,3 (C(3')); 116,7 (C(8)); 111,4 (C(4')); 96,2 (C(3)); 17,2 (Me)
HRMS(EI)	(M ⁺) 295,0946 (C ₁₆ H ₁₃ N ₃ O ₃); израчунато 295,0957 (Δ = -1,1 mmu)
Елементална анализа	израчунато за C ₁₆ H ₁₃ N ₃ O ₃ : C 65,08, H 4,44, N 14,23, O 16,25; нађено: C 65,33, H 4,34, N 14,11, O 16,22

Ознака једињења	[213]
Структурна формула	
Назив једињења	1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(N-метилпирол-2-ил-2-метилен)хидразин
Изглед	прах жуте боје
Тачка топљења	223-225 °C
Принос	83%
IR (KBr)	1030, 1173, 1553, 1605, 1693, 3191, 3283 cm ⁻¹
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ 17,01 (<i>br s</i> , HO-C(4)); 8,26 (<i>s</i> , N=CH); 8,07 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,6, 1,6, H-C(5)); 7,58, (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,4, 7,6, 1,6, H-C(7)); 7,28-7,23 (<i>m</i> , H-C(6/8)); 6,93-6,92 (<i>m</i> , H-C(5')); 6,71 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 4,0, 1,6 H-C(3')); 6,27 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 4,0, 2,4, H-C(4')); 4,00 (<i>s</i> , N-Me) 3,01 (<i>s</i> , Me)
¹³ C-NMR (100,6 MHz, CDCl ₃)	δ 181,2 (C(4)); 171,1 (C=N); 162,4 (C(2)); 153,8 (C(8a)); 146,6 (N=CH); 134,0 (C(7)); 131,0 (C(5')); 126,1 (C(2')); 125,8 (C(5)); 123,7 (C(6)); 120,6 (C(3')); 120,1 (C(4a)); 116,7 (C(8)); 109,9 (C(4')); 96,2 (C(3)); 37,5 (N-Me); 17,7 (Me)
HRMS(EI)	(M ⁺) 309,1121 (C ₁₇ H ₁₅ N ₃ O ₃); израчунато 309,1113 (Δ = +0,8 mmu)
Елементална анализа	израчунато за C ₁₇ H ₁₅ N ₃ O ₃ : C 66,01, H 4,89, N 13,58, O 15,52; нађено: C 66,21, H 4,70, N 13,33, O 15,76

Ознака једињења	[214]
Структурна формула	
Назив једињења	1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(2-хлорпиридин-3-ил-3-метилен)хидразин

Изглед	прах жуте боје
Тачка топљења	230-231 °C
Принос	80%
IR (KBr)	1063, 1152, 1539, 1606, 1697, 2656, 3038 cm ⁻¹
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ 17,12 (<i>br s</i> , HO-C(4)); 8,73 (<i>s</i> , N=CH); 8,53 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 4,8, 2,0, H-C(6')); 8,43, (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0, 2,0, H-C(4')); 8,08 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0, 1,6, H-C(5)); 7,61, (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,0, 7,2, 1,6, H-C(7)); 7,40 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,0, 4,8, 0,8, H-C(5')); 7,29-7,23 (<i>m</i> , H-C(6/8)); 3,10 (<i>s</i> , Me)
¹³ C-NMR (100,6 MHz, CDCl ₃)	δ 182,2 (C(4)); 174,4 (C=N); 162,0 (C(2)); 154,0 (C(8a)); 152,1 (C(6')); 151,6 (C(2')); 149,5 (N=CH); 136,5 (C(4')); 134,8 (C(7)); 127,4 (C(3')); 126,1 (C(5)); 124,0 (C(6)); 123,1 (C(5')); 119,8 (C(4a)); 116,9 (C(8)); 97,2 (C(3)); 17,7 (Me)
HRMS(EI)	(M ⁺) 341,0580 (C ₁₇ H ₁₂ N ₃ O ₃ Cl); израчунато 341,0567 (Δ = +1,3 mmu)
Елементална анализа	израчунато за C ₁₇ H ₁₂ N ₃ O ₃ Cl: C 59,75, H 3,54, N 12,30, O 14,04, Cl 10,37; нађено: C 59,51, H 3,41, N 12,52, O 14,28

Ознака једињења	[215]
Структурна формула	
Назив једињења	1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(индол-3-ил-3-метилен)хидразин
Изглед	прах жуте боје
Тачка топљења	> 300 °C
Принос	87%
IR (KBr)	1026, 1124, 1575, 1603, 1671, 2935, 3153 cm ⁻¹
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 16,53 (<i>br s</i> , HO-C(4)); 12,02 (<i>s</i> , N-H); 8,85 (<i>s</i> , N=CH); 8,18-8,14 (<i>m</i> , H-C(4')); 8,08 (<i>s</i> , H-C(2')); 8,00 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,6, 1,6, H-C(5)); 7,67 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,4, 7,6, 1,6, H-C(7)); 7,55-7,51 (<i>m</i> , H-C(7')); 7,36-7,30 (<i>m</i> , H-C(6/8)); 7,29-7,24 (<i>m</i> , H-C(5'/6')); 3,01 (<i>s</i> , Me)
¹³ C-NMR (100,6 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 179,9 (C(4)); 196,6 (C=N); 162,0 (C(2)); 153,6 (C(8a)); 153,5 (N=CH); 137,8 (C(7a')); 135,4 (C(2')); 134,6 (C(7)); 126,1 (C(5)); 124,4 (C(3a')); 124,3 (C(6)); 123,8 (C(6')); 122,1 (C(4'/5')); 120,4 (C(4a)); 116,8 (C(8)); 112,9 (C(7')); 111,2 (C(3')); 95,5 (C(3)); 17,7 (Me)
HRMS(EI)	(M ⁺) 345,1102 (C ₂₀ H ₁₅ N ₃ O ₃); израчунато 345,1113 (Δ = -1,1 mmu)
Елементална анализа	израчунато за C ₂₀ H ₁₅ N ₃ O ₃ : C 69,56, H 4,38, N 12,16, O 13,90; нађено: C 69,89, H 4,11, N 12,38, O 13,62

Ознака једињења	[216]
Структурна формула	
Назив једињења	1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(хинолин-2-ил-2-метилен)хидразин
Изглед	прах тамно жуте боје
Тачка топљења	> 300 °C
Принос	88%
IR (KBr)	1033, 1164, 1539, 1607, 1695, 3073, 3284 cm ⁻¹
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ 17,14 (<i>br s</i> , HO-C(4)); 8,66 (<i>s</i> , N=CH); 8,27 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,4, H-C(4')); 8,21 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,4, H-C(3')); 8,17 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,4, H-C(8')); 8,12 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0, 1,6, H-C(5)); 7,90 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0, 1,6, H-C(5')); 7,81 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,4, 7,2, 1,6, H-C(7')); 7,66 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,0, 7,2, 1,6, H-C(6')); 7,61 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,4, 7,6, 1,6, H-C(7)); 7,32-7,26 (<i>m</i> , H-C(6/8)); 3,17 (<i>s</i> , Me)
¹³ C-NMR (100.6 MHz, CDCl ₃)	δ 182,2 (C(4)); 174,4 (C=N); 162,2 (C(2)); 155,1 (N=CH); 154,0 (C(8a)); 152,0 (C(2')); 148,2 (C(8a')); 136,8 (C(4')); 134,6 (C(7)); 130,3 (C(7')); 129,9 (C(8')); 128,8 (C(4a')); 128,2 (C(6')); 127,8 (C(5')); 126,3 (C(5)); 123,9 (C(6)); 119,9 (C(4a)); 118,2 (C(3')); 116,8 (C(8)); 97,3 (C(3)); 17,7 (Me)
HRMS(EI)	(M ⁺) 357,1121 (C ₂₁ H ₁₅ N ₃ O ₃); израчунато 357,1113 (Δ = +0,8 mmu)
Елементална анализа	израчунато за C ₂₁ H ₁₅ N ₃ O ₃ : C 70,58, H 4,23, N 11,76, O 13,43; нађено: C 70,32, H 4,48, N 11,42, O 13,78

3.3.4. Синтеза аква-bis(3-ацетил-4-хидрокси-2H-хромен-4-олато-κ²O,O')цинк(II)-монохидрата [217]

У врели раствор 3-ацетил-4-хидрокси-2H-хромен-2-она [60] (1,8 g, 9 mmol) у етанолу (10 ml) додаје се Zn(NO₃)₂·5H₂O (0,85 g, 4,5 mmol). Добијена смеша се потом рефлуктује на уљаном купатилу у трајању од 30 минута, након чега се охлади до собне температуре и остави да растварач лагано испарава. Добијају се безбојни кристали аква-bis(3-ацетил-4-хидрокси-2H-хромен-4-олато-κ²O,O')цинк(II)-монохидрата [217] (принос 81%). Кристалографски подаци, дужине веза и геометрија водоничних веза добијеног једињења дати су у табелама 5, 6 и 7.

Табела 5. Кристалографски подаци једињења [217]

Ознака једињења	[217]
Емпиријска формула	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀ Zn
Молекулска маса	507,73
Боја и облик кристала	Безбојан, плочасти
Величина кристала (mm ³)	0,46 × 0,35 × 0,09
Температура (К)	295(2)
Таласна дужина (Å)	0,71073
Кристални систем	Трициклични
Просторна група	<i>P</i> 1
Димензија јединичне ћелије	
<i>a</i> (Å)	7,9616(3)
<i>b</i> (Å)	9,5386(3)
<i>c</i> (Å)	4,2569(4)
α (°)	81,713(3)
β (°)	82,724(3)
γ (°)	73,103(3)
<i>V</i> (Å ³), запремина јединичне ћелије	1021,03(6)
<i>Z</i> (број молекула по јединичној ћелији)	2
<i>D</i> _{calc} (Mg/m ³), израчуната густина кристала	1,651
Апсорпциони коефицијент (mm ⁻¹)	1,26
<i>F</i> (000)	520
θ опсег за прикупљање података (°)	2,8-26,3
Опсег индекса	<i>h</i> = -9→9, <i>k</i> = -11→11, <i>l</i> = -17→17
Број сакупљене рефлексије	20929
Број независне рефлексије, <i>R</i> _{int}	4157 (0,022)
Подаци/параметри	4157/312
Коначни <i>R</i> ₁ / <i>wR</i> ₂ индекси [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)]	0,0223/0,0603

Табела 6. Дужине веза (Å) једињења [217]

Веза	Дужина	Веза	Дужина
Zn1-O1A	2,0384 (11)	C10A-C11A	1,501 (2)
Zn1-O2A	1,9673 (10)	C11A-H11A	0,9600
Zn1-O2B	1,9811 (11)	C11A-H11B	0,9600
Zn1-O1B	2,0135 (11)	C11A-H11C	0,9600
Zn1-O5	2,0231 (13)	C1B-O4B	1,211 (2)
O5-H51	0,806 (15)	C1B-O3B	1,373 (2)
O5-H52	0,800 (15)	C1B-C2B	1,453 (2)
O6-H61	0,826 (16)	O1B-C10B	1,2517 (18)
O6-H62	0,796 (16)	C2B-C3B	1,418 (2)
C1A-O4A	1,2190 (18)	C2B-C10B	1,446 (2)
C1A-O3A	1,3695 (18)	O2B-C3B	1,2724 (18)
C1A-C2A	1,4456 (19)	C3B-C4B	1,461 (2)
O1A-C10A	1,2486 (18)	O3B-C9B	1,3690 (19)
C2A-C3A	1,427 (2)	C4B-C9B	1,382 (2)
C2A-C10A	1,452 (2)	C4B-C5B	1,400 (2)

O2A–C3A	1,2666 (17)	C5B–C6B	1,366 (2)
C3A–C4A	1,460 (2)	C5B–H5B	0,9300
O3A–C9A	1,3741 (18)	C6B–C7B	1,395 (3)
C4A–C9A	1,382 (2)	C6B–H6B	0,9300
C4A–C5A	1,398 (2)	C7B–C8B	1,374 (3)
C5A–C6A	1,372 (2)	C7B–H7B	0,9300
C5A–H5A	0,9300	C8B–C9B	1,384 (2)
C6A–C7A	1,390 (3)	C8B–H8B	0,9300
C6A–H6A	0,9300	C10B–C11B	1,496 (2)
C7A–C8A	1,375 (2)	C11B–H11D	0,9600
C7A–H7A	0,9300	C11B–H11E	0,9600
C8A–C9A	1,382 (2)	C11B–H11F	0,9600
C8A–H8A	0,9300		

Табела 7. Геометријски параметри водоничних веза (Å, °) једињења [217]

<i>D–H...A</i>	<i>D–H</i>	<i>H...A</i>	<i>D...A</i>	<i>D–H...A</i>
O5–H51...O6	0,81 (1)	1,97 (2)	2,763 (2)	166 (2)
O5–H52...O3A ⁱ	0,80 (1)	2,57 (2)	3,0965 (15)	125 (2)
O5–H52...O4A ⁱ	0,80 (1)	1,97 (2)	2,7615 (16)	174 (2)
O6–H61...O2B	0,83 (1)	2,39 (2)	3,091 (2)	143 (3)
O6–H62...O4B ⁱⁱ	0,80 (1)	2,11 (2)	2,8728 (19)	162 (3)

Симетријски код: (i) -x+2, -y+1, -z+1; (ii) -x+1, -y+1, -z

3.4. Испитивање биолошке/фармаколошке активности синтетисаних азина

3.4.1. Испитивање *in vitro* активности

3.4.1.1. Коришћени микроорганизми

Антимикробна активност синтетисаних азина [200-208] испитана је на четири Грам-позитивна, три Грам-негативна бактеријска соја и две врсте гљива, док су деривати [210-216] испитани према два Грам-позитивна, два Грам-негативна бактеријска соја и једној врсти квасца (табела 8). Сви тестирани микроорганизми припадају Америчкој колекцији култура сојева (ATCC). Бактеријски сојеви су пре тестирања гајени на температури од 37 °C на хранљивом агару (NA), док су гљиве одржаване на 30 °C на Сабуро декстрозном агару (SDA) у лабораторији за микробиологију, Департмана за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Нишу.

Табела 8. Микроорганизми коришћени за тестирања антимикуробне активности једињења [200-208] и [210-216]

Врста микроорганизама	Порекло изолата (АТСС)
Грам-позитивне бактерије	
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538 ^{а,б}
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228 ^а
<i>Bacillus cereus</i>	11778 ^{а,б}
<i>Sarcina lutea</i>	9431 ^а
Грам-негативне бактерије	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027 ^а
<i>Escherichia coli</i>	8739 ^а и 25992 ^б
<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606 ^а
<i>Salmonella enteritidis</i>	13076 ^б
Гљиве	
<i>Candida albicans</i>	10231 ^а и 24433 ^б
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	16404 ^а

^аМикроорганизам коришћен за тестирање активности једињења [200-208]
^бМикроорганизам коришћен за тестирање активности једињења [210-216]

3.4.1.2. Испитивање антимикуробне активности

Антимикуробна активност синтетисаних азина испитивана је бујон микродилуционом методом, серијским разблажењем у бунарићима (96) микротитарских плоча. Након 18 часова култивисања (сојеви бактерија су гајени на Милер Хинтон агару на 37 °С, а гљиве на Сабуро декстрозном агару на 30 °С) суспензије бактерија су припремљене у Милер Хинтон бујону и помоћу дензитометра (*DEN-1*, Biosan) њихов турбидитет је подешен на 0,5 јединица Мекфарландове скале. Основни раствори испитиваних једињења припремљени су у чистом DMSO-у и разблаживани одговарајућим стерилним бујонима (Милер Хинтон и Сабуро декстрозни бујони) у циљу добијања раствора тачно одређене концентрације. Највећа концентрација DMSO-а износила је 10% (v/v) и раније је верификовано да она не утиче на раст и размножавање тестираних микроорганизама. Серијским разблажењем (фактор разблажења 2) испитиваних узорака добијени су раствори у опсегу концентрација 0,005-2,10 mg/ml за једињења [200-208] и 0,0002-2,2 mg/ml за једињења [210-216]. Након припреме раствора, инокулуми су додати у све бунариће, а плоче су затим инкубирани на 37 °С током 24 часа у случају бактерија и на 30 °С током 48 часова у случају гљива. Као позитивне контроле

коришћени су стрептомицин, хлорамфеникол и нистатин. Раст бактерија је одређен додавањем 20 μl 0,5%-ног (w/v) воденог раствора 2,3,5-трифенилтетразолијум-хлорида (ТТС). Минимална инхибиторна концентрација (MIC) дефинисана је као најмања концентрација тестираних једињења која инхибира раст микроорганизама (црвена боја на дну бунарића након додатка ТТС-а омогућава бољу визуелизацију раста испитиваних сојева). Сви урађени експерименти поновљени су два пута у трипликату.

3.4.1.3. Испитивање антиоксидативне активности DPPH методом

Антиоксидативна активност синтетисаних једињења [200-202], [204], [206], [208], [209] и [210-216] испитивана је методом неутрализације DPPH (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил) радикала. Од полазног раствора тестираних једињења [200-202], [204], [206] и [208] концентрације 0,1 mM у метанолу направљена је серија разблажења у опсегу концентрација од 100, 50 и 25 μM , док је за једињења [209] и [210-216] од полазног раствора (1 mM) направљена серија разблажења од 400, 200, 100, 50, 25 и 12,5 μM . Метанолни раствор DPPH (0,1 mM) направљен је непосредно пре саме анализе. Аликвот од 2 ml раствора испитиваних једињења различитих концентрација помешан је са 1 ml раствора DPPH, добијена смеша је добро измешана и инкубирана на собној температури. Након 40 минута мерена је апсорбанца на 517 nm у односу на слепу пробу (која је садржала само метанол). Иста процедура поновљена је за негативну контролу (која није садржала антиоксиданс) и за раствор аскорбинске киселине, која је употребљена за поређење неутрализације DPPH радикала са тестираним једињењима, тј. као позитивна контрола. Сви урађени експерименти поновљени су три пута и израчунате су средње вредности. Активност „хватања“ слободних радикала израчуната је на основу формуле:

$$(\%) \text{ RSC} = \frac{(A_{\text{контрола}} - A_{\text{узорак}})}{A_{\text{контрола}}} \cdot 100$$

(%) RSC – проценат „хватања“ DPPH радикала

$A_{\text{контрола}}$ – средња вредност апсорбанце контрола (1 ml раствора DPPH и 2 ml метанола)

$A_{\text{узорка}}$ – средња вредност апсорбанце узорка за дату концентрацију (1 ml раствора DPPH и 2 ml раствора тестираних једињења)

На основу линеарне регресионе анализе и једначине која се добија као графички приказ зависности процента инхибиције DPPH радикала од концентрације испитиваних једињења израчунате су IC_{50} вредности (μM). Ова вредност дефинисана је као концентрација испитиваних једињења или стандардног антиоксиданса која инхибира 50% почетне концентрације DPPH радикала.

3.4.2. Испитивање *in vivo* активности

3.4.2.1. Испитивање акутне токсичности у моделу рачића *Artemia salina*

Лиофилизоване цисте слановодних рачића *Artemia salina* (око 8 g) суспендоване су у 1 l вештачке морске воде следећег састава: NaCl (23,926 g/l), Na_2SO_4 (4,008 g/l), KCl (0,677 g/l), NaHCO_3 (0,196 g/l), KBr (0,098 g/l), H_3BO_3 (0,026 g/l), NaF (0,003 g/l), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,054 g/l), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,010 g/l), $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g/l). Суспензија је термостатирана на 25 °C, аерисана и константно осветљавана. После 48 часова већина цисти се трансформисала у науплије. Тестирана једињења [200-208] и [210-216] су растворена у диметил-сулфоксиду (DMSO) и разблажена вештачком морском водом, тако да су њихове крајње концентрације износиле 2,00, 0,20 и 0,020 mg/ml, при чему је концентрација DMSO-а била мања од 1% (v/v). Након тога је по 20 излегнутих науплија пребачено у Петријеве шоље које садрже растворе тестираних једињења. Петријеве шоље су држане на собној температури под константним осветљењем и нису аерисане. Рачићи нису храњени током теста. DMSO је представљао негативну контролу, с обзиром да није показао никакав ефекат на рачиће под датим условима. Као позитивна контрола коришћене су различите концентрације натријум-додецилсулфата. Мртви рачићи су бројани након 24 и 48 часова. Резултати су изражени у процентима (%) мртвих рачића након одговарајућег временског периода и као леталне концентрације (LC_{50}) које узрокују смрт 50% рачића. LC_{50} вредности одређене су након статистичке анализе. Сви тестови су рађени у трипликату и

поновљени су два пута.

3.5. Статистичка анализа

За статистичку обраду добијених података коришћен је *GraphPad Prism ver. 7.00* софтверски пакет, а статистичка значајност утврђена је анализом варијансе (ANOVA) са интервалом поверења од 95%. Метода агломеративне хијерархијске кластер анализе (АНК) извршена је помоћу *MS Excel 2013* (plugin *XLSTAT ver. 2013.5*) софтверског пакета, при чему су примењени Пирсонова разлика и Еуклидска удаљеност.

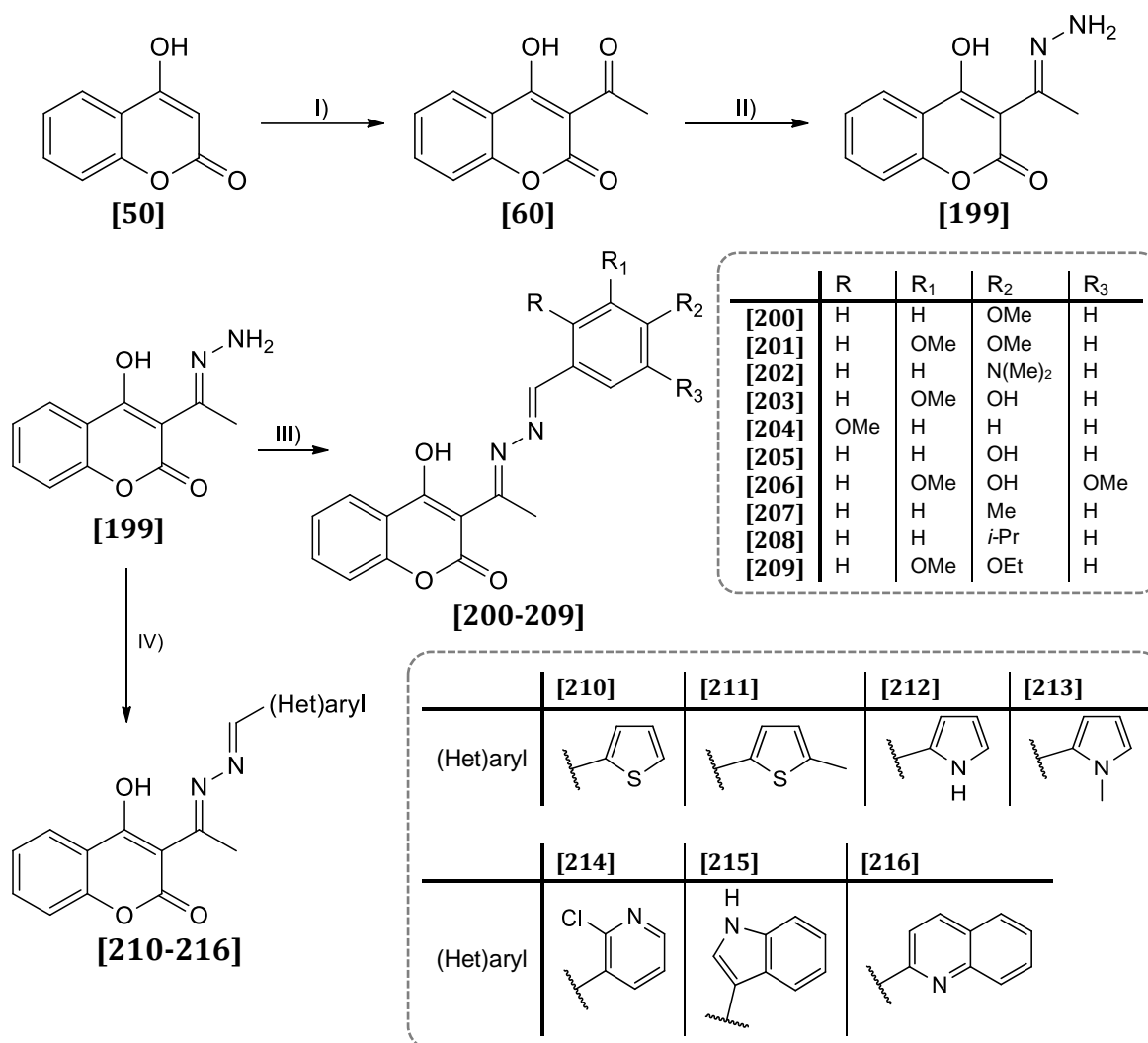
3.6. Молекулско моделовање

Оптимизација геометрије молекула извршена је помоћу *ChemBio3D Ultra 12.0* и *HyperChem 7.0* софтверских пакета.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. Синтеза

Синтеза мешовитих азина остварена је у три реакциона корака полазећи од 4-хидрокси-2*H*-хромен-2-она [50] (шема 28).



I) глацијална АсОН, POCl₃, рефлукс 35 мин.; II) NH₂NH₂·H₂O, MeOH, рефлукс 5 ч.; III) Ar-CHO, апсолутни EtOH, рефлукс 3-4 ч.; IV) (Het)Ar-CHO, апсолутни EtOH, рефлукс 2-3 ч.

Шема 28. Реакциона шема добијања мешовитих азина

Након синтезе 3-ацетил-4-хидрокси-2*H*-хромен-2-она [60] разматрана су два начина за добијање циљних мешовитих азина. Први начин подразумевао је добијање азина у једном кораку, директном кондензацијом свих реактаната, која не подразумева контролу над стварањем међупроизвода (хидразона), док је други начин предвиђао два одвојена корака, при чему би хидразон био изолован и пречишћен, а затим подвргнут реакцији са још једним

еквивалентом карбонилног једињења. Очекивано, први приступ је водио ка смеси производа, која се углавном састојала од симетричног азина (хетеро)арил-алдехида, хидразона 3-ацетил-4-хидрокси-2*H*-хромен-2-она [199] и различитих количина мешовитих азина. Мања реактивност једињења [60], приликом стварања хидразона [199] и изостанак настајања симетричног азина, у поређењу са (електрофилнијим) алдехидима може се објаснити на неколико начина. Смањена нуклеофилност амино-групе у хидразону [199] услед формирања интрамолекулске водоничне везе са водоником хидроксилне-групе у положају 4 кумаринског језгра може успорити настајање азина или условити мању растворљивост насталог хидразона (због интрамолекулске водоничне везе) у реакционом медијуму (о чему сведочи стварање талоба), што би померило равнотежу реакције у смеру грађења производа.

Из поменутог разлога одлучили смо се за приступ у два корака, где су постојале две могуће комбинације, формирање хидразона (хетеро)арил-алдехида или хидразона једињења [60]. Претходно поменути резултати подстакли су нас да одаберемо приступ који укључује хидразон [199], тако да су мешовити азини добијени од пречишћеног хидразона [199] који је кондензован са еквивалентном количином хетероцикличних и карбоцикличних ароматичних алдехида. Такође, анализирали смо и другу комбинацију, реакцију једињења [60] са хидразоном (хетеро)арил-алдехида и утврдили да она даје знатно ниже приносе жељених производа који су били контаминирани симетричним азинима алдехида.

Потврда структуре синтетисаних једињења вршена је комбиновањем 1D (¹H- и ¹³C-NMR, укључујући DEPT 90/135 и ¹H спектре са хомонуклеарним декуполовањем) и 2D (¹H-¹H COSY, NOESY/ROESY, HSQC и HMBC) NMR, HRMS(EI) и FTIR спектралних података, као и елементалном анализом.

4.1.1. Синтеза 3-ацетил-4-хидрокси-2*H*-хромен-2-она [60]

Полазећи од 4-хидрокси-2*H*-хромен-2-она [50] реакцијом ацетиловања глацијалном сирћетном киселином у присуству POCl₃ добијен је 3-ацетил-4-хидрокси-2*H*-хромен-2-он [60]. Реакција се изводи уз загревање на уљаном

купатилу, након чега се раствор хлади на собну температуру или ледом. Захваљујући својим електрон-донорским особинама хидроксилна-група у положају 4 кумаринског језгра доводи до прерасподеле наелектрисања у молекулу, и повећања нуклеофилности угљеника у положају 3. Реакцијом ацетиловања у контролисаним условима као главни производ настаје 3-ацетил-4-хидрокси-2*H*-хромен-2-он [60]. Прекристализација насталог производа врши се из етанола, а структура је потврђена упоређивањем спектралних података са подацима доступним из литературе, као и упоређивањем тачке топљења (Sukdolak *et al.*, 2004).

4.1.2. Синтеза и спектрална карактеризација 3-(1-хидразоноетил)-4-хидрокси-2*H*-хромен-2-она [199]

Оптимални услови за синтезу 3-(1-хидразоноетил)-4-хидрокси-2*H*-хромен-2-она [199] остварени су реакцијом 3-ацетил-4-хидрокси-2*H*-хромен-2-она [60] са хидразин-хидратом у еквимоларном односу. Реакција је извођена рефлуковањем смеше у метанолу у трајању од 5 часова. Механизам ове реакције заснива се на нуклеофилној адицији хидразина на карбонилни угљеник ацетил-групе кумарина. За синтетисани хидразон [199] у литератури не постоје спектрални подаци.

Масеном спектрометријом високе резолуције, HRMS(EI), потврђена је молекулска формула $C_{11}H_{10}N_2O_3$ ($(M^+) m/z$ 218,0673, $\Delta = -1,8$ mmu) једињења [199]. IR спектар овог једињења показује апсорпциону траку на 3458 cm^{-1} која одговара интрамолекулској водоничној вези ОН-групе, док NH_2 -група даје две карактеристичне траке на 3281 и 3190 cm^{-1} . Резонанције $C=O$ и $C=C$ веза јављају се на 1688 и 1605 cm^{-1} , док трака на 1552 cm^{-1} потиче од $C=N$ везе.

У циљу потврде структуре синтетисаног једињења потпуна асигнација сигнала из 1H - и ^{13}C -NMR спектра (табела 9) остварена је помоћу 2D NMR спектралних података (прилози 4-6). У 1H -NMR спектру овог једињења налази се седам сигнала. Резонанције које се јављају као дублети дублета на $7,31$ и $7,94$ ppm, као и дублет дублета дублета на $7,60$ ppm и триплет дублета на $7,34$ ppm одговарају метинским протонима кумаринског језгра. Потпуна асигнација ових протона извршена је полазећи од њихових NOESY и HMBC

корелација (слика 35). Очекивано је да протони чији се сигнали јављају као дублети дублета буду у положајима Н-5 и Н-8, због купловања са по једним суседним и једним удаљеним (*meta*) протоном. Анализом поменутих корелација закључује се да протон са померањем од 7,94 ppm је у положају 5 и да у НМВС-спектру показује интеракције са непротонованим угљеницима С-4 (178,3) и С-8а (153,4). Истовремено Н-8 има померање од 7,31 ppm и кроз три хемијске везе показује корелацију са С-4а (120,7), а кроз две везе са С-8а (153,4) (слика 35). Из претходног се такође може закључити да сигнал на 133,8 ppm, са којим Н-5 показује корелацију у истом спектру, одговара метинском угљенику С-7. Овим се истовремено, на основу HSQC-спектра, асигнира и Н-7 (прилог 4). Облик и интеграл сигнала Н-7 слаже се са његовим положајем у молекулу, јер се он куплује са два суседна протона (Н-6 и Н-8) и једним удаљеним (Н-5). Аналогно, корелација Н-8 са угљеником на 123,9 ppm одређује С-6, а самим тим и Н-6 (7,34 ppm) (HSQC). Асигнација угљеника С-4 и С-8а потврђена је, такође, на основу НМВС-интеракција Н-6 са С-4а и Н-7 са С-8а.

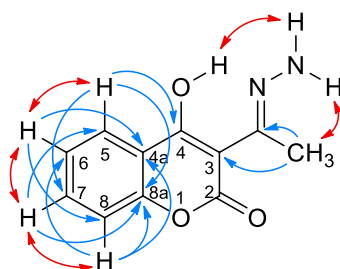
Табела 9. ^1H - (400 MHz) и ^{13}C - (100,6 MHz) NMR спектрални подаци и уочене NOESY и НМВС интеракције синтетисаног хидразона [199]

Положај	$\delta ^1\text{H}$ (ppm)	Мулт.	Инт.	J (Hz)	$\delta ^{13}\text{C}$ (ppm)	NOESY ($^1\text{H} \leftrightarrow ^1\text{H}$)	НМВС ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
2	–	–	–	–	162,2	–	–
3	–	–	–	–	94,1	–	–
4	–	–	–	–	178,3	–	–
4a	–	–	–	–	120,7	–	–
5	7,94	dd	1H	8,0, 1,6	125,8	6	4, 7, 8a
6	7,34	td	1H	8,0, 0,8	123,9	5, 7	4a, 8
7	7,60	ddd	1H	8,4, 8,0, 1,6	133,8	6, 8	5, 8a
8	7,25	dd	1H	8,4, 0,8	116,6	7	4a, 6, 8a
8a	–	–	–	–	153,4	–	–
ОН	15,17	br s	1H	–	–	NH ₂	–
С=N	–	–	–	–	166,4	–	–
Me	2,64	s	3H	–	16,5	NH ₂	3, C=N
NH ₂	6,16	br s	2H	–	–	CH ₃	–

Скраћенице: Мулт. – мултиплет; Инт. – интеграл; dd – дублет дублета; ddd – дублет дублета дублета; td – триплет дублета; s – синглет; br s – широки синглет.

Преостала три сигнала у ^1H -NMR спектру јављају се са хемијским померањем од 15,17, 6,16 и 2,64 ppm. Највеће хемијско померање од 15,17 ppm

које се јавља као широки синглет приписано је протону ОН-групе, који у NOESY спектру показује интеракцију (хемијска измена) са широким синглетом на 6,16 ppm. Како овом сигналу одговара интеграл од два протона, јасно је да он потиче од водоникових атома NH₂-групе. Истовремено ови протони у NOESY спектру показују интеракцију (диполарно купловање) са последњим преосталим сигналом из ¹H-NMR спектра, који се као синглет јавља на 2,64 ppm и додељен је протонима метил групе. У HMBC спектру протони метил-групе показују интеракцију, кроз три хемијске везе, са угљеником C-3 (94,1 ppm), док кроз две везе са сигналом на 166,4 ppm, који је асигниран као угљеник имино-групе (C=N). Једини неасигнирани сигнал у ¹³C-NMR спектру, који не показује корелације у HSQC и HMBC спектрима, са померањем од 162,2 ppm, додељен је преосталом угљенику у положају 2 кумаринског језгра. Поређење ове вредности померања са вредношћу аналогних сигнала у сродним једињењима потврдило је ову претпоставку (Dekić *et al.*, 2010).



Слика 35. Уочене NOESY (↔) и HMBC (H → C) корелације у молекулу 3-(1-хидразоноетил)-4-хидрокси-2H-хромен-2-она [199]

4.1.3. Синтеза и спектрална карактеризација мешовитих азина

4.1.3.1. Азини добијени из ароматичних алдехида [200-209]

Реакцијом кондензације 3-(1-хидразоноетил)-4-хидрокси-2H-хромен-2-она [199] са одговарајућим ароматичним алдехидима добијени су циљни азини [200-209]. Реакција се изводи рефлуктовањем у кључалом апсолутном етанолу у трајању од 3 до 4 часа. Механизам реакције заснива се на адицији амино-групе хидразона на карбонилни угљеников атом алдехида. Осам добијених азинских деривата [200] и [203-209] представљају нова једињења, док су [201] и [202] претходно синтетисани (Abdel Latif *et al.*, 2016), али су

њихови објављени NMR подаци непотпуни. Осим протонских, овде су представљени и ^{13}C - и 2D NMR спектри ових једињења, тако да су она по први пут у потпуности спектрално окарактерисана. У наставку је приказана детаљна асигнација спектра два одабрана једињења из ове групе азинкумаринских хибрида, док је за остала једињења дат сумарни приказ 1D и 2D NMR спектралних података и интеракција.

4.1.3.1.1. Спектрална карактеризација 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метоксибензилиден)хидразина [200]

У реакцији између 3-(1-хидразоноетил)-4-хидрокси-2H-хромен-2-она [199] и 4-метоксибензалдехида добијен је 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метоксибензилиден)хидразин [200].

Резултати добијени масеном спектрометријом високе резолуције (HRMS(EI)) потврђују претпостављену структуру једињења са молекулском формулом $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$ ($(\text{M}^+) m/z$ 336,1121, израчунато 336,1110 ($\Delta = +1,1$ mmu)). IR спектар азина [200] показује оштру апсорпциону траку на 3434 cm^{-1} која одговара OH-групи и вибрације Ar-H везе на 3085 cm^{-1} . Јака апсорпција на 1697 cm^{-1} могла би се приписати лактонској C=O групи кумаринског језгра. IR спектар такође показује интензивне вибрације на 1602, 1568 и 1170 cm^{-1} , које су проистекле присуством C=C, C=N и C-O веза.

^1H -NMR спектар једињења [200] састоји се од десет сигнала, од којих је шест са хемијским померањем карактеристичним за метинске протоне на ароматичном језгру (табела 10). На основу информација добијених из ^1H - ^1H COSY и NOESY спектра (прилог 12), као и на основу оптимизације геометрије молекула са минимализованом енергијом помоћу MM2 модела (слика 36), ови сигнали се могу раздвојити у две групе. Прва група обухвата два мултиплета вишег реда (AA'BB') на хемијском померању од 7,06-7,11 и 7,81-7,86 ppm који потичу од *para*-супституисаног ароматичног језгра (један електрон-донорски и један електрон-акцепторски супституент). Друга група представља спински систем са четири резонанције које припадају *ortho*-дисупституисаном (кондензованом) бензенском прстену са две групе дублета дублета на 7,98 и 7,31 ppm, једним дублетом дублета дублета (7,68 ppm) и једним триплетом

дублета на 7,34 ppm. Интеграљењем сигнала потврђено је да се обе групе састоје од по четири протона. На основу HSQC и HMBC спектралних података (прилози 10 и 11) и структуре једињења [200], две поменуте групе сигнала се лако могу доделити протонима фенил-групе из почетног бензалдехида (*para*-супституисани) и кумаринском језгру (група са четири спина). Асигнирање ових сигнала извршено је на основу HSQC и HMBC корелација и додатно потврђено присуством вициналних и даљинских купловања.

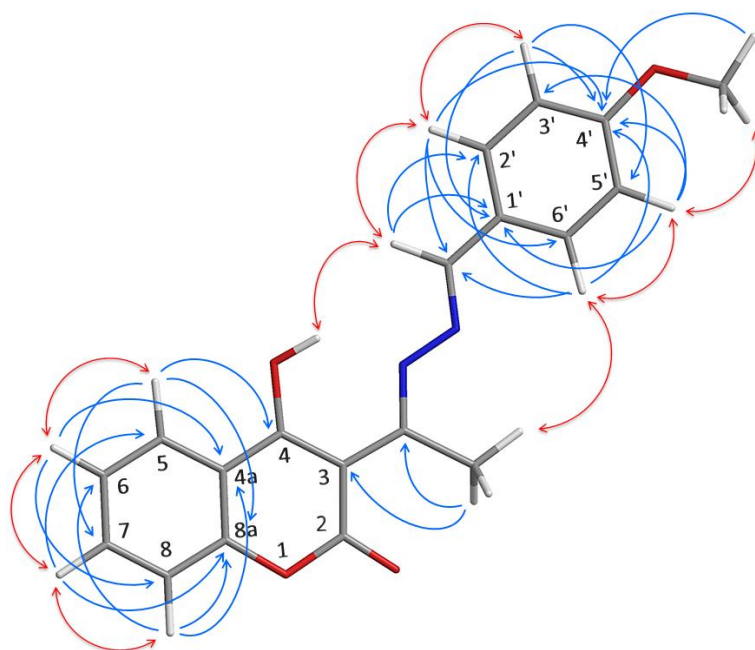
Табела 10. ^1H - (400 MHz) и ^{13}C - (100,6 MHz) NMR спектрални подаци и уочене NOESY и HMBC интеракције синтетисаног азина [200]

Положај	$\delta ^1\text{H}$ (ppm)	Мулти.	Инт.	J (Hz)	$\delta ^{13}\text{C}$ (ppm)	NOESY ($^1\text{H}\leftrightarrow^1\text{H}$)	HMBC ($^1\text{H}\rightarrow^{13}\text{C}$)
2	–	–	–	–	161,9	–	–
3	–	–	–	–	95,9	–	–
4	–	–	–	–	180,4	–	–
4a	–	–	–	–	120,2	–	–
5	7,98	dd	1H	8,0, 1,6	126,1	6	4, 7, 8a
6	7,34	td	1H	8,0, 0,8	124,4	5, 7	4a, 8
7	7,68	ddd	1H	8,8, 8,0, 1,6	134,9	6, 8	5, 8a
8	7,31	dd	1H	8,8, 0,8	116,9	7	4a, 6, 8a
8a	–	–	–	–	153,7	–	–
OH	16,44	br s	1H	–	–	N=CH	–
C=N	–	–	–	–	171,9	–	–
Me	2,95	s	3H	–	17,8	2'/6'	3, C=N
N=CH	8,71	s	1H	–	156,8	OH, 2'/6'	1', 2'/6'
1'	–	–	–	–	125,7	–	–
2'/6'	7,81-7,86	m	2H	–	130,9	Me, N=CH, 3'/5'	N=CH, 4', 2'/6'
3'/5'	7,06-7,11	m	2H	–	115,1	2'/6', OMe	1', 4', 3'/5'
4'	–	–	–	–	162,8	–	–
4'-OMe	3,84	s	3H	–	55,9	3'/5'	4'

Скраћенице: Мулт. – мултиплет; Инт. – интеграл; dd – дублет дублета; ddd – дублет дублета дублета; td – триплет дублета; s – синглет; br s – широки синглет, m – мултиплет

Сигнал на хемијском померању од 7,98 ppm у ^1H -NMR спектру додељен је протону у положају 5 кумаринског језгра, пошто је кроз три везе показао корелацију са два непротонована угљеника на 180,4 (C-4) и 153,7 (C-8a) ppm, као и са једним метинским угљеником (C-7) са померањем од 134,9 ppm (слика 36). Занимљиво је приметити да преостали дублет дублета на 7,32 ppm (H-8), поред тога што показује корелације кроз три везе са C-6 (124,4 ppm) и C-4a (120,2 ppm), куплује се и кроз две везе са непротонованим угљеником C-8a

(153,7 ppm) као што је претходно забележено у сродним кумаринским системима (Dekić *et al.*, 2010). Два протонска сигнала на вишем пољу, 2,95 и 3,84 ppm (интеграли од по три протона), одговарају заштићенијим протонима метил- и метокси-групе. NOESY корелација сигнала на 3,84 ppm са мултиплетом на 7,06-7,11 ppm асигнирала је протоне метокси-групе, као и протоне на положају 3'/5'. Истовремено, протони на положају 3'/5' у NOESY спектру показују интеракције са сигналом на 7,81-7,86 ppm који се приписује протонима 2'/6'.



Слика 36. Оптимизована геометрија (MM2) и уочене NOESY (↔) и HMBC (H → C) интеракције за 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метоксибензилиден)хидразин [200]

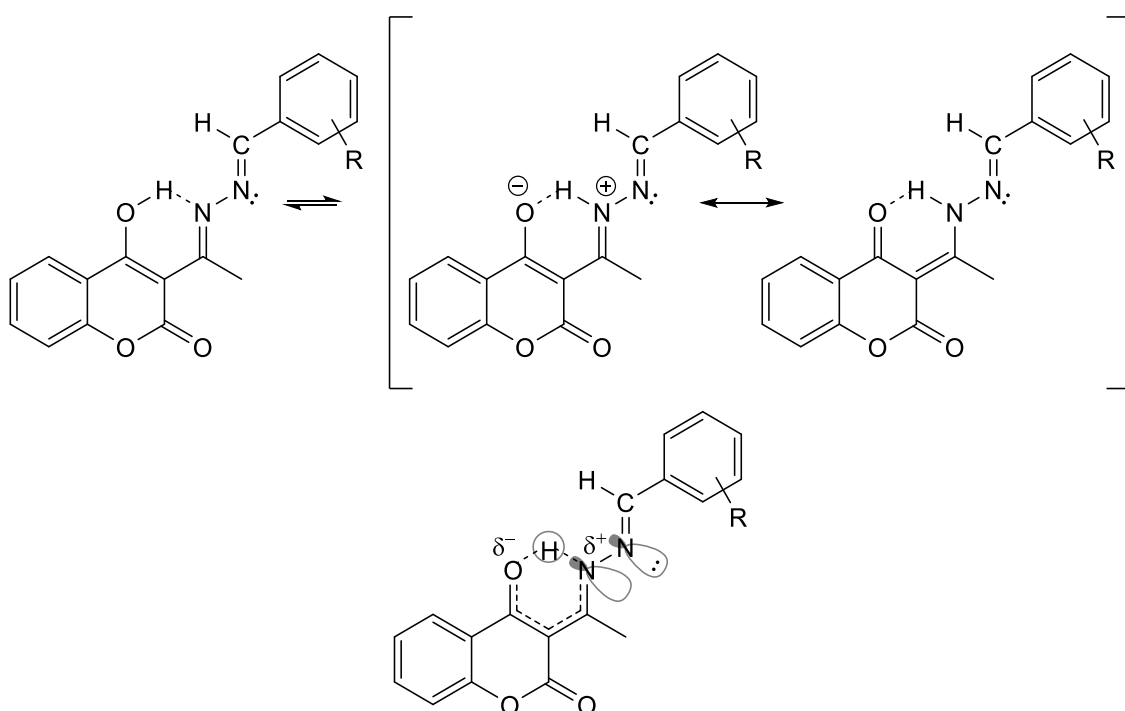
Хемијска померања атома угљеника за који су везани горе поменути протони могу се лако одредити из HSQC-спектра (C-2'/6' на 130,9 ppm, C-3'/5' на 115,1 ppm и угљеник метокси групе на померању од 55,9 ppm). Синглет који се јавља на 8,71 ppm додељен је протону N=CH (део азинског моста) који у HMBC-спектру, кроз три хемијске везе показује интеракцију са угљеницима на положају C-2'/6', и карактеристичну интеракцију кроз две везе са сигналом на 125,7 ppm чиме се асигнира C-1'. HMBC-корелације H-3'/5' са сигнаlima на 125,7 и 162,8 ppm, као и истовремене интеракција H-2'/6' и метокси-протона

са сигналом на 162,8 ppm асигнирају C-1' и C-4', редом. Протони метил-групе кроз три везе показују интеракцију са угљеником у положају 3 (95,9 ppm) кумаринског језгра и кроз две везе са сигналом на 171,9 ppm који је додељен угљениковом атому имино групе ($\text{MeC}=\text{N}$). Једини преостали неасигнирани сигнал у ^{13}C -NMR спектру на 161,9 ppm, који није показао ниједну интеракцију у НМВС спектру, додељен је угљенику C-2, као што је и био случај са претходно добијеним хидразоном [199].

Најнезаштићенији сигнал у ^1H -NMR спектру који се јавља на 16,44 ppm асигниран је као протон ОН-групе у положају 4 кумаринског језгра. Овај сигнал у NOESY спектру показује cross-peak са протоном азометинске-групе на 8,71 ppm (хемијска измена). Ова корелација потврђује постојање дииминског моста између кумаринског језгра и арил дела молекула. Додатно, протон азометинске-групе у поменутом спектру показује корелацију са H-2'/6' (диполарно спрезање).

Сигнал ОН-групе показује резонанцију на знатно нижем пољу (изнад 16 ppm) у поређењу са интрамолекулски водонично везаном фенолном групом (10-12 ppm) код сличних азина или хидразону салицилалдехида (Cordier *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2017). Ово би се могло протумачити као постојање изузетно јаке интрамолекулске водоничне везе која целокупном молекулу даје цвитерјонски карактер ($\text{R}-\text{O}-\text{H}^+ \text{NR}'\text{R}''$), а која се граничи са другим могућим таутомером (кетон-енамин). Померање угљеника C-4 (180,4 ppm) за који је везана ОН-група се такође слаже са овим тумачењем. Поменута кључна NOESY-интерекција између протона ОН-групе и $\text{HC}=\text{N}$ је једино могућа само ако је конформација тог дела молекула близу планарности, нпр. када је ОН-група најближа и *sin* са водоником из $\text{HC}=\text{N}$ фрагмента. Овакав распоред доводи метил-групу ($\text{MeC}=\text{N}$) у непосредну близину *ortho*-водоника (H-2'/6') фенилног језгра полазног алдехида, што резултира планарном *s-trans* конформацијом азинске јединице. Ротација око $\text{N}=\text{CH}-\text{C}^{\text{Ar}}$ једноструке везе искључује арил-групу из продужене коњугације добијеног планарног азин-кумаринског хибрида. Ово омогућава да кумарински прстен и арил-супституент не леже у истој равни и да међусобно граде одређени торзиони угао. Утврђено је да многи азини нису планарни, већ

да постоје у гош конформацији, која се јавља као последица неповољног одбијања (4 електрона) слободних електронских парова на два суседна атома азота. У случају нашег једињења, као и у случају азина салицилалдехида (Tang *et al.*, 2009) ова одбојна интеракција или не постоји, или је конвертована у неку другу, приликом грађења веома јаке интрамолекулске водоничне везе, а која мења поларност (природу) слободних електронских парова (слика 37). Ово се може замислити као повољна орбитална интеракција аномерног типа, у конкретном случају са антиперипланарном $n_{\text{N}} \rightarrow \sigma^*_{\text{N-H}}$ интеракцијом, као што је и приказано.



Слика 37. Структуре могуће таутомерне равнотеже која постоји за азин-кумаринске хибриде [200-209] и квалитативни приказ орбиталне интеракције која доводи до *s-trans* конформације планарне азинске јединице

4.1.3.1.2. Спектрална карактеризација 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-етокси-3-метоксибензилиден) хидразина [209]

Реакцијом 3-(1-хидразоноетил)-4-хидрокси-2*H*-хромен-2-она [199] са 4-етокси-3-метоксибензалдехидом синтетисан је 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-етокси-3-метоксибензилиден)хидразин [209].

Масеном спектрометријом високе резолуције одређена је молекулска маса за 1,2 mти већа од израчунате вредности за предпостављену структуру (HRMS(EI)): $C_{21}H_{20}N_2O_5$ ((M^+) m/z 380,1384, израчунато 380,1372). IR спектар такође потврђује структуру једињења [209]. Апсорпциона трака која одговара ОН-групи јавља се на 3389 cm^{-1} . Карактеристична вибрација на 3092 cm^{-1} потиче од Аг–Н, док се трака коњуговане карбонилне групе јавља на 1697 cm^{-1} . Траке на 1601 и 1555 cm^{-1} одговарају С=С и С=Н вибрацијама, редом.

У ^1H -NMR спектру једињења [209] налази се седам сигнала са хемијским померањима карактеристичним за метинске протоне ароматичних једињења од којих се три јављају као дублети, два као дублети дублета и два као дублети дублета дублета (табела 11).

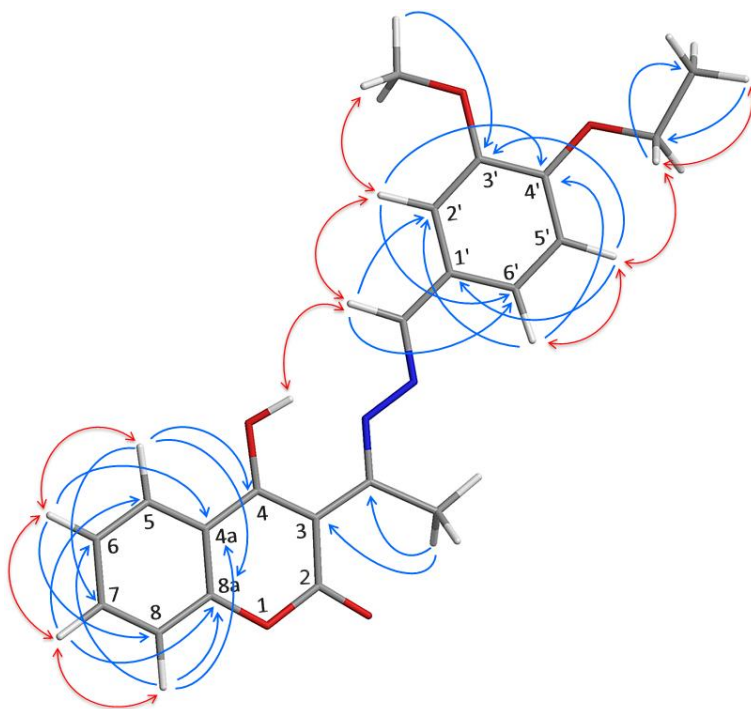
Табела 11. ^1H - (400 MHz) и ^{13}C - (100,6 MHz) NMR спектрални подаци и уочене NOESY и HMBC интеракције синтетисаног азина [209]

Положај	$\delta^{1\text{H}}$ (ppm)	Мулти.	Инт.	J (Hz)	$\delta^{13\text{C}}$ (ppm)	NOESY ($^1\text{H} \leftrightarrow ^1\text{H}$)	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
2	–	–	–	–	161,3	–	–
3	–	–	–	–	94,1	–	–
4	–	–	–	–	178,3	–	–
4a	–	–	–	–	120,7	–	–
5	7,95	dd	1H	7,2, 1,6	125,8	6	7, 4, 8a
6	7,29	ddd	1H	8,4, 7,2, 0,8	123,9	5, 7	4a, 8
7	7,61	ddd	1H	8,4, 7,2, 1,6	133,8	6, 8	5, 8a
8	7,25	dd	1H	8,4, 0,8	116,6	7	4a, 6, 8a
8a	–	–	–	–	153,4	–	–
ОН	16,39	br s	1H	–	–	N=C <u>H</u>	–
C=N	–	–	–	–	171,8	–	–
Me	2,96	s	3H	–	17,9	–	3, N=C
N=CH	8,68	s	1H	–	157,1	2', ОН	2', 6'
1'	–	–	–	–	126,1	–	–
2'	7,48	d	1H	1,6	109,7	N=C <u>H</u> , 3'- O <u>C</u> H ₃	4', 6'
3'	–	–	–	–	149,6	–	–
3'-OMe	3,85	s	3H	–	55,9	2'	3'
4'	–	–	–	–	152,1	–	–
4'-O <u>C</u> H ₂ CH ₃	4,11	q	2H	6,8	64,4	5', 4'-O <u>C</u> H ₂ <u>C</u> H ₃	4'- O <u>C</u> H ₂ <u>C</u> H ₃
4'-O <u>C</u> H ₂ <u>C</u> H ₃	1,37	t	3H	6,8	15,0	4'-O <u>C</u> H ₂ <u>C</u> H ₃	4'- O <u>C</u> H ₂ <u>C</u> H ₃
5'	7,10	d	1H	8,2	112,8	6', 4'-O <u>C</u> H ₂ <u>C</u> H ₃	1', 3'
6'	7,41	d	1H	8,2	124,7	5'	2', 4'

Скраћенице: Мулт. – мултиплет; Инт. – интеграл; d – дублет; dd – дублет дублета; ddd – дублет дублета дублета; q – квартет; t – триплет; s – синглет; br s – широки синглет.

Ван дијагонални сигнали у NOESY спектру издвајају се у две групе од три и четири сигнала (прилог 66), односно протона везаних за кумарински прстен и арил-супституент. Три сигнала, који се јављају као дублети са хемијским померањем од 7,48, 7,41 и 7,10 ppm, чине прву групу протона, док се друга састоји од два дублета дублета (7,95 и 7,25 ppm) и два дублета дублета дублета (7,61 и 7,29 ppm). Оптимизација геометрије једињења [209] и уочене NOESY- и HMBC-интеракције приказане су на слици 38.

На основу NOESY, HMBC и HSQC спектралних података могуће је одредити која група протона је везана за прстен кумарина, а која за арил-супституент. На основу облика сигнала и њихових интеграла може се закључити да друга група протона, од четири сигнала, припада кумаринском делу молекула. Хемијска померања од 7,95 и 7,25 ppm која се јављају као дублети дублета, асигнирани су као протони H-5 и H-8, при чему се куплују са по једним вициналним и једним удаљеним (*meta*) протоном (H-5 са H-6 ($J = 7,2$ Hz) и H-7 ($J = 1,6$ Hz); H-8 са H-7 ($J = 8,4$ Hz) и H-6 ($J = 0,8$ Hz)).



Слика 38. Уочене NOESY (↔) и HMBC (H → C) интеракције, оптимизоване геометрије једињења 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-етокси-3-метоксибензилиден)хидразина [209]

Протон у положају 5 кумаринског језгра у НМВС спектру, кроз три везе, показује корелацију са непротонованим угљениковим атомима C-4 (178,3 ppm) и C-8a (153,4 ppm). Кроспик протона H-5 са сигналом на 133,8 ppm асигнира угљеник C-7, при чему се истовремено асигнира и H-7 као сигнал на 7,61 ppm, а на основу HSQC-спектра (прилог 64). Аналогно овоме, протон H-8 у НМВС-спектру показује интеракцију са сигналом на 120,7 ppm који одговара угљенику C-4a и сигналом на 123,9 ppm чиме се асигнира угљеник у положају 6, односно протон H-6 на 7,29 ppm (на основу HSQC спектра). Уочена је и карактеристична интеракција кроз две везе протона H-8 и непротонованог угљеника C-8a (153,4 ppm), (слика 38). Такође, асигнацију угљеника C-4a и C-8a потврђује и њихова интеракција (НМВС спектар) са H-6 и H-7. Синглет који се у $^1\text{H-NMR}$ спектру јавља на 2,96 ppm (интеграл од три протона) додељен је протонима метил-групе која је везана за C=N. Поменути протони кроз три везе у НМВС спектру асигнирају угљеник C-3 (94,1 ppm) и кроз две везе угљеник имино-групе $\text{MeC}=\text{N}$ (171,8 ppm). Највеће хемијско померање у $^1\text{H-NMR}$ спектру на 16,39 ppm, које се јавља као широки синглет, додељено је протону ОН-групе у положају 4.

Друга група сигнала, коју чине ароматични протони арил-супституента, састоји се од три дублета, са вредностима хемијских померања од 7,48, 7,41 и 7,10 ppm, што је у сагласности са структуром, имајући у виду да потичу од три хемијски нееквивалентна протона. Сигнал на 7,48 ppm асигниран је као H-2', јер у NOESY спектру показује интеракцију са синглетом на 3,85 ppm, коме одговара интеграл од три протона, а то једино може бити метокси-група у суседном положају 3'. Аналогно овоме, сигнал на 7,10 ppm додељен је протону у положају 5', јер у истом спектру показује интеракцију са квартетом (интеграл од два протона) који се у $^1\text{H-NMR}$ спектру јавља на 4,11 ppm и одговара метиленским протонима етокси-групе на положају 4'. Истовремено, метиленски протони показују и корелацију са метил-протонима поменуте групе који се јављају на 1,37 ppm. Додатно, протон H-5' куплује се са вициналним протоном H-6' ($J = 8,2 \text{ Hz}$) на померању од 7,41 ppm, чиме је завршена асигнација свих протона на арил-супституенту. На основу HSQC-спектралних података одређена су и хемијска померања одговарајућих

угљеника везаних директно за све горе наведене протоне. Овакву асигнацију поменутих протона и угљеника такође потврђују и одговарајуће НМВС-корелације. Положај непротонованог угљеника C-1' (126,1 ppm) одређен је на основу НМВС-корелације са протоном Н-5', кроз три везе, док је асигнација C-4' (152,1 ppm) потврђена интеракцијом са Н-2' и Н-6' на аналоган начин.

Једини преостали сигнал у ^1H -NMR спектру на 8,68 ppm, који се јавља као синглет, у NOESY спектру показује интеракцију са ОН-групом и асигниран је као протон азометинске групе (N=CH). Поменута корелација указује да је дошло до формирања дииминског моста између арил и кумаринског дела молекула. Истовремено овај протон у истом спектру показује и кроспик са Н-2' са стране арил-супституента. У НМВС спектру, кроз три везе, протон азометинске групе показује корелацију са угљениковим атомима C-2' и C-6'. Лактонском карбонилу C-2, једином преосталом неасигнираном угљенику са стране кумаринског језгра који не показује интеракције у 2D NMR спектрима, одговара сигнал на 161,3 ppm, базирано на подацима осталих, горе асигнираних једињења.

На сличан, горе описан начин, асигнирани су спектри преосталих синтетисаних азина [201-208].

4.1.3.1.3. NMR спектрална карактеризација азина [201-208]

Сумарни преглед 1D (^1H - и ^{13}C -) и 2D (NOESY и НМВС) NMR спектралних података за синтетисане азине [201-208] приказан је у табелама 12-15, док се спектри наведених једињења, укључујући IR и HSQC, налазе у прилогу (прилози 13-60). Као што је и очекивано, сигнали протона из кумаринског спинског система имају скоро идентична хемијска померања у спектрима код свих азина [201-208]. Ароматични протони кумаринског фрагмента у ^1H -NMR спектру имају хемијска померања у интервалу од 7,22 до 8,07 ppm. Сигнали протона Н-5 код једињења [201-208] имају облик дублета дублета и налазе се у области 7,92-8,07 ppm са константама купловања од 7,2 до 7,6 Hz за вицинално и 1,6-2,0 Hz за *meta* купловање. Тренд сличан овоме показали су и протони Н-7, дајући дублете дублета дублета у свим синтетисаним азинима у области 7,56-7,69 ppm ($J = 8,0-8,8$; 7,2-7,6 и 1,6-2,0 Hz за вицинална и даљинско

купловање, редом). Карактеристично за протоне у положајима 6 и 8 кумаринског језгра код једињења [201-203] и [207] је да се јављају као мултиплети на вредностима δ од 7,23 до 7,39 ppm, који настају као резултат преклапања њихових сигнала, као и преклапања са сигнаlima протона арил-супституента. Због тога није било могуће одредити константе купловања за ове мултиплете код наведених једињења. Са друге стране, код једињења [204], [205] и [208] протони H-6 дају триплете дублета у области 7,29-7,34 ppm са константама купловања од 0,8 Hz за даљинско и 7,6 Hz за вицинална купловања, док H-8 дају дублете дублета (δ 7,25-7,31 ppm, $J = 0,8$ и 8,4 Hz). Код свих једињења карактеристичан је широки синглет на највишем хемијском померању у области 16,39-16,45 ppm који потиче од интрамолекулски водонично везаног протона OH-групе. Сигнал који потиче од протона метил-групе везане за угљеник имино-групе код свих једињења јавља се у облику синглета са померањем у области од 2,80 до 2,98 ppm. Хемијско померање протона азометинске групе (N=CH) у случају свих азина је у опсегу 8,23-8,83 ppm и јавља се као синглет.

Хемијска померања сигнала протона ароматичног језга фенил-супституента су у области од 6,90 до 7,82 ppm, што је скоро исто, односно за нијансу мање у поређењу са ароматичним протонима кумаринског језгра, посматрајући у целини све азине [201-208]. Овакво померање фенилних протона ка мало вишем пољу је очекивано с обзиром да бензенов прстен у коришћеним алдехидима садржи углавном по једну или више електрон-донорских група. Оно што је карактеристично је да сигнали хемијски еквивалентних протона *p*-супституисаног фенил-језгра код једињења [202], [205], [207] и [208] дају две групе мултиплета вишег реда (AA'BB'). Прва група припада *o*-протонима са већим хемијским померањем у области од 7,63 до 7,82 ppm, док друга група припада *m*-протонима у опсегу 6,68-7,43 ppm. Протони метокси-група код једињења [201], [203], [204] и [206] дају синглете у области од 3,81 до 3,93 ppm, док је код једињења [208] карактеристичан дублет на најмањем хемијском померању од 1,23 ppm који потиче од метил-група изопропил супституента бензеновог сегмента, са константом купловања од 6,8 Hz. Сигнал који се код једињења [203], [205] и [206] јавља

у облику синглета са вредностима померања од 9,30 до 10,31 ppm потиче од протона ОН-групе која се налази у *p*-положају бензеновог језгра супституента.

У ^{13}C -NMR спектрима свих азина [201-208] на највишем хемијском померању налази се сигнал угљеника С-4 са кумаринског језгра у области од 180,3 до 181,1 ppm. На нижим вредностима померања налазе се сигнали угљеника имино-групе (N=C) у опсегу 171,2-172,4 ppm, док се сигнали угљеника азометинске-групе (N=CH) налазе у интервалу од 151,9 до 157,2 ppm. Сигнали непротонованих угљеникових атома С-4а и С-8а налазе се у области померања од 120,1 до 120,3 и 153,6-153,8 ppm. Лактонском карбонилу С-2 одговарају сигнали у опсегу 161,8-162,4 ppm код свих једињења, док угљенику С-3 сигнали од 95,8 до 96,1 ppm. Протоновани угљеникови атоми кумаринског језгра дају сигнале у опсегу померања од 116,6 до 135,0 ppm. С обзиром да је за бензенов прстен супституента везана једна или више разичитих група, сигнали угљеникових атома бензеновог прстена имају широки опсег померања који се креће од 106,6 до 161,7 ppm. Сигнали осталих алифатичних угљеникових атома налазе се у области 21,7-56,4 ppm.

У циљу потпуног расветљавања структура једињења [201-208] главну улогу имали су подаци добијени из NOESY и HMBC спектра (табела 14 и 15). Код свих добијених азина уочена је кључна NOESY-интеракција између протона ОН и азометинске (N=CH) групе. Њоме се потврђује постојање дииминског моста између кумаринског фрагмента и арил-супституента, са планарном *s-trans* конформацијом азинске јединице. Са друге стране, протон азометинске групе код свих једињења показује корелацију са *o*-протонима арил-супституента, док је интеракција метил-групе везане за С=N са *o*-протонима изостала само код једињења [201] и [202]. Једна од кључних HMBC-интеракција, која није изостала код ниједног азина [201-208], је између протона метил-групе везане за С=N и угљеника С-3 кумаринског језгра. С обзиром да овај угљеник није показивао корелације у другим спектрима, његова асигнација је била могућа само преко ове поменуте интеракције у HMBC спектру.

Табела 12. $^1\text{H-NMR}$ хемијска померања (δ , ppm), мултиплети и константе купловања (J , Hz) за једињења [201-208]

Положај	[201]*	[202]**	[203]*	[204]*	[205]*	[206]*	[207]*	[208]*
H-5	7,99, dd (7,6, 1,6)	8,07, dd (7,2, 2,0)	7,96, dd (7,6, 1,6)	7,99, dd (7,6, 1,6)	7,94, dd (7,6, 1,6)	7,92, dd (7,6, 1,6)	7,99, dd (7,2, 1,6)	7,99, dd (7,6, 1,6)
H-6	7,39-7,28, m	7,27-7,23, m	7,34-7,26, m	7,35, td (7,6, 0,8)	7,29, td (7,6, 0,8)	7,27, t (7,6)	7,37-7,29, m	7,34, td (7,6, 0,8)
H-7	7,68, ddd, (8,4, 7,6, 1,6)	7,56, ddd (8,0, 7,2, 2,0)	7,66, ddd (8,8, 7,6, 1,6)	7,69, ddd (8,4, 7,6, 1,6)	7,63, ddd (8,4, 7,6, 1,6)	7,61, ddd (8,4, 7,6, 1,6)	7,68, ddd (8,4, 7,2, 1,6)	7,68, ddd (8,4, 7,6, 1,6)
H-8	7,39-7,28, m	7,27-7,23, m	7,34-7,26, m	7,31, dd (8,4, 0,8)	7,25, dd (8,4, 0,8)	7,22, d (8,4)	7,37-7,29, m	7,30, dd (8,4, 0,8)
OH	16,45, br s	16,40, br s	16,46, br s	16,39, br s	16,39, br s	16,45, br s	16,41, br s	16,41, br s
Me	2,98, s	2,80, s	2,94, s	2,97, s	2,90, s	2,90, s	2,97, s	2,98-2,93, m
N=CH	8,64, s	8,23, s	8,61, s	8,83, s	8,58, s	8,50, s	8,74, s	8,74, s
H-2'	7,48, d (2,0)	7,67-7,63, m <u>AA'BB'</u>	7,43, d (1,6)	–	7,73-7,69, m <u>AA'BB'</u>	7,12, s	7,80-7,76, m <u>AA'BB'</u>	7,82-7,78, m <u>AA'BB'</u>
H-3'	–	6,73-6,68, m <u>AA'BB'</u>	–	7,19, d (8,0)	6,91-6,86, m <u>AA'BB'</u>	–	7,37-7,29, m	7,43-7,39, m <u>AA'BB'</u>
H-4'	–	–	–	7,56, ddd (8,0, 7,6, 1,6)	–	–	–	–
H-5'	7,08, d (8,4)	6,73-6,68, m <u>AA'BB'</u>	6,90, d (8,4)	7,08, t (7,6)	6,91-6,86, m <u>AA'BB'</u>	–	7,37-7,29, m	7,43-7,39, m <u>AA'BB'</u>
H-6'	7,39-7,28, m	7,67-7,63, m <u>AA'BB'</u>	7,34-7,26, m	7,95, dd (7,6, 1,6)	7,73-7,69, m <u>AA'BB'</u>	7,12, s	7,80-7,76, m <u>AA'BB'</u>	7,82-7,78, m <u>AA'BB'</u>
C-2'-OMe	–	–	–	3,93, s	–	–	–	–
C-3'-OMe	3,83, s	–	3,84, s	–	–	3,81, s	–	–
C-4'-OMe	3,84, s	–	–	–	–	–	–	–
C-4'-OH	–	–	10,01, s	–	10,31, s	9,30, s	–	–
C-4'-Me	–	–	–	–	–	–	2,38, s	–
C-4'-CHMe ₂	–	–	–	–	–	–	–	1,23-Me ₂ , d (6,8) 2,98-2,93, m
C-4'-NMe ₂	–	3,06, s	–	–	–	–	–	–
C-5'-OMe	–	–	–	–	–	3,81, s	–	–

* $^1\text{H-NMR}$ спектри снимани су на 400 MHz у DMSO- d_6 . ** $^1\text{H-NMR}$ спектар снимљен је на 400 MHz у CDCl₃. Скраћенице: d – дублет; dd – дублет дублета; ddd – дублет дублета дублета; t – триплет; td – триплет дублета; s – синглет; br s – широки синглет; m – мултиплет

Табела 13. ^{13}C -NMR спектрални подаци за једињења [201-208]

Положај	[201]*	[202]**	[203]*	[204]*	[205]*	[206]*	[207]*	[208]*
C-2	161,9	162,4	161,9	161,9	161,8	161,8	161,9	161,9
C-3	95,9	96,1	95,8	96,1	95,8	95,8	96,1	96,1
C-4	180,4	181,1	180,3	180,5	180,3	180,3	180,5	180,5
C-4a	120,2	120,3	120,2	120,2	120,2	120,1	120,2	120,2
C-5	126,1	125,9	126,1	126,2	126,1	126,0	126,2	126,2
C-6	124,4	123,5	124,3	124,4	124,1	124,2	124,4	124,4
C-7	135,0	133,8	134,9	135,0	134,8	134,7	135,0	135,0
C-8	116,9	116,6	116,8	116,9	116,8	116,7	116,9	116,9
C-8a	153,7	153,8	153,6	153,7	153,6	153,6	153,7	153,7
C=N	171,8	171,2	171,5	172,3	171,5	171,4	172,4	172,4
Me	17,8	17,5	17,8	17,9	17,7	17,7	17,8	17,8
N=CH	157,0	155,3	157,2	151,9	156,9	157,1	157,0	157,1
C-1'	127,1	119,9	124,4	120,9	124,1	123,1	130,5	130,9
C-2'	109,5	130,3	110,7	159,4	131,1	106,6	129,0	129,1
C-3'	149,6	111,7	148,5	112,7	116,5	148,6	130,2	127,6
C-4'	152,1	152,8	151,4	134,4	161,7	140,4	142,8	153,7
C-5'	111,9	111,7	116,1	121,4	116,5	148,6	130,2	127,6
C-6'	124,0	130,3	124,7	127,1	131,1	106,6	129,0	129,1
C-2'-OMe	–	–	–	56,4	–	–	–	–
C-3'-OMe	55,9	–	56,0	–	–	56,4	–	–
C-4'-OMe	56,0	–	–	–	–	–	–	–
C-4'-Me	–	–	–	–	–	–	21,7	–
C-4'-CHMe ₂	–	–	–	–	–	–	–	CH-34,0 Me ₂ -24,0
C-4'-NMe ₂	–	40,1	–	–	–	–	–	–
C-5'-OMe	–	–	–	–	–	56,4	–	–

* ^{13}C -NMR спектри снимани су на 100,6 MHz у DMSO-*d*₆. ** ^{13}C -NMR спектар снимљен је на 100,6 MHz у CDCl₃.

Табела 14. Уочене NOESY интеракције за једињења [201-208]

Положај	[201]	[202]	[203]	[204]	[205]	[206]	[207]	[208]
H-5	H-6	H-6	H-6	H-6	H-6	H-6	H-6	H-6
H-6	H-5, H-7	H-5, H-7	H-5, H-7	H-5, H-7	H-5, H-7	H-5, H-7	H-5, H-7	H-5, H-7
H-7	H-6, H-8	H-6, H-8	H-6, H-8	H-6, H-8	H-6, H-8	H-6, H-8	H-6, H-8	H-6, H-8
H-8	H-7	H-7	H-7	H-7	H-7	H-7	H-7	H-7
OH	N=CH	N=CH	N=CH	N=CH	N=CH	N=CH	N=CH	N=CH
Me	–	–	H-6'	H-6'	H-2'/6'	H-2'/6', 3'/5'-OMe	H-2'/6'	H-2'/6'
N=CH	H-2', OH	H-2'/6', OH	H-2', OH	2'-OMe, OH	H-2'/6', OH	H-2'/6', OH	H-2'/6', OH	H-2'/6', OH
H-2'	3'-OMe, N=CH	H-3'/5', N=CH, 4'-NMe ₂	3'-OMe, N=CH	–	H-3'/5', N=CH, Me	3'/5'-OMe, N=CH, Me	H-3'/5', N=CH, Me	H-3'/5', N=CH, Me
H-3'	–	H-2'/6', 4'-NMe ₂	–	2'-OMe, H-4'	H-2'/6', 4'-OH	–	H-2'/6', 4'-Me	H-2'/6', 4'-CH, 4'-CHMe ₂
H-4'	–	–	–	H-3', H-5'	–	–	–	–
H-5'	H-6', 4'-OMe	H-2'/6', 4'-NMe ₂	H-6', 4'-OH	H-4', H-6'	H-2'/6', 4'-OH	–	H-2'/6', 4'-Me	H-2'/6', 4'-CH, 4'-CHMe ₂
H-6'	H-5', N=CH	H-3'/5', N=CH, 4'-NMe ₂	H-5', N=CH, Me	H-5', Me	H-3'/5', N=CH, Me	3'/5'-OMe, N=CH, Me	H-3'/5', N=CH, Me	H-3'/5', N=CH, Me
2'-OMe	–	–	–	H-3', N=CH	–	–	–	–
3'-OMe	H-2'	–	H-2'	–	–	H-2'/6', 4'-OH	–	–
4'-OMe	H-5'	–	–	–	–	–	–	–
4'-OH	–	–	H-5'	–	H-3'/5'	3'/5'-OMe	–	–
4'-Me	–	–	–	–	–	–	H-3'/5'	–
4'-CHMe ₂	–	–	–	–	–	–	–	4'-CH, H-3'/5', 4'-CHMe ₂
4'-NMe ₂	–	H-2'/6', H-3'/5'	–	–	–	–	–	H-3'/5', 4'-CH
5'-OMe	–	–	–	–	–	H-2'/6', 4'-OH	–	–

Табела 15. Уочене НМВС интеракције за једињења [201-208]

Положај	[201]	[202]	[203]	[204]	[205]	[206]	[207]	[208]
H-5	C-4, C-7, C-8a	C-4, C-7, C-8a	C-4, C-7, C-8a	C-4, C-7, C-8a	C-4, C-7, C-8a	C-4, C-7, C-8a	C-4, C-7, C-8a	C-4, C-7, C-8a
H-6	C-4a, C-8	C-4a, C-7, C-8	C-4a, C-8	C-4a, C-8	C-4a, C-8	C-4a, C-8	C-4a, C-8	C-4a, C-8
H-7	C-5, C-8a	C-5, C-8, C-8a	C-5, C-8a	C-5, C-8a	C-5, C-8a	C-5, C-8a	C-5, C-8a	C-5, C-8a
H-8	C-6, C-8a	C-4a, C-6, 8a	C-4a, C-6, 8a	C-4a, C-6, 8a	C-4a, C-6, 8a	C-4a, C-6, 8a	C-4a, C-6, 8a	C-4a, C-6, 8a
ОН	–	–	–	–	–	–	–	–
Me	C-3, <u>C</u> =N	C-3, <u>C</u> =N	C-3, <u>C</u> =N	C-3, <u>C</u> =N	C-3, <u>C</u> =N	C-3, <u>C</u> =N	C-3, <u>C</u> =N	C-3, <u>C</u> =N
N=CH	C-2', C-6'	C-1', C-2'/6'	C-1', C-2'	C-1', C-6'	C-1', C-2'/6'	C-1', C-2'/6'	C-2'/6'	C-1', C-2'/6'
H-2'	C-4', C-6'	C-2'/6', C-3'/5', C-4', N= <u>CH</u>	C-3', C-4', C-6', N= <u>CH</u>	–	C-2'/6', C-4', N= <u>CH</u>	C-1', C-4', C-2'/6', C-3'/5', N= <u>CH</u>	C-2'/6', C-4', N= <u>CH</u>	C-2'/6', C-4', N= <u>CH</u>
H-3'	–	C-1', C-3'/5'	–	C-1', C-5'	C-1', C-3'/5', C-4'	–	C-1', C-3'/5', 4'-Me	C-1', C-3'/5', 4'- <u>CH</u>
H-4'	–	–	–	C-2', C-6'	–	–	–	–
H-5'	C-1', C-3'	C-1', C-3'/5'	C-1', C-3', C-4'	C-1', C-3'	C-1', C-3'/5', C-4'	–	C-1', C-3'/5', 4'-Me	C-1', C-3'/5', 4'- <u>CH</u>
H-6'	C-2', C-4'	C-2'/6', C-3'/5', C-4', N= <u>CH</u>	C-2', C-4', N= <u>CH</u>	C-2', C-4', N= <u>CH</u>	C-2'/6', C-4', N= <u>CH</u>	C-1', C-4', C-2'/6', C-3'/5', N= <u>CH</u>	C-2'/6', C-4', N= <u>CH</u>	C-2'/6', C-4', N= <u>CH</u>
2'-OMe	–	–	–	C-2'	–	–	–	–
3'-OMe	C-3'	–	C-3'	–	–	C-3'/5'	–	–
4'-OMe	C-4'	–	–	–	–	–	–	–
4'-OH	–	–	C-3'	–	C-3'/5', C-4'	C-3'/5', C-4'	–	–
4'-Me	–	–	–	–	–	–	C-3'/5', C-4'	–
4'-CHMe ₂	–	–	–	–	–	–	–	4'-CH, 4'-CHMe ₂ C-4', 4'- <u>CH</u> , 4'- <u>CH</u> Me ₂
4'-NMe ₂	–	C-4', 4'-NMe ₂	–	–	–	–	–	–
5'-OMe	–	–	–	–	–	C-3'/5'	–	–

4.1.3.2. Азини добијени из хетероцикличних алдехида [210-216]

Нови азински деривати [210-216] добијени су рефлуктовањем 3-(1-хидразоноетил)-4-хидрокси-2*H*-хромен-2-она [199] у апсолутном етанолу са еквимоларном количином одговарајућих хетероцикличних алдехида, као што је приказано на шеми 28. Нуклеофилна адиција амино-групе хидразона [199] на карбонилни угљеников атом алдехида представља механизам реакција којима су добијени сви деривати. За синтетисана једињења у литератури не постоје спектрални подаци. У наставку је дата потпуна асигнација NMR спектра, за два одабрана једињења из ове групе хибрида, док је у случају осталих једињења збирно описана спектрална карактеризација која недвосмислено потврђује њихову структуру.

4.1.3.2.1. Спектрална карактеризација 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(индол-3-ил-3-метилен)хидразина [215]

Азински дериват 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(индол-3-ил-3-метилен)хидразин [215] добијен је реакцијом 3-(1-хидразоноетил)-4-хидрокси-2*H*-хромен-2-она [199] са индол-3-карбалдехидом.

Масеном спектрометријом високе резолуције, HRMS(EI), потврђена је претпостављена молекулска формула [215], C₂₀H₁₅N₃O₃ (молекулски јон на *m/z* 345,1102, Δ = -1,1 *m*u). У IR спектру траке које се јављају у интервалу 3153-2935 cm⁻¹ одговарају N-H и Ar-H вибрацијама. Интензивна трака коњуговане карбонилне групе јавља се на 1671 cm⁻¹, док траке на 1603 и 1575 cm⁻¹ потичу од вибрација C=C и C=N веза.

У ¹H-NMR спектру једињења [215] уочено је једанаест сигнала од којих седам по хемијском померању одговара метинским протонима ароматичног језгра (δ 7,24-8,18 ppm) (табела 16). Једини синглет који се у „ароматичном“ региону јавља на δ 8,08 ppm у NOESY спектру (прилог 102) показује корелацију са сигнаlima на 12,02 и 8,85 ppm. Сигнал на великом хемијском померању од 12,02 ppm одговара, по облику и по интензитету, протону везаном за азотов атом индола, док је сигнал на 8,85 ppm (интеграл од једног протона) слично претходним једињењима додељен водонику азометинске (N=CH) групе. На

основу просторне блискости и наведених корелација у NOESY спектру закључује се да резонанцију на 8,08 ppm можемо једино приписати протону супституента и то у положају 2'. Подаци добијени из HSQC спектра одредили су и померање угљеника C-2' (135,4 ppm). У складу са овим у HMBC спектру јављају се интеракције између H-2' и три угљеника на 137,8, 124,4 и 111,2 ppm. Изостанак интеракције ових угљеника са протонима у HSQC спектру потврђује да је реч о непротонованим угљениковим атомима. Из структуре једињења видимо да кроз три везе то морају бити C-7a' (137,8 ppm) и C-3a' (124,4 ppm) и кроз две везе C-3' (111,2 ppm). Асигнацију угљеника C-3' потврђује и HMBC интеракција са протоном азометинске-групе.

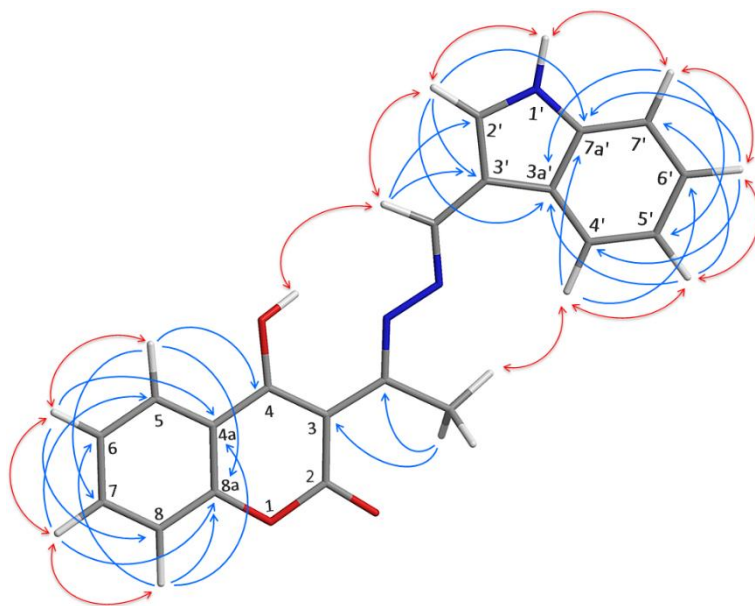
Табела 16. ^1H - (400 MHz) и ^{13}C - (100,6 MHz) NMR спектрални подаци и уочене NOESY и HMBC интеракције код једињења [215]

Положај	$\delta ^1\text{H}$ (ppm)	Мулти.	Инт.	J (Hz)	$\delta ^{13}\text{C}$ (ppm)	NOESY ($^1\text{H}\leftrightarrow^1\text{H}$)	HMBC ($^1\text{H}\rightarrow^{13}\text{C}$)
2	–	–	–	–	162,0	–	–
3	–	–	–	–	95,5	–	–
4	–	–	–	–	179,9	–	–
4a	–	–	–	–	120,4	–	–
5	8,00	dd	1H	7,6, 1,6	126,1	6	4, 7, 8a
6	7,36-7,30	m	2H	–	124,3	5, 7	4a, 8
7	7,67	ddd	1H	8,4, 7,6, 1,6	134,6	6, 8	5, 8a
8	7,36-7,30	m	2H	–	116,8	7	4a, 6, 8a
8a	–	–	–	–	153,6	–	–
OH	16,53	br s	1H	–	–	N=CH	–
C=N	–	–	–	–	169,6	–	–
Me	3,01	s	3H	–	17,7	4'	3, C=N
N=CH	8,85	s	1H	–	153,5	OH, 2'	2', 3', 3a'
1'-H	12,02	s	1H	–	–	2', 7'	–
2'	8,08	s	1H	–	135,4	N=CH, 1'	3', 3a', 7a'
3'	–	–	–	–	111,2	–	–
3a'	–	–	–	–	124,4	–	–
4'	8,18-8,14	m	1H	–	122,1	Me, 5'	6', 7a'
5'	7,29-7,24	m	2H	–	122,1	4', 6'	3a', 7'
6'	7,29-7,24	m	2H	–	123,8	5', 7'	4', 7a'
7'	7,55-7,51	m	1H	–	112,9	1', 6'	3a', 5'
7a'	–	–	–	–	137,8	–	–

Скраћенице: Мулт. – мултиплет; Инт. – интеграл; dd – дублет дублета; ddd – дублет дублета дублета; s – синглет; br s – широки синглет, m – мултиплет

Са највећим хемијским померањем од сигнала метинских протона из ароматичног језгра јавља се мултиплет у опсегу 8,14-8,18 ppm. Како једино

овај сигнал у NOESY спектру, а на основу оптимизоване геометрије овог једињења (слика 39), показује интеракцију са синглетом на 3,01 ppm, који припада метил-групи везаној за угљеник имино-групе, овај сигнал асигниран је као протон H-4'. Истовремена NOESY интеракција овог протона са мултиплетом на 7,24-7,29 ppm, асигнира положај суседног протона H-5', што је у складу са структуром једињења. У HMBC спектру H-4' остварује корелације са сигнаlima на 137,8 и 123,8 ppm. Како је поменуто да сигнал од 137,8 ppm одговара угљениковом атому C-7a', следи да сигнал на 123,8 ppm (кроз три везе) једино може бити угљеник C-6'. Ово потврђује и интеракција поменутог угљеника са одговарајућим протоном у HSQC спектру, односно са H-6' (7,24-7,29 ppm). Такође, овај протон кроз три хемијске везе показује корелацију са поменутиm C-7a'.



Слика 39. Оптимизована геометрија молекула 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(индол-3-ил-3-метилен)хидразина [215] и уочене NOESY (↔) и HMBC (H ↔ C) интеракције

Једини преостали неасигнирани протон супституента који се јавља као мултиплет (7,51-7,55 ppm), у NOESY спектру показује интеракцију са протоном на азотовом атому и суседним H-6', што потврђује да овај положај одговара протону H-7'. У HMBC спектру уочљиве су и истовремене интеракције H-6' и H-7' са угљеником на 122,1 ppm. Ове интеракције уз

повећани интензитет сигнала поменутог угљеника у ^{13}C -NMR спектру указују да су C-4' и C-5' случајно изохрони, односно имају врло слично хемијско померање. Поред наведеног у HMBC спектру, кроз три везе, протон H-6' корелира са угљеником на 137,8 ppm (C-7a'), док H-7' са угљеником на 124,4 ppm (C-3a').

Од протона везаних за кумарински сегмент ^1H -NMR резонанца на 8,00 ppm додељена је протону H-5 који се јавља као дублет дублета, због купловања са вициналним (H-6) и *meta* (H-7) протоном ($J = 7,6, 1,6$ Hz). Поменути протон у HMBC спектру, кроз три везе, показује интеракцију са два непротонована угљеникова атома на 179,9 и 153,6 ppm, чиме се асигнирају C-4 и C-8a. У истом спектру овај протон показује још једну интеракцију са угљеником на 134,6 ppm, за који је везан протон са сигналом на 7,67 ppm (HSQC спектар). Овај сигнал који се јавља као дублет дублета дублета додељен је водонику у положају 7, с обзиром да се куплује са вициналним H-6 и H-8 и удаљеним H-5 протоном, са константама купловања $J = 8,4, 7,6$ и $1,6$ Hz. У HMBC спектру H-7 асигнира поменути C-8a и C-5 (126,1 ppm). Сигнали два преостала протона на кумаринском језгру, H-6 и H-8, међусобно се преклапају у области 7,30-7,36 ppm. HMBC корелација H-8 са угљеником на 124,3 ppm одређује C-6, док H-6 одређује C-8 (116,8 ppm). Асигнација угљеника C-4a потврђена је, такође, HMBC интеракцијама са H-6 и H-8. Са непротонованим C-8a у HMBC спектру, кроз две везе, као и код претходних једињења, корелира H-8. Угљеник у положају 3 кумаринског језгра (95,5 ppm) у истом спектру асигниран је на основу корелације са сигналом на 3,01 ppm који је претходно додељен протонима метил-групе везане за C=N. Ови протони истовремено кроз две везе одређују и угљеник имино-групе коме одговара померање од 169,9 ppm. Лактонском угљенику C-2, коме није одређено хемијско померање, додељен је једини преостали сигнал на 162,0 ppm у ^{13}C -NMR спектру.

Карактеристичан широки синглет који се у ^1H -NMR спектру јавља на најслабијем пољу (16,53 ppm) припада протону OH-групе. Велико хемијско померање ове резонанце потиче од стварања интрамолекулске водоничне везе са слободним електронским паром са азота имино-групе. У NOESY спектру овај протон показује интеракцију са сигналом на 8,85 ppm (асигниран

као протон везан за угљеник имино-групе), што указује да је дошло до стварања дииминске јединице између кумаринског и хетероарил делова молекула. Такође, везу између ова два дела молекула потврђује и NOESY интеракција метил-групе са стране кумаринског језгра са протоном H-4' на хетероарил-супституенту, односно индолу.

4.1.3.2.2. Спектрална карактеризација 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(хинолин-2-ил-2-метилен)хидразина [216]

Реакцијом 3-(1-хидразоноетил)-4-хидрокси-2H-хромен-2-она [199] са хинолин-2-карбалдехидом добијен је 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(хинолин-2-ил-2-метилен)хидразин [216].

Молекулска маса одређена помоћу HRMS(EI) од 357,1121 (израчунато 357,1113, $\Delta = +0,8$ mmu) у складу је са молекулском формулом C₂₁H₁₅N₃O₃. У IR спектру добијеног једињења у области високих фреквенција изражена трака на 3284 cm⁻¹ потиче од OH-групе, док се трака на 3073 cm⁻¹ може приписати Ag-H вибрацијама. Вибрација коњуговане карбонилне групе јавља се у виду интензивне траке на 1695 cm⁻¹. Трака на 1607 cm⁻¹ одговара C=C вибрацији, док трака на 1539 cm⁻¹ највероватније потиче од вибрације C=N групе.

У ¹H-NMR спектру у региону хемијских померања метинских протона на ароматичном језгру, налази се широки синглет на 17,14 ppm и синглет на 8,66 ppm (табела 17). Као и код претходних једињења, ови сигнали су асигнирани као протони OH-групе и азометинске-групе. Поред њихових међусобних корелација у NOESY спектру (прилог 108), протон азометинске-групе показује још једну NOESY-интеракцију са сигналом на 8,21 ppm који се јавља као дублет. Како овом сигналу одговара интеграл од једног протона, на основу структуре једињења то једино може бити H-3' са стране супституента, тј. хинолина. Кроз три везе овај протон у HMBC спектру асигнира угљеник азометинске групе (155,1 ppm) и непротоновани C-4a' (128,8 ppm). Интеракција протона H-3' са дублетом на 8,27 ppm потврђује положај суседног H-4', а самим тим и C-4' (136,8 ppm, HSQC). HMBC корелације протона H-4' са сигнаlima на 152,0 и 148,2 ppm, асигнирају непротоноване угљеникове атоме C-2' и C-8a', редом, што потврђује и изостанак њихових интеракција са

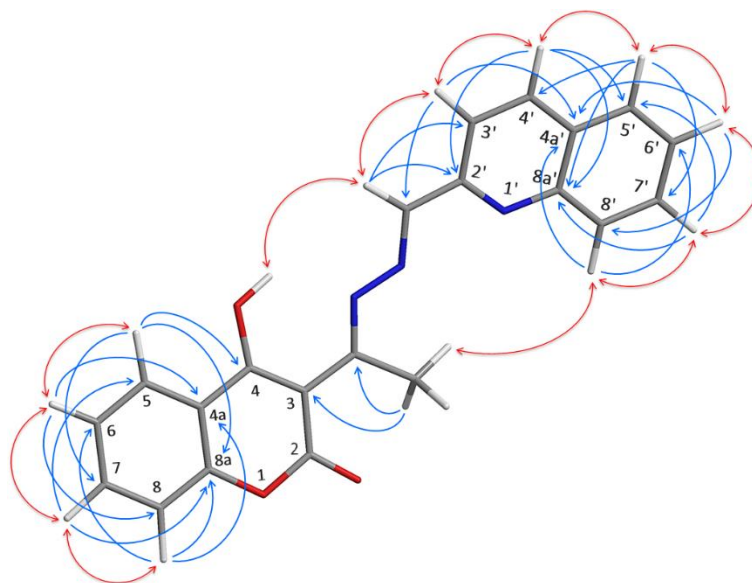
протонима у HSQC спектру. Још једна интеракција овог протона у истом спектру са сигналом на 127,8 ppm који је додељен угљенику C-5' истовремено асигнира и H-5' (7,90 ppm) на основу HSQC спектра. Овакву асигнацију потврђује NOESY корелација између сигнала на 8,27 и 7,90 ppm (H-4' и H-5'). Даља асигнација протона на супституенту извршена је на основу NOESY корелација и у сагласности је са њиховим мултиплицитетом.

Табела 17. ^1H - (400 MHz) и ^{13}C - (100,6 MHz) NMR спектрални подаци и уочене NOESY и HMBC интеракције код једињења [216]

Положај	$\delta ^1\text{H}$ (ppm)	Мулти.	Инт.	J (Hz)	$\delta ^{13}\text{C}$ (ppm)	NOESY ($^1\text{H}\leftrightarrow^1\text{H}$)	HMBC ($^1\text{H}\rightarrow^{13}\text{C}$)
2	–	–	–	–	162,2	–	–
3	–	–	–	–	97,3	–	–
4	–	–	–	–	182,2	–	–
4a	–	–	–	–	119,9	–	–
5	8,12	dd	1H	8,0, 1,6	126,3	6	4, 7, 8a
6	7,32-7,26	m	2H	–	123,9	5, 7	4a, 8
7	7,61	ddd	1H	8,4, 7,6, 1,6	134,6	6, 8	5, 8a
8	7,32-7,26	m	2H	–	116,8	7	4a, 6, 8a
8a	–	–	–	–	154,0	–	–
OH	17,14	br s	1H	–	–	N=CH	–
C=N	–	–	–	–	174,4	–	–
Me	3,17	s	3H	–	17,7	8'	3, C=N
N=CH	8,66	s	1H	–	155,1	OH, 3'	2', 3'
2'	–	–	–	–	152,0	–	–
3'	8,21	d	1H	8,4	118,2	N=CH, 4'	4a', N=CH
4'	8,27	d	1H	8,4	136,8	3', 5'	2', 5', 8a'
4a'	–	–	–	–	128,8	–	–
5'	7,90	dd	1H	8,0, 1,6	127,8	4', 6'	4', 7', 8a'
6'	7,66	ddd	1H	8,0, 7,2, 1,6	128,2	5', 7'	4a', 8'
7'	7,81	ddd	1H	8,4, 7,2, 1,6	130,3	6', 8'	5', 8a'
8'	8,17	d	1H	8,4	129,9	Me, 7'	4a', 6'
8a'	–	–	–	–	148,2	–	–

Скраћенице: Мулт. – мултиплет; Инт. – интеграл; d – дублет; dd – дублет дублета; ddd – дублет дублета дублета; s – синглет; br s – широки синглет, m – мултиплет

Дублет дублета дублета са хемијским померањем од 7,66 ppm припада протону H-6', с обзиром да се куплује са суседним H-5' и H-7' (7,81 ppm) и *meta*-H-8' (8,17 ppm) протоном ($J = 8,0, 7,2, 1,6$ Hz). Асигнација угљеникових атома (HSQC) је у корелацији са HMBC интеракцијама, које су приказане на оптимизованој геометрији овог једињења (слика 40).



Слика 40. Оптимизована геометрија (MM2) и уочене NOESY (↔) и HMBC (H → C) интеракције за 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(хинолин-2-ил-2-метилен)хидразин [216]

Од протона кумаринског језгра, као што је и очекивано, на највећем померању налази се дублет дублета који потиче од протона H-5 (8,12 ppm). Он у NOESY спектру показује интеракцију са мултиплетом (интеграл од два протона) у интервалу 7,26-7,32 ppm који је додељен протонима H-6 и H-8. Подаци добијени из HSQC спектра, као и одговарајуће HMBC интеракције одређују хемијска померања њима одговарајућих угљеника C-6 (123,9 ppm) и C-8 (116,8 ppm). Резонанца на 7,61 ppm која се јавља као дублет дублета дублета припада протону H-7, што је у сагласности са структуром једињења, с обзиром да се куплује са два *ortho* (H-6 и H-8) и једним *meta* (H-5) протоном, са константама купловања 8,4, 7,6 и 1,6 Hz. Асигнација непротонованих угљеникових атома C-4 (182,2 ppm), C-4a (119,9 ppm) и C-8a (154,0 ppm) извршена је на основу одговарајућих HMBC корелација, а карактеристична интеракција кроз две везе, између H-8 и C-8a, као и код претходних једињења није изостала ни овде. Синглет на вишем пољу од 3,17 ppm (интеграл од три протона) додељен је протонима метил-групе везаној за угљеник имино-групе и у HMBC спектру асигнира поменути угљеник (174,4 ppm) и C-3 (97,3 ppm). Такође, поменути протони у NOESY спектру показују кроспик са H-8'. Неасигнираном угљенику карбонилне групе на положају 2 за који није везан

протон и који не показује интеракције у 2D NMR спектрима, додељен је преостали сигнал у ^{13}C -NMR спектру (162,2 ppm), аналогно претходним једињењима.

Интеракције уочене у NOESY спектру између протона ОН и азометинске-групе, као и протона метил групе и Н-8', потврђују присуство дииминског моста. Просторна оријентација хетероцикличног језгра супституента је таква да је оно окренуто према кумаринском фрагменту, имајући у виду NOESY корелацију протона метил-групе са Н-8' на страни супституента.

Спектри осталих азина [210-214] асигнирани су на аналогни начин.

4.1.3.2.3. NMR спектрална карактеризација азина [210-214]

Структуре синтетисаних азина [210-214] потврђене су анализом 1D и 2D NMR спектра, а добијени резултати се у целости слажу са претпостављеним структурама. Спектрални (NMR) подаци за добијене азине дати су у табелама 18 и 19, док су спектри приказани у прилогу (прилози 67-96). Сигнали метинских протона из кумаринског сегмента у ^1H -NMR спектрима, као што је и очекивано, показују хемијска померања која се јављају у интервалу од 7,23 до 8,08 ppm. Највеће померање од поменутих протона код свих једињења [210-214] показују они у положају 5 и јављају се као дублети дублета у интервалу од 8,06 до 8,08 ppm ($J_{5-7} = 1,6$ и $J_{5-6} = 7,6-8,0$ Hz). Занимљиво је да се сигнали Н-6 и Н-8 у свим једињењима међусобно преклапају дајући мултиплете у опсегу 7,23-7,29 ppm. Карактеристични дублети дублета дублета протона Н-7 јављају се у области од 7,58 до 7,61 ppm. Сигнал за Н-7 код једињења [210], се преклапао са сигналом протона тиофенског супституента (7,57-7,62 ppm). Синглет у ^1H -NMR спектру који се јавља у интервалу δ 3,01-3,10 ppm потиче од протона метил-групе, везане за угљеник имино-групе. На највишим δ вредностима у ^1H -NMR спектрима (у интервалу 17,01-17,12 ppm) налази се сигнал који потиче од протона ОН-групе (интрамолекулски водонично везане).

У ^{13}C -NMR спектрима група сигнала која потиче од угљеникових атома кумаринског језгра јавља се са очекиваним вредностима хемијског померања.

На најслабијем пољу код свих једињења [210-214] C-4 се налази у области померања од 181,2 до 182,2 ppm, док се метински угљеници јављају са померањима 116,7-134,8 ppm. Непротоновани C-4а јављају се на δ 119,8-120,1 ppm, док C-8а у опсегу 153,8-154,0 ppm. Угљенику карбонилне групе (C-2) одговарају померања од 162,0 до 162,4 ppm, а резонанце C-3 се налазе на најмањем померању у области 96,2-97,2 ppm. Сигнали у опсегу 171,1-174,4 ppm и 17,5-17,7 ppm припадају угљениковим атомима имино-групе и метил-групе.

Хемијска померања протона хетероарил-супституената у $^1\text{H-NMR}$ спектру код свих једињења [210-214], као што је и очекивано, јављају се у области од 6,38 до 8,53 ppm. Код једињења [210] и [211] која као супституент садрже језгро тиофена поменути протони дају дублете дублета (δ 6,82-7,49, $J = 1,2-4,0$ Hz) или мултиплете (7,23-7,62 ppm). Сигнал који се код једињења [211] јавља на најмањем хемијском померању од 2,57 ppm потиче од водоникових атома метил-групе која се налази на тиофенском супституенту. Метиленски протони пироловог прстена код једињења [212] и [213] јављају се као дублети дублета на δ вредностима 6,27-6,71 са константама купловања у опсегу од 1,6 до 4,0 Hz и дублети дублета дублета (6,73-7,09 ppm, $J = 0,8-4,0$ Hz), док се H-4' код једињења [212] јавља у облику дублета триплета (6,38 ppm, $J = 2,4, 4,0$ Hz). У овом једињењу широки синглет на 9,22 ppm припада протону везаном за азот пирола, док протони метил-групе везани за поменути азот у једињењу [213] дају интензиван синглет на 4,00 ppm. Пиридински прстен једињења [214] даје два типа мултиплета који потичу од три протона. Протони H-4' и H-6' јављају се као дублети дублета у области померања од 8,43 до 8,53 ppm ($J = 2,0-8,0$ Hz), док се H-5' у облику дублета дублета дублета јавља на 7,40 ppm ($J = 8,0, 4,8, 0,8$ Hz). Код свих једињења протон азометинске-групе налази се у интервалу 8,22-8,73 ppm као синглет. У $^{13}\text{C-NMR}$ спектрима код једињења [210] и [211] сигнали ароматичних угљеника тиофеновог прстена налазе се у области δ 128,2-147,5 ppm, док се код једињења са пироловим прстеном [212] и [213] налазе у интервалу померања од 109,9 до 131,0 ppm. Сигнали угљеникових атома из пиридинског сегмента у једињењу [214] јављају се у интервалу 123,1-152,1 ppm.

Табела 18. ¹H- и ¹³C-NMR хемијска померања (δ , ppm), мултиплети и константе купловања (J , Hz) за једињења [210-214]

Положај	[210]		[211]		[212]		[213]		[214]	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
2	–	162,2	–	162,2	–	162,4	–	162,4	–	162,0
3	–	96,7	–	96,5	–	96,2	–	96,2	–	97,2
4	–	181,7	–	181,5	–	181,3	–	181,2	–	182,2
4a	–	120,0	–	120,0	–	120,1	–	120,1	–	119,8
5	8,08, dd (8,0, 1,6)	126,0	8,06, dd (8,0, 1,6)	125,9	8,07, dd (7,6, 1,6)	125,9	8,07, dd (7,6, 1,6)	125,8	8,08, dd (8,0, 1,6)	126,1
6	7,27-7,25, m	123,7	7,28-7,23, m	123,7	7,28-7,23, m	123,7	7,28-7,23, m	123,7	7,29-7,23, m	124,0
7	7,62-7,57, m	134,3	7,58, ddd (8,0, 7,6, 1,6)	134,2	7,58, ddd (8,4, 7,6, 1,6)	134,1	7,58, ddd (8,4, 7,6, 1,6)	134,0	7,61, ddd (8,0, 7,2, 1,6)	134,8
8	7,27-7,25, m	116,8	7,28-7,23, m	116,7	7,28-7,23, m	116,7	7,28-7,23, m	116,7	7,29-7,23, m	116,8
8a	–	153,9	–	153,9	–	153,8	–	153,8	–	154,0
OH	17,12, br s	–	17,06, br s	–	17,09, br s	–	17,01, br s	–	17,12, br s	–
C=N	–	173,2	–	172,6	–	171,5	–	171,1	–	174,4
Me	3,06, s	17,6	3,03, s	17,5	3,03, s	17,5	3,01, s	17,7	3,10, s	17,7
N=CH	8,54, s	148,6	8,43, s	148,8	8,22, s	145,3	8,26, s	146,6	8,73, s	149,5
2'	–	137,3	–	135,1	–	126,2	–	126,1	–	151,6
3'	7,49, dd (4,0, 1,2)	133,3	7,28-7,23, m	134,1	6,73, ddd (4,0, 2,4, 1,6)	118,3	6,71, dd (4,0, 1,6)	120,6	–	127,4
4'	7,17, dd (4,0, 1,2)	128,2	6,82, dd (4,0, 1,2)	126,7	6,38, dt (4,0, 2,4)	111,4	6,27, dd (4,0, 2,4)	109,9	8,43, dd (8,0, 2,0)	136,5
5'	7,62-7,57, m	131,4	–	147,5	7,09, ddd (2,4, 1,6, 0,8)	124,4	6,93-6,92, m	131,0	7,40, ddd (8,0, 4,8, 0,8)	123,1
6'	–	–	–	–	–	–	–	–	8,53, dd (4,8, 2,0)	152,1
5'-Me	–	–	2,57, s	16,0	–	–	–	–	–	–
1'-H	–	–	–	–	9,22 br s	–	–	–	–	–
1'-Me	–	–	–	–	–	–	4,00, s	37,5	–	–

¹H- (400 MHz) и ¹³C - (100,6 MHz) NMR спектри снимани су у CDCl₃. Скраћенице: d – дублет; dd – дублет дублета; ddd – дублет дублета дублета; dt – дублет триплет; s – синглет; br s – широки синглет; m – мултиплет

Табела 19. Уочене NOESY и HMBC интеракције за једињења [210-214]

Положај	[210]		[211]		[212]		[213]		[214]	
	NOESY	HMBC	NOESY	HMBC	NOESY	HMBC	NOESY	HMBC	NOESY	HMBC
H-5	H-6	C-4, C-7, C-8a	H-6	C-4, C-7, C-8a	H-6	C-4, C-7, C-8a	H-6	C-4, C-7, C-8a	H-6	C-4, C-7, C-8a
H-6	H-5, H-7	C-4a, C-7, C-8	H-5, H-7	C-4a, C-7, C-8	H-5, H-7	C-4a, C-7, C-8	H-5, H-7	C-4a, C-7, C-8	H-5, H-7	C-4a, C-7, C-8
H-7	H-6, H-8	C-5, C-8, C-8a	H-6, H-8	C-5, C-8, C-8a	H-6, H-8	C-5, C-8, C-8a	H-6, H-8	C-5, C-8, C-8a	H-6, H-8	C-5, C-8, C-8a
H-8	H-7	C-4a, C-6, 8a	H-7	C-4a, C-6, 8a	H-7	C-4a, C-6, 8a	H-7	C-4a, C-6, 8a	H-7	C-4a, C-6, 8a
OH	N=CH	–	N=CH	–	N=CH	–	N=CH	–	N=CH	–
Me	–	C-3, C=N	–	C-3, C=N	1'-H	C-3, C=N	1'-H	C-3, C=N	H-4'	C-3, C=N
N=CH	H-3', OH	C-2'	H-3', OH	C-2'	H-3', OH	C-2'	H-3', OH	C-2'	OH	C-2', C-3', C-4'
H-3'	H-4', N=CH	C-2', C-5'	H-4', N=CH	C-2', C-4', C-5'	H-4', N=CH	C-2', C-5'	H-4', N=CH	C-2', C-5'	–	–
H-4'	H-3', H-5'	C-2'	H-3', 5'-Me	C-2', C-5'	H-3', H-5'	C-2', C-3', C-5'	H-3', H-5'	C-2', C-5'	H-5', Me	C-2', C-6', N=CH
H-5'	H-4'	C-3'	–	–	1'-H, H-4'	C-2', C-3', C-4'	H-1', H-4'	C-2', C-3', C-4'	H-4', H-6'	C-3'
H-6'	–	–	–	–	–	–	–	–	H-5'	C-2', C-4'
5'-Me	–	–	H-4'	C-4', C-5'	–	–	–	–	–	–
1'-H	–	–	–	–	H-5', Me	–	–	–	–	–
1'-Me	–	–	–	–	–	–	H-5', Me	C-2', C-5'	–	–

Кључну улогу у одређивању структуре добијених азина [210-214] имала је интрепретација NOESY и HMBC спектара. Сви протони су показивали NOESY интеракције са суседним протонима, а постојање дииминског моста између кумаринаског језгра и хетероарил-супституента потврђена је NOESY корелацијом протона ОН и азометинске-групе. Такође, диимински мост потврђује и NOESY-интеракција протона метил-групе са стране кумаринског фрагмента са одговарајућим протонима супституента (табела 19). У HMBC спектрима ових једињења није изостала ниједна важна корелација протона кроз две или три хемијске везе са одговарајућим угљениковим атомима, аналогно као и код претходно описаних једињења [215] и [216].

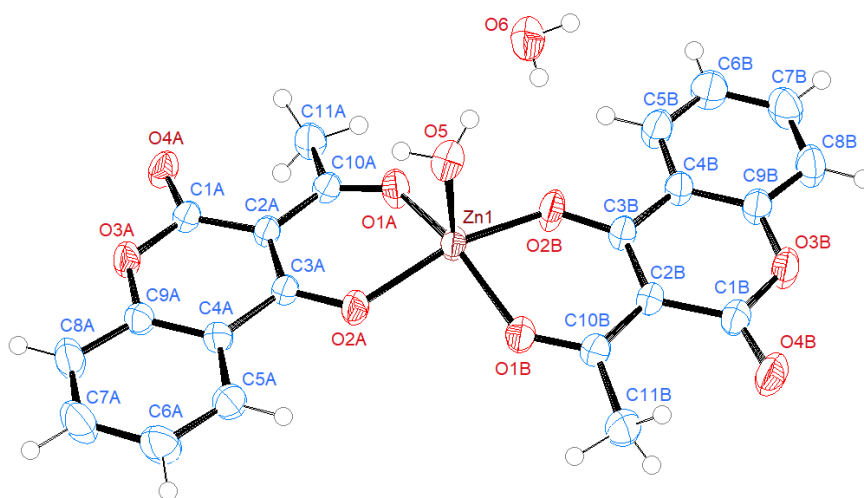
4.1.4. Синтеза и кристалографска анализа аква-bis(3-ацетил-4-хидрокси-2*H*-хромен-4-олато-к²O,O')цинк(II)-монохидрата [217]

Реакцијом 3-ацетил-4-хидрокси-2*H*-хромен-2-она [60] и цинк-нитрата-пентахидрата у етанолу добијен је аква-bis(3-ацетил-4-хидрокси-2*H*-хромен-4-олато-к²O,O')цинк(II)-монохидрат [217].

Асиметрични део јединичне ћелије једињења [217] састоји се од [Zn(C₁₁H₇O₄)₂H₂O] и молекула воде. Структура [Zn(C₁₁H₇O₄)₂H₂O] приближно одговара C₂ тачкастој групи симетрије (искључујући атоме водоника) са двоструком осом која се поклапа са правцем везе Zn1–O5. На слици 41 приказан је ORTEP цртеж молекула једињења [217].

Координационо окружење Zn(II) јона најбоље се може описати квадратно пирамидалном геометријом. Равни којој припада основа квадратне пирамиде чине два бидентатна кумаринска лиганда (који су преко два атома кисеоника координационо везани за цинк), док се на врху налази координисани молекул воде. Кумарински лиганди су координисани у моноанјонском облику, преко O2A депротоноване хидроксилне групе и O1A ацетил-групе, односно O2B и O1B. Дужине веза између угљеникових атома бензеновог прстена кумарина одговарају дужинама веза код ароматичних једињења. У α-пироновом прстену дужина веза C1A–C2A (1,4456 (19) Å) и C3A–C4A (1,460 (2) Å), односно C1B–C2B (1,453 (19) Å) и C3B–C4B (1,461 (2) Å), нешто је већа од C2A–C3A (1,2666 (17) Å), односно C2B–C3B (1,2724 (17) Å), из

разлога локализоване двоструке везе између C2A и C3A, односно C2B и C3B. Дужине веза Zn1–O2A (1,9673 (10) Å), Zn1–O2B (1,9811 (11) Å) и Zn1–O1A (2,0384 (11) Å), Zn1–O1B (2,0135 (11) Å) нешто су краће од хемијски еквивалентних веза у структурно сродним октаедарским Zn(II) комплексима са кумаринским лигандима (Davis *et al.*, 2016; Stefanou *et al.*, 2018). Ово се може објаснити нижим координационим бројем Zn(II) у једињењу [217]. Дужине веза унутар шесточланих металоцикла су у складу са делокализацијом електрона кроз фрагменте O2A–C3A–C2A–C10A–O1A и O2B–C3B–C2B–C10B–O1B. Дужине осталих веза су у оквиру очекиваних вредности.



Слика 41. Молекулска структура (ORTEP приказ) једињења [217] са нумерацијом атома која је коришћена при структурној анализи. Елипсоиди представљају 40% вероватноће налажења језгра. Атоми водоника приказани су као сфере произвољног радијуса

Повезивање структурних јединица у молекулу једињења [217] постиже се водоничним везама O–H...O. Сваки координисани молекул воде O5 (i) је водонично везан са комплексом (ii) и другим некоординационим молекулом воде (i) [симетријски код: (i) x, y, z ; (ii) $-x+2, -y+1, -z$]. Такође, некоординисани молекул воде (i) је водонично везан за суседни комплекс (iii) [симетријски код: (iii) $-x+1, -y+1, -z$]. Енергије интеракција израчунате помоћу SE-V3LYP модела, указују да су ове интеракције доминантно електростатичке природе, са енергијама од -165 , -72 и -32 kJ/mol, редом. Занимљиво је да добијени прорачуни показују да интеракције, у којима је доминантан дисперзиони удео,

нису занемарљиве.

4.2. Биолошка/фармаколошка активност синтетисаних једињења

4.2.1. Антимикробна активност

4.2.1.1. Одређивање антимикробне активности азина [200-208]

In vitro антимикробна активност једињења [200-208] тестирана је у случају седам сојева бактерија (четири Грам-позитивне и три Грам-негативне) и два соја гљива, методом микродилуције. Резултати (MIC у μM) активности испитиваних једињења приказани су у табели 20 као просечне вредности три понављања и упоређени са стандардним антибиотицима (хлорамфеникол и стрептомицин) и антимикотиком (нистатин). Испитивана једињења су показала веома широк спектар активности са MIC вредностима у опсегу 0,16-6,03 μM , што је у одређеним случајевима било упоредиво са посматраном активношћу једне од коришћених позитивних контрола (хлорамфеникол). Минимална инхибиторна концентрација за једињења [200-208] је била у опсегу 0,16-6,03 μM за Грам-позитивне сојеве бактерија, 0,60-6,03 μM у случају Грам-негативних сојева, док је за гљиве износила 0,37-6,03 μM . У већини случајева, једињења су била ефикасна у инхибирању раста свих испитиваних сојева, са изузетком једињења [208] према квасцу *C. albicans*, који је показао резистентност чак и при највећој тестираној концентрацији овог једињења. Најнижа MIC вредност (0,16 μM) одређена је за једињење [205] према Грам-позитивној бактерији *S. aureus*. Када се међусобно упоређују сви испитивани деривати, једињења [200] и [205] су показала најјачи антимикробни ефекат са средњим MIC вредностима од 1,32 и 1,46 μM . Са друге стране, једињења [204], [206] и [208] била су најмање ефикасна са MIC вредностима у опсегу 2,68-5,36 μM , 1,31-5,23 μM и 0,75-6,03 μM (са највећим MIC вредностима за *C. albicans*). Такође, није примећена значајна селективност према било ком соју тестираних микроорганизама. Међу испитиваним сојевима, *S. epidermidis* и *P. aeruginosa* показали су највећу резистентност према тестираним једињењима, што је и било видљиво из њихове осетљивости према испитиваним референтним антибиотицима (табела 20).

Табела 20. Минималне инхибиторне концентрације (MIC) једињења [200-208] (μM) и антибиотика (nM)

Микроорганизам	Једињење									Антибиотици		
	[200]	[201]	[202]	[203]	[204]	[205]	[206]	[207]	[208]	X ^a	C ^b	H ^b
Грам-позитивне												
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,74	2,46	3,01	0,28	5,36	0,16	5,23	1,56	6,03	19,34	0,67	/
<i>Bacillus cereus</i>	0,74	1,23	1,49	2,41	5,36	0,31	5,23	3,12	1,49	9,66	0,15	/
<i>Sarcina lutea</i>	0,74	2,46	1,49	0,28	2,68	0,31	1,31	1,56	1,49	2,41	2,68	/
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,49	2,46	3,01	1,19	5,36	2,48	5,23	1,56	6,03	4,83	2,68	/
Грам-негативне												
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,49	5,19	6,01	1,19	5,36	1,24	5,23	3,12	6,03	38,68	5,36	/
<i>Escherichia coli</i>	0,74	1,23	3,01	2,41	5,36	2,48	5,23	1,56	1,49	4,83	0,67	/
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1,49	2,46	3,01	0,60	2,68	1,24	5,23	3,12	0,75	154,7	21,5	/
Гљиве												
<i>Candida albicans</i>	2,98	2,46	0,72	2,41	2,68	2,48	5,23	3,12	> 6,03	/	/	2,53
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	1,49	2,46	0,37	2,41	5,36	2,48	2,62	3,12	3,02	/	/	0,33

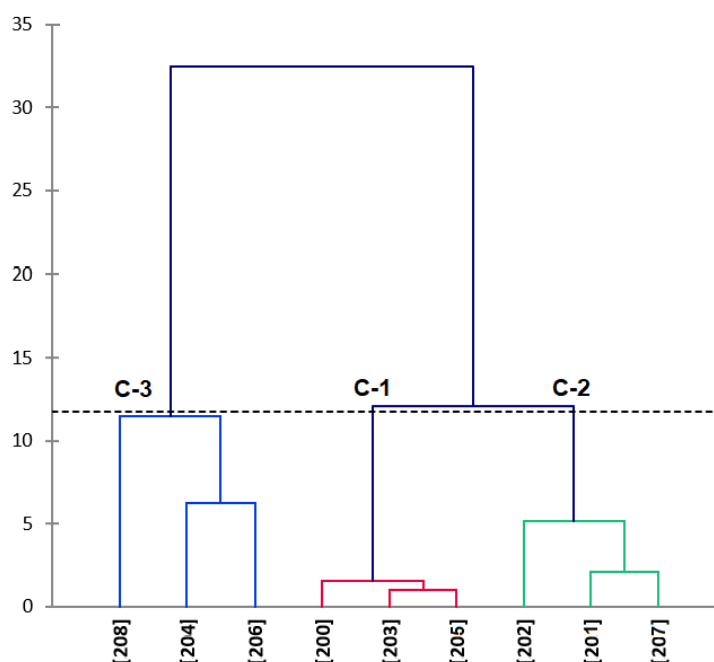
^aХлорамфеникол; ^bСтрептомицин; ^вНистатин, / - није тестирано

Иако је *A. baumannii* био прилично отпоран на обе примењене позитивне контроле, једињења [200-208] показала су значајну активност према поменутој бактерији која се креће у опсегу од 0,60 до 3,01 μM . Занимљиво је поменути да је велика осетљивост овог соја према једињењима [203] и [208] изражена при веома ниским концентрацијама ових једињења од 0,60, односно 0,75 μM . Ове вредности су око четири пута веће од МИС вредности хлорамфеникола за исти сој бактерије. Будући да ова бактеријска врста представља веома важан људски опортунистички патоген, првенствено као узрочник многих мултирезистентних болничких инфекција, добијени резултати су врло обећавајући и подстичу даља истраживања у овом правцу. Међу испитиваним једињењима, [202] је показало веома изражену активност према оба соја гљива (0,37 и 0,72 μM), док су остала једињења показала мање-више сличну активност.

У циљу класификације тестираних једињења [200-208] на основу њихове антимикробне активности, резултате смо обрадили коришћењем мултиваријантне статистичке анализе, тј. агломеративно хијерархијско кластеровање (АНС). Како би се утврдиле сличности и селективности поменутих једињења, АНС анализа је извршена користећи добијене МИС вредности једињења за седам сојева бактерија и два соја гљива, а резултати су представљени дендрограмом (слика 42). Као што се може видети, АНС анализом, јасно су се издвојиле три групе/класе једињења (С-1-С-3).

Група С-1, која садржи једињења [200], [203] и [205], показала је најниже МИС вредности за већину тестираних микроорганизама. Антимикробни ефекат ових једињења није се показао селективним, али као што се може видети са слике 43, оба соја гљива су показала за нијансу већу резистентност од бактеријских сојева. Једињења која припадају овој групи у свом саставу садрже електрон-донорске групе (ОН и ОМе-групу) у положају 4'. Иако показују мало нижу инхибицију раста, али још увек велику неселективност, једињења [201], [202] и [207], која припадају групи С-2, разликовала су се од једињења групе С-1 једино по свом слабијем дејству према соју *P. aeruginosa*. Фенил-прстенови једињења групе С-2 су такође били богати електронима и поседовали 4' супституент, али овог пута поред једног

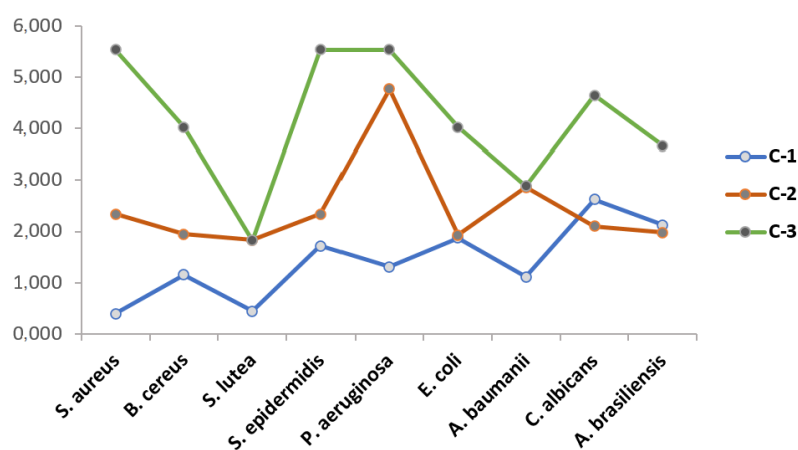
деривата са ОМе-групом [201], нашла су се и једињења са метил [207] и NMe₂-групом [202] на овом прстену. Једињења из групе C-3 ([204], [206] и [208]) показала су најмању активност у случају испитаваних сојева, али су показала већу селективност утичући на раст *S. lutea* и *A. baumannii* у готово истим концентрацијама као једињења из група C-1 и C-2.



Слика 42. Дендрограм (АНС анализа) – различитост на основу антимикробне активности (МИС вредности једињења [200-208] користе се као променљиве у случају седам бактеријских и два соја гљива) кумарин-азин хибрида (добијена на основу Еуклидске удаљености уз употребу агрегационог критеријума – Вардова метода). Нађене су три групе једињења: C-1 – C-3.

На основу изложеног може се закључити да антимикробне активности кумарин-азин хибрида [200-208] зависе од природе фармакофоре која је везана за азински мост кумарина. Већина деривата који су имали ОН-групу на фенил-прстену ([203] и [205] из групе C-1) били су међу најактивнијим. Чини се да је ово и очекивани исход, узимајући у обзир чињеницу да су феноли познати као ефикасни антимикробни агенси, а међу природним производима добар пример су тимол и карвакрол (Radulović *et al.*, 2013). Како је познато да ови монотерпенски феноли ступају у интеракцију са ћелијским мембранама, чинећи их пермеабилнијим (Radulović *et al.*, 2013), наши кумарин-азин

деривати [200-208] такође могу имати сличан начин деловања (ОН-група у положају 4 може се сматрати фенолном групом). На основу овога може се очекивати да додатне фенолне групе на фенил-супституенту појачавају укупну активност. Изгледа да је нижа активност једињења [206] из групе С-3 последица стерних сметњи две волуминозне суседне метокси-групе. Значајно је поменути да дериват који у положају 4' нема супституент [204] показује најмању активност од свих тестираних једињења. Ово упућује на закључак да постојање супституента на С-4' доприноси бољој антимикуробној активности ових деривата. Такође, *ortho*-ОМе-група код једињења [206] може утицати на конформацију овог дела молекула и на овај начин испољити свој ефекат.



Слика 43. Графички приказ резултата (најмања активност одговара највећим MIC вредностима) центроида (класе С-1 – С-3) из АНС анализе

4.2.1.2. Одређивање антимикуробне активности азина [210-216]

Антимикуробна активност деривата азина [210-216] испитивана је микродилуционом методом према пет сојева микроорганизама, и то према два соја Грам-позитивних (*S. aureus* и *B. cereus*) и Грам-негативних (*S. enteritidis* и *E. coli*) бактерија и једном соју квасца (*C. albicans*). Као позитивна контрола коришћени су антибиотик стрептомицин и антимикотик нистатин. Добијени резултати (MIC у μM) приказани су у табели 21.

Испитивана једињења су показала добру инхибиторну активност са MIC вредностима у интервалу од 0,30 до 6,45 μM , при чему је осетљивост Грам-негативних сојева за нијансу већа у односу на Грам-позитивне.

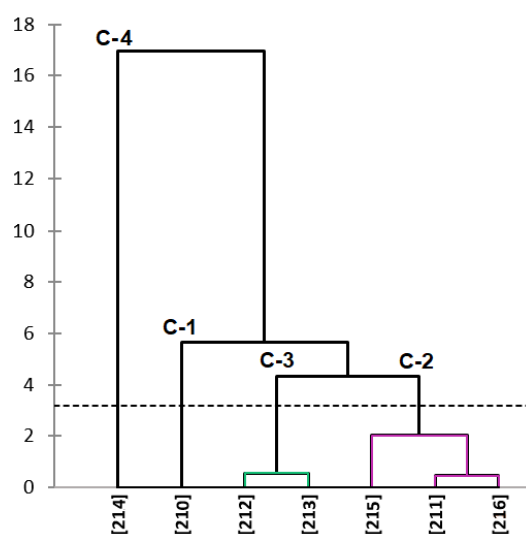
Табела 21. Минималне инхибиторне концентрације (МИС) једињења [210-216] (μМ) и антибиотика (nМ)

Микроорганизам	Једињење							Антибиотици	
	[210]	[211]	[212]	[213]	[214]	[215]	[216]	С ^а	Н ^б
Грам-позитивне									
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,82	2,30	> 2,44	3,23	> 6,45	3,19	> 1,68	0,24	/
<i>Bacillus cereus</i>	> 5,45	> 2,30	2,44	> 3,23	> 6,45	3,19	1,68	0,12	/
Грам-негативне									
<i>Salmonella enteritidis</i>	5,45	2,30	2,44	3,23	6,45	1,59	1,68	0,24	/
<i>Escherichia coli</i>	2,82	2,30	0,30	0,81	1,61	3,19	1,68	0,12	/
Квасац									
<i>Candida albicans</i>	2,82	> 2,30	> 2,44	> 3,23	6,45	> 3,19	> 1,68	/	0,33

^аСтрептомицин; ^бНистатин, / - није тестирано

Најосетљивија на тестирана једињења је Грам-негативна бактерија *E. coli*. Активности једињења [212] (0,30 μM) и [213] (0,81 μM) према овој бактерији су нешто мање од стрептомицина употребљеног као позитивна контрола. Највећа активност, уз потпуни изостанак селективности карактеристике су деривата [216] и [211]. Најселективније је једињење [214], које је, осим у односу на *E. coli*, показало и најмању активност према испитиваним микроорганизмима. Међу коришћеним сојевима микроорганизама највећу резистенцију према тестираним једињењима показали су сојеви *B. cereus* и *C. albicans*.

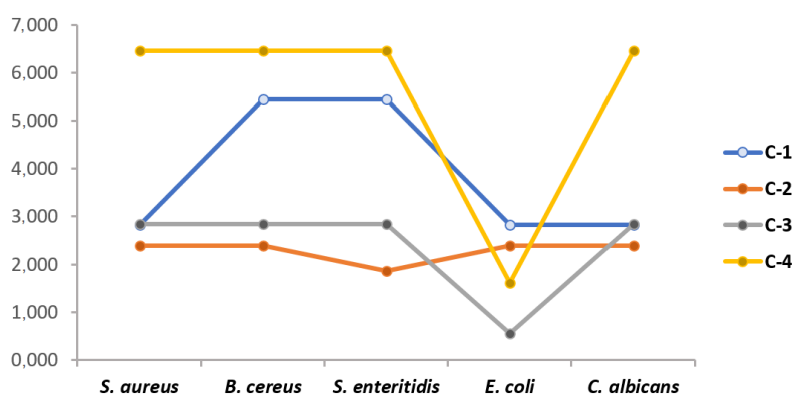
Са циљем поређења антимикуробне активности деривата [210-216], као и код једињења [200-208], урађена је статистичка анализа агломеративног хијерархијског кластеровања (АНС). Резултати АНС анализе представљени су на слици 44 у облику дендрограма.



Слика 44. Дендрограм (АНС анализа) – различитост на основу антимикуробне активности (МИС вредности једињења [210-216] користе се као променљиве у случају четири бактеријска и једног соја квасца) кумарин-азин хибрида (добијена на основу Еуклидске удаљености уз употребу агрегационог критеријума – Вардова метода). Нађене су четири групе једињења: С-1 – С-4.

Испитивана једињења су према својој активности подељена у четири групе (С-1 до С-4). Заједничко за једињења групе С-2 ([211], [215] и [216], од којих [211] и [216], имају најниже МИС вредности према већини тестираних

сојева микроорганизама), јесте највећа инхибиторна активност према бактерији *S. enteritidis* (слика 45). Класа С-3 коју чине деривати са пироловим фрагментом [212] и [213], разликује се од једињења класе С-2 по нешто већим МИС вредностима и изразито већој инхибиторној активности према соју *E. coli*. Једињење са тиофенским фрагментом [210], које чини класу С-1 показује мању осетљивост према бактеријама *B. cereus*, *S. enteritidis* и *E. coli*, од једињења из класе С-3. Класу С-4 чини једињење [214], дериват са пиридинским језгром на азинском мосту. Оно је показало најмању активност против испитиваних сојева, осим према *E. coli*, која је већа и од активности једињења из класе С-1 и С-2.



Слика 45. Графички приказ резултата (најмања активност одговара највећим МИС вредностима) центроида (класе С-1 – С-4) из АНС анализе

4.2.2. Акутна токсичност у моделу рачића *A. salina*

4.2.2.1. Одређивање акутне токсичности азина [200-208] и [210-216]

Једињењима [200-208] и [210-216] испитана је акутна токсичност према јединкама слановодних рачића *A. salina*. На основу процента морталитета науплија *A. salina* након периода инкубације од 24 и 48 часова са тестираним једињењима, резултати испитивања акутне токсичности у овом моделу приказани су у табели 22. Као што се може видети, испитивана једињења нису показала значајну токсичност ни у високим концентрацијама, можда са изузетком једињења [210]. Како су сва испитивана једињења, а посебно [200-209] слабо растворна у вештачкој морској води није било могуће тестирати веће концентрације, док за дериват [209] уопште није било

могуће испитати токсичност овим тестом, управо због веома ниске растворљивости.

Од испитиваних деривата са арил-супституентом [200-208], при највишој тестираној концентрацији након периода од 24 часа, највећи проценат морталитета од 18,3% показало је једињење [200], а затим следе [207] (15,0%), [204] (13,3%) и [205] (13,3%). Значајан степен токсичности, након инкубације од 48 часова, показала су једињења [201] (48,3%), [204] (35,0%), [205] (35%) и [207] (36,7%). При концентрацији од 0,20 и 0,02 mg/ml, после 24 часа, једињење [200] се није показало токсичним, док су једињења [204], [202], [205] и [207] (после 24 часа) показала упоредиву стопу смртности од 11,7, 10,0, 10,0 и 8,3%, при концентрацији од 0,20 mg/ml.

Деривати са хетероцикличним супституентом [210-216] након интервала инкубације од 24 часа, у највећој тестираној концентрацији, показали су проценат морталитета у опсегу 3,3-44,3%, односно 20,0-53,3% након 48 часова. У овој концентрацији највећу токсичност за рачиће, након 24 и 48 часова, показало је једињење [210] са тиофенским прстеном са процентом морталитета од 44,3 и 53,3%. На основу овога одређена је LC_{50} вредност (1,74 mg/ml) након 48 часова. Једињења [213] и [215] показала су нешто умеренију токсичност након 24 часа (23,3 и 20,0%), а значајнију након 48 часова (35,0 и 43,3%). Од свих тестираних деривата са хетероцикличним супституентом [210-216], при најнижој концентрацији од 0,02 mg/ml, једињење [213] после 24 часа показује највећи проценат морталитета рачића (6,7%), а затим следе једињења [210], [211] и [215] са истим процентом морталитета од 5,0%. При поменутој концентрацији деривати [212], [214] и [216] нису били токсични након 24 часа.

Генерално гледано, добијени резултати су показали да на акутну токсичност значајно утиче хемијска структура уведеног супституента. Чини се да је присуство хетероатома важно за токсичност, што потврђује дериват са тиофенским супституентом [210] који је показао највећу токсичност. У прилог овоме иде и чињеница да се увођењем хетероатома мења липофилност, растворљивост и поларност молекула чиме се побољшавају фармакокинетичка и фармаколошка својства (Jampilek, 2019).

Табела 22. Акутна токсичност једињења [200-208] и [210-216] у моделу рачића *A. salina*

Концентрација (mg/ml)	Период инкубације (часови)	Процент (%) морталитета								
		[200]	[201]	[202]	[203]	[204]	[205]	[206]	[207]	[208]
2,00	24	18,3	11,7	11,7	10,0	13,3	13,3	10,0	15,0	10,0
	48	30,0	48,3	23,3	25,0	35,0	35,0	31,7	36,7	18,3
0,20	24	0,0	6,7	10,0	5,0	11,7	10,0	5,0	8,3	8,3
	48	16,7	35,0	23,3	15,0	18,3	16,7	30,0	16,7	15,0
0,02	24	0,0	5,0	5,0	0,0	10,0	6,7	3,3	3,3	5,0
	48	13,7	11,7	16,7	10,0	16,7	11,7	18,3	11,7	13,3

Концентрација (mg/ml)	Период инкубације (часова)	Процент (%) морталитета						
		[210]	[211]	[212]	[213]	[214]	[215]	[216]
2,00	24	44,3	16,7	10,0	23,3	10,0	20,0	3,3
	48	53,3	26,7	26,7	35,0	26,7	43,3	20,0
0,20	24	16,7	6,7	6,7	13,3	3,3	6,7	3,3
	48	33,3	10,0	16,7	25,0	11,7	11,7	5,0
0,02	24	5,0	5,0	0,0	6,7	0,0	5,0	0,0
	48	20,0	6,7	6,7	16,7	5,0	6,7	3,3
LC ₅₀ *		1,74	/	/	/	/	/	/

*LC₅₀ вредност је дата у mg/ml, након 48 часова, / - није било могуће одредити LC₅₀

4.2.3. Антиоксидативна активност

4.2.3.1. Одређивање антиоксидативне активности азина DPPH методом

Једна од најкоришћенијих метода за одређивање антиоксидативне активности заснива се на примени стабилног DPPH (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил) радикала, тзв. DPPH тест. Овај тест темељи се на способности антиоксиданаса да неутралишу слободне DPPH радикале, при чему љубичасто обојени раствор DPPH прелази у жуто обојени, редуковани DPPH-Н хидразин (Lu *et al.*, 2014). Резултати способности неутрализације DPPH радикала (IC_{50} у μM) једињења [200-202], [204], [206], [208], [209] и [210-216] приказани су у табели 23.

Табела 23. Антиоксидативна активност једињења [200-202], [204], [206], [208], [209] и [210-216]

Једињење	IC_{50} (μM)
[200]	>100
[201]	>100
[202]	>100
[204]	>100
[206]	26,34
[208]	>100
[209]	216,60
[210]	35,95
[211]	131,41
[212]	132,74
[213]	17,98
[214]	108,42
[215]	193,17
[216]	19,55
А.к*	7,82

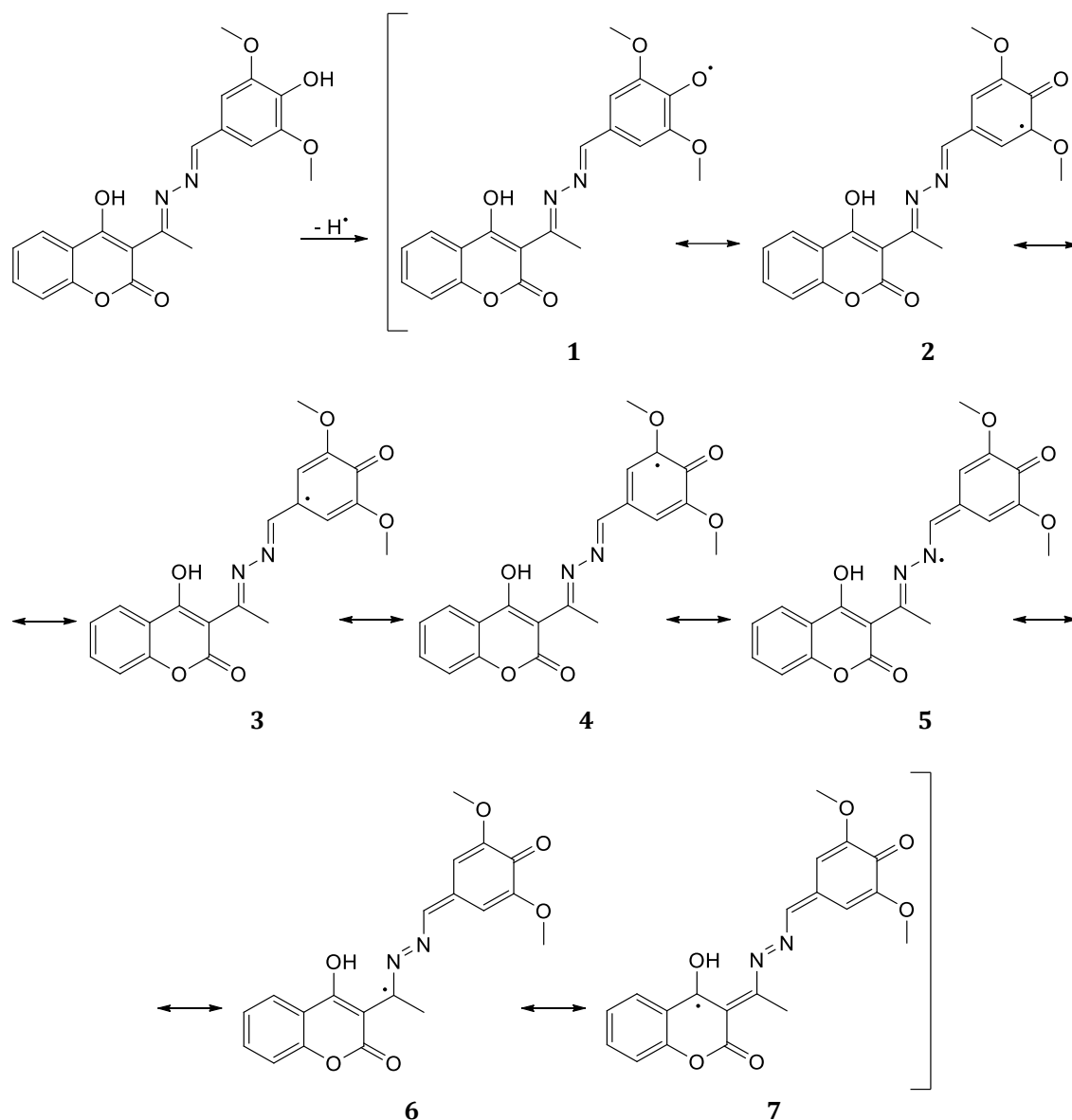
*Аскорбинска киселина

Антирадикалска активност испитиваних једињења креће се у опсегу IC_{50} вредности од 17,98 до 216,60 μM . Висок степен антиоксидативне активност показао је дериват [213] који неутралише 50% DPPH радикала при концентрацији од 17,98 μM , а затим следе [216] (19,55 μM), [206] (26,34 μM) и [210] (35,95 μM).

Тип хетероцикличног супституента представљао је значајан фактор у антиоксидативној активности тестираних једињења [210-216]. Присуство хетероатома у хетероцикличном фрагменту доводи до прерасподеле густине електрона, што за последицу има побољшање реактивности целокупног молекула (Matczak и Domagała, 2017). Што је боља делокализација неспареног електрона то је настали радикал стабилнији. Већи степен антиоксидативне активности деривата [213] и [210] са пироловим, односно тиофенским прстенима у односу на дериват [214] који садржи пиридински фрагмент, може се објаснити повећаном електронском густином у прстену, с обзиром да је познато да азотов атом код пиридина не доприноси значајном повећању електронске густине на остатку молекула (Eicher *et al.*, 2013). Веома јакој антирадикалској активности једињења [213] које садржи азот као хетероатом, доприноси и електрон-донорска метил-група.

Једињење [206], које припада групи кумарин-азин хибрида са арил-супституентом, показало је јаку антоксидативну активност која указује да је настали радикал стабилан и кинетички и термодинамички. Како сви испитивани кумарин-азин хибриди имају фенолну ОН-групу у положају 4 кумаринског језгра, добијени резултати су у почетку били неочекивани. Изгледа да поменута група не доприноси антирадикалским својствима, вероватно због стварања јаке интрамолекулске водоничне везе, која би се изгубила одвајањем водоника из овог положаја. Из свега наведеног следи да активност једињења [206] мора бити повезана са фенолном групом присутном на арил-делу у положају 4'. Чини се да је арил-језгро које је богато електронима веома важно за формирање стабилних радикалских врста насталих губитком протона из 4'-ОН (слика 46). Иако је очекивано да ће азински мост бити копланаран са кумаринским језгром због интрамолекулске водоничне везе, постојање резонантних структура 5-7 је упитно, пошто је познато да се арил-група може слободно ротирати око C-1'-C=N везе и притом није у копланарној оријентацији из стерних разлога. Присуство ароматичног супституента има значајан ефекат који се највише огледа у стабилизацији неспареног електрона. Поред наведеног, очекивано је да се увођењем додатне електрон-донорске групе на супституенту повећава антирадикалска

активност неког једињења. У овом случају метокси-групе једињења [206] повећавају стабилност фенокси радикала, а самим тим повећавају и способност неутрализације DPPH радикала.



Слика 46. Могућа резонантна стабилизација слободног радикала насталог у реакцији кумарин-азин хибрида [206] са DPPH радикалом

5. ЗАКЉУЧАК

Полазећи од 4-хидроксикумарина, у оквиру ове докторске тезе синтетисано је и спектрално окарактерисано осамнаест једињења, од којих је једно било погодно за рендгентску структурну анализу, којом је недвосмислено потврђена његова структура. Током истраживања, развијена је оптимизована метода за синтезу серије кумарин-азин хибрида [200-216] у два корака, која представља ефикасан, једноставан и брз поступак, којим су циљни азини добијени у добрим приносима реакцијом хидразона 3-ацетил-4-хидроксикумарина са различито супституисаним арил- и хетероарил-алдехидима. Добијеним азинима испитана је акутна токсичност, антимикуробна и антиоксидативна активност. Овим је први пут пружен увид у хемијска, спектрална и биолошка својства ове групе хибрида и испитана веза између односа структуре и фармаколошке активности добијених деривата.

Синтетисани азини су у потпуности спектрално окарактерисани, укључујући комплетну асигнацију 1D и 2D NMR спектра. На основу добијених спектралних података установљено је присуство јаке интрамолекуларске водоничне везе настале између ОН-групе у положају 4 кумаринског језгра и суседног азотовог атома азинског моста. Интеракција остварена на овај начин условљава да кумарински фрагмент и азински мост буду копланарни, а кључна NOESY интеракција између протона ОН и азометинске-групе открила је *s-trans* конформацију азинске јединице.

Антимикуробна активност испитивана је према одабраним сојевима бактерија и гљива методом микродилуције. На основу добијених резултата уочена је значајна зависност антимикуробне активности од природе фармакофоре везане за кумарин преко азинског моста. Већина синтетисаних азина са арил-супституентом [200-208] показала је широк спектар антимикуробних активности са МИС вредностима у опсегу 0,16-6,03 μM . Као изузетно активни показали су се производи са *p*-хидроксифенил фармакофором, посебно једињење [205] према соју *S. aureus*, као и [203] и [208] према *A. baumannii*. Добијене МИС вредности за наведена једињења упоредиве су са активношћу коришћеног референтног антибиотика хлорамфеникола. Једињења из групе азина са хетероарил-супституентом [210-216] показала су добру инхибиторну активност са МИС вредностима у

интервалу од 0,30 до 6,45 μM . Осетљивост Грам-негативних сојева према овим једињењима била је за нијансу већа у односу на Грам-позитивне. Највећу активност показали су деривати са пироловим фрагментом, [212] и [213], према *E. coli*.

Акутна токсичност испитиваних деривата азина вршена је на моделу слановодних рачића *A. salina*, а добијени резултати тестирања показали су да они поседују (веома) ниску токсичност. Као најтоксичнији према јединкама *A. salina* показали су се деривати са тиофенским [210], индоловим [215] и диметоксифенил [201] прстеном, а уочено је и да присуство хетероатома на језгру супституента додатно доприноси израженијој токсичности азина.

Антиоксидативна активност испитивана је методом неутрализације DPPH радикала, при чему је утврђено да синтетисана једињења поседују веома различиту активност (IC_{50} вредности у интервалу 17,98-216,60 μM) у зависности од уведене фармакофоре. Од деривата са хетероарил-супституентом, највећу антиоксидативну снагу показала су једињења са пироловим [213] и хинолинским [216] прстеном, док је из групе азина са арил-супституентом најактивнији био дериват са *p*-хидроксифенил-групом и две додатне OMe-групе [206]. Закључено је да на способност неутрализације поменутог радикала утиче присуство хетероатома у супституенту, као и присуство фенолних OH-група.

У закључку, утврђено је да синтетисана једињења, добијена вишефазним структурним модификацијама, која садрже исти супструктурни фрагмент, доприносе различитим биолошким одговорима у *in vitro* и *in vivo* условима. Стога, синтетисани кумарин-азин хибриди представљају добру основу за потенцијални развој фармацеутских препарата као антимикробна средства са антиоксидативним својствима и ниском токсичношћу.

6. ЛИТЕРАТУРА

- Abbaskhan A., Choudhary M. I., Ghayur M. N., Parween Z., Shaheen F., Gilani A. U., Maruyama T., Iqbal K., Tsuda Y., *Phytother. Res.*, 26(5): 783-786 (2012).
- Abdel Latif N. A., Batran R. Z., Khedr M. A., Abdalla M. M., *Bioorg. Chem.*, 67: 116-129 (2016).
- Abdelhafez O. M., Batran R. Z., Amin K. M., Maher T. J., Sethumadhavan S., Nada S. A., *Bioorg. Med. Chem.*, 18: 3371-3378 (2010).
- Abdou M. M., *Arab. J. Chem.*, 10(2): S3664-S3675 (2017).
- Abdou M. M., El-Saeed R. A., Bondock S., *Arab. J. Chem.*, 12(1): 88-121 (2019).
- Abelt C. J., Pleier J. M., *J. Am. Chem. Soc.*, 111(55): 1795-1799 (1989).
- Adhami H. R., Lutz J., Kählig H., Zehl M., Krenn L., *Sci. Pharm.*, 81(3): 793-805 (2013).
- Ahmadi F., Valadbeigi S., Sajjadi S. E., Shokoohinia Y., Azizian H., Taheripak G., *Chem. Biol. Interact.*, 258: 89-101 (2016).
- Al-Ayed A. S., *Molecules*, 16: 10292-10302 (2011).
- Aldulaimi O., *Pharmacogn. Mag.*, 13(suppl 4): s189-s195 (2017).
- Alkorta I., Blanco F., Elguero J., *ARKIVOC*, (vii): 48-56 (2008).
- Andrew G. J., Cardellina H. J., Dominic S., Kondapaka S., Zhang H., Kim H., Shoemaker R., Pommier Y., *Mol. Pharmacol.*, 72: 876-884 (2007).
- Annunziata F., Pinna C., Dallavalle S., Tamborini L., Pinto A., *Int. J. Mol. Sci.*, 21(13): 4618 (2020).
- Aslam K., Khosa M. K., Jahan N., Nosheen S., *Pak. J. Pharm. Sci.*, 23: 449-454 (2010).
- Augustine J. K., Bombrun A., Ramappa B., Boodappa C., *Tetrahedron Lett.*, 53: 4422-4425 (2012).
- Bao W., Wang Z., Li Y., *J. Chem. Res.*, 2003(5): 294-295 (2003).
- Barahona M. V., Sánchez-Fortún S., *Environ. Pollut.*, 104: 469-476 (1999).
- Basile A., Sorbo S., Spadaro V., Bruno M., Maggio A., Faraone N., Rosselli S., *Molecules*, 14(3): 939-952 (2009).
- Bavisotto L. M., Ellis D. J., Milner P. G., Combs D. L., Irwin I., Canafax D. M., *J. Clin. Pharmacol.*, 51(4): 561-574 (2011).
- Beattie K. A., Ressler J., Wiegand C., Krause E., Codd G. A., Steinberg C. E. W.,

- Pflugmacher S., *Aquat. Toxicol.*, 62: 219-226 (2003).
- Bedoya L. M., Beltrán M., Sancho R., Olmedo D. A., Sánchez-Palomino S., del Olmo E., López-Pérez J. L., Muñoz E., San Feliciano A., Alcamí J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15(20): 4447-4450 (2005).
- Bhat A. N., Jain B. D., *Talanta*, 4(1): 13-16 (1960).
- Bhat M. A., Al-Omar M. A., *Acta Pol. Pharm.*, 68(6): 889-895 (2011).
- Birben E., Sahiner U. M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O., *World Allergy Organ. J.*, 5(1): 9-19 (2012).
- Bisacchi G. S., Manchester J. I., *ACS Infect. Dis.*, 1(1): 4-41 (2015).
- Bodtke A., Pfeiffer W. D., Ahrens N., Langer P., *Tetrahedron*, 61(46): 10926-10929 (2005).
- Bondock S., Gieman H., El-Shafei A., *J. Saudi Chem. Soc.*, 20(6): 695-702 (2016).
- Borges F., Roleira F., Milhazes N., Santana L., Uriarte E., *Curr. Med. Chem.*, 12(8): 887-916 (2005).
- Borges F., Roleira F., Milhazes N., Uriarte E., Santana L., *Front. Med. Chem.*, 4: 23-85 (2009).
- Bouasla S., Amaro-Gahete J., Esquivel D., López M. I., Jiménez-Sanchidrián C., Teguche M., Romero-Salguero F. J., *Molecules*, 22: 2072 (2017).
- Brahmachari G., Das S., Kumar A., Misra N., Sharma S., Gupta V. K., *J. Mol. Struct.*, 1136: 214-221 (2017).
- Brenzan M. A., Santos A. O., Nakamura C. V., Filho B. P., Ueda-Nakamura T., Young M. C., Côrrea A. G., Júnior J. A., Morgado-Díaz J. A., Cortez D. A., *Phytomedicine*, 19(3-4): 223-230 (2012).
- Buckheit R. W. Jr., White E. L., Fliakas-Boltz V., Russell J., Stup T. L., Kinjerski T. L., Osterling M. C., Weigand A., Bader J. P., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43(8): 1827-1834 (1999).
- Burlison J. A., Neckers L., Smith A. B., Maxwell A., Blagg B. S., *J. Am. Chem. Soc.*, 128(48): 15529-15536 (2006).
- Canning C., Sun S., Ji X., Gupta S., Zhou K., *J. Ethnopharmacol.*, 147(1): 259-262 (2013).

- Cao Y., Zhang Y., Wang N., He L., *J. Am. Soc. Hypertens.*, 8: 527-536 (2014).
- Catarzi D., Cecchi L., Colotta V., Filacchioni G., Martini C., Tacchi P., Lucacchini A., *J. Med. Chem.*, 38: 1330-1336 (1995).
- Cavallini G., Massarani E., Nardi D., Mauri L., Mantegazza P., *J. Med. Pharmaceut. Chem.*, 4: 177-182 (1961).
- Cazal C. de M., Domingues V. de C., Batalhão J. R., Bueno O. C., Filho E. R., da Silva M. F., Vieira P. C., Fernandes J. B., *J. Chromatogr. A*, 1216(19): 4307-4312 (2009).
- Chahar M. K., Sanjaya Kumar D. S., Lokesh T., Manohara K. P., *Int. Immunopharmacol.*, 13(4): 386-391 (2012).
- Chanfrau J. E. R., Ferrada C. R., *Rev. Cuba. de Farm.*, 48: 477-485 (2014).
- Chen G. S., Wilbur J. K., Barnes C. L. Glaser R., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 12: 2311-2317 (1995a).
- Chen Y. F., Tsai H. Y., Wu T. S., *Planta Med.*, 61(1): 2-8 (1995b).
- Chen Y. S., Kuo P. Y., Shie T. L., Yang D. Y., *Tetrahedron*, 62: 9410-9416 (2006).
- Cheng H. C., Qi R. Z., Paudel H., Zhu H. J., *Enzyme Res.*, 2011: e794089 (2011).
- Chiang C. C., Cheng M. J., Peng C. F., Huang H. Y., Chen I. S., *Chem. Biodivers.*, 7(7): 1728-1736 (2010).
- Chung C. Y., Hwang T. L., Kuo L. M., Kuo W. L., Cheng M. J., Wu Y. H., Sung P.J., Chung M. I., Chen J. J., *Int. J. Mol. Sci.*, 14(11): 22395-22408 (2013).
- Choonara I. A., Malia R. G., Haynes B. P., Hay C. R., Cholerton S., Breckenridge A. M., Preston F. E., Park B. K., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 25(1): 1-7 (1988).
- Chou S. Y., Hsu C. S., Wang K. T., Wang M. C., Wang C. C., *Phytother. Res.*, 21(3): 226-230 (2007).
- Chougala B. M., Samundeeswari S., Holiyachi M., Naik N. S., Shastri L. A., Dodamani S., Jalalpure S., Dixit S. R., Joshi S. D., Sunagar V. A., *Eur. J. Med. Chem.*, 143: 1744-1756 (2018).
- Chourasiya S. S., Kathuria D., Singh S., Sonawane V. C., Chakraborti A. K., Bharatam P. V., *RSC Adv.*, 5: 80027-80038 (2015).
- Chourasiya S. S., Kathuria D., Wani A. A., Bharatam P. V., *Org. Biomol. Chem.*, 17(37):

- 8486-8521 (2019).
- Chunyan C., Bo S., Ping L., Jingmei L., Ito Y., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 32(1): 136-143 (2009).
- Cohen A. J., *Food Cosmet. Toxicol.*, 17(3): 277-289 (1979).
- Colotta V., Cecchi L., Filacchioni G., Melani F., Palazzino G., Martini C., Giannaccini G., Lucacchini A., *J. Med. Chem.*, 31: 1-3 (1988).
- Cordier C., Vauthier E., Adenier A., Lu Y., Massat A., Coss'e-Barbi A., *Struct. Chem.*, 15, 295-307 (2004).
- Costa T. M., Tavares L. B. B., de Oliveira D., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100(15): 6571-6584 (2016).
- Couttolenc A., Díaz-Porras Á., Espinoza C., Medina M. E., Trigos Á., *J. Phys. Org. Chem.*, 33: 1-10 (2020).
- Curtius T., Thun K., *J. Prakt. Chem.*, 44: 161-186 (1891).
- Ćavar S., Kovač F., Maksimović M., *Food Chem.*, 117(1): 135-142 (2009).
- Danish I. A., Prasad K. J. R., *Acta Pharm.*, 54: 133-142 (2004).
- Dapeng Y., Tianwei G. U., Ting W., Qingjiu T., Changyan M., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 74: 1430-1434 (2010).
- Davis A. B., Fronczek F. R., Wallace K. J., *Acta Crystallogr.*, E72: 1032-1036 (2016).
- Dawood D. H., Batran R. Z., Farghaly T. A., Khedr M. A., Abdulla M. M., *Arch. Pharm.*, 348(12): 875-888 (2015).
- Dekić V., Radulović N., Vukićević R., Dekić B., Skropeta D., Palić R., *Magn. Reson. Chem.*, 48 (11): 896-902 (2010).
- Diamant S., Agranat I., Goldblum A., Cohen S., Atlas D., *Biochem. Pharmacol.*, 34: 491-498 (1985).
- Eeva M., Rauha J. P., Vuorela P., Vuorela H., *Phytochem. Anal.*, 15(3): 167-174 (2004).
- Eicher T., Hauptmann S., Speicher A., *The Chemistry of Heterocycles: Structures, Reactions, Synthesis, and Applications*, 3rd edition, Wiley-VCH Verlag, Germany (2013).
- El-Ansary S. L., Abdel Rahman D. E., Abdel Ghany L. M. A., *Open Med. Chem. J.*, 11: 81-

- 91 (2017).
- El-Hafiz M. A. A., Weniger B., Quirion J. C., Anton R., *Phytochemistry*, 30(6): 2029-2031 (1991).
- Ellis D. J., Usman M. H., Milner P. G., Canafax D. M., Ezekowitz M. D., *Circulation*, 120(12): 1029-1035 (2009).
- Etemad L., Zamani M., Iranshahi M., Roohbakhsh A., *Iran J. Pharm. Res.*, 18(3):1395-1402 (2019).
- Evans W. C., *Trease and Evans Pharmacognosy*, 16th edition, Elsevier Ltd., (2009).
- Eyles A., Jones W., Riedl K., Cipollini D., Schwartz S., Chan K., Herms D. A., Bonello P., *J. Chem. Ecol.*, 33(7): 1430-1448 (2007).
- Facundo V. A., Sá A. L., Silva S. A. F., Morais S. M., Matos C. R. R., Braz-Filho R., *J. Braz. Chem. Soc.*, 15(1): 140-145 (2004).
- Fan H., Gao Z., Ji K., Li X., Wu J., Liu Y., Wang X., Liang H., Liu P., Chen D., Zhao F., *Phytomedicine.*, 58: 152864 (2019).
- Fayed E. A., Sabour R., Harras M. F., Mehany A. B. M., *Med. Chem. Res.*, 28: 1284-1297 (2019).
- Ford-Hutchinson A. W., Gresser M., Young R. N., *Annu. Rev. Biochem.*, 63: 383-417 (1994).
- French F. A., DoAmaral J. R., Blanz Jr E. J., French D. A., *J. Med. Chem.* 14: 862-866 (1971).
- Gaddi A., Cicero A. F., Pedro E. J., *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 38(3): 201-212 (2004).
- Galano A., Mazzone G., Alvarez-Diduk R., Marino T., Alvarez-Idaboy J. R., Russo N., *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 7: 335-352 (2016).
- Galetta J., Man S., Potáček M., *ARKIVOC*, (vi): 245-259 (2009).
- Gestetner B., Conn E. E., *Desr. Arch. Biochem. Biophys.*, 163: 617-624 (1974).
- Ghate M., Manohar D., Kulkarni V., Shobha R., Kattimani S. Y., *Eur. J. Med. Chem.*, 38(3): 297-302 (2003).
- Glaser R., Chen G. S., *J. Comput. Chem.*, 19: 1130-1140 (1998).
- Golfakhrabadi F., Abdollahi M., Ardakani M. R., Saeidnia S., Akbarzadeh T., Ahmadabadi

- A. N., Ebrahimi A., Yousefbeyk F., Hassanzadeh A., Khanavi M., *Pharm. Biol.*, 52(10): 1335-1340 (2014).
- Grzegorzec J., Mielke Z., Filarowski A., *J. Mol. Struct.*, 976(1-3): 371-376 (2010).
- Guilet D., Séraphin D., Rondeau D., Richomme P., Bruneton J., *Phytochemistry*, 58(4): 571-575 (2001).
- Gul H. I., Calis U., Vepsalainen J., *Arzneimittelforschung.*, 54: 359-364 (2004).
- Hahn E. F., Carroll-Buatti M., Pasternak G. W., *J. Neurosci.*, 2: 572-576 (1982).
- Halawa A. H., Eliwa E. M., Hassan A. A., Nassar H. S., El-Eisawy R. A., Ismail M., Frese M., Shaaban M., El-Agrody A. M., Bedair A., Sewald N., *J. Mol. Struct.*, 1200: 127047 (2020).
- Halawani A. Latif N., *J. Egypt. Med. Assoc.*, 37(8): 957-962 (1954).
- Hamidi M. R., Jovanova B., Panovska T. K., *Maced. Pharm. Bull.*, 60: 9-18 (2014).
- Hanahan D., Weinberg R. A., *Cell*, 100(1): 57-70 (2000).
- Hassan M. Z., Osman H., Ali M. A., Ahsan M. J., *Eur. J. Med. Chem.*, 123: 236-255 (2016).
- He X., Shang Y., Zhou Y., Yu Z., Han G., Jin W., Chen J., *Tetrahedron*, 71: 863-868 (2015).
- He X., Yan Z., Hu X., Zuo Y., Jiang C., Jin L., Shang Y., *Synth. Commun.*, 44: 1507-1514 (2014).
- Hermann M., Lukacin R., Ekiert H., Matern U., *Eur. J. Biochem.*, 271(5): 932-940 (2004).
- Herrera-R A., Castrillón W., Otero E., Ruiz E., Carda M., Agut R., Naranjo T., Moreno G., Maldonado M. E., Cardona-G W., *Med. Chem. Res.*, 27: 1893-1905 (2018).
- Herrera-R A., Naranjo T. W., Maldonado M. E., Moreno-Q G., Yepes A., Cardona-G W., *Med. Chem. Res.*, 29: 377-395 (2020).
- Hirsh J., Dalen J., Anderson D. R., Poller L., Bussey H., Ansell J., Deykin D., *Chest.*, 119: 8S-21S (2001).
- Holmes B., Brogden R., Heel R., Speight T., Avery G., *Drugs*, 26: 212-229 (1983).
- Hopkins J. M., Bowdridge M., Robertson K. N., Cameron T. S., Jenkins H. A., *J. Org. Chem.*, 66(17): 5713-5716 (2001).

- Hoult J. R. S., Payá M., *Gen. Pharmacol.*, 27: 713-722 (1996).
- Hroboňová K., Machyňáková A., Čižmárik J., *J. Chromatogr. A*, 1539: 93-102 (2018).
- Hu J. H., Sun Y., Qi J., Li Q., Wei T. B., *Spectrochim. Acta Part A*, 175: 125-133 (2017).
- Hu Y., Wang B., Yang J., Liu T., Sun J., Wang X., *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 34(1): 15-30 (2019).
- Huang G. J., Deng J. S., Liao J. C., Hou W. C., Wang S. Y., Sung P. J., Kuo Y. H., *J. Agric. Food Chem.*, 60(7): 1673-1681 (2012).
- Huang S. X., Mou J. F., Luo Q., Mo Q. H., Zhou X. L., Huang X., Xu Q., Tan X. D., Chen X., Liang C. Q., *Molecules*, 24(19): 3475 (2019).
- Hwang C. H., Jaki B. U., Klein L. L., Lankin D. C., McAlpine J. B., Napolitano J. G., Fryling N. A., Franzblau S. G., Cho S. H., Stamets P. E., Wang Y., Pauli G. F., *J. Nat. Prod.*, 76: 1916-1922 (2013).
- Hwu J. R., Singha R., Hong S. C., Chang Y. H., Das A. R., Vliegen I., De Clercq E., Neyts J., *Antiviral Res.*, 77(2): 157-162 (2008).
- Innocenti G., Bourgaud F., Piovan A., Favretto D., *Int. J. Pharmacogn.*, 35(4): 232-236 (1997).
- Islam M. R., Omar M., Moyen Uddin P.K., Mia M.R., Kamrunnahar M., *Am. J. Biol. Life Sci.*, 3: 31-35 (2015).
- Ito A., Chai H. B., Shin Y. G., García R., Mejía M., Gao Q., Fairchild C. R., Lane K. E., Menendez A. T., Farnsworth N. R., Cordell G. A., Pezzuto J. M., Kinghorn A. D., *Tetrahedron*, 56(35): 6401-6405 (2000).
- Jain P. K., Joshi H., *J. Appl. Pharm. Sci.*, 2: 236-240 (2012).
- Jampilek J., *Molecules*, 24(21): 3839 (2019).
- Jayabharathi J., Thanikachalam V., Thangamani A. Padmavathy M., *Med. Chem. Res.*, 16(6): 266-279 (2007).
- Jesumoroti O. J., Faridoon, Mnkandhla D., Isaacs M., Hoppe H. C., Klein R., *MedChemComm*, 10(1): 80-88 (2019).
- Joule J. A., Millis K., *Heterocyclic chemistry*, 5th edition, Wiley, UK (2010).
- Ju Y., Zhao Y., Still C. C., Sacalis J. N., *Tsinghua Sci. Technol.*, 5(2): 159-162 (2000).

- Jukič M., Šterk D., Časar Z., *Curr. Org. Synth.*, 9: 488-512 (2012).
- Jung J. C., Park O. S., *Molecules*, 14(11): 4790-4803 (2009).
- Kalinowski D. S., Sharpe P. C., Bernhardt P. V., Richardson D. R., *J. Med. Chem.*, 50: 6212-6225 (2007).
- Kaneria A., Giri R., Bhila V., Prajapati H., Brahmhatt D., *Arab. J. Chem.*, 10: S1100-S1104 (2017).
- Kaniyarakkal V., Orvankundil S., Lalitha S. K., Thazhethekandi R., Thottathil J., *Case Rep. Infect. Dis.*, 2016: 6795743 (2016).
- Kappe T., Aigner R., Roschger P., Schnell B., Stadlbauer W., *Tetrahedron*, 51: 12923-12928 (1995).
- Karmakar R., Choudhury C. R., Batten S. R., Mitra S., *J. Mol. Struct.*, 826: 75-81 (2007).
- Kashman Y., Gustafson K. R., Fuller R. W., Cardellina J. H., McMahon J. B., Currens M. J., Buckheit R. W. Jr., Hughes S. H., Cragg G. M., Boyd M. R., *J. Med. Chem.*, 35(15): 2735-2743 (1992).
- Khan S., Shin E. M., Choi R. J., Jung Y. H., Kim J., Tosun A., Kim Y. S., *J. Cell Biochem.*, 112(8): 2179-2188 (2011).
- Kim S. H., Kang K. A., Zhang R., Piao M. J., Ko D. O., Wang Z. H., Chae S. W., Kang S. S., Lee K. H., Kang H. K., Kang H. W., Hyun J. W., *Acta. Pharmacol. Sin.*, 29(11): 1319-1326 (2008).
- Kirkiacharian S., Thuy D. T., Sicsic S., Bakhchinian R., Kurkjian R., Tonnaire T., *Farmaco*, 57(9): 703-708 (2002).
- Kleinhofs A., Haskins F. A., Gorz H. J., *Phytochemistry*, 6: 1313-1318 (1967).
- Kohno S., Murata T., Sugiura A., Ito C., Iranshahi M., Hikita K., Kaneda N. *J. Nat. Med.*, 65: 353-359 (2011).
- Kolb V. M., Hua D. H., Duax W. L., *J. Org. Chem.*, 52(14): 3003-3010 (1987).
- Kolb V. M., Hua D. H., *J. Org. Chem.*, 49: 3824-3828 (1984).
- Koman A., Kolb V. M., Terenius L., *Pharm. Res.*, 3(1): 56-60 (1986).
- Kominek L. A., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1(2): 123-134 (1972).
- Kong L. Y., Yi L., Min Z. D., Li X., Zhu T. R., *Phytochemistry*, 41(5): 1423-1426 (1996).

- Koukol J., Conn E. E., *J. Biol. Chem.*, 236: 2692-2698 (1961).
- Krezel I., Mikiciuk-olasik E., Zurek E., Glowka M. L., *Pharm. Pharmacol. Commun.*, 5: 485-490 (1999).
- Kulaksızoğlu S., Gup R., *Chem. Pap.*, 66(3): 194-201 (2012).
- Kuo P., Chuang R., Yang D., *Mol. Divers.*, 13: 253-260 (2009).
- Kurteva V. B., Simeonov S. P., Stoilova-Disheva M., *Pharmacol. Pharm.*, 2: 1-9 (2011).
- Kviesis J., Kļimenkovs I., Arbidans L., Podjava A., Kļaviņš M., Liepiņš E., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 1105: 54-66 (2019).
- Lake B. G., *Food. Chem. Toxicol.*, 37(4): 423-453 (1999).
- Larsen T. M., Toubro S., Astrup A., *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 27(2): 147-161 (2003).
- Lasri J., Aly M. M., Eltayeb N. E., Babgi B. A., *J. Mol. Struct.*, 1164: 1-8 (2018).
- Latif N., Fathy I., *J. Org. Chem.*, 25(9): 1614-1617 (1960).
- Lee M. K., Ling J. H., Chun M. H., Jeong J. H., Na Y. C., Lee K. W., Jung J. H., Hong J., *Bull. Korean Chem. Soc.*, 29(12): 2465-2470 (2008).
- Lewis M., Barnes C. L., Glaser R., *Can. J. Chem.*, 76(10): 1371-1378 (1998).
- Lewis M., Glaser R., *J. Org. Chem.*, 67: 1441-1447 (2002).
- Li D. Q., Tan M. X., Jie L., *Adv. Mater. Res.*, 396-398: 2366-2369 (2011).
- Li J., Li X., Wang S., *Spectrochim. Acta, Part A*, 88: 31-36 (2012).
- Liang C., Xia J., Lei D., Li X., Yao Q., Gao J., *Eur. J. Med. Chem.*, 74: 742-750 (2014).
- Libralato G., Prato E., Migliore L., Cicero A. M., Manfra L., *Ecol. Indic.*, 69: 35-49 (2016).
- Lim C. K., Hemaroopini S., Gan S. Y., Loo S. M., Low J. R., Jong V. Y., Soo H. C., Leong C. O., Mai C. W., Chee C. F., *Med. Chem. Res.*, 25: 1686-1694 (2016).
- Lim H. J., Lee J. H., Choi J. S., Lee S. K., Kim Y.S., Kim H. P., *J. Ethnopharmacol.*, 155(2): 1353-1361 (2014).
- Lima V., Silva C. B., Mafezoli J., Bezerra M. M., Moraes M. O., Mourão G. S. M. M., Silva J. N., Oliveira M. C. F., *Fitoterapia*, 77, 574-578 (2006).
- Lin C. M., Huang S. T., Lee F. W., Kuo H. S., Lin M. H., *Bioorg. Med. Chem.*, 14(13): 4402-

- 4409 (2006).
- Lin C. T., Shih J. H., Chen C. L., Yang D. Y., *Tetrahedron Lett.*, 46: 5033-5037 (2005).
- Lin H. C., Tsai S. H., Chen C. S., Chang Y. C., Lee C. M., Lai Z. Y., Lin C.M., *Biochem. Pharmacol.*, 75(6): 1416-1425 (2008).
- Lin Y., Sun X., Yuan Q., Yan Y., *Metab. Eng.*, 18: 69-77 (2013).
- Lin Y. M., Anderson H. M., Jenta T. R., Williams M. J., Flavin M. T., Xu Z. Q., *Pharm. Biol.*, 37(1): 71-76 (1999).
- Liu R., Sun Q., Sun A., Cui J., *J. Chromatogr. A*, 1072: 195-199 (2005).
- Lu Y., Shipton F., Khoo T., Wiart C., *Pharmacol. Pharm.*, 5: 395-400 (2014).
- Lu Y., Xu X., Meng C., Zhou J., Sheng J., Wu C., Xu S., *Adv. Mat. Res.*, 726-731: 230-233 (2013).
- Luo Z. G., Liu P., Fang Y. Y., Xu X. M., Feng C. T., Li Z., Zhang X. M., He J., *Res. Chem. Intermed.*, 43: 1139-1148 (2017).
- Manvar A., Bochiya P., Virsodia V., Khunt R., Shah A., *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 275: 148-152 (2007).
- March J., *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure*, John Wiley & Sons, Inc., New York (1992).
- Marek R., *Molecules*, 2(5): M11 (1997).
- Mark R., Lyu X., Lee J. J. L., Parra-Saldívar R., Chen W. N., *J. Funct. Foods*, 57: 233-254 (2019).
- Marrelli M., Menichini F., Statti G. A., Bonesi M., Duez P., Menichini F., Conforti F., *Food Chem. Toxicol.*, 50(3-4): 726-33 (2012).
- Masamoto Y., Ando H., Murata Y., Shimoishi Y., Tada M., Takahata K., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67(3): 631-634 (2003).
- Matos M. J., Santana L., Uriarte E., Abreu O. A., Molina E., Yordi E. G., *Coumarins – An Important Class of Phytochemicals*, Chapter 5 in *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health*, InTech, Rijeka, Croatia (2015).
- Matos M. J., Vazquez-Rodriguez S., Fonseca A., Uriarte E., Santana L., Borges F., *Curr. Org. Chem.*, 21: 311-324 (2017).

- Matczak P., Domagała M., *J. Mol. Model.*, 23(9): 268 (2017).
- McNamara J. O., *J. Neurosci.*, 14: 3413-3425 (1994).
- Medina M. E., Iuga C., Álvarez-Idaboy J. R., *RSC Adv.*, 4: 52920-52932 (2014).
- Melagraki G., Afantitis A., Igglessi-Markopoulou O., Detsi A., Koufaki M., Kontogiorgis C., Hadjipavlou-Litina D. J., *Eur. J. Med. Chem.*, 44(7): 3020-3026 (2009).
- Menéndez-Arias L., Gago F., *Antiviral Agents: Structural Basis of Action and Rational Design*, Chapter 20 in *Structure and Physics of Viruses*, Springer (2013).
- Menteşe E., Baltaş N., Bekircan O., *Arch. Pharm.*, 352(12): e1900227 (2019).
- Miglietta A., Bocca C., Gabriel L. Rampa A., Bisi A., Valenti P., *Cell Biochem. Funct.*, 19(3): 181-189 (2001).
- Mira A., Shimizu K., *Pharmacogn. Mag.*, 11(suppl 2): s564-s569 (2015).
- Mishra S., Pandey A., Manvati S., *Heliyon*, 6(1): e03217 (2020).
- Mladenović M., Vuković N., Niciforović N., Sukdolak S., Solujić S., *Molecules*, 14: 1495-1512 (2009).
- Mogland E. H. O., Saadabi A. M., *Microbiol. J.*, 2: 64-69 (2012).
- Mohammadi-Khanaposhtani M., Ahangar N., Sobhani S., Masihi P. H., Shakiba A., Saeedi M., Akbarzadeh T., *Bioorg. Chem.*, 89: 102989 (2019).
- Mokdad-Bzeouich I., Mustapha N., Chaabane F., Ghedira Z., Ghedira K., Ghouli M., Chebil L., Chekir-Ghedira L., *J. Antibiot.*, 68(3): 148-152 (2015).
- Mokrov G. V., Savel'ev V. L., Voronina T., Litvinova S. A., Kovalev I. G., Nerobkova L., Dmitrienko A. O., Gudasheva T., Seredenin S. *Pharm. Chem. J.*, 53: 118-124 (2019).
- Montagut-Romans A., Boulven M., Jacolot M., Moebis-Sanchez S., Hascoët C., Hammed A., Besse S., Lemaire M., Benoit E., Lattard V., Popowycz F., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 27(7): 1598-1601 (2017).
- Moradi L., Rabiei K., Belali F., *Synth. Commun.*, 47: 1283-1291 (2016).
- Moreno-Mañas M., Pleixats R., Andreu R., Garín J., Orduna J., Villacampa B., Levillain E., Sallé M., *J. Mater. Chem.*, 11: 374-380 (2001).
- Moss G., Smith P., Tavernier D., *Pure & Appl. Chem.*, 67: 1307-1375 (1995).

- Mukandiwa L., Ahmed A., Eloff J. N., Naidoo V., *J. Ethnopharmacol.*, 150(3): 886-891 (2013).
- Mulwad V. V., Hegde A. S., *Indian J. Chem., Sect. B.*, 48B: 128-133 (2009).
- Murray R. D. H., Mendez J., Brown S. A., *The natural coumarins occurrence*, Wiley & Sons, Chichester, UK (1982).
- Musa M. A., Badisa V. L., Latinwo L. M., Cooperwood J., Sinclair A., Abdullah A., *Anticancer Res.*, 31(6): 2017-2022 (2011).
- Mustahil N. A., Riyanto S., Sukari M. A., Rahmani M., Mohd Nor S. M., Ali A. M., *Res. J. Chem. Environ.*, 17(1): 62-67 (2013).
- Naceur H., Fischmeister C., Puerta M. C., Valerga P., *Med. Chem. Res.*, 20: 522-530 (2011).
- Nagamallu R., Srinivasan B., Ningappa M. B., Kariyappa A. K., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 26(2): 690-694 (2016).
- Nakano T., Kakuda H., Mori Y., Shiro M., *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.*, 62: o331-o332 (2006).
- Naowaboot J., Somparn N., Saentaweek S., Pannangpetch P., *Phytother. Res.*, 29(9): 1388-1395 (2015).
- Nasr T., Bondock S., Youns M., *Eur. J. Med. Chem.*, 76: 539-548 (2014).
- Nassar M. I., Aboutabl E. A., Makled Y. A., El-Khrisy E. A., Osman A. F., *Rev. Latinoam. Quími.*, 38: 103-112 (2010).
- Neureiter T. P., *J. Am. Chem. Soc.*, 81(11): 2910 (1959).
- Niu X., Xing W., Li W., Fan T., Hu H., Li Y., *Int. Immunopharmacol.*, 14(2): 164-171 (2012).
- Norn S., Permin H., Kruse E., Kruse P. R., *Dan. Medicinhist Arbog.*, 42: 99-119 (2014).
- Oba K., Conn E. E., Canut H., Boudet A. M., *Plant. Physiol.*, 68: 1359-1363 (1981).
- Okimoto M., Yoshida T., Hoshi M., Hattori K., Komata M., Tomozawa K., Chiba T., *Synth. Commun.*, 38: 3320-3328 (2008).
- Olmedo D., Sancho R., Bedoya L. M., López-Pérez J. L., Del Olmo E., Muñoz E., Alcamí J., Gupta M. P., San Feliciano A., *Molecules*, 17(8): 9245-9257 (2012).

- Olomola T. O., Klein R., Mautsa N., Sayed Y., Kaye P. T., *Bioorg. Med. Chem.*, 21(7):1964-1971 (2013).
- Osman H., Yusufzai S. K., Khan M. S., Razik B. M. A., Sulaiman O., Mohamad S., Gansau J. A., Ezzat M. O., Parumasivam T., Hassan M. Z., *J. Mol. Struct.*, 1166: 147-154 (2018).
- Patel K., Karthikeyan C., Solomon V. R., Moorthy N. S. H., Lee H., Sahu K., Deora G. S., Trivedi P., *Lett. Drug Des. Discov.*, 8: 308-311 (2011).
- Parast B. M., Chetri S. K., Sharma K., Agrawal V., *Plant Physiol. Biochem.*, 49(10): 1138-1146 (2011).
- Pari L., Rajarajeswari N., *Chem. Biol. Interact.*, 181(3): 292-296 (2009).
- Parra A., Yhebra R. S., Sardiñas I., Buella L. *Phytomedicine*, 8: 395-400 (2001).
- Paterna A., Khonkarn R., Mulhovo S., Moreno A., Girio P. M., Baubichon-Cortay H., Falson P., Ferreira M. J. U., *Bioorg. Med. Chem.*, 26: 421-434 (2018).
- Patil A. D., Freyer A. J., Eggleston D. S., Haltiwanger R. C., Bean M. F., Taylor P. B., Caranfa M. J., Breen A. L., Bartus H. R., Johnson R. K., Hertzberg R. P., Westley J. W., *J. Med. Chem.*, 36(26): 4131-4138 (1993).
- Pavurala S., Vaarla K., Kesharwani R., Naesens L., Liekens S., Vedula R. R. *Synth. Commun.*, 48: 1494-1503 (2018).
- Pelka M., Danzl C., Distler W., Petschelt A., *J. Dent.*, 28(5): 341-345 (2000).
- Peng X. M., Damu G. L. V., Zhou C. H., *Curr. Pharm. Des.*, 19(21): 3884-3930 (2013).
- Pereira T. M., Franco D. P., Vitorio F., Kummerle A. E., *Curr. Top. Med. Chem.*, 18: 124-148 (2018).
- Pérez-Cruz F., Serra S., Delogu G., Lapier M., Maya J. D., Olea-Azar C., Santana L., Uriarte E., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22(17): 5569-5573 (2012).
- Phadtare S. B., Shankarling G. S., *Environ. Chem. Lett.*, 10: 363-368 (2012).
- Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F., Arcoraci V., Squadrito F., Altavilla D., Bitto A., *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2017: e8416763 (2017).
- Poole C. F., *J. Chromatog. A*, 1037: 49-82 (2004).
- Pornsattitworakul S., Boekfa B., Maihom T., Treesukol P., Namuangruk S., Jarussophon

- S., Limtrakul J., *Chem. Mon.*, 148: 1245-1250 (2017).
- Pu W., Lin Y., Zhang J., Wang F., Wang C., Zhang G., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 24: 5432-5434 (2014).
- Qian G. S., Wang Q., Leung, K. S. Y., Qin Y., Zhao Z., Jiang Z. H., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 44(3): 812-817 (2007).
- Qian Y., Zhang H-Jia., Lv P-C., Zhu H-L., *Bioorg. Med. Chem.*, 18: 8218-8225 (2010).
- Radulović N. S., Blagojević P. D., Stojanović-Radić Z. Z., Stojanović N. M., *Curr. Med. Chem.*, 20(7): 932-952 (2013).
- Radulović N., Stojanović-Radić Z., Stojanović P., Stojanović, N., Dekić V., Dekić B., *J. Serb. Chem. Soc.*, 80: 315-327 (2015).
- Ragavan R. V., Kumar K. M., Vijayakumar V., Sarveswari S., Ramaiah S., Anbarasu A., Karthikeyan S., Giridharan P., Kumari N. S., *Org. Med. Chem. Lett.*, 3(1): 6 (2015).
- Rahman A., Shabbir M., Ziauddin Sultani S., Jabbar A., Choudhary M. I., *Phytochemistry*, 44(4): 683-685 (1997).
- Rajabi S., Ramazani A., Hamidi M., Naji T., *DARU*, 23(1), article no. 20 (2015).
- Ramesh B., Pugalendi K. V., *J. Med. Food*, 9(4): 562-566 (2006).
- Ranu B. C., Jana R., *Eur. J. Org. Chem.*, 16: 3767-3770 (2006).
- Rasul A., Khan M., Yu B., Ma T., Yang H., *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 12(5): 1219-1223 (2011).
- Ravelonjato B., Libot F., Ramiandrasoa F., Kunesch N., Gayral P., Poisson J., *Planta Med.*, 58(1): 51-55 (1992).
- Reddy M. D., Fronczek F. R., Watkins E. B., *Org. Lett.*, 18: 5620-5623 (2016).
- Reddy M. D., Uredi D., Watkins E. B., *Chem. Sci.*, 9: 1782-1788 (2018).
- Reddy M. S., Thirupathi N., Haribabu M., *Beilstein J. Org. Chem.*, 9: 180-184 (2013).
- Rezaei R., Farjam M. H., Farasat M., *Org. Chem. Ind. J.*, 10: 73-78 (2014).
- Rohini K., Srikumar P. S., *J. Thermodyn. Catal.*, 5: 1-4 (2014).
- Rosselli S., Maggio A. M., Faraone N., Spadaro V., Morris-Natschke S. L., Bastow K. F., Lee K. H., Bruno M., *Nat. Prod. Commun.*, 4(12): 1701-1706 (2009).

- Safari J., Gandomi-Ravandi S., *RSC Adv.*, 4: 46224-46249 (2014).
- Safari J., Gandomi-Ravandi S., *Synth. Commun.*, 41: 645-651 (2011).
- Sahoo J., Kumar P. S., Mekap S. K., *J. Taibah Univ. Sci.*, 9(2): 187-195 (2015).
- Sandjo L. P., Foster A. J., Rheinheimer J., Anke H., Opatz T., Thines E., *Tetrahedron Lett.*, 53: 2153-2156 (2012).
- Sarfraz I., Rasul A., Jabeen F., Younis T., Zahoor M. K., Arshad M., Ali M., *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2017: 4269868 (2017).
- Sasidharan S., Chen Y., Saravanan D., Sundram K. M., Yoga Latha L., *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, 8(1): 1-10 (2011).
- Sauro V. A., Workentin M. S., *J. Org. Chem.*, 66(3): 831-838 (2001).
- Schimmer O., Eschelbach H., *Pharmazie*, 52(6): 476-478 (1997).
- Sha Q., Wei Y., *Tetrahedron*, 69: 3829-3835 (2013).
- Shah S. N., Chudgar N. K., *Molecules*, 5(4), 657-664 (2000).
- Shah V. R., Bose J. L., Shah, R. C., *J. Org. Chem.*, 25: 677-678 (1960).
- Shaikh M. H., Subhedar D. D., Kalam Khan F. A., Sangshetti J. N., Shingate B. B., *Chin. Chem. Lett.*, 27: 295-301 (2016).
- Shalaby N., Abd-Alla H., Aly H., Albalawy M. A., Shaker K., Bouajila J., *BioMed. Res. Int.*, 2014: ID 480545 (2014).
- Shin E., Choi K. M., Yoo H. S., Lee C. K., Hwang B. Y., Lee M. K., *Biol. Pharm. Bull.*, 33(9): 1610-1614 (2010).
- Siddiqui N., Arshad M. F., Khan S. A., *Acta Pol. Pharm.*, 66(2): 161-167 (2009).
- Singh K. S., Mozharivskyj Y. A., Thöne C., Kollipara M. R., *J. Organomet. Chem.*, 690: 3720-3729 (2005).
- Singhuber J., Baburin I., Ecker G. F., Kopp B., Hering S., *Eur. J. Pharmacol.*, 668(1-2): 57-64 (2011).
- Skalicka-Woźniak K., Zagaja M., Głowniak K., Łuszczki J. J., *Cent. Eur. J. Biol.*, 9: 431-436 (2014).
- Soll R. M., Tianobao L., Bruce T., Carl R. I., Cynthia F., Stephen E., Roger B., Larry M., John S., Salemme F. R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10(1): 1-4 (2000).

- Soltani F., Mosaffa F., Iranshahi M., Karimi G., Malekaneh M., Haghghi F., Behravan J., *Phytother. Res.*, 24: 85-89 (2010).
- Souri E., Farsam H., Sarkheil P., Ebadi F., *Pharm. Biol.*, 42(6): 396-399 (2004).
- Srikrishna D., Godugu C., Dubey P. K., *Mini Rev. Med. Chem.*, 18(2): 113-141 (2018).
- Srivastava P., Vyas V. K., Variya B., Patel P., Qureshi G., Ghate M., *Bioorg. Chem.*, 67: 130-138 (2016).
- Stadlbauer W., Hojas G., *J. Heterocycl. Chem.*, 41: 681-690 (2004).
- Stanchev S., Jensen F., Hinkov A., Atanasov V., Genova-Kalou P., Argirova R., Manolov I., *ISRN Pharm.*, 2011: 137637 (2011).
- Stanić G., Jurišić B., Brkić D., *Croat. Chem. Acta.*, 72(4): 827-834 (1999).
- Stefanou V., Matiadis D., Tsironis D., Igglessi-Markopoulou O., McKee V., Markopoulos J., *Polyhedron*, 141: 289-295 (2018).
- Steffensky M., Mühlenweg A., Wang Z. X., Li S. M., Heide L., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44: 1214-1222 (2000).
- Subedi L., Kwon O. W., Pak C., Lee G., Lee K., Kim H. Kim S. Y., *BMC Neurosci.*, 18: 82 (2017).
- Sukdolak S., Solujić S., Vuković N., *Hemija i biohemija kumarina*, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac (2007).
- Sukdolak S., Solujić S., Vuković N., Manojlović N., Krstić Lj. *J. Serb. Chem. Soc.*, 69(5): 319-326 (2004).
- Suljić S., Pietruszka J., *Adv. Synth. Catal.*, 356: 1007-1020 (2014).
- Sun X., Shen X., Jain R., Lin Y., Wang J., Sun J., Wang J., Yan Y., Yuan Q., *Chem. Soc. Rev.*, 44: 3760-3785 (2015).
- Sundberg R. J., Dahlhausen D. J., Manikumar G., Mavunkel B., Biswas A., Srinivasan V., Musallam H., Reid Jr W. A., Ager, A. L., *J. Med. Chem.*, 33: 298-307 (1990).
- Takahashi Y., Inaba N., Kuwahara S., Kuki W., Yamane K., Murakami A., *J. Agric. Food Chem.*, 50(11): 3193-3196 (2002).
- Tang W., Xiang Y., Tong A., *J. Org. Chem.*, 74(5): 2163-2166 (2009).
- Tangmouo J. G., Meli A. L., Komguem J., Kuete V., Ngounou F. N., Lontsi D., Beng V. P.,

- Choudhary M. I., Sondengam B. L., *Tetrahedron Lett.*, 47: 3067-3070 (2006).
- Taylor A., Robinson R., Fobian Y., Blakemore D., Jones L., Fadeyi O., *Org. Biomol. Chem.*, 14: 6611-6637 (2016).
- Thuong P. T., Pokharel Y. R., Lee M. Y., Kim S. K., Bae K., Su N. D., Oh W. K., Kang K. W., *Biol. Pharm. Bull.*, 32(9): 1527-1532 (2009).
- Tighadouini S., Radi S., Toupet L., Sirajuddin M., Hadda T. B., Akkurt M., Warad I., Mabkhot Y. N., Ali S., *J. Chem. Sci.*, 127: 2211-2216 (2015).
- Törnquist K., Vuorela H., *Planta Med.*, 56(1): 127-129 (1990).
- Traykova M., Kostova I., *Int. J. Pharm.*, 1: 29-32 (2005).
- Trkovnik M., Ivezić Z., *J. Heterocycl. Chem.*, 37: 137-141 (2000).
- Tsay S. C., Lin S. Y., Huang W. C., Hsu M. H., Hwang K. C., Lin C. C., Horng J. C., Chen I. C., Hwu J. R., Shieh F. K., Leyssen P., Neyts J., *Molecules*, 21(2): 228 (2016).
- Ujjanamatada R. K., Agasimundin Y. S., *Ind. J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.*, 46(3): 540-543 (2007).
- Urbanczyk-Lipkowska Z., Lipkowski A., Etter M., Hahn E., Pasternak G., Portoghese P. S., *J. Med. Chem.*, 30: 1489-1494 (1987).
- Van Deun R., Parac-Vogt T. N., Van Hecke K., Van Meervelt L., Binnemans K., Guillon D., Donnio B., *J. Mater. Chem.*, 13: 1639-1645 (2003).
- Vannelli T., Qi W. W., Sweigard J., Gatenby A. A., Sariaslani S. F., *Metab. Eng.*, 9: 142-151 (2007).
- Vazquez-Rodriguez S., Matos M. J., Santana L., Uriarte E., Borges F., Kachler S., Klotz K. N., *J. Pharm. Pharmacol.*, 65(5): 697-703 (2013).
- Veena K., Ramaiah M., Shashikaladevi K., Avinash T. S., Vaidya V. P., *J. Chem. Pharm. Res.*, 3(5): 130-135 (2011).
- Vekariya R. H., Patel H. D., *Synth. Commun.*, 44: 2756-2788 (2014).
- Venugopala K. N., Rashmi V., Odhav B., *BioMed. Res. Int.*, 2013: 963248 (2013).
- Vermeer C., *Biochem. J.*, 266(3): 625-636 (1990).
- Verotta L., Lovaglio E., Vidari G., Finzi P. V., Neri M. G., Raimondi A., Parapini S., Taramelli D., Riva A., Bombardelli E., *Phytochemistry*, 65(21): 2867-2879 (2004).

- Veselinović J. B., Veselinović A. M., Vitnik Ž. J., Vitnik V. D., Nikolić G. M., *Chem. Biol. Interact.*, 214: 49-56 (2014).
- Vogl S., Zehl M., Picker P., Urban E., Wawrosch C., Reznicek G., Saukel J., Kopp B., *J. Agric. Food Chem.*, 59(9): 4371-4377 (2011).
- Wang B., Li N., Liu T., Sun J., Wang X., *RSC Adv.*, 7: 34448-34460 (2017).
- Wang H., Zou D., Xie K., Xie M., *Mol. Med. Rep.*, 10(5): 2341-1345 (2014).
- Wang L., Sun F., Zhang X., Ma Z., Cheng L., *Fitoterapia*, 81(7): 834-837 (2010).
- Wang S. J., Lin T. Y., Lu C. W., Huang W. J., *Neurochem. Int.*, 53: 416-423 (2008).
- Wang Z., *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, Wiley, UK (2010).
- Wardrop D., Keeling D., *Br. J. Haematol.*, 141(6): 757-763 (2008).
- Wasserscheid P., Welton T., *Ionic Liquids in Synthesis*, 2nd edition, Wiley-VCH Verlag, Germany (2007).
- Watanabe A., Kato T., Ito Y., Yoshida I., Harada T., Mishima T., Fujita K., Watai M., Nakagawa K., Miyazawa T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 453: 787-792 (2014).
- Whang W. K., Park H. S., Ham I., Oh M., Namkoong H., Kim H. K., Hwang D. W., Hur S. Y., Kim T. E., Park Y. G., Kim J. R., Kim J. W., *Exp. Mol. Med.*, 37(5): 436-446 (2005).
- Whitlock R. P., Fordyce C. B., Midei M. G., Ellis D., Garcia D., Weitz J. I., Canafax D. M., Albrecht D., Milner P. G., *Thromb. Haemost.*, 116(2): 241-250 (2016).
- Woo T. S., Yoon S. Y., Dela Pena I. C., Choi Y. Ji., Lee H. L., Choi Y. J., Lee Y. S., Ryu J. H., Choi J. S., Cheong J. H., *Biomol. Ther.*, 19: 342-347 (2011).
- Wu T. S., Hsu M. Y., Kuo P. C., Sreenivasulu B., Damu A. G., Su C. R., Li C. Y., Chang H. C., *J. Nat. Prod.*, 66(9): 1207-1211 (2003).
- Xu X., Lu Y., Zhang D., Wang Y., Zhou X., Xu H., Mei Y., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 95: 728-733 (2015).
- Yan W., Zheng C., He J., Zhang W., Huang X., Li X., Wang Y., Wang X., *Int. J. Mol. Med.*, 42(5): 2776-2792 (2018).
- Yang J. Y., Koo J. H., Yoon H. Y., Lee J. H., Park B. H., Kim J. S., Chi M. S., Park J. W., *Int.*

- J. Mol. Med.*, 20(4): 527-531 (2007).
- Yu J., Wang L., Walzem R. L., Miller E. G., Pike L. M., Patil B. S., *J. Agric. Food Chem.*, 53(6): 2009-2014 (2005).
- Yusupov M. I., Sidyakin G. P., *Chem. Nat. Compd.*, 11(1): 94 (1975).
- Zafar S., Sarfraz I., Rasul A., Shah M. A., Hussain G., Zahoor M. K., Shafiq N., Riaz A., Selamoglu Z., Sarker S., *Mini Rev. Med. Chem.*, ahead of print (2020). DOI: 10.2174/1389557520666200709175948
- Zhang L., Sun X., Si J., Li G., Cao L., *PLoS One.*, 14(7): e0207169 (2019).
- Zhang Z. R., Leung W. N., Cheung H. Y., Chan C. W., *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2015: 919616 (2015).
- Zhao M. N., Liang H., Ren Z. H., Guan Z. H., *Synthesis*, 44: 1501-1506 (2012).
- Zhu J. J., Jiang J. G., *Mol. Nutr. Food Res.*, 62: e1701073 (2018).
- Ziai S. A., Gholami O., Iranshahi M., Zamani A. H., Jeddi-Tehrani M., *Iran. J. Pharm. Res.*, 11: 653-659 (2012).
- Zulkifli S. Z., Aziz F. Z. A., Ajis S. Z. M., Ismail A., *Nauplii of Brine Shrimp (Artemia salina) as a Potential Toxicity Testing Organism for Heavy Metals Contamination*, Chapter 43 In *From Sources to Solution*, Springer, Singapore (2014).
- Zuman P., Ludvík J., *Tetrahedron Lett.*, 41: 7851-7853 (2000).

7. ПРИЛОЗИ

Списак прилога

Прилог 1. IR спектар 3-(1-хидразоетил)-4-хидрокси-2*H*-хромен-2-она [199]

Прилог 2. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) спектар 3-(1-хидразоетил)-4-хидрокси-2*H*-хромен-2-она [199]

Прилог 3. ¹³C-NMR (100,6 MHz, DMSO-*d*₆) спектар 3-(1-хидразоетил)-4-хидрокси-2*H*-хромен-2-она [199]

Прилог 4. HSQC спектар 3-(1-хидразоетил)-4-хидрокси-2*H*-хромен-2-она [199]

Прилог 5. HMBC спектар 3-(1-хидразоетил)-4-хидрокси-2*H*-хромен-2-она [199]

Прилог 6. NOESY спектар 3-(1-хидразоетил)-4-хидрокси-2*H*-хромен-2-она [199]

Прилог 7. IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метоксибензилиден)хидразина [200]

Прилог 8. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метоксибензилиден)хидразина [200]

Прилог 9. ¹³C-NMR (100,6 MHz, DMSO-*d*₆) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метоксибензилиден)хидразина [200]

Прилог 10. HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метоксибензилиден)хидразина [200]

Прилог 11. HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метоксибензилиден)хидразина [200]

Прилог 12. NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метоксибензилиден)хидразина [200]

Прилог 13. IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3,4-диметоксибензилиден)хидразина [201]

Прилог 14. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3,4-диметоксибензилиден)хидразина [201]

Прилог 15. ¹³C-NMR (100,6 MHz, DMSO-*d*₆) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3,4-диметоксибензилиден)хидразина [201]

Прилог 16. HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3,4-диметоксибензилиден)хидразина [201]

Прилог 17. HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3,4-диметоксибензилиден)хидразина [201]

Прилог 18. NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3,4-диметоксибензилиден)хидразина [201]

Прилог 19. IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-[4-(диметиламино)бензилиден]хидразина [202]

Прилог 20. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-[4-(диметиламино)бензилиден]хидразина [202]

Прилог 21. ¹³C-NMR (100,6 MHz, CDCl₃) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-[4-(диметиламино)бензилиден]хидразина [202]

Прилог 22. HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-[4-(диметиламино)бензилиден]хидразина [202]

Прилог 23. HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-[4-(диметиламино)бензилиден]хидразина [202]

Прилог 24. NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-[4-(диметиламино)бензилиден]хидразина [202]

Прилог 25. IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3-метокси-4-хидроксибензилиден)хидразина [203]

Прилог 26. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3-метокси-4-хидроксибензилиден)хидразина [203]

Прилог 27. ¹³C-NMR (100,6 MHz, DMSO-*d*₆) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3-метокси-4-хидроксибензилиден)хидразина [203]

Прилог 28. HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3-метокси-4-хидроксибензилиден)хидразина [203]

Прилог 29. HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3-метокси-4-хидроксибензилиден)хидразина [203]

Прилог 30. NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3-метокси-4-хидроксибензилиден)хидразина [203]

Прилог 31. IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(2-метоксибензилиден)хидразина [204]

Прилог 32. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(2-метоксибензилиден)хидразина [204]

Прилог 33. ¹³C-NMR (100,6 MHz, DMSO-*d*₆) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(2-метоксибензилиден)хидразина [204]

Прилог 34. HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(2-метоксибензилиден)хидразина [204]

Прилог 35. HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(2-метоксибензилиден)хидразина [204]

Прилог 36. NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(2-метоксибензилиден)хидразина [204]

Прилог 37. IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-хидроксибензилиден)хидразина [205]

Прилог 38. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-хидроксибензилиден)хидразина [205]

Прилог 39. ¹³C-NMR (100,6 MHz, DMSO-*d*₆) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-хидроксибензилиден)хидразина [205]

Прилог 40. HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-хидроксибензилиден)хидразина [205]

Прилог 41. HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-хидроксибензилиден)хидразина [205]

Прилог 42. NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-хидроксибензилиден)хидразина [205]

Прилог 43. IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3,5-диметокси-4-хидроксибензилиден)хидразина [206]

Прилог 44. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3,5-диметокси-4-хидроксибензилиден)хидразина [206]

Прилог 45. ¹³C-NMR (100,6 MHz, DMSO-*d*₆) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3,5-диметокси-4-хидроксибензилиден)хидразина [206]

- Прилог 46.** HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3,5-диметокси-4-хидроксибензилиден)хидразина [206]
- Прилог 47.** HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3,5-диметокси-4-хидроксибензилиден)хидразина [206]
- Прилог 48.** NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3,5-диметокси-4-хидроксибензилиден)хидразина [206]
- Прилог 49.** IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метилбензилиден)хидразина [207]
- Прилог 50.** ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метилбензилиден)хидразина [207]
- Прилог 51.** ¹³C-NMR (100,6 MHz, DMSO-*d*₆) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метилбензилиден)хидразина [207]
- Прилог 52.** HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метилбензилиден)хидразина [207]
- Прилог 53.** HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метилбензилиден)хидразина [207]
- Прилог 54.** NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метилбензилиден)хидразина [207]
- Прилог 55.** IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-изопропилбензилиден)хидразина [208]
- Прилог 56.** ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-изопропилбензилиден)хидразина [208]
- Прилог 57.** ¹³C-NMR (100,6 MHz, DMSO-*d*₆) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-изопропилбензилиден)хидразина [208]
- Прилог 58.** HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-изопропилбензилиден)хидразина [208]
- Прилог 59.** HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-изопропилбензилиден)хидразина [208]
- Прилог 60.** NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-изопропилбензилиден)хидразина [208]
- Прилог 61.** IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-етокси-3-метоксибензилиден)хидразина [209]

- Прилог 62.** $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-етокси-3-метоксибензилиден)хидразина [209]
- Прилог 63.** $^{13}\text{C-NMR}$ (100,6 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-етокси-3-метоксибензилиден)хидразина [209]
- Прилог 64.** HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-етокси-3-метоксибензилиден)хидразина [209]
- Прилог 65.** HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-етокси-3-метоксибензилиден)хидразина [209]
- Прилог 66.** NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-етокси-3-метоксибензилиден)хидразина [209]
- Прилог 67.** IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(тиофен-2-ил-2-метилен)хидразина [210]
- Прилог 68.** $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(тиофен-2-ил-2-метилен)хидразина [210]
- Прилог 69.** $^{13}\text{C-NMR}$ (100,6 MHz, CDCl_3) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(тиофен-2-ил-2-метилен)хидразина [210]
- Прилог 70.** HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(тиофен-2-ил-2-метилен)хидразина [210]
- Прилог 71.** HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(тиофен-2-ил-2-метилен)хидразина [210]
- Прилог 72.** NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(тиофен-2-ил-2-метилен)хидразина [210]
- Прилог 73.** IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(5-метилтиофен-2-ил-2-метилен)хидразина [211]
- Прилог 74.** $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(5-метилтиофен-2-ил-2-метилен)хидразина [211]
- Прилог 75.** $^{13}\text{C-NMR}$ (100,6 MHz, CDCl_3) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(5-метилтиофен-2-ил-2-метилен)хидразина [211]
- Прилог 76.** HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(5-метилтиофен-2-ил-2-метилен)хидразина [211]

- Прилог 77.** HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(5-метилтиофен-2-ил-2-метилен)хидразина [211]
- Прилог 78.** NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(5-метилтиофен-2-ил-2-метилен)хидразина [211]
- Прилог 79.** IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(пирол-2-ил-2-метилен)хидразина [212]
- Прилог 80.** ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(пирол-2-ил-2-метилен)хидразина [212]
- Прилог 81.** ¹³C-NMR (100,6 MHz, CDCl₃) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(пирол-2-ил-2-метилен)хидразина [212]
- Прилог 82.** HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(пирол-2-ил-2-метилен)хидразина [212]
- Прилог 83.** HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(пирол-2-ил-2-метилен)хидразина [212]
- Прилог 84.** NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(пирол-2-ил-2-метилен)хидразина [212]
- Прилог 85.** IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(*N*-метилпирол-2-ил-2-метилен)хидразина [213]
- Прилог 86.** ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(*N*-метилпирол-2-ил-2-метилен)хидразина [213]
- Прилог 87.** ¹³C-NMR (100,6 MHz, CDCl₃) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(*N*-метилпирол-2-ил-2-метилен)хидразина [213]
- Прилог 88.** HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(*N*-метилпирол-2-ил-2-метилен)хидразина [213]
- Прилог 89.** HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(*N*-метилпирол-2-ил-2-метилен)хидразина [213]
- Прилог 90.** NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(*N*-метилпирол-2-ил-2-метилен)хидразина [213]
- Прилог 91.** IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(2-хлорпиридин-3-ил-3-метилен)хидразина [214]
- Прилог 92.** ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(2-хлорпиридин-3-ил-3-метилен)хидразина [214]

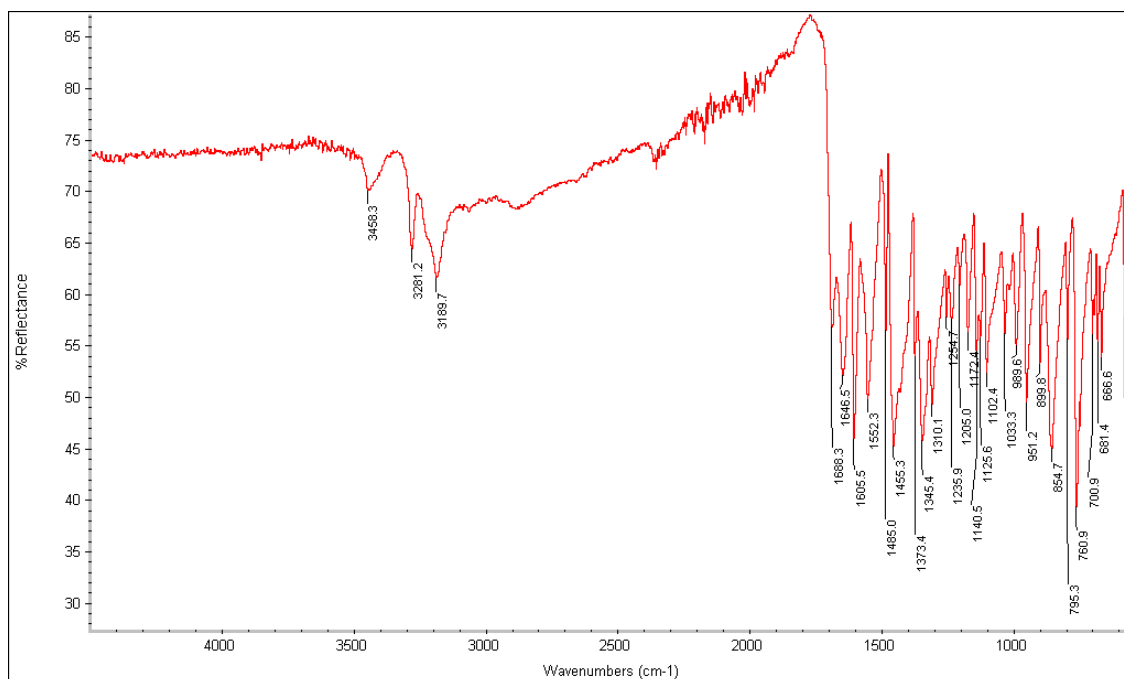
- Прилог 93.** ^{13}C -NMR (100,6 MHz, CDCl_3) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(2-хлорпиридин-3-ил-3-метилен)хидразина [214]
- Прилог 94.** HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(2-хлорпиридин-3-ил-3-метилен)хидразина [214]
- Прилог 95.** HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(2-хлорпиридин-3-ил-3-метилен)хидразина [214]
- Прилог 96.** NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(2-хлорпиридин-3-ил-3-метилен)хидразина [214]
- Прилог 97.** IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(индол-3-ил-3-метилен)хидразина [215]
- Прилог 98.** ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(индол-3-ил-3-метилен)хидразина [215]
- Прилог 99.** ^{13}C -NMR (100,6 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(индол-3-ил-3-метилен)хидразина [215]
- Прилог 100.** HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(индол-3-ил-3-метилен)хидразина [215]
- Прилог 101.** HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(индол-3-ил-3-метилен)хидразина [215]
- Прилог 102.** NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(индол-3-ил-3-метилен)хидразина [215]
- Прилог 103.** IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(хинолин-2-ил-2-метилен)хидразина [216]
- Прилог 104.** ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(хинолин-2-ил-2-метилен)хидразина [216]
- Прилог 105.** ^{13}C -NMR (100,6 MHz, CDCl_3) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(хинолин-2-ил-2-метилен)хидразина [216]
- Прилог 106.** HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(хинолин-2-ил-2-метилен)хидразина [216]
- Прилог 107.** HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(хинолин-2-ил-2-метилен)хидразина [216]
- Прилог 108.** NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(хинолин-2-ил-2-метилен)хидразина [216]

Прилог 109. IR спектар аква-bis(3-ацетил-4-хидрокси-2*H*-хромен-4-олато- κ^2O,O')цинк(II)-монохидрата [217]

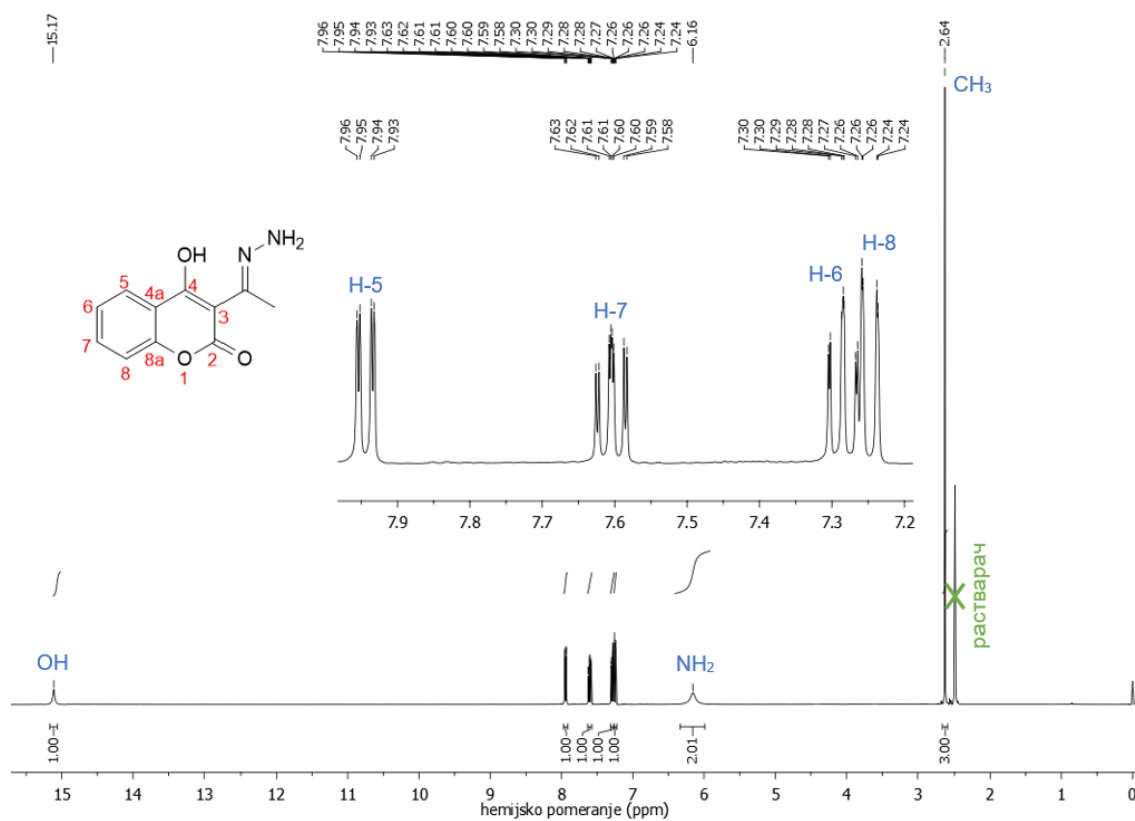
Прилог 110. Атомске координате и изотропни параметри померања (Å^2) за једињење [217]

Прилог 111. Анизотропни параметри померања (Å^2) за једињење [217]

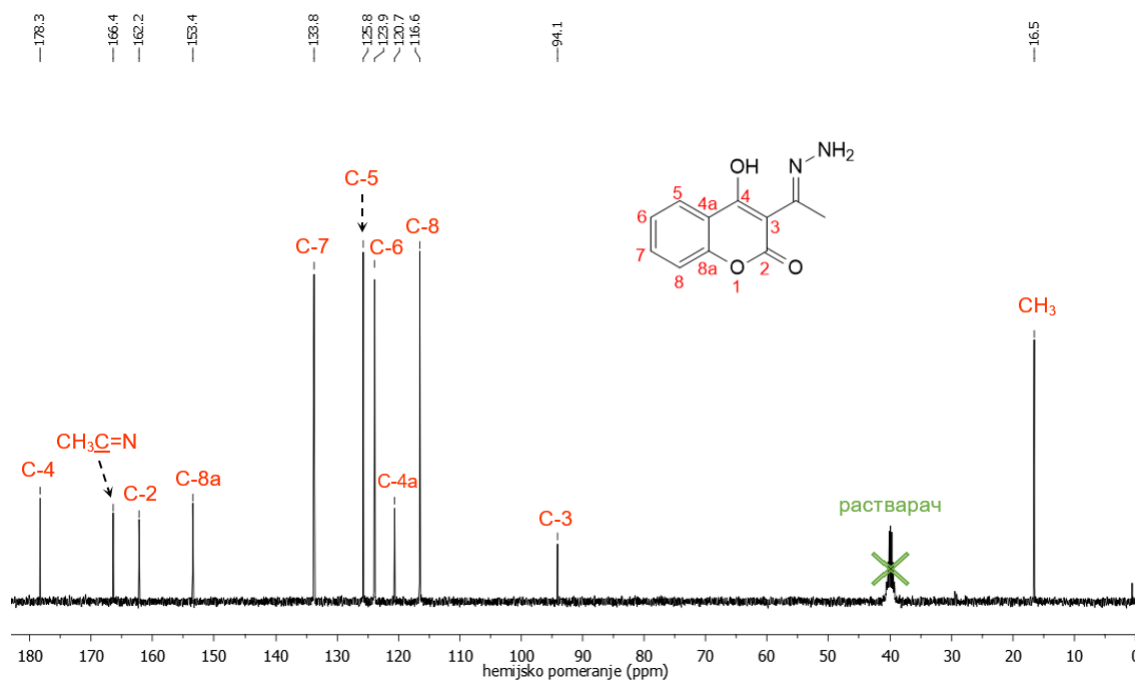
Прилог 112. Углови веза ($^\circ$) за једињење [217]



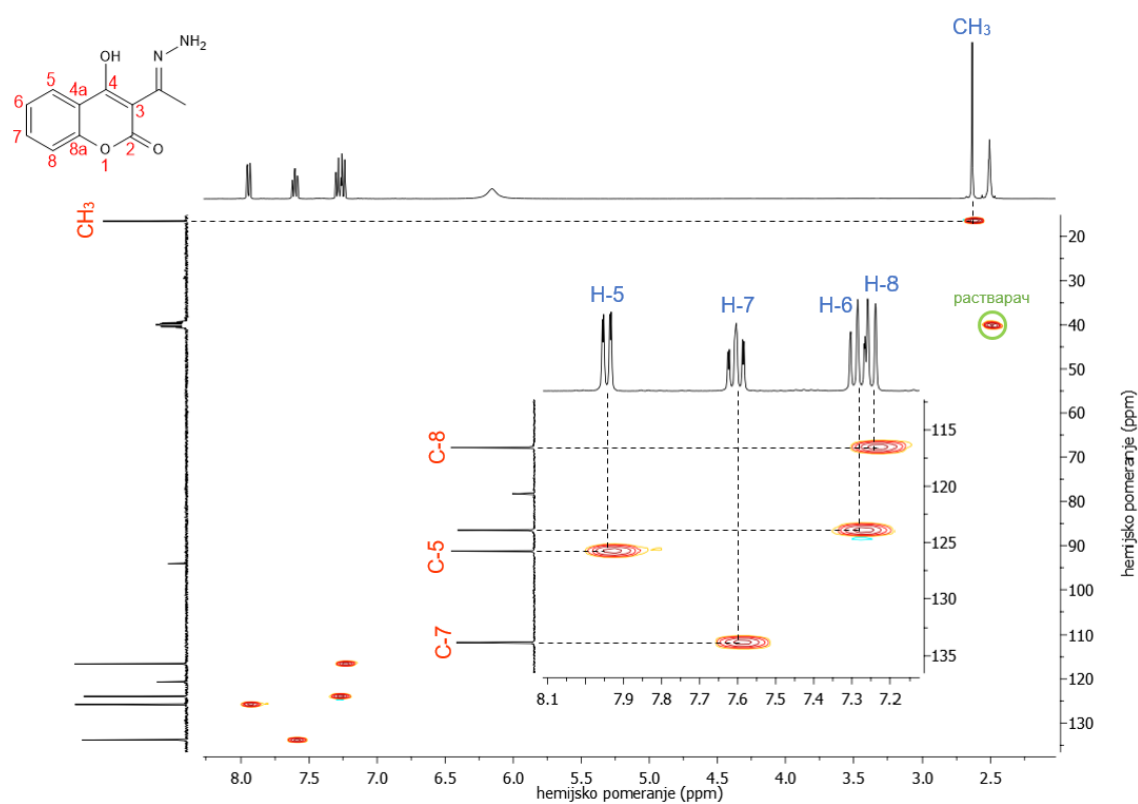
Прилог 1. IR спектар 3-(1-хидразоетил)-4-хидрокси-2H-хромен-2-она [199]



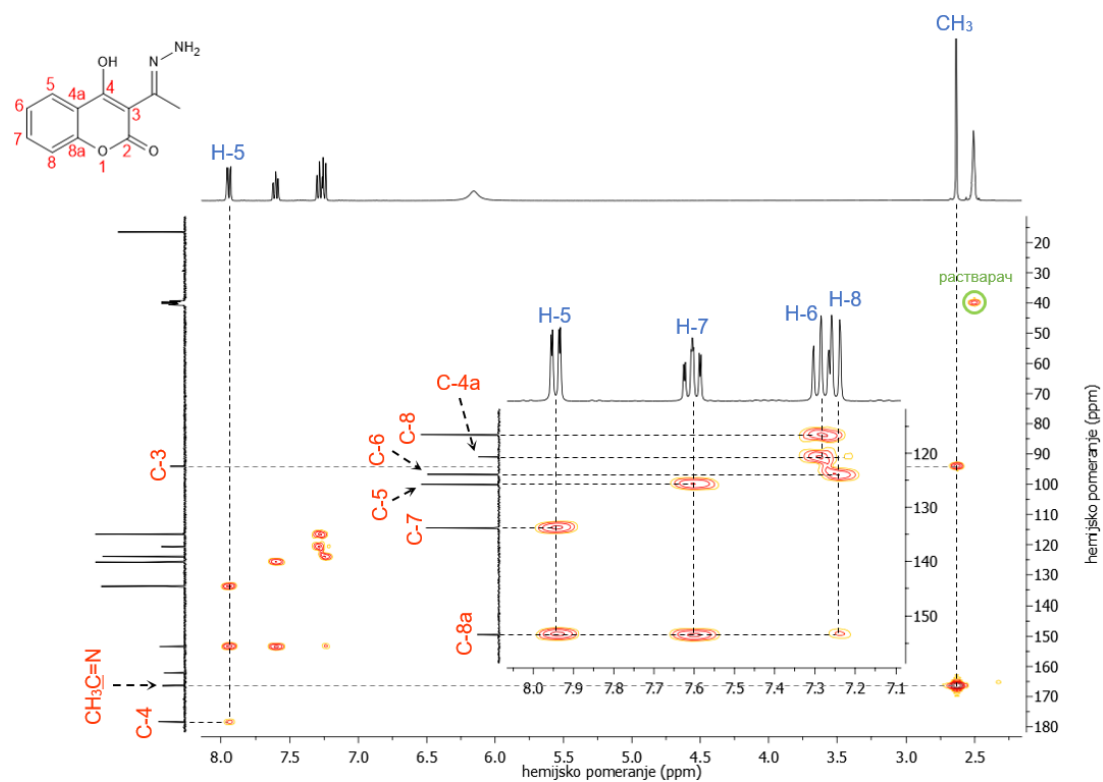
Прилог 2. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) спектар 3-(1-хидразоетил)-4-хидрокси-2H-хромен-2-она [199]



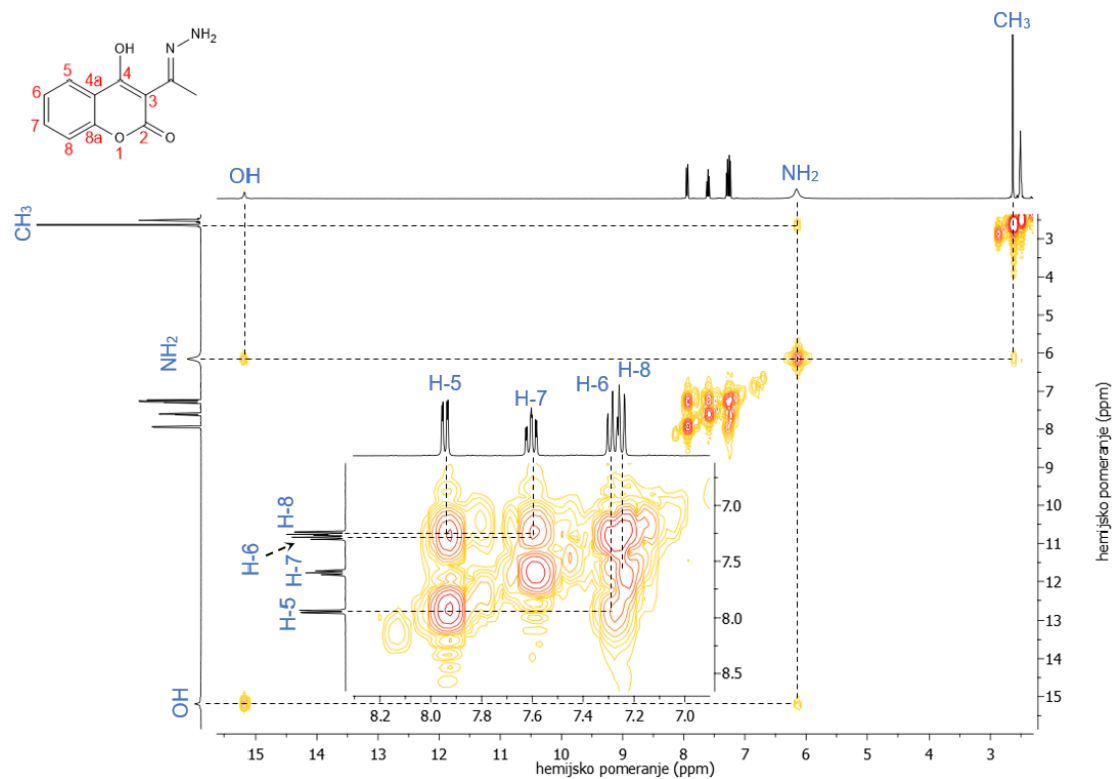
Прилог 3. ^{13}C -NMR (100,6 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) спектар 3-(1-хидразоноетил)-4-хидрокси-2H-хромен-2-она [199]



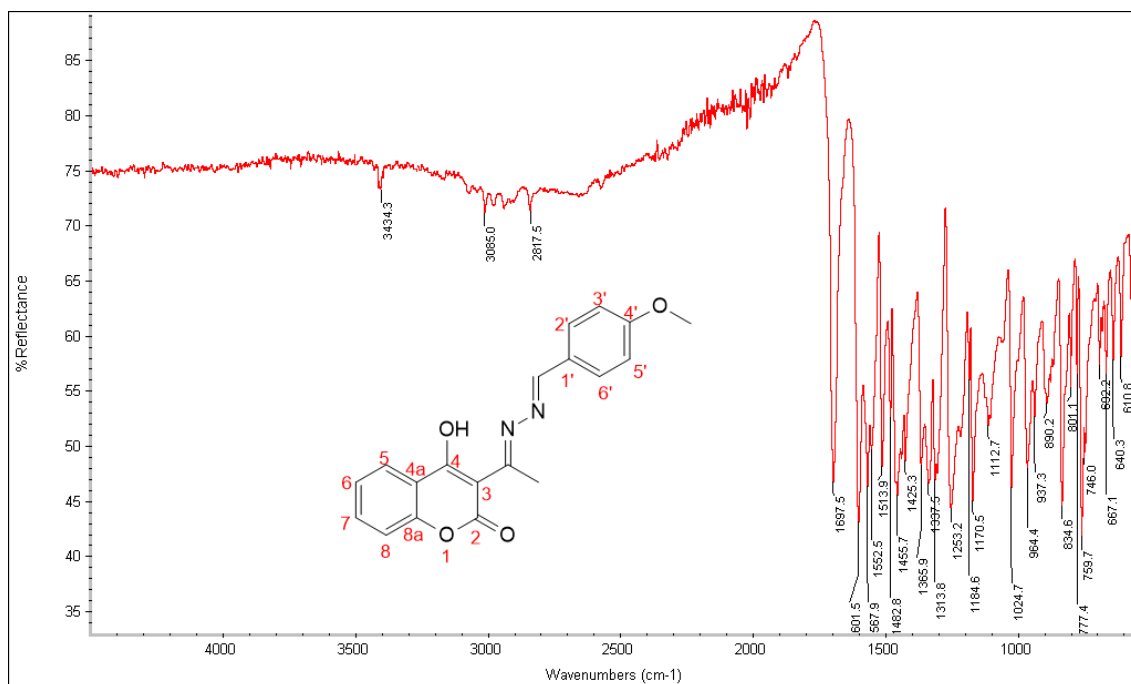
Прилог 4. HSQC спектар 3-(1-хидразоноетил)-4-хидрокси-2H-хромен-2-она [199]



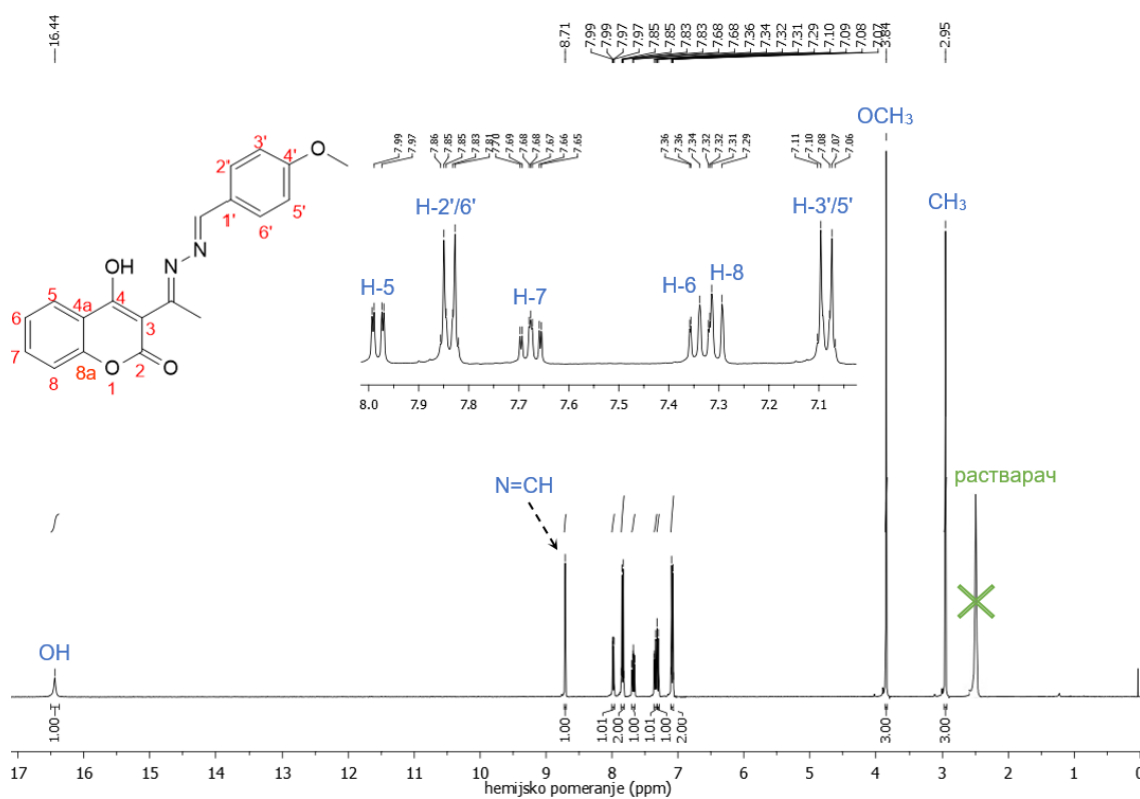
Прилог 5. HMBC спектар 3-(1-хидразоетил)-4-хидрокси-2H-хромен-2-она [199]



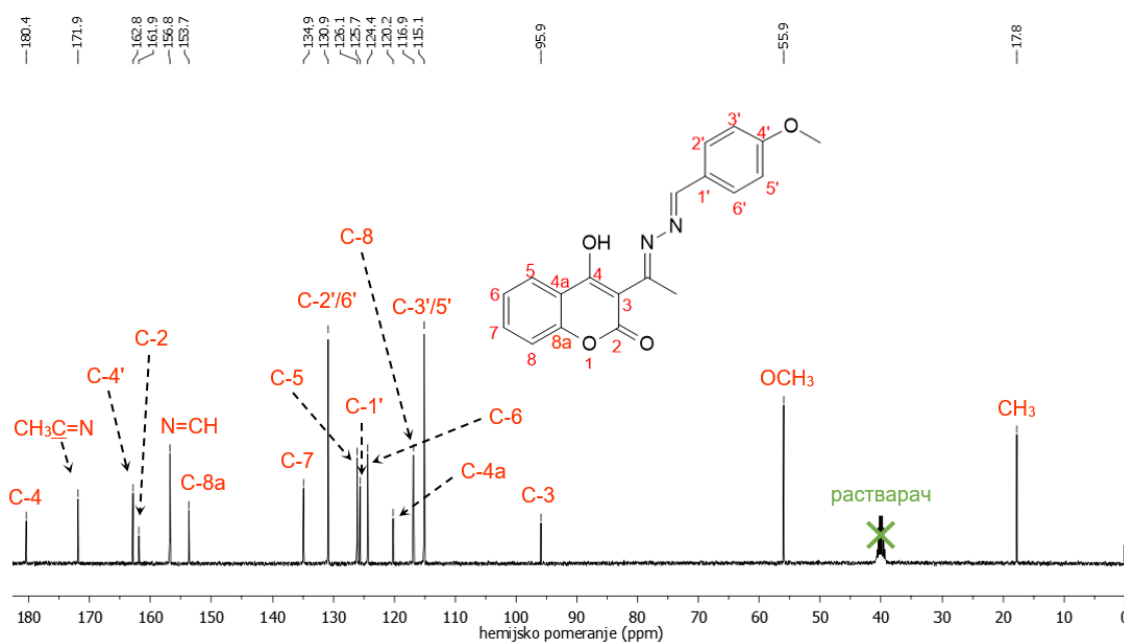
Прилог 6. NOESY спектар 3-(1-хидразоетил)-4-хидрокси-2H-хромен-2-она [199]



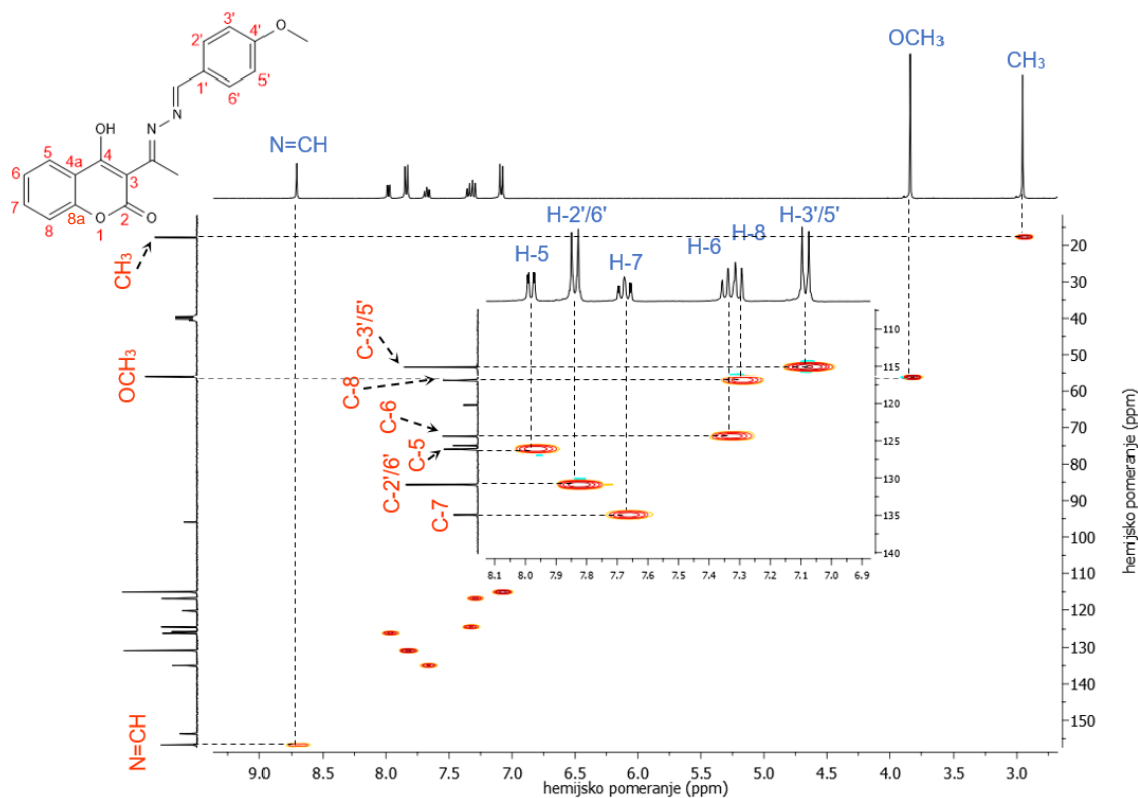
Прилог 7. IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метоксибензилиден)хидразина [200]



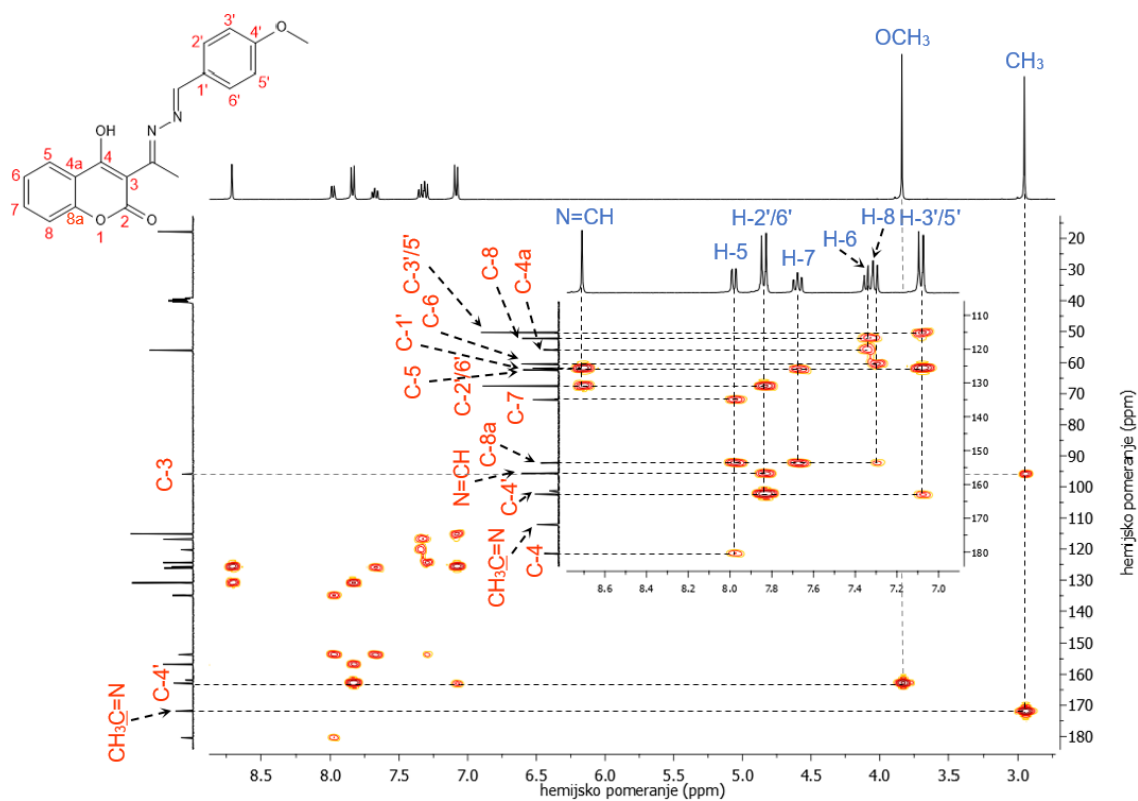
Прилог 8. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метоксибензилиден)хидразина [200]



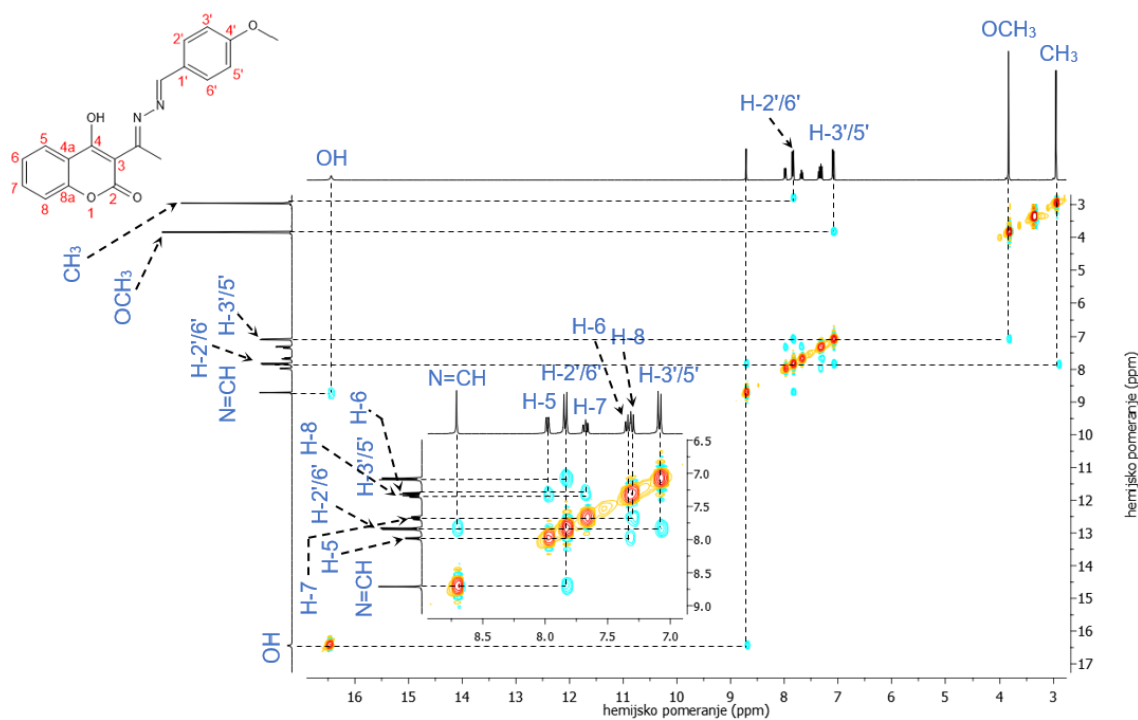
Прилог 9. ^{13}C -NMR (100,6 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метоксибензилиден)хидразина [200]



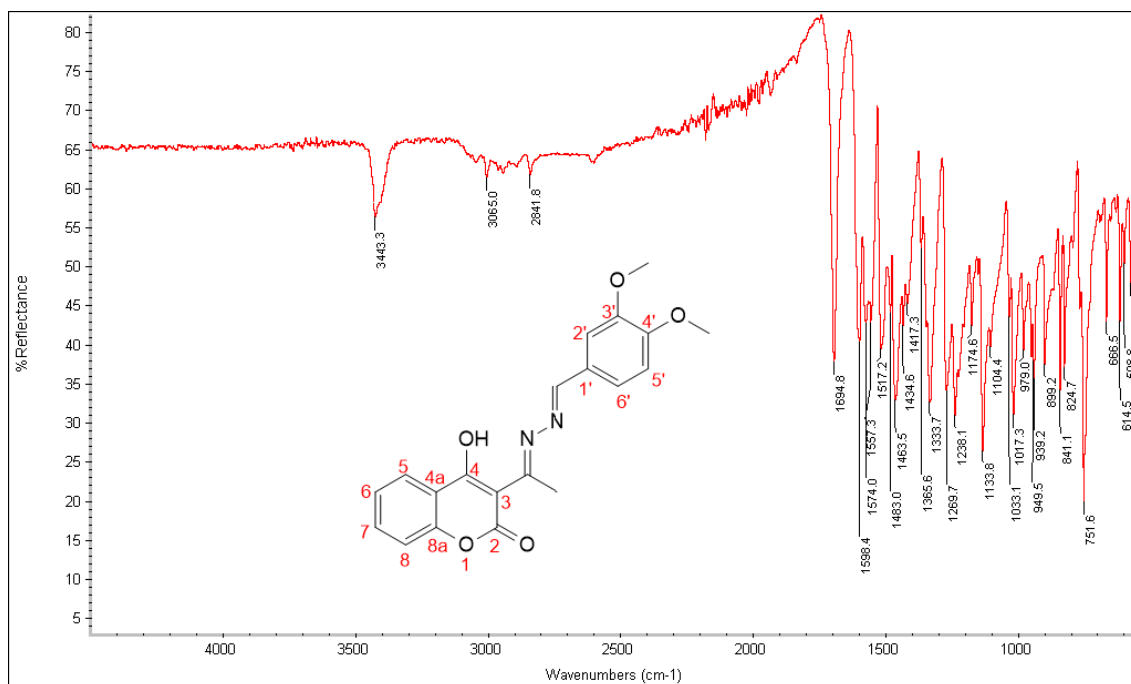
Прилог 10. HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метоксибензилиден)хидразина [200]



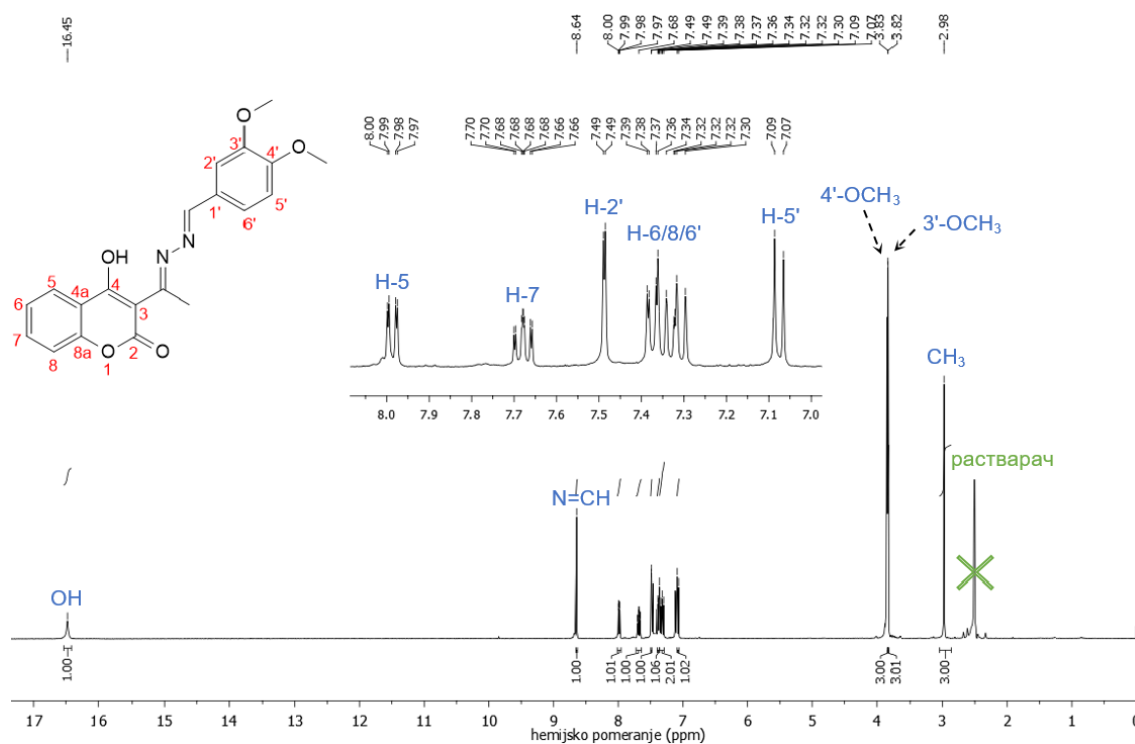
Прилог 11. HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метоксибензилиден)хидразина [200]



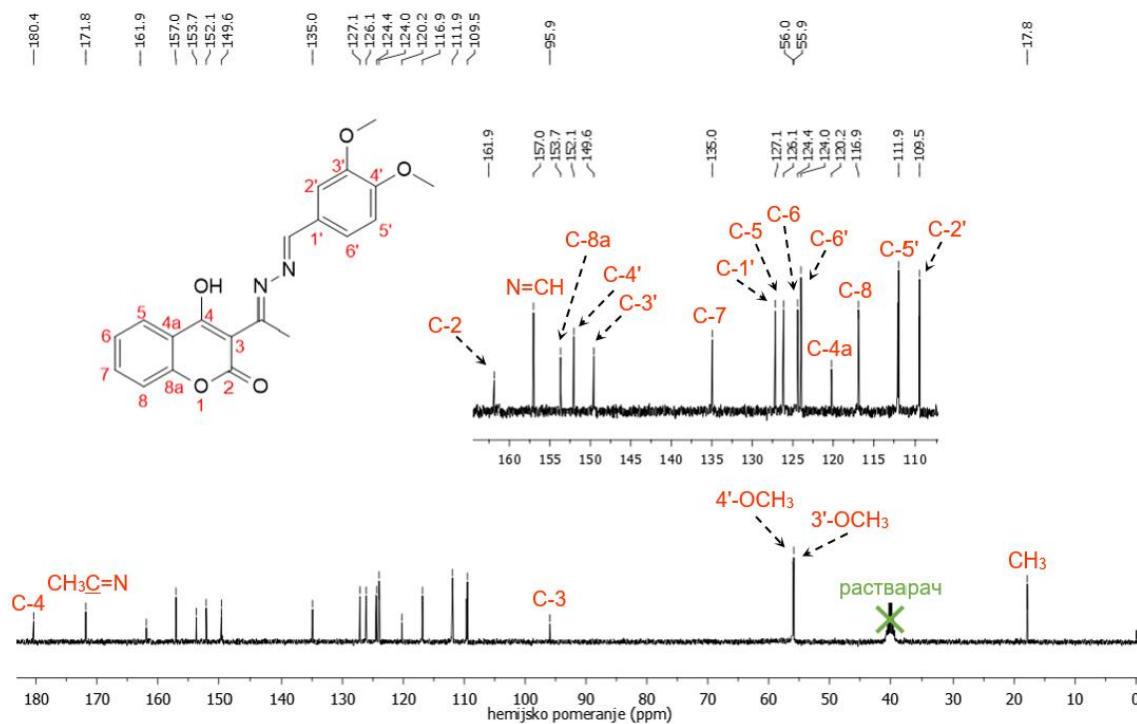
Прилог 12. NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метоксибензилиден)хидразина [200]



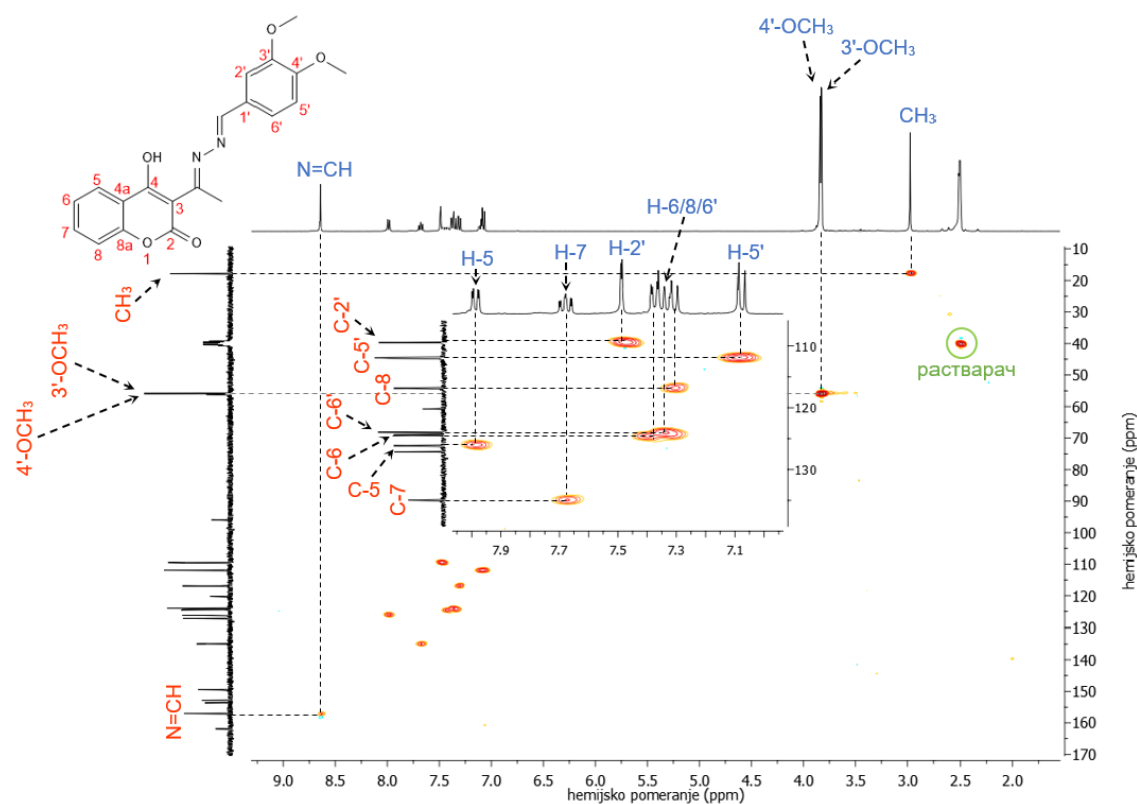
Прилог 13. IR спектар 1-[1-(4-hidroksi-2-okso-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3,4-диметоксибензилиден)хидразина [201]



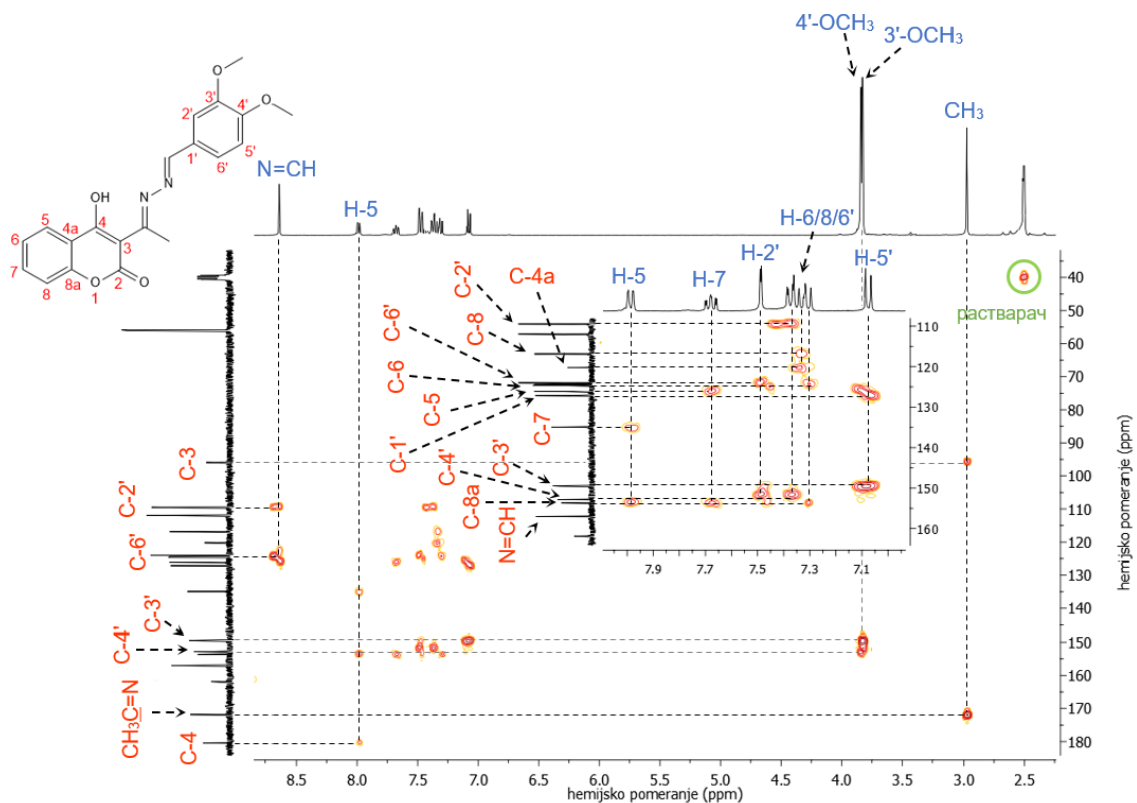
Прилог 14. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) спектар 1-[1-(4-hidroksi-2-okso-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3,4-диметоксибензилиден)хидразина [201]



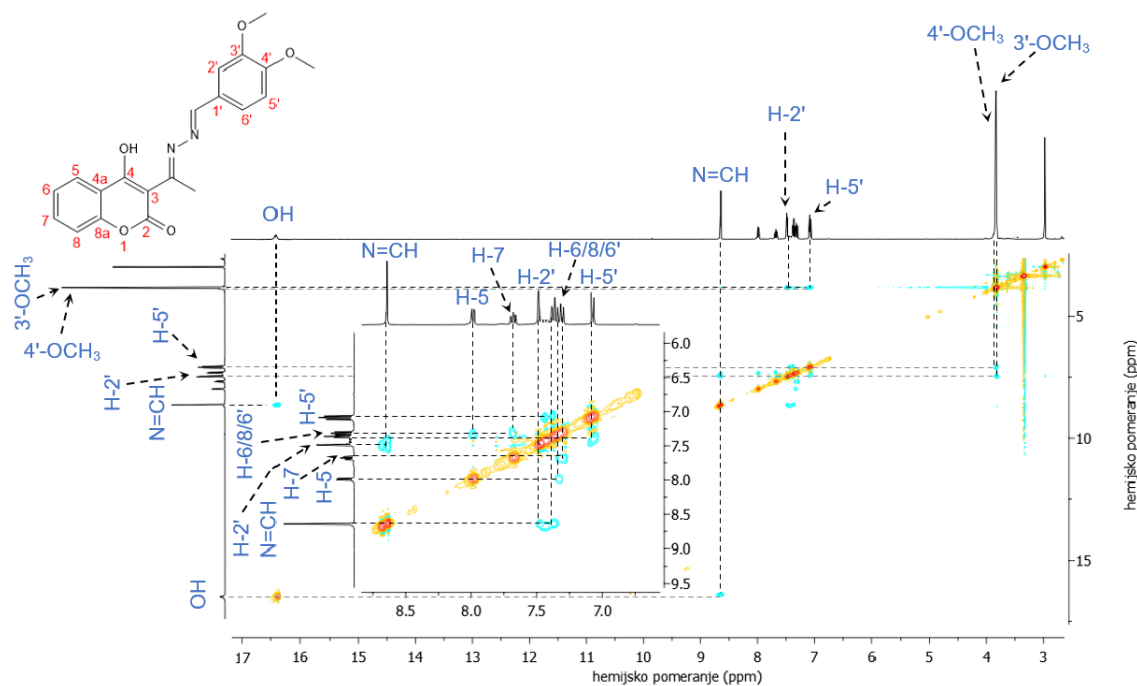
Прилог 15. ^{13}C -NMR (100,6 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3,4-диметоксибензилиден)хидразина [201]



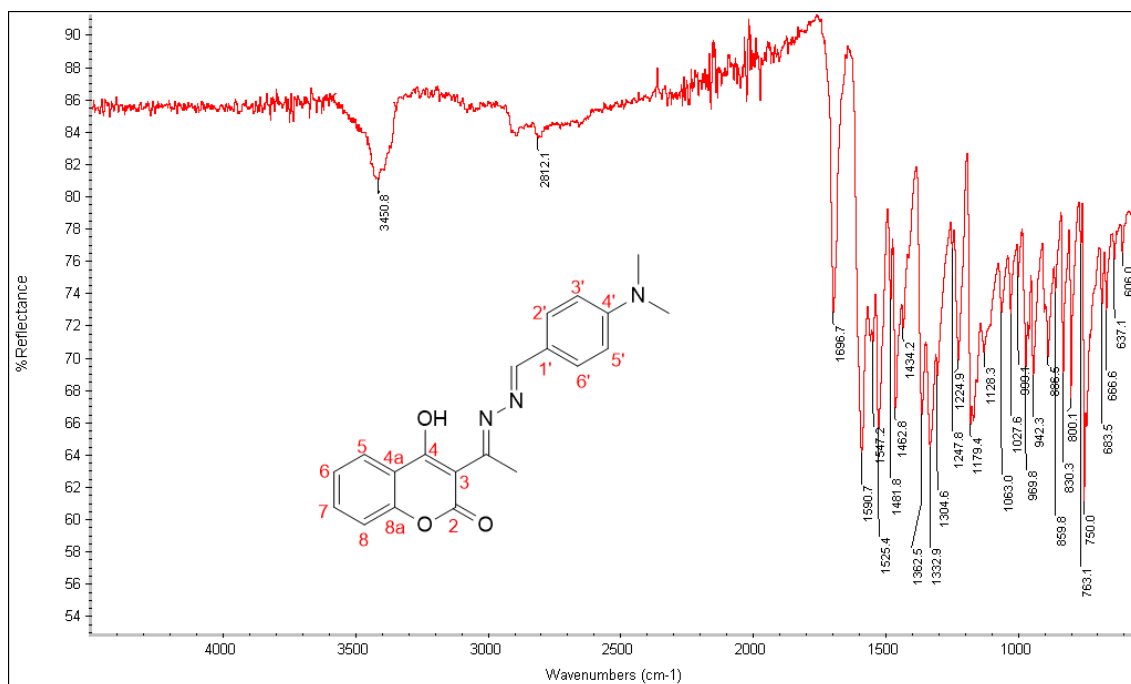
Прилог 16. HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3,4-диметоксибензилиден)хидразина [201]



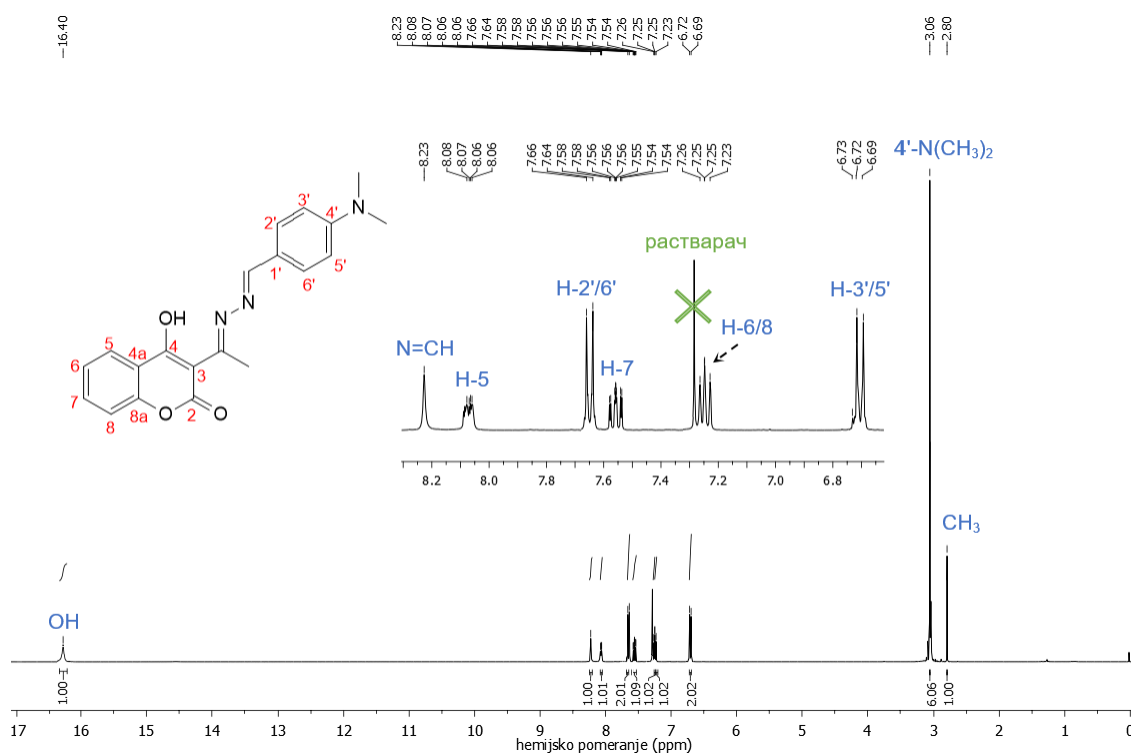
Прилог 17. HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3,4-диметоксибензилиден)хидразина [201]



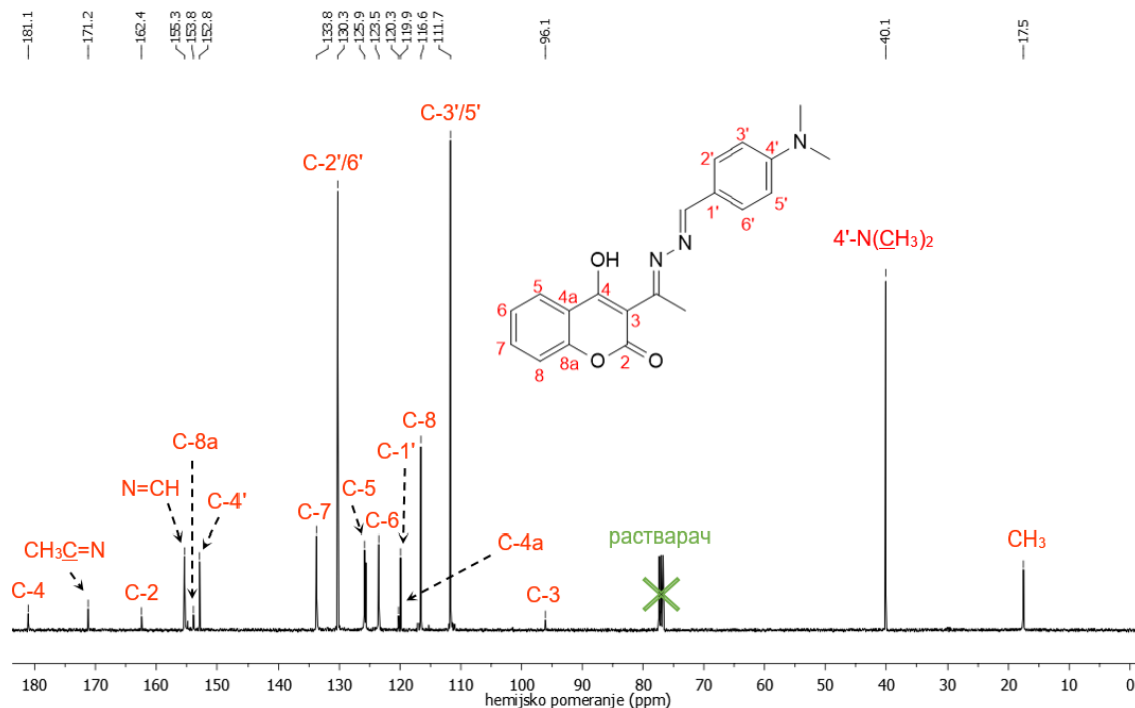
Прилог 18. NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3,4-диметоксибензилиден)хидразина [201]



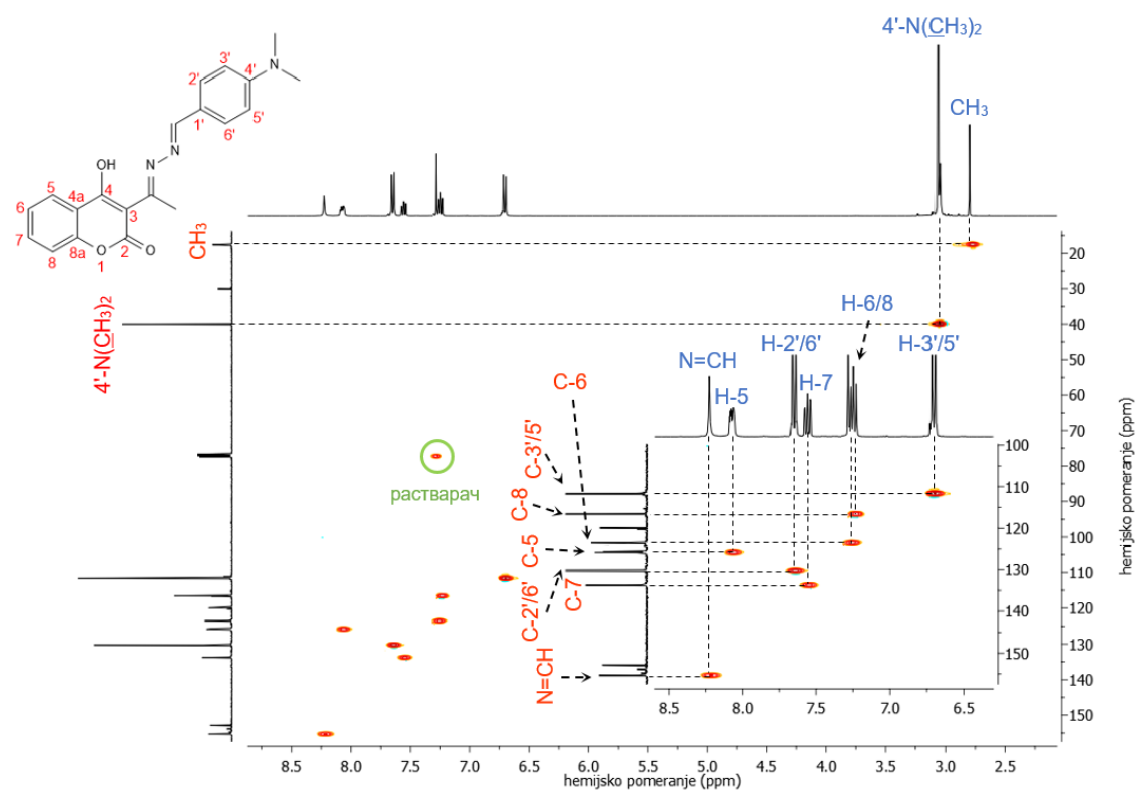
Прилог 19. IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-[4-(диметиламино)бензилиден]хидразина [202]



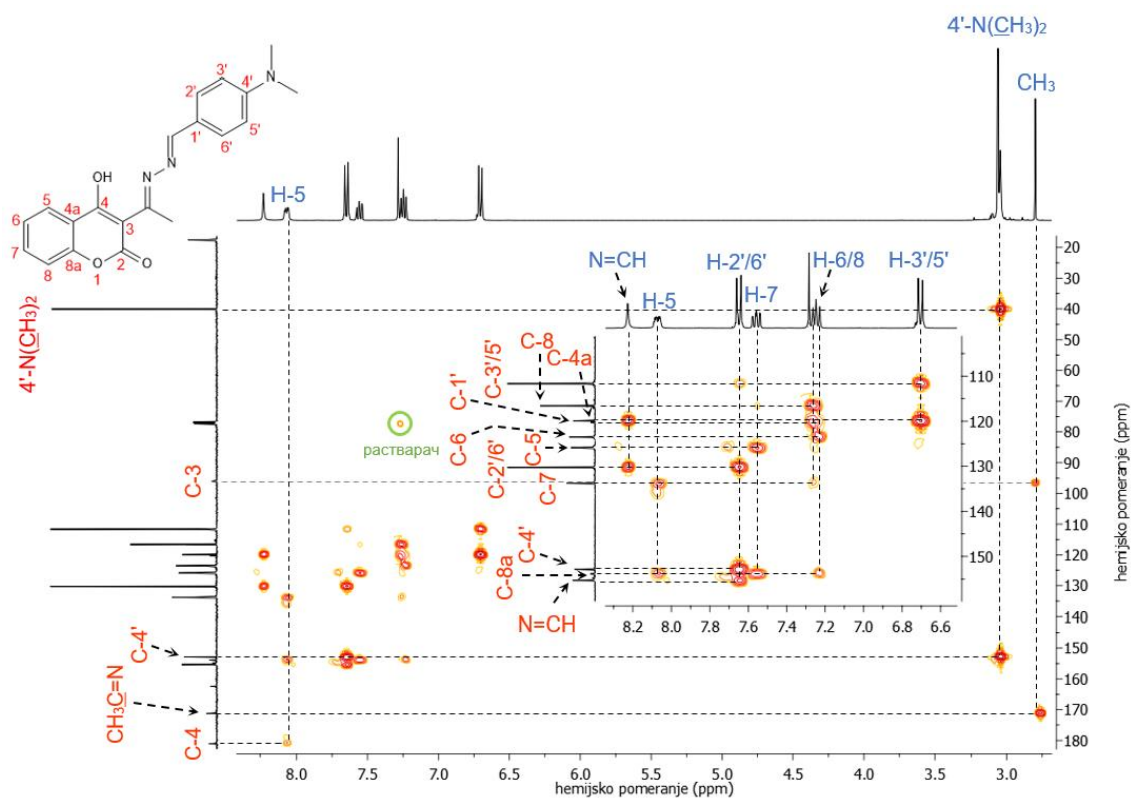
Прилог 20. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-[4-(диметиламино)бензилиден]хидразина [202]



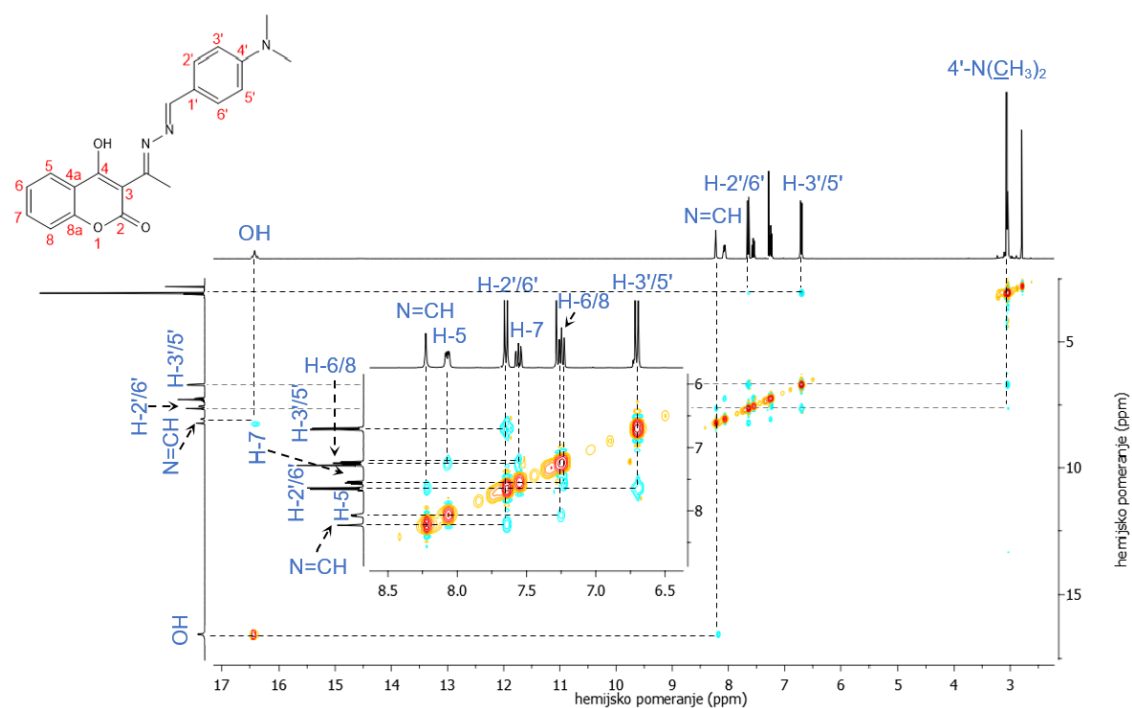
Прилог 21. ^{13}C -NMR (100,6 МHz, CDCl_3) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-[4-(диметиламино)бензилиден]хидразина [202]



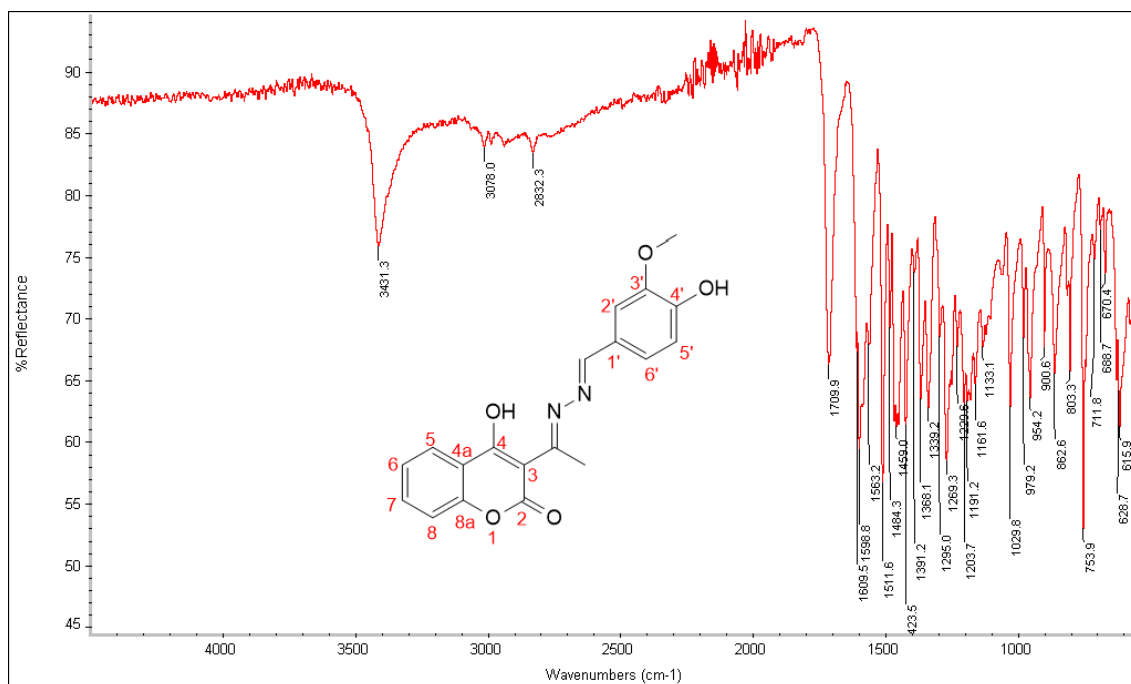
Прилог 22. HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-[4-(диметиламино)бензилиден]хидразина [202]



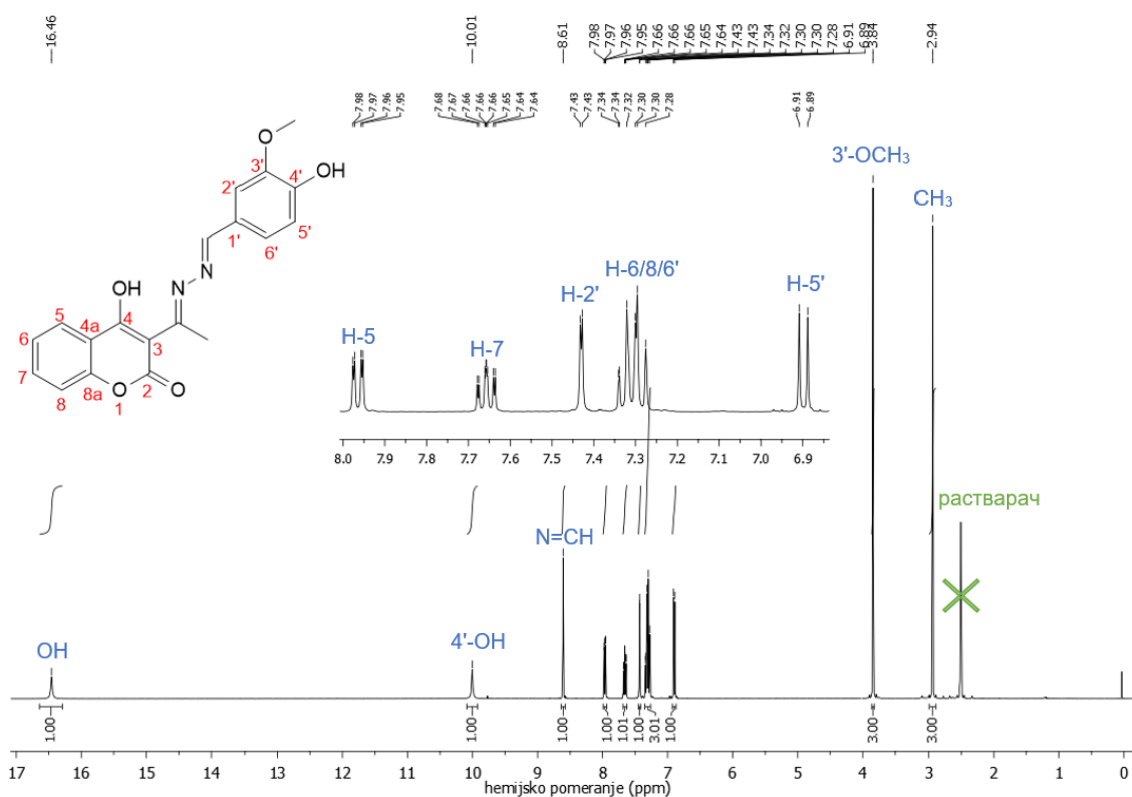
Прилог 23. HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромон-3-ил)этилиден]-2-[4-(диметиламино)бензилиден]хидразина [202]



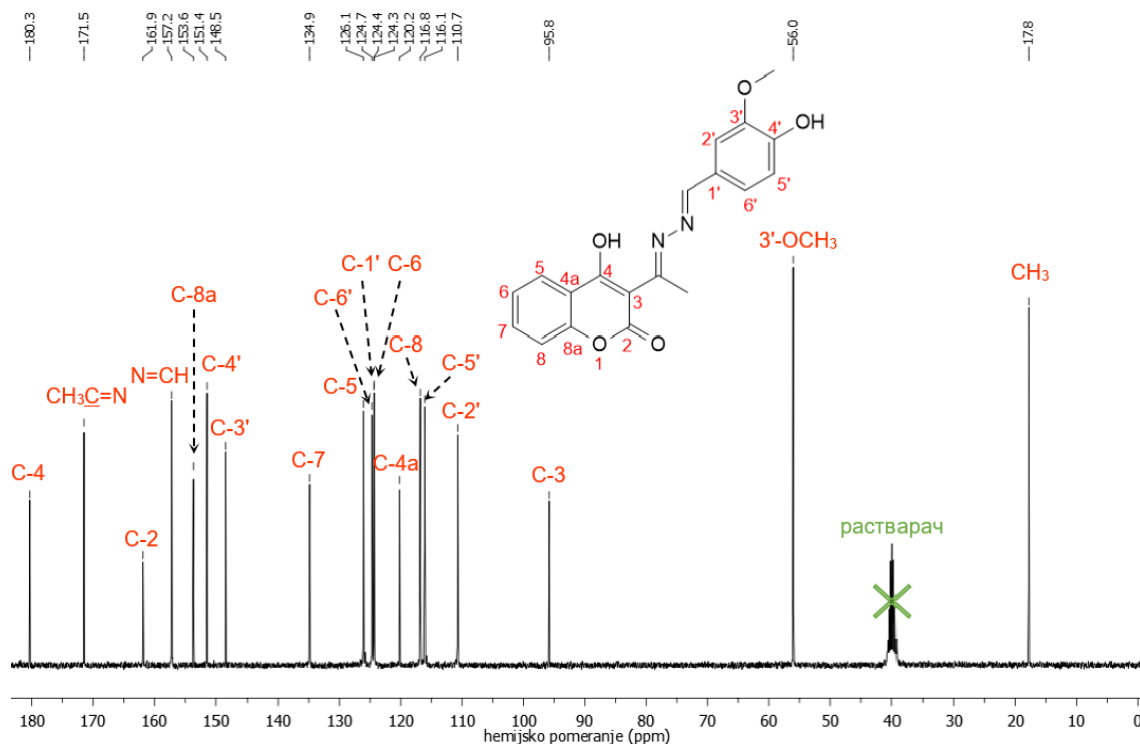
Прилог 24. NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромон-3-ил)этилиден]-2-[4-(диметиламино)бензилиден]хидразина [202]



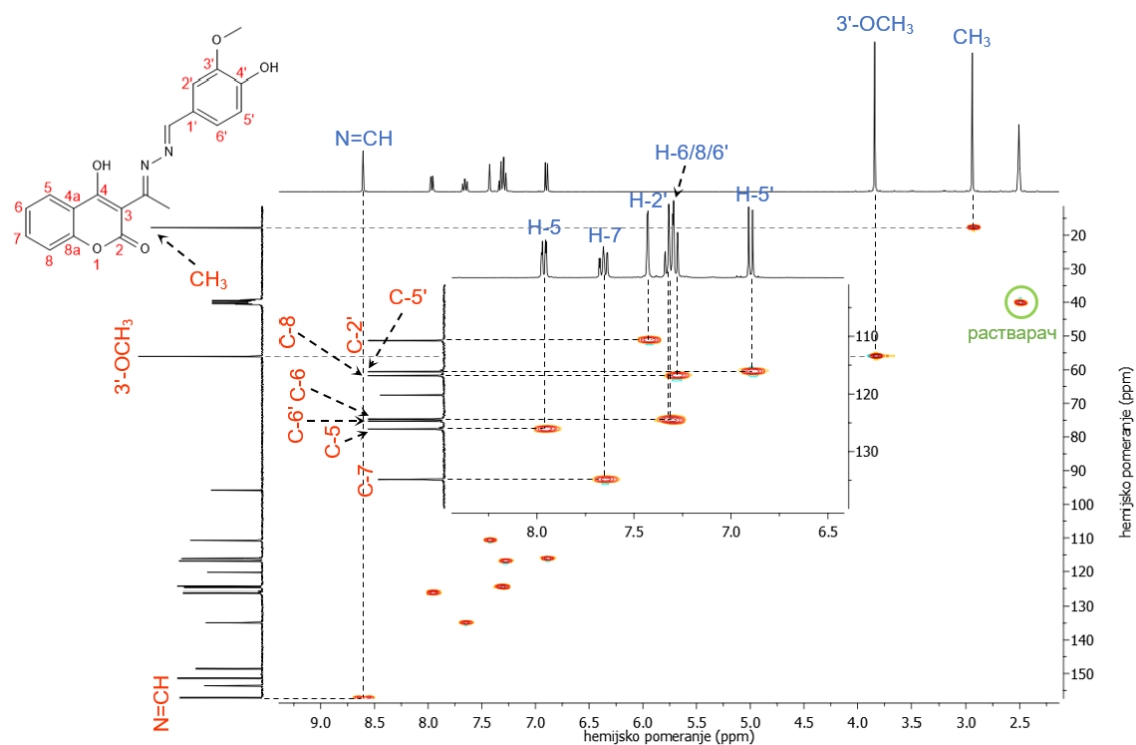
Прилог 25. IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3-метокси-4-хидроксибензилиден)хидразина [203]



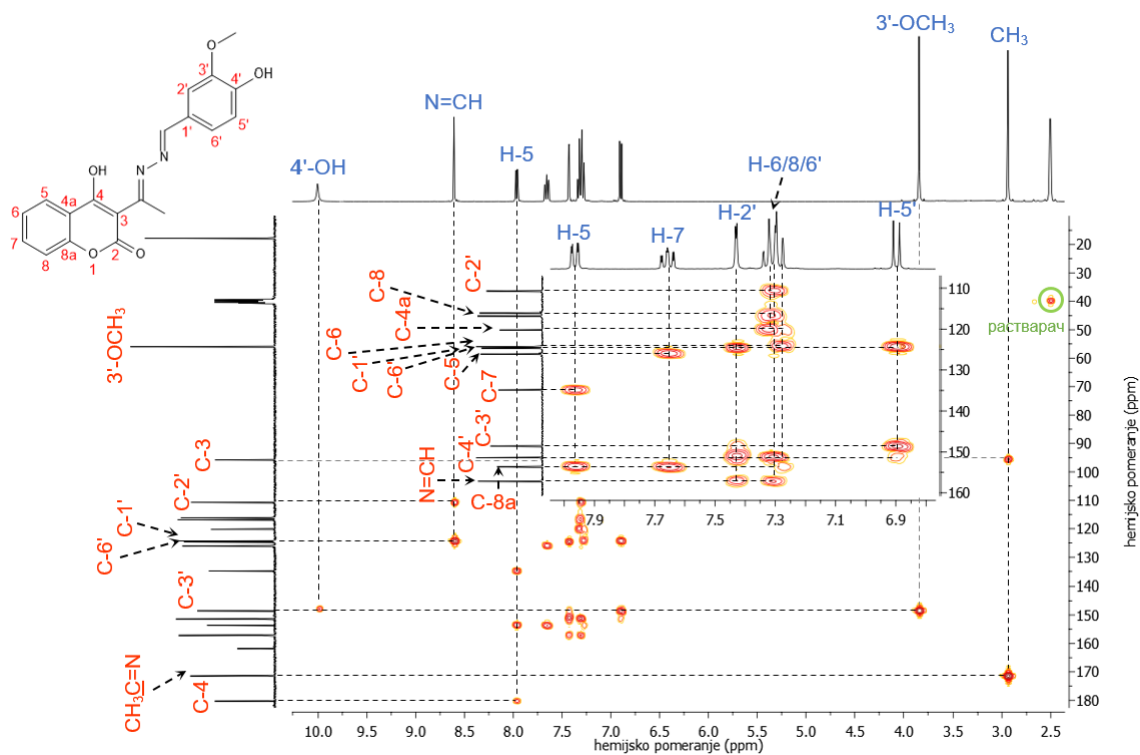
Прилог 26. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3-метокси-4-хидроксибензилиден)хидразина [203]



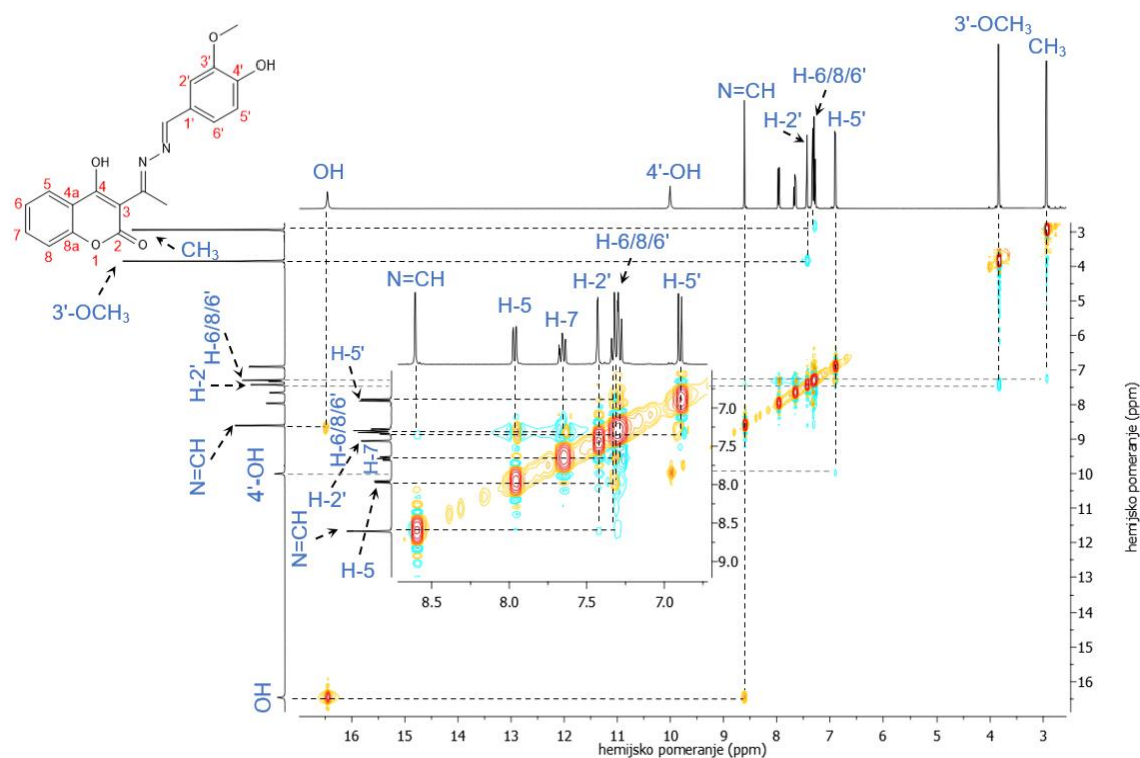
Прилог 27. ^{13}C NMR (100,6 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3-метокси-4-хидроксибензилиден)хидразина [203]



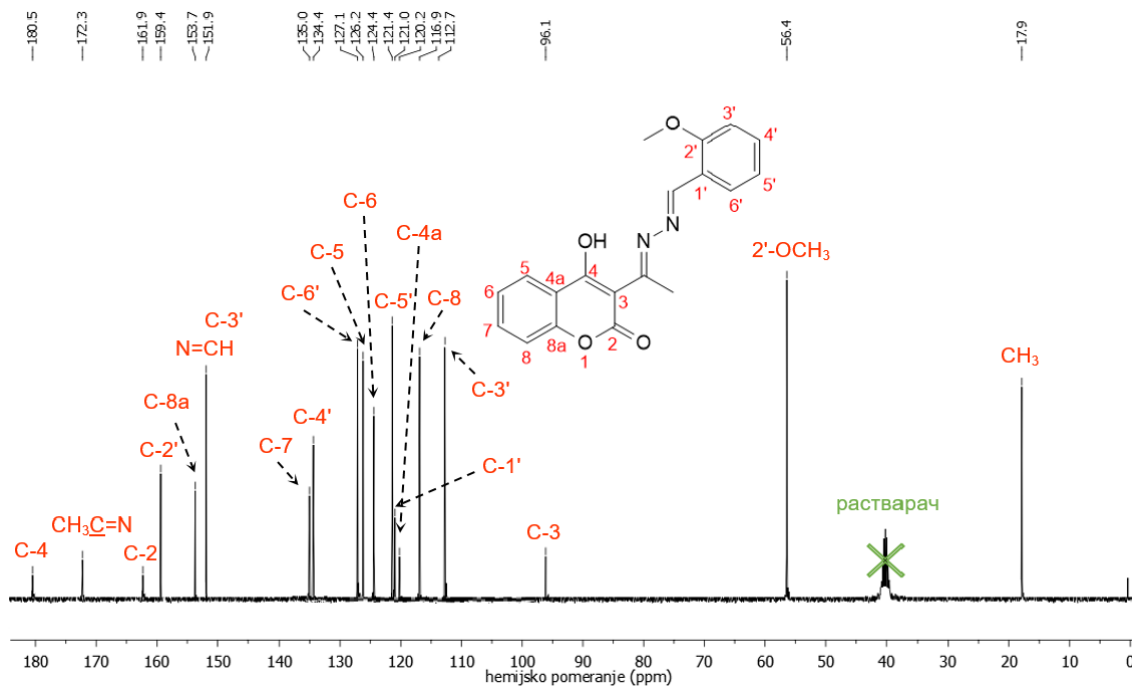
Прилог 28. HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3-метокси-4-хидроксибензилиден)хидразина [203]



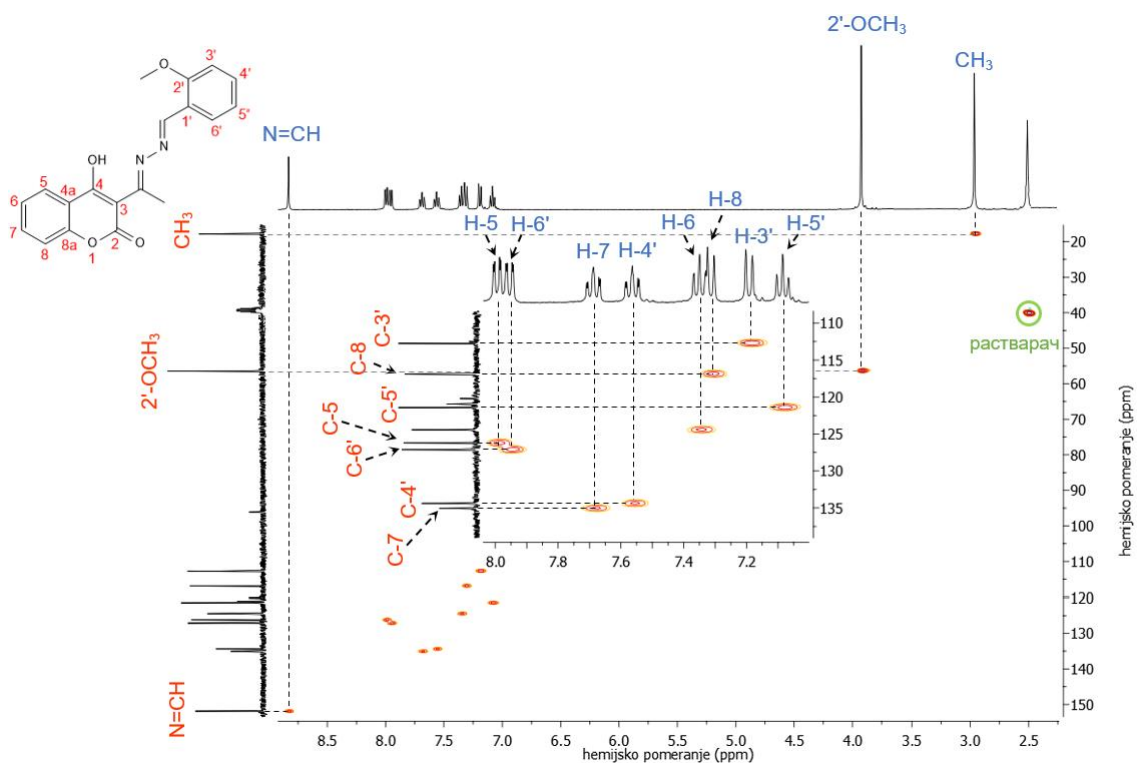
Прилог 29. НМВС спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромон-3-ил)этилиден]-2-(3-метокси-4-хидроксибензилиден)гидразина [203]



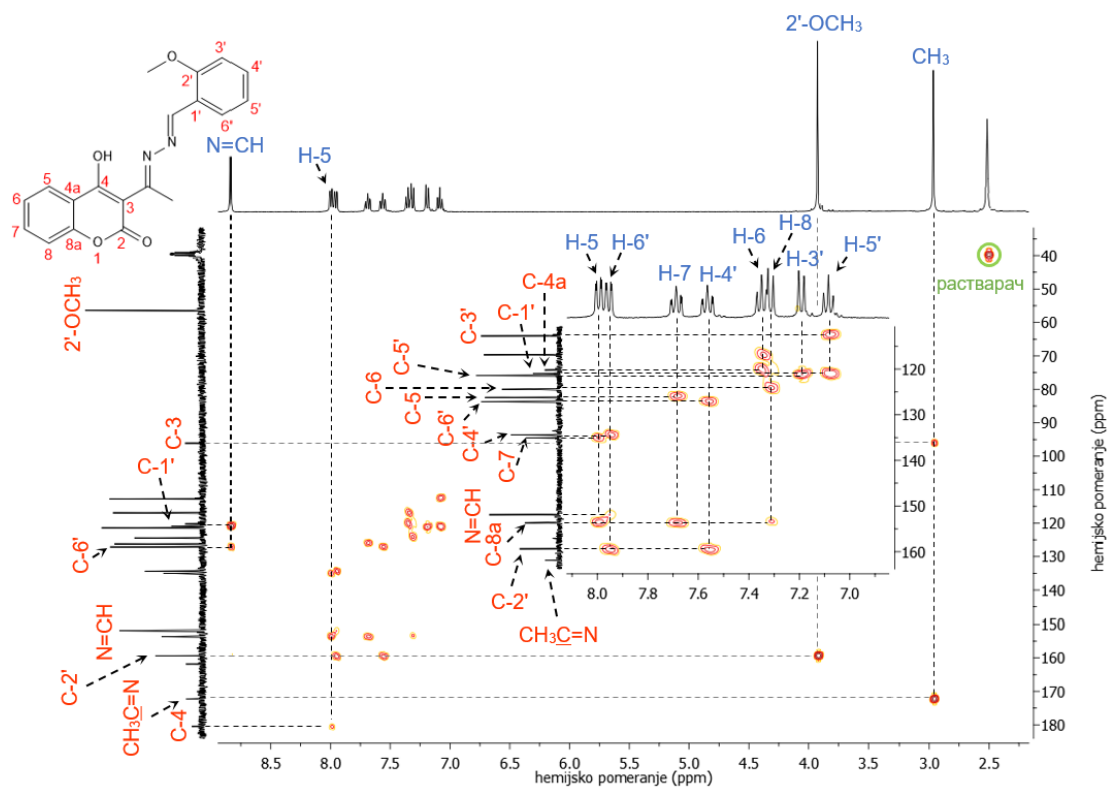
Прилог 30. NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромон-3-ил)этилиден]-2-(3-метокси-4-хидроксибензилиден)гидразина [203]



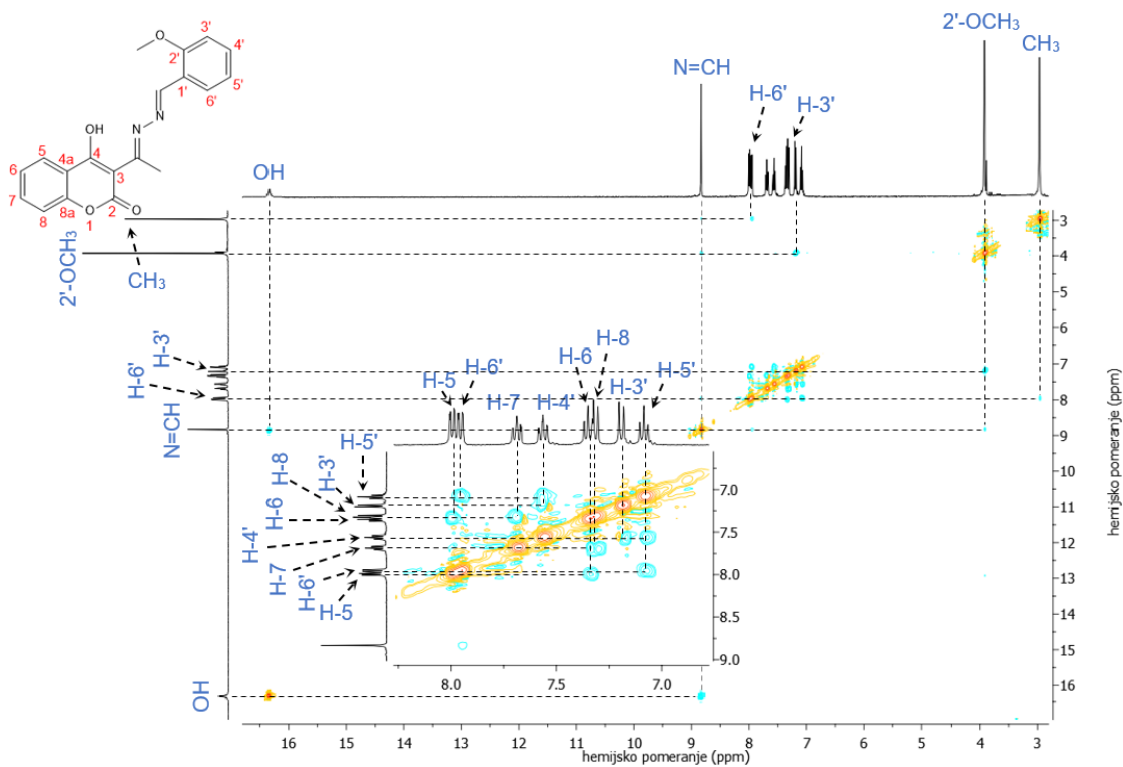
Прилог 33. ^{13}C -NMR (100,6 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(2-метоксибензилиден)хидразина [204]



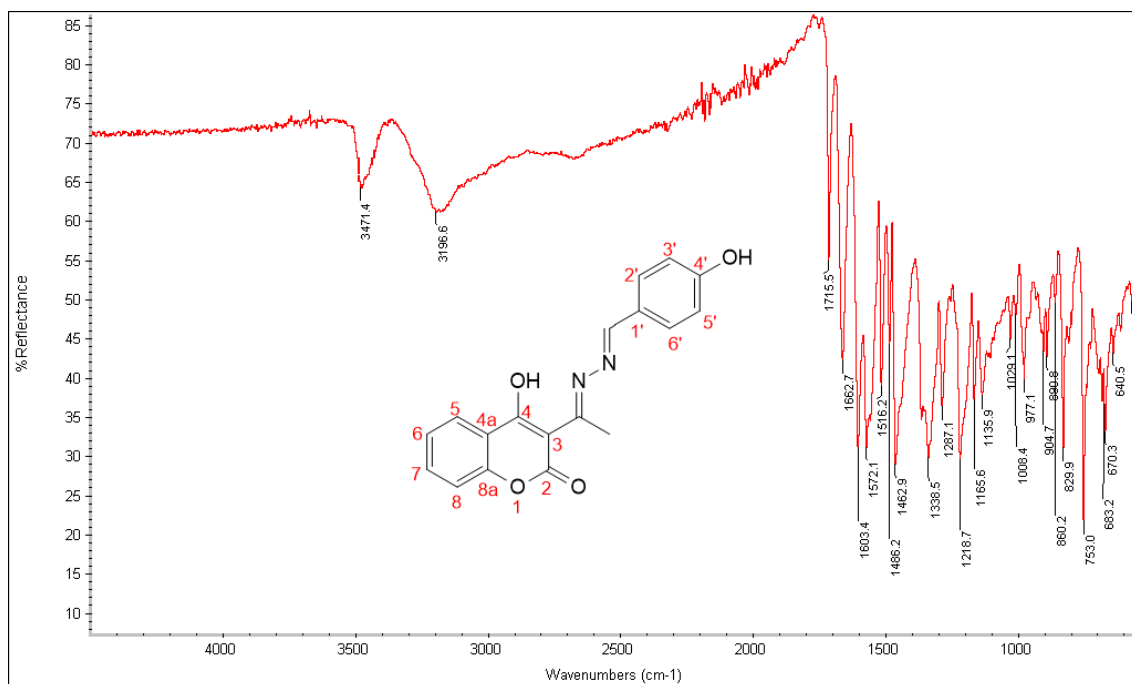
Прилог 34. HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(2-метоксибензилиден)хидразина [204]



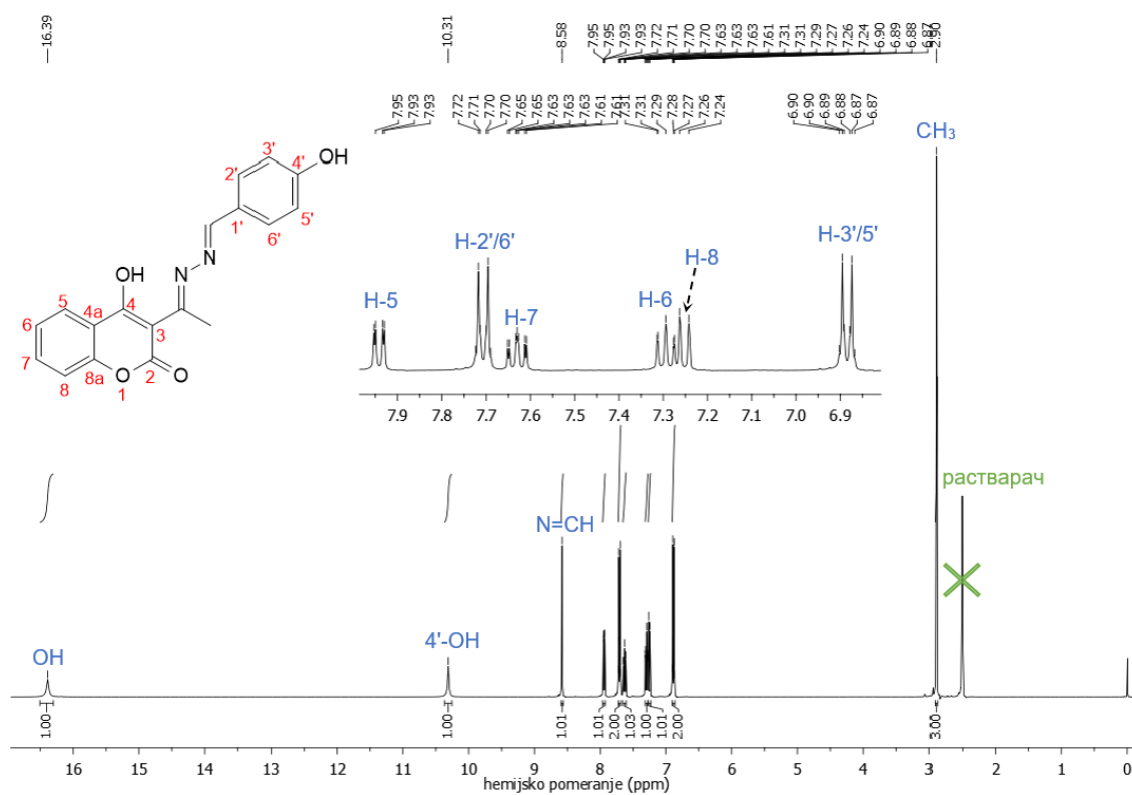
Прилог 35. HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(2-метоксибензилиден)хидразина [204]



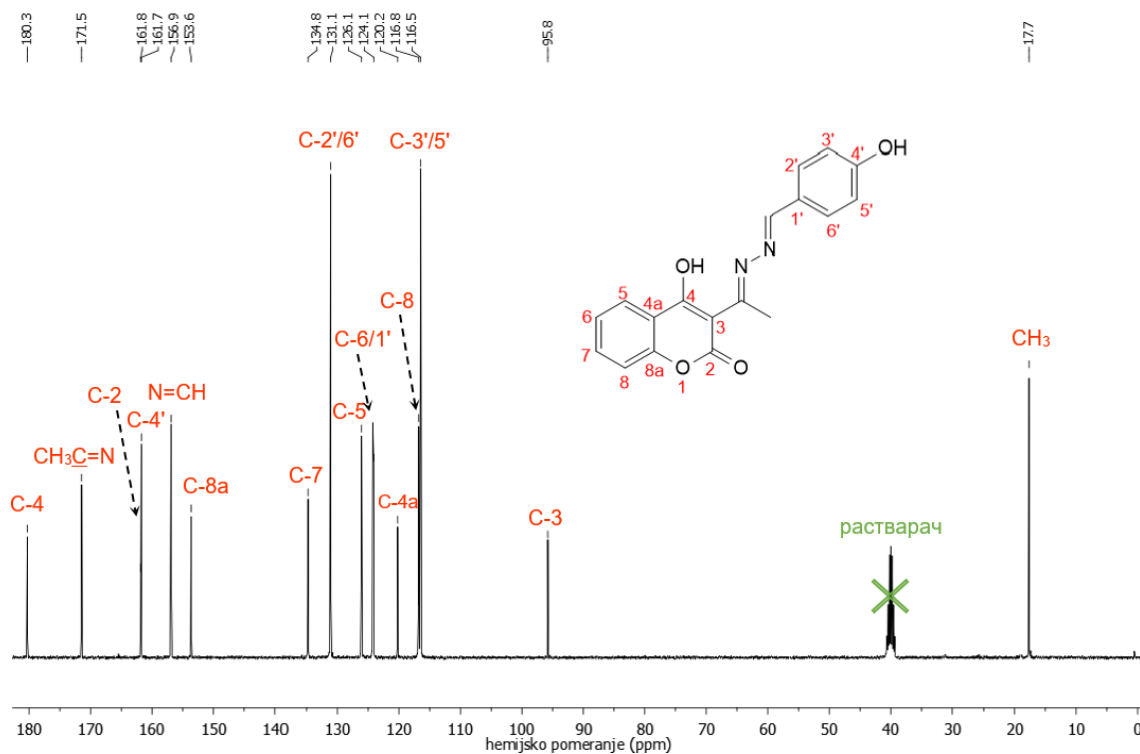
Прилог 36. NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(2-метоксибензилиден)хидразина [204]



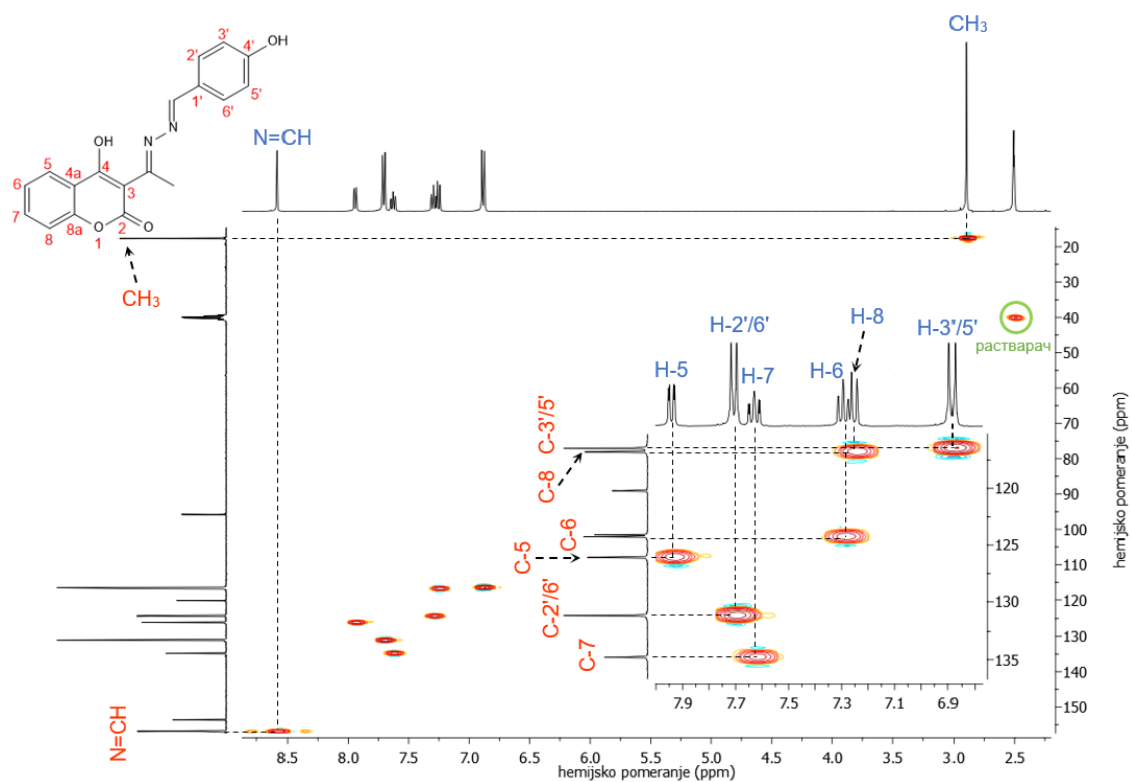
Прилог 37. IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-хидроксибензилиден)хидразина [205]



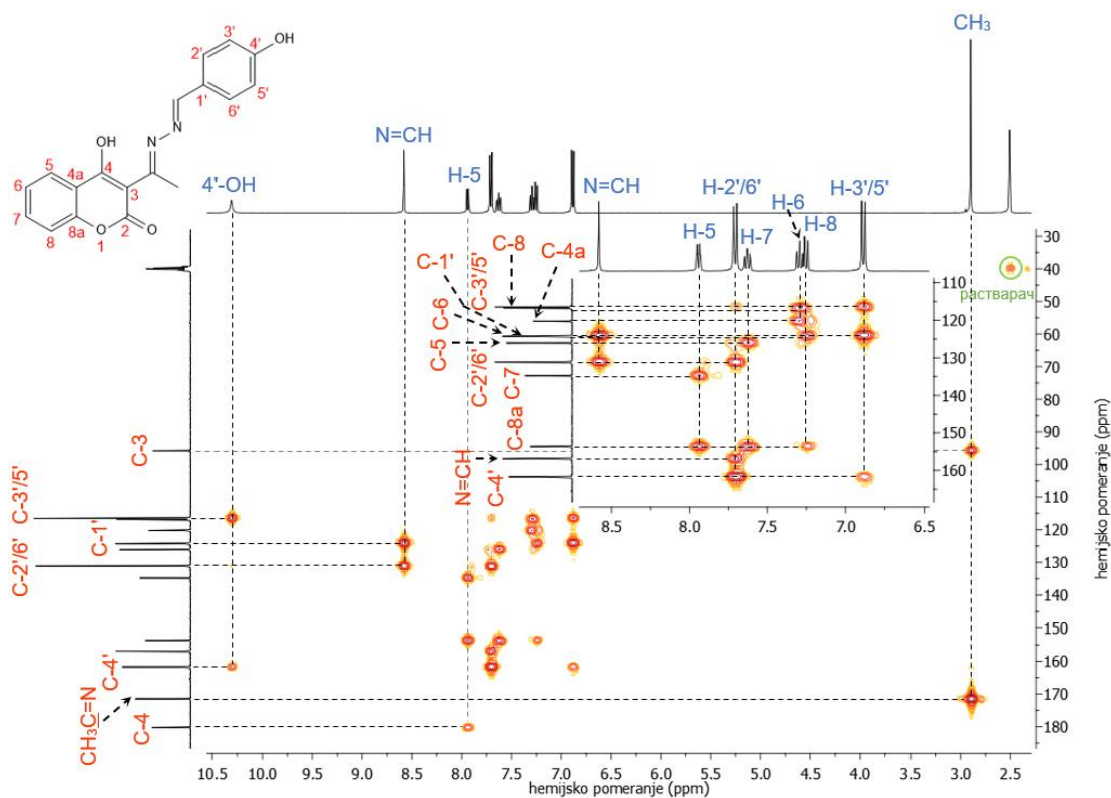
Прилог 38. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-хидроксибензилиден)хидразина [205]



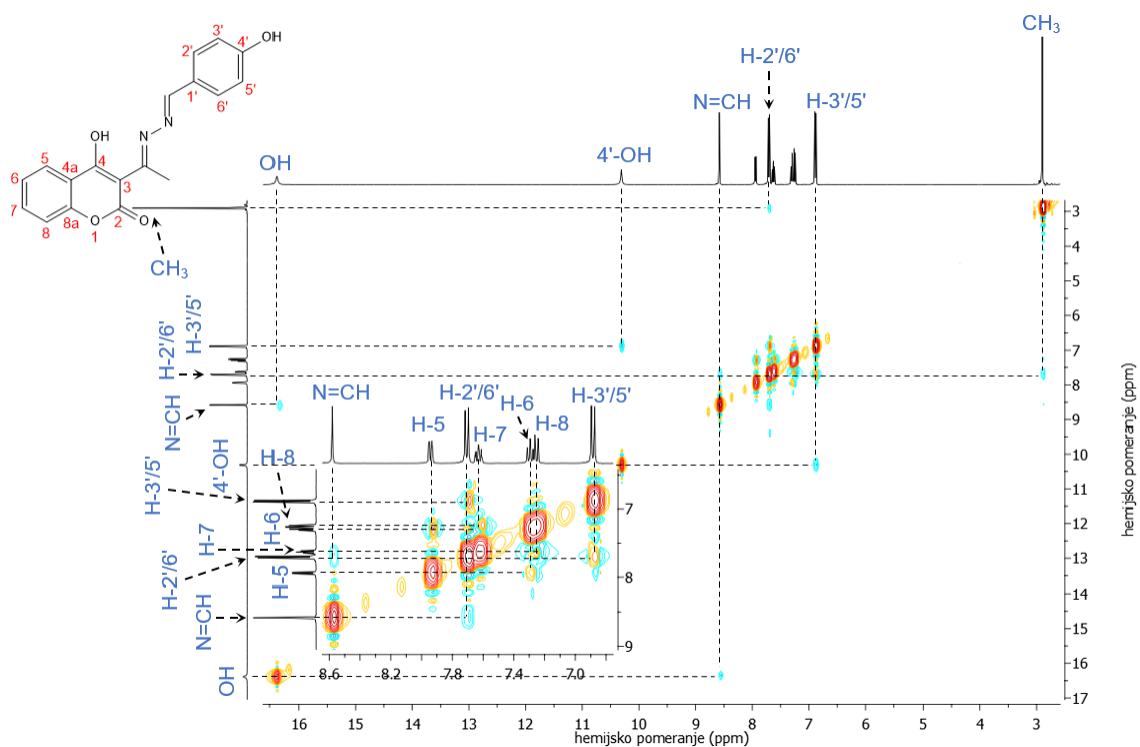
Прилог 39. ^{13}C -NMR (100,6 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-хидроксибензилиден)хидразина [205]



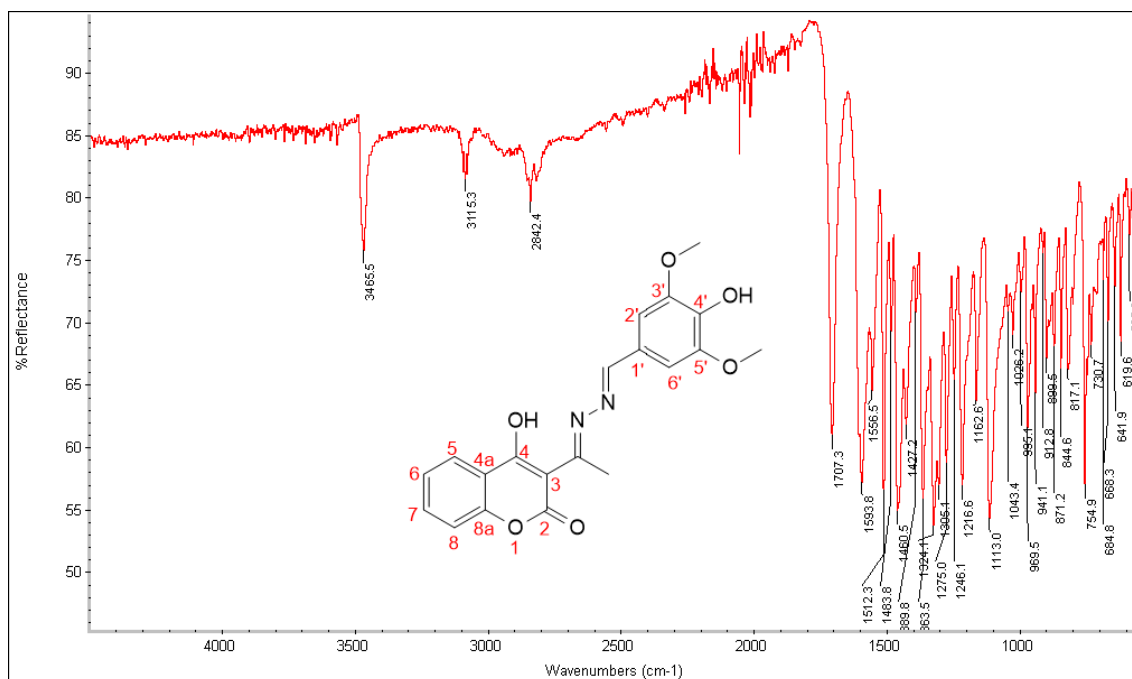
Прилог 40. HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-хидроксибензилиден)хидразина [205]



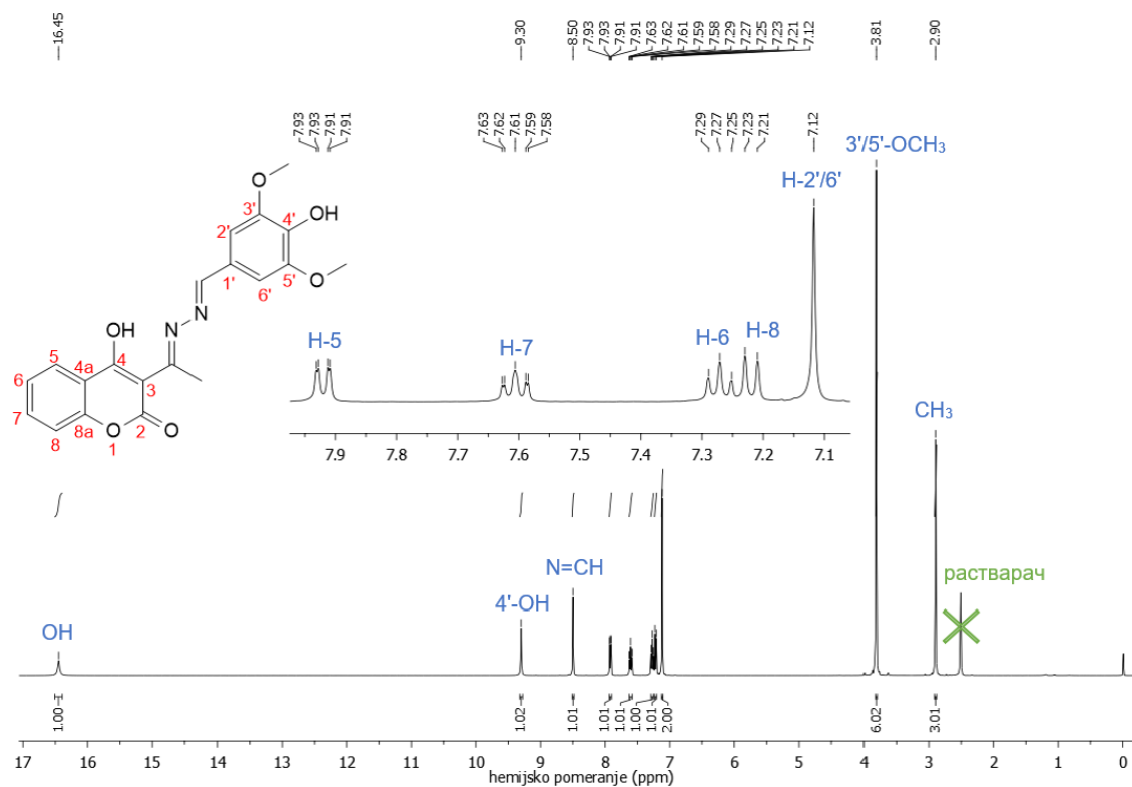
Прилог 41. HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-хидроксибензилиден)хидразина [205]



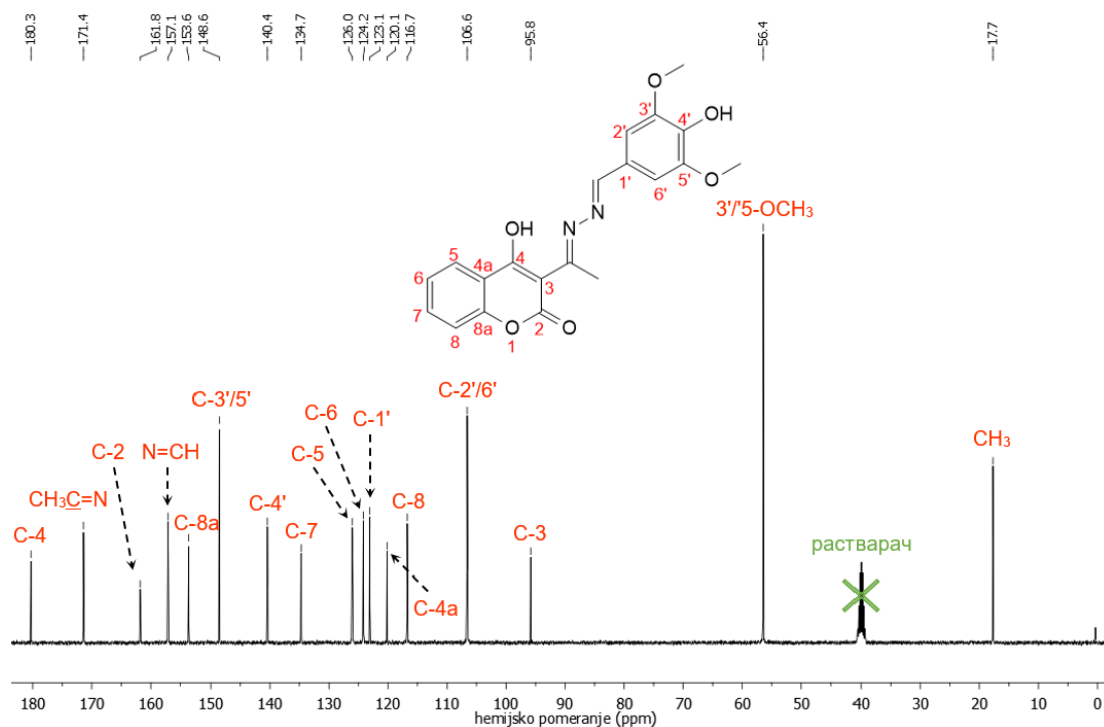
Прилог 42. NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-хидроксибензилиден)хидразина [205]



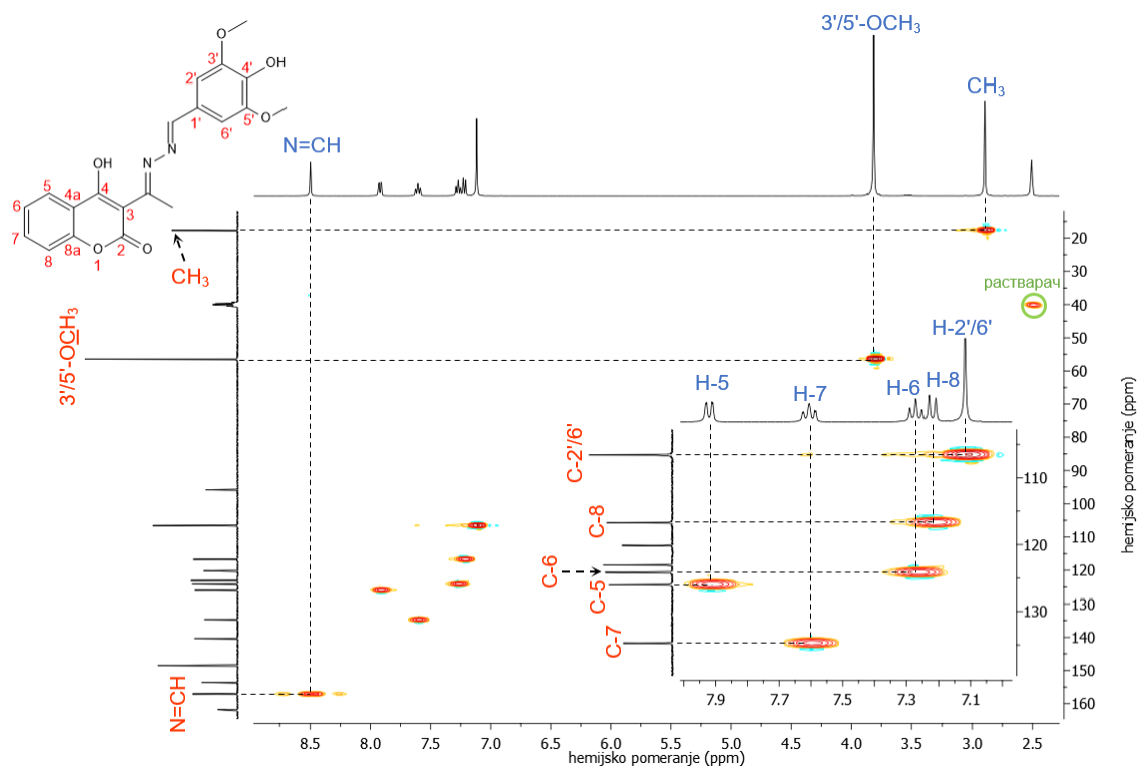
Прилог 43. IR спектар 1-[1-(4-hidroksi-2-okso-2H-xromen-3-il)etiliden]-2-(3,5-dimetoksi-4-hidroksibenziiden)hidrazina [206]



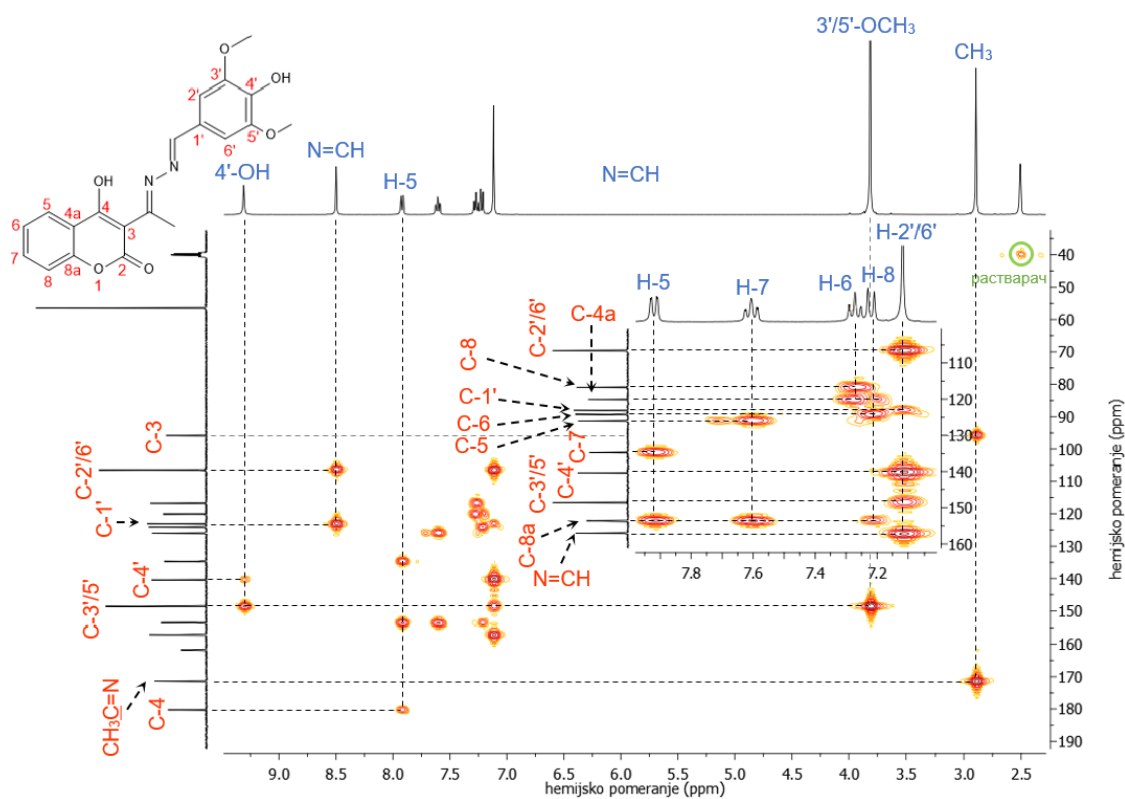
Прилог 44. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) спектар 1-[1-(4-hidroksi-2-okso-2H-xromen-3-il)etiliden]-2-(3,5-dimetoksi-4-hidroksibenziiden)hidrazina [206]



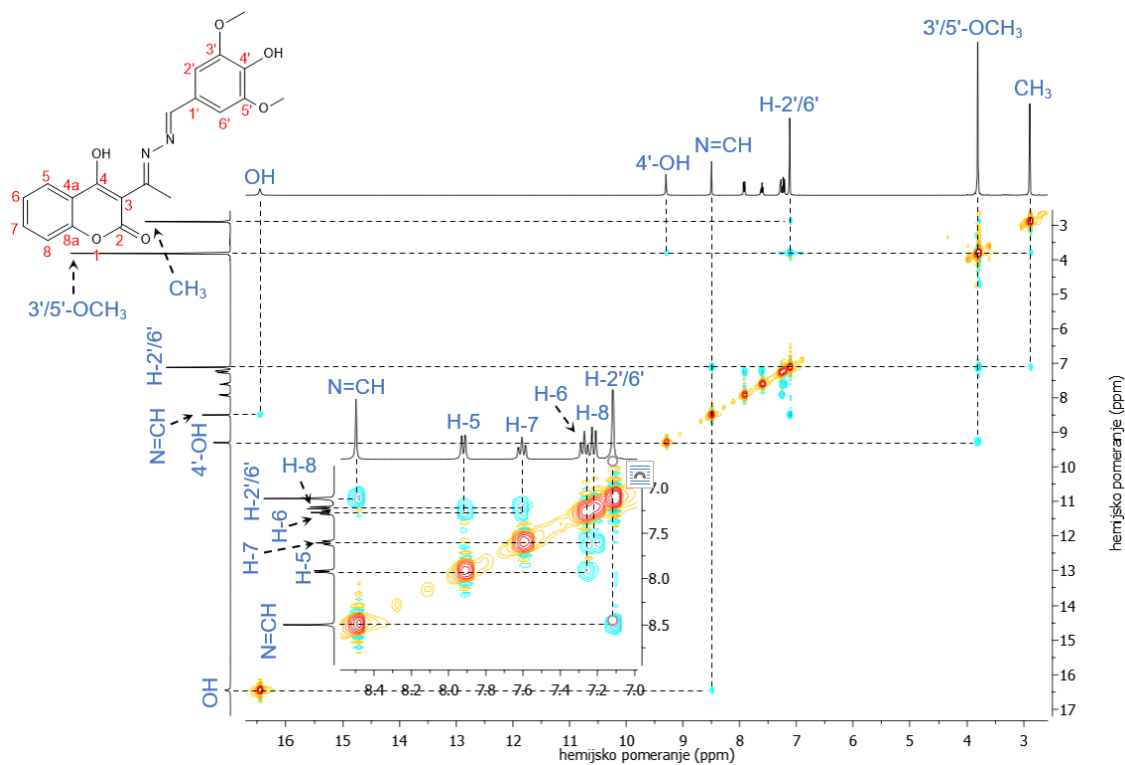
Прилог 45. ^{13}C -NMR (100,6 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3,5-диметокси-4-хидроксибензилиден)хидразина [206]



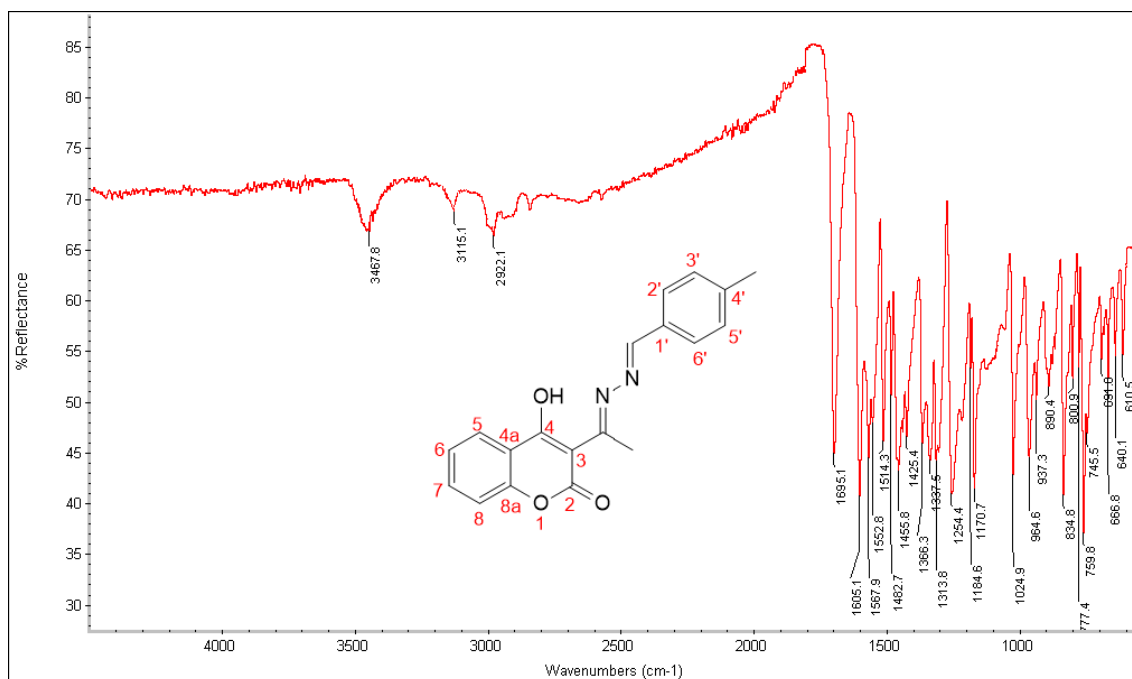
Прилог 46. HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3,5-диметокси-4-хидроксибензилиден)хидразина [206]



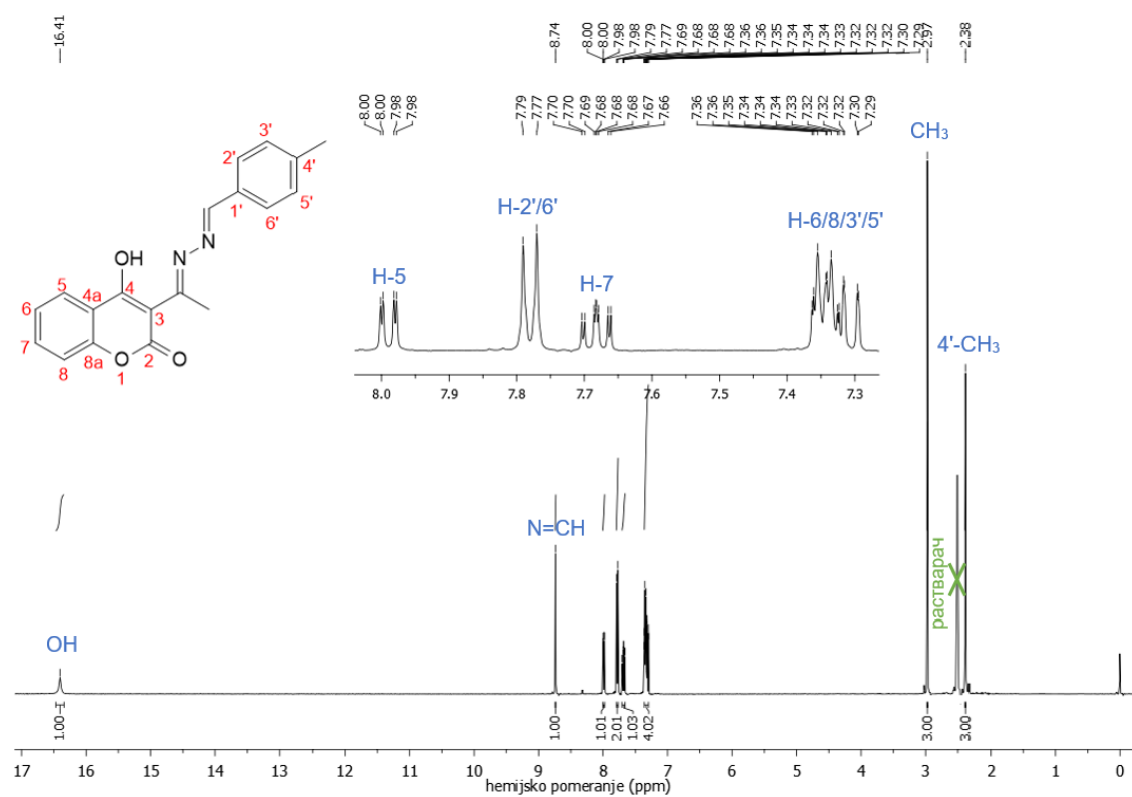
Прилог 47. HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3,5-диметокси-4-хидроксибензилиден)хидразина [206]



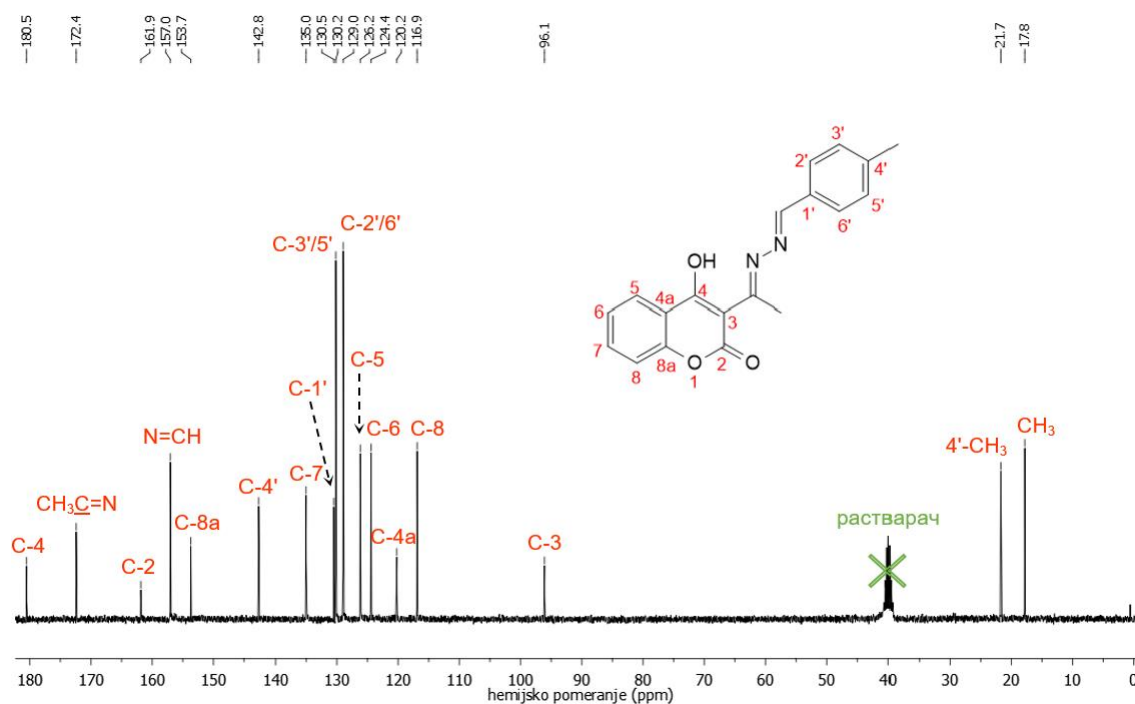
Прилог 48. NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(3,5-диметокси-4-хидроксибензилиден)хидразина [206]



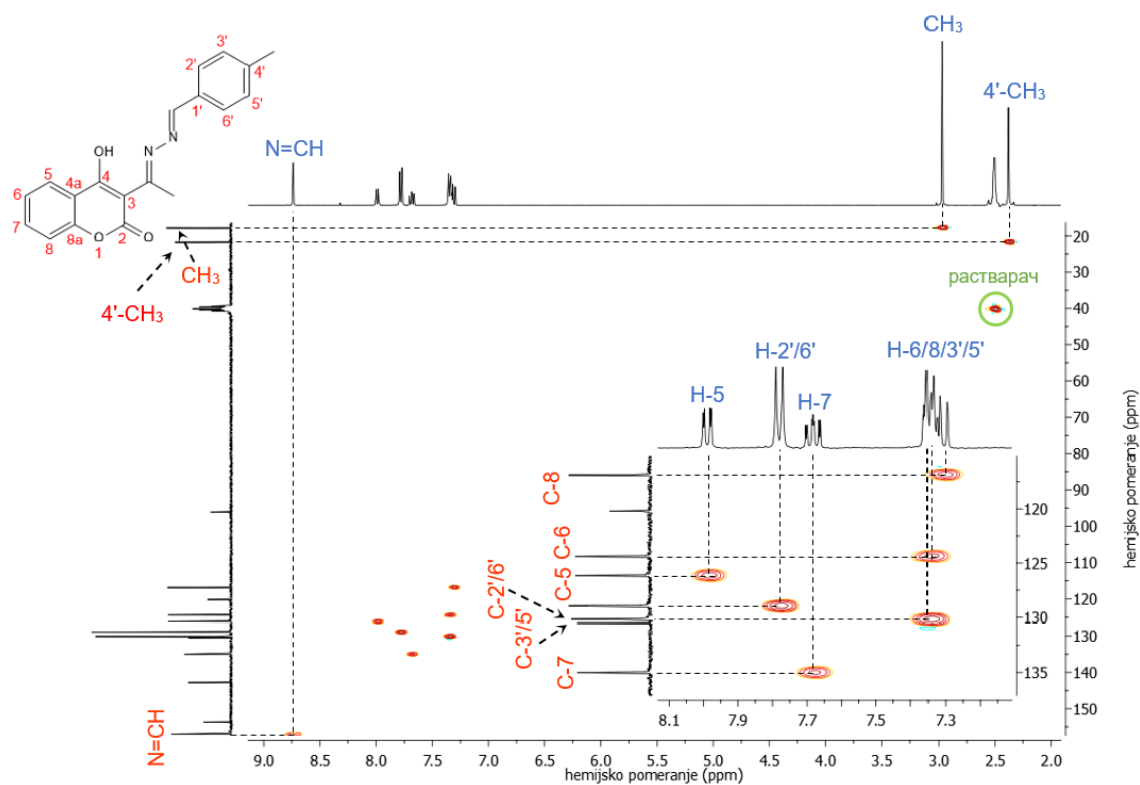
Прилог 49. IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромон-3-ил)етилиден]-2-(4-метилбензилиден)хидразина [207]



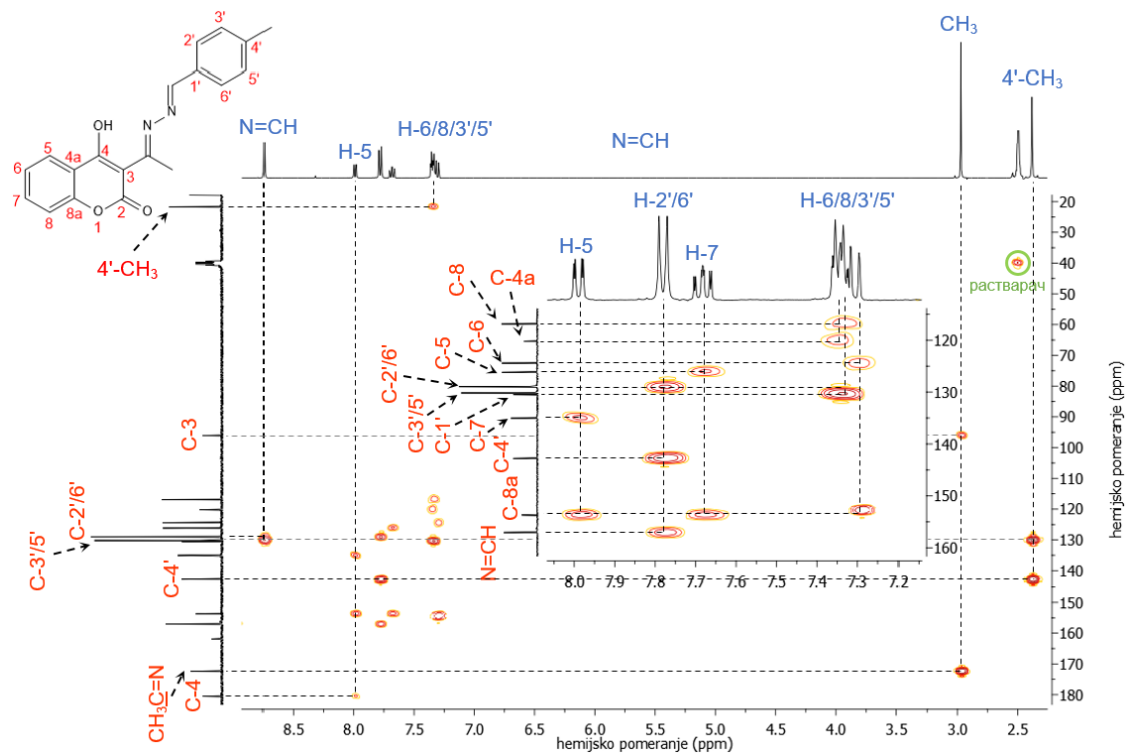
Прилог 50. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромон-3-ил)етилиден]-2-(4-метилбензилиден)хидразина [207]



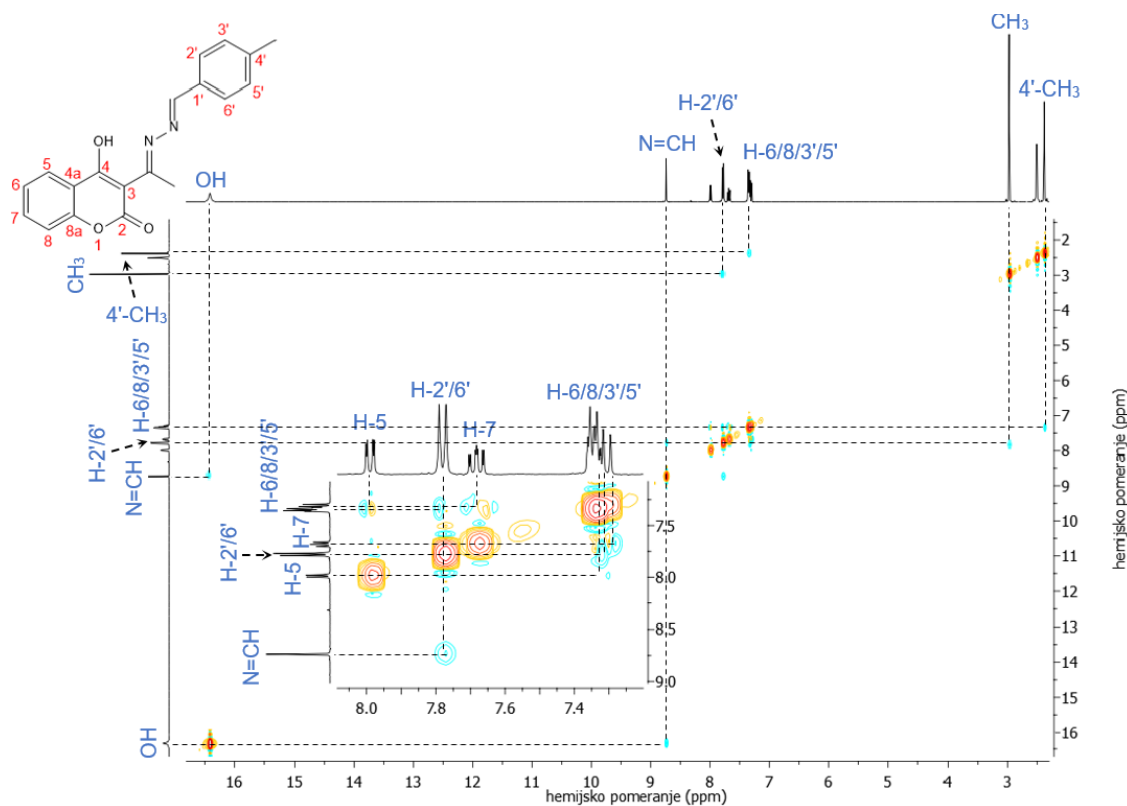
Прилог 51. ^{13}C -NMR (100,6 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метилбензилиден)хидразина [207]



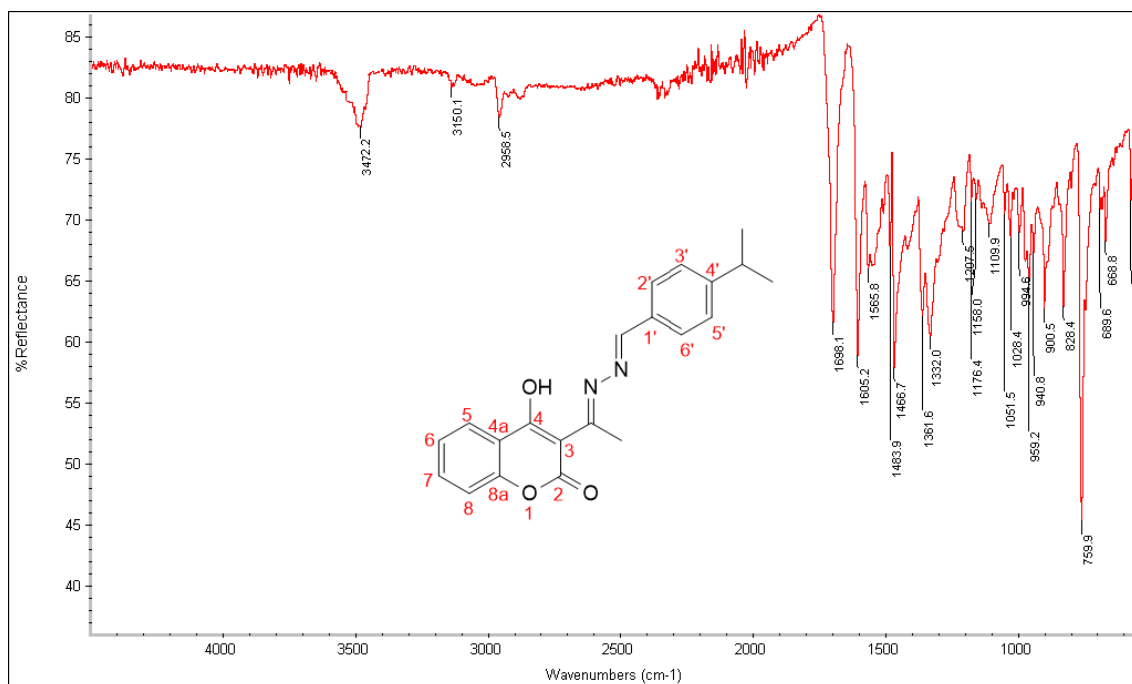
Прилог 52. HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метилбензилиден)хидразина [207]



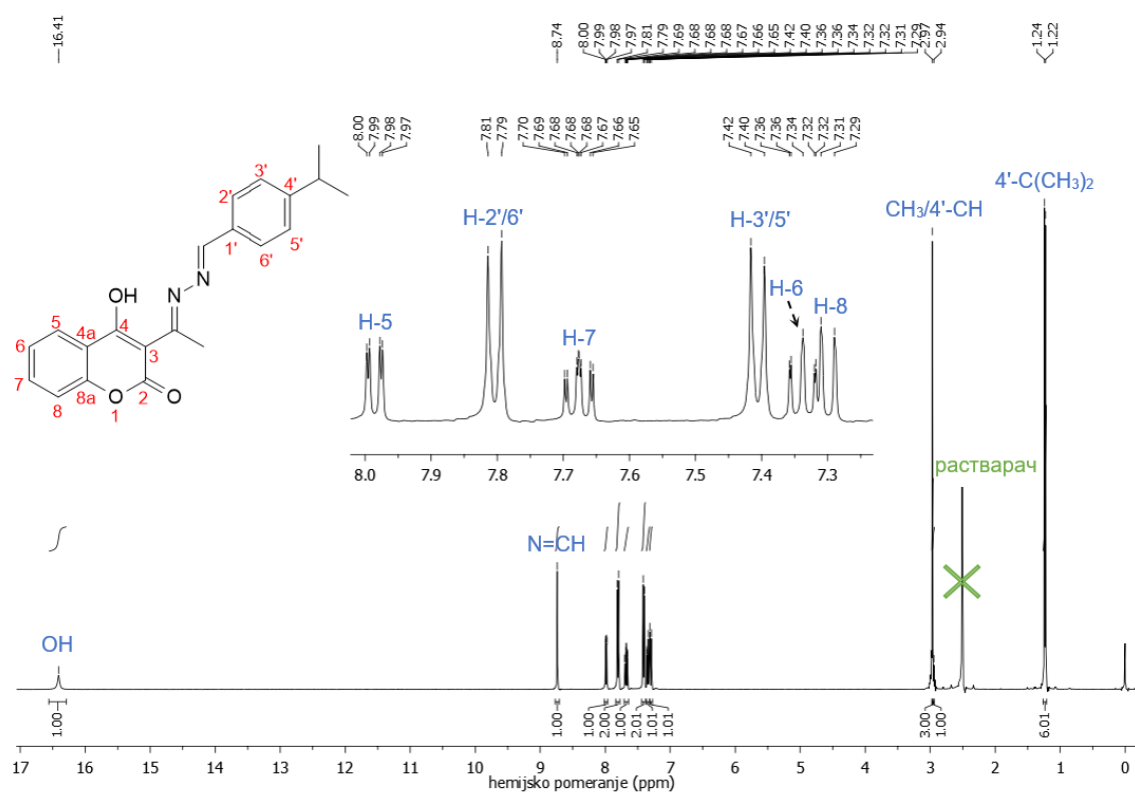
Прилог 53. HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метилбензилиден)хидразина [207]



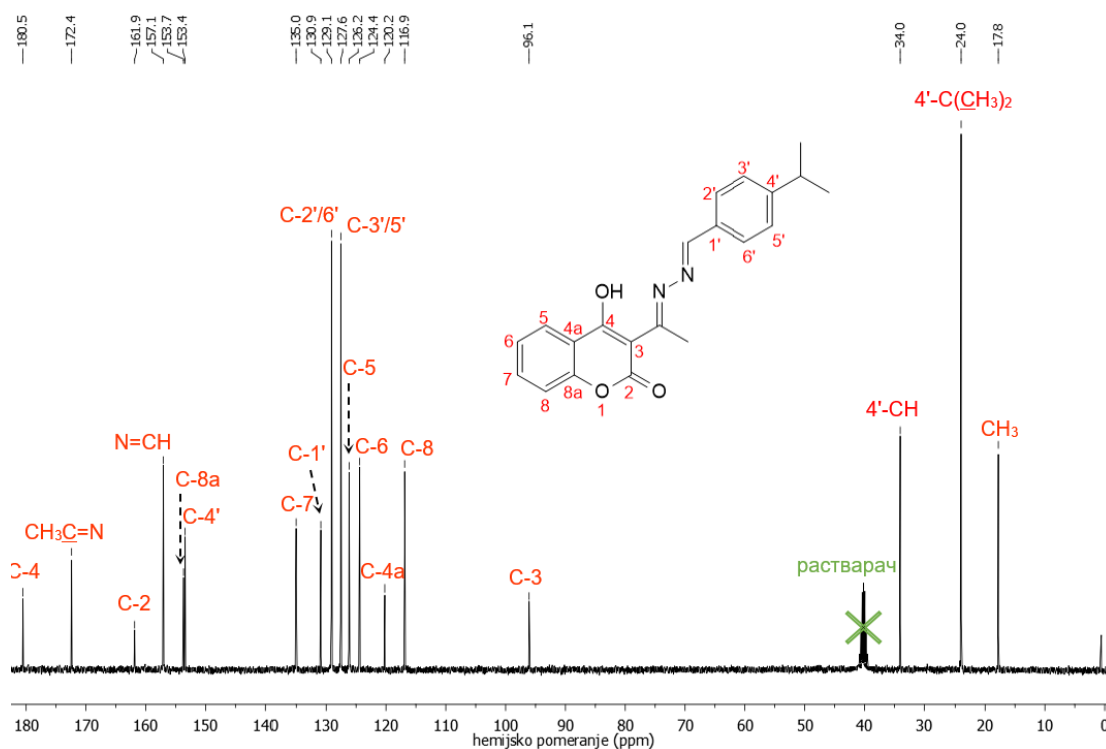
Прилог 54. NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-метилбензилиден)хидразина [207]



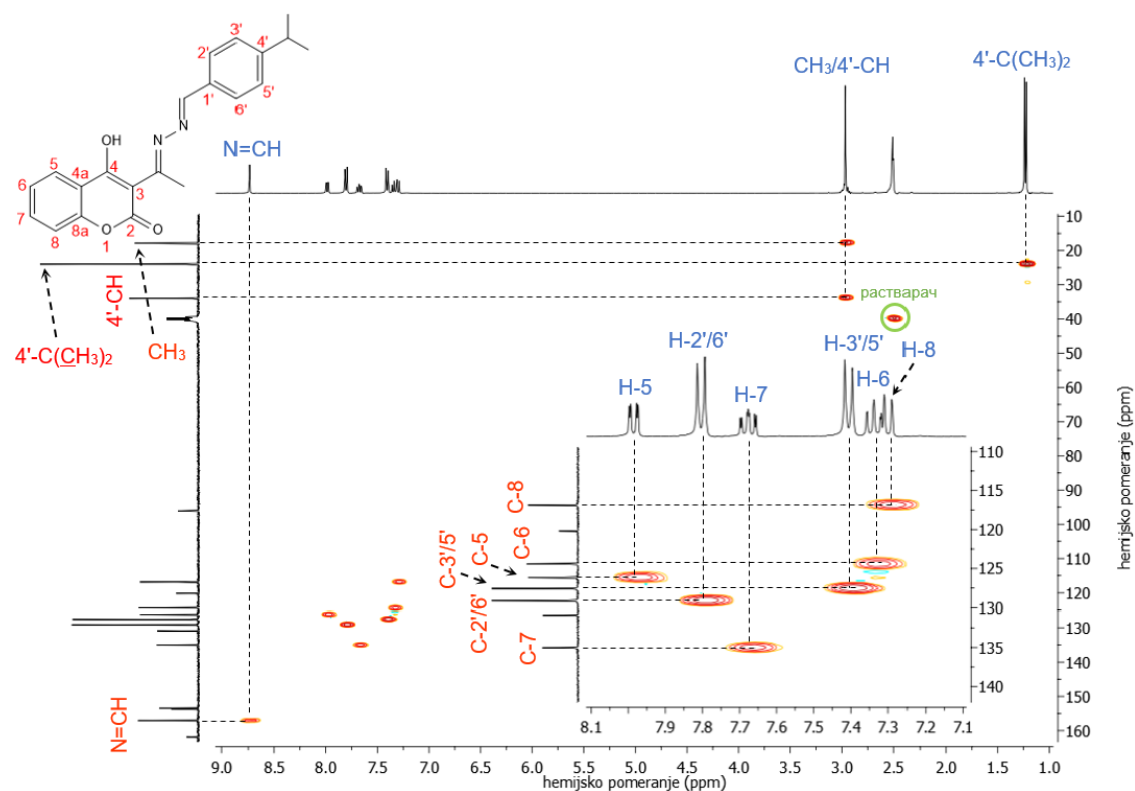
Прилог 55. IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромн-3-ил)етилиден]-2-(4-изопропилбензилиден)хидразина [208]



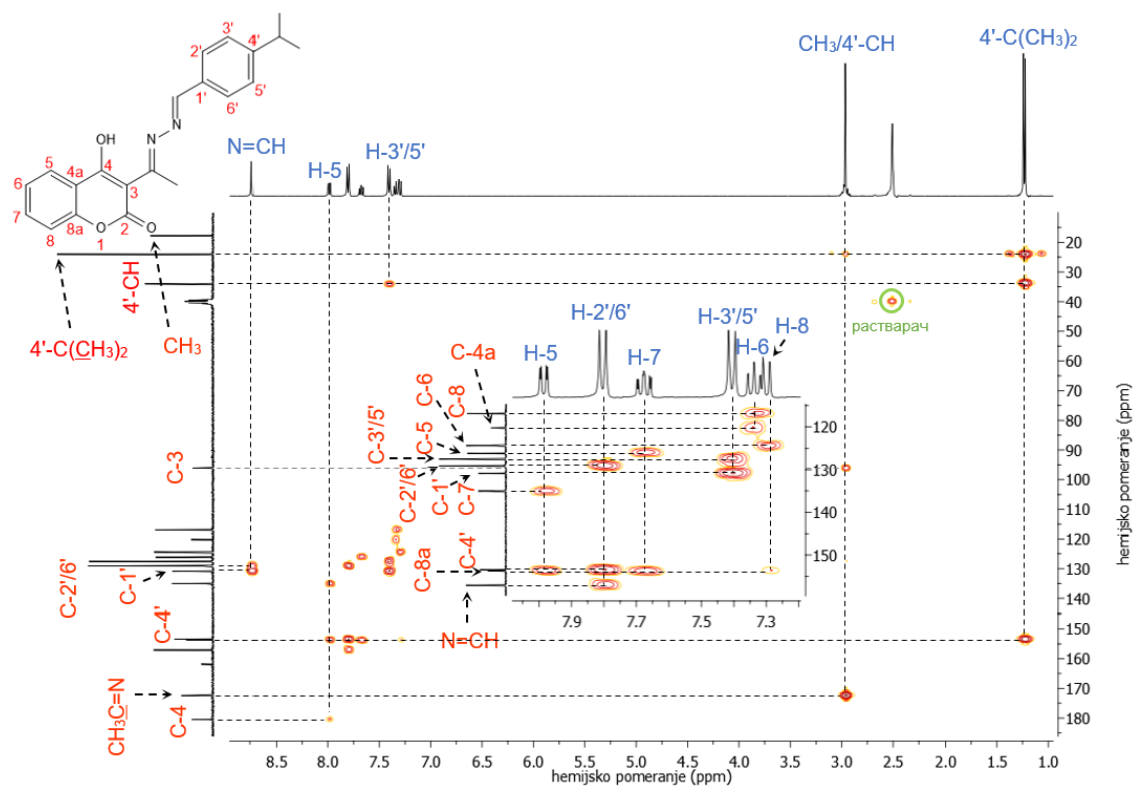
Прилог 56. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромн-3-ил)етилиден]-2-(4-изопропилбензилиден)хидразина [208]



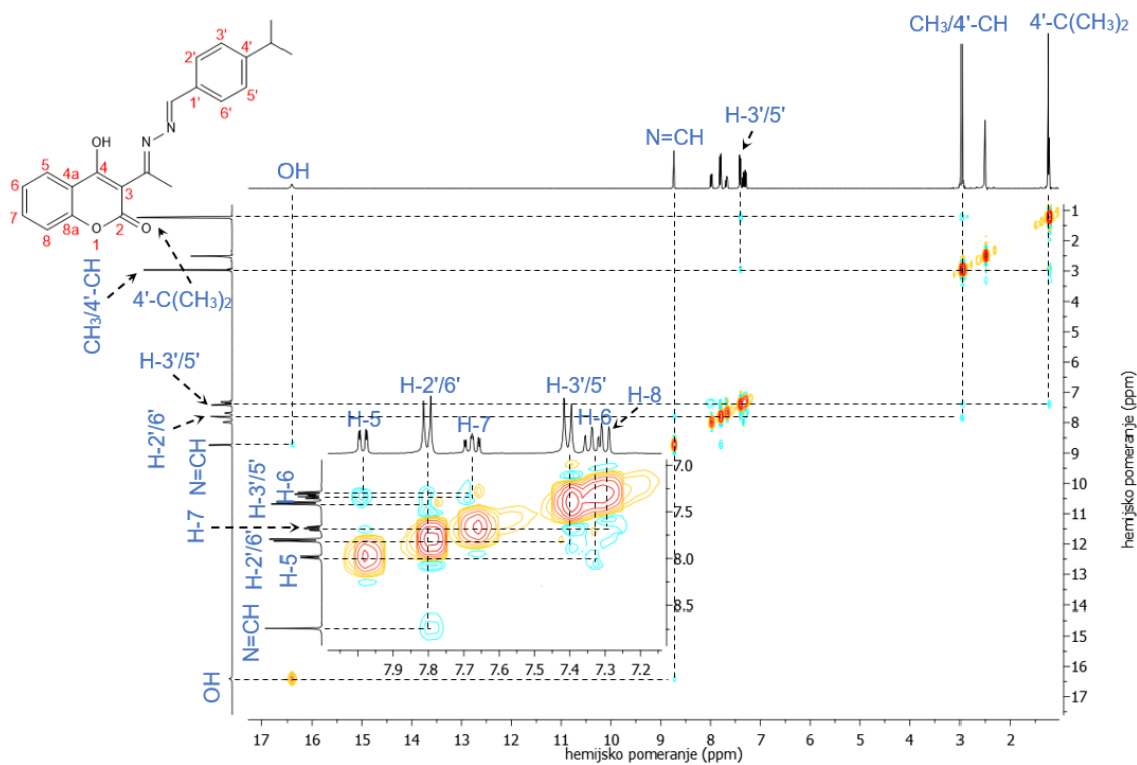
Прилог 57. ^{13}C -NMR (100,6 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-изопропилбензилиден)хидразина [208]



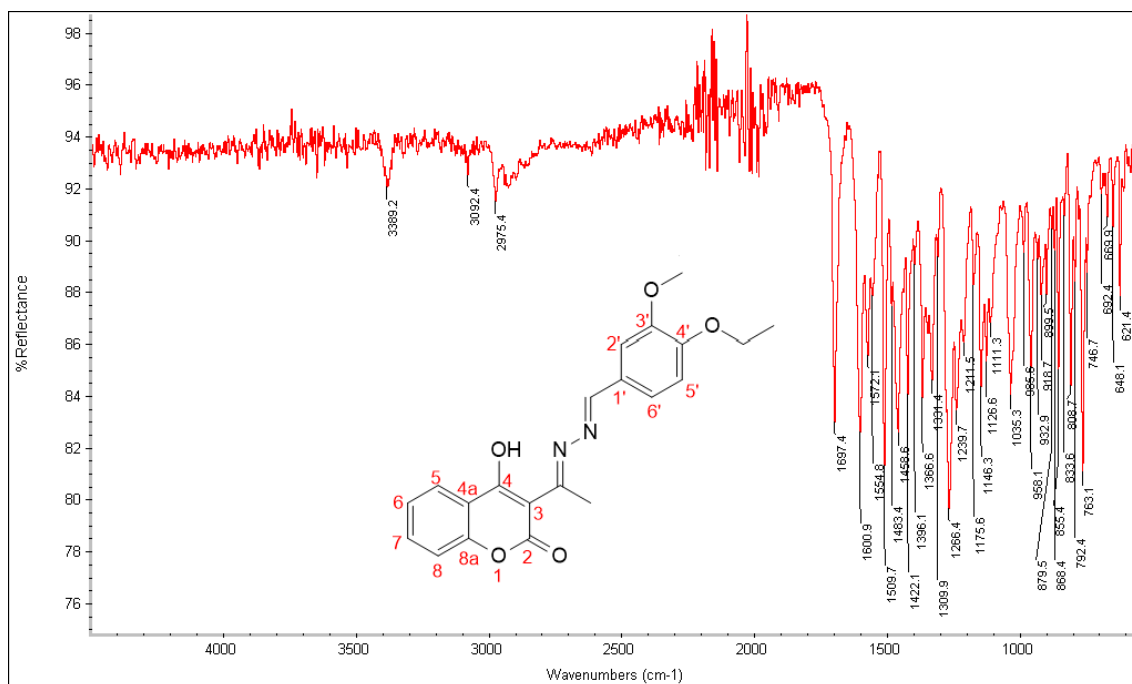
Прилог 58. HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-изопропилбензилиден)хидразина [208]



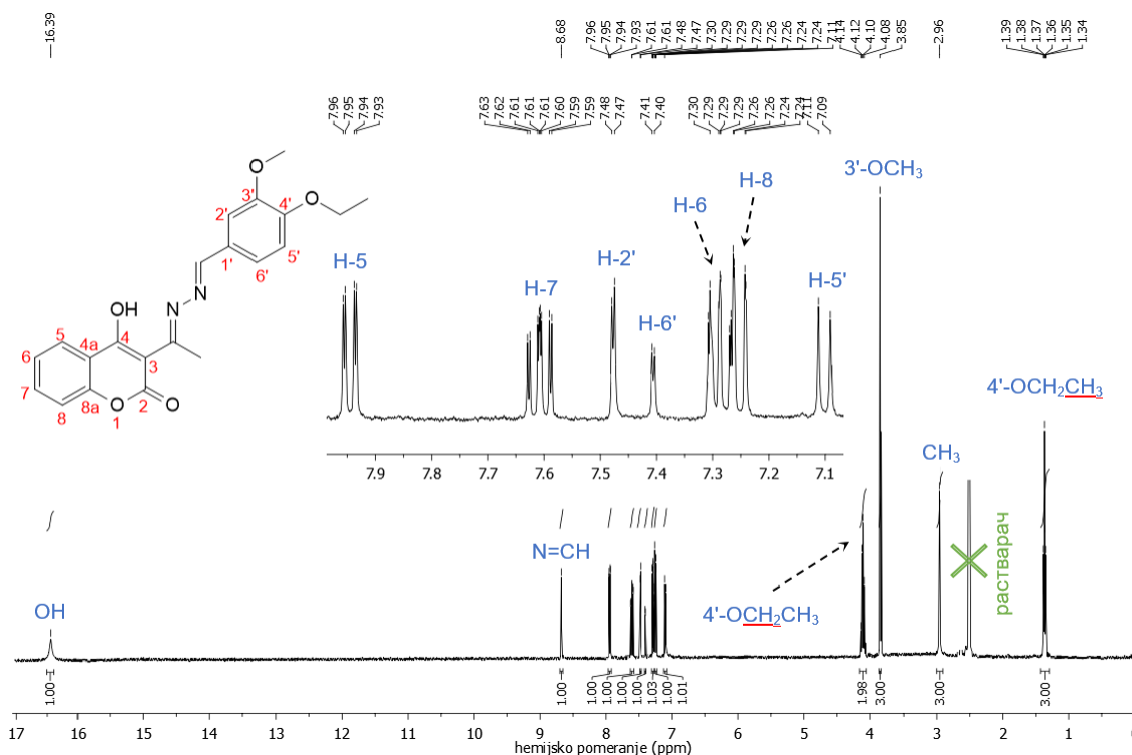
Прилог 59. HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромон-3-ил)этилиден]-2-(4-изопропилбензилиден)хидразина [208]



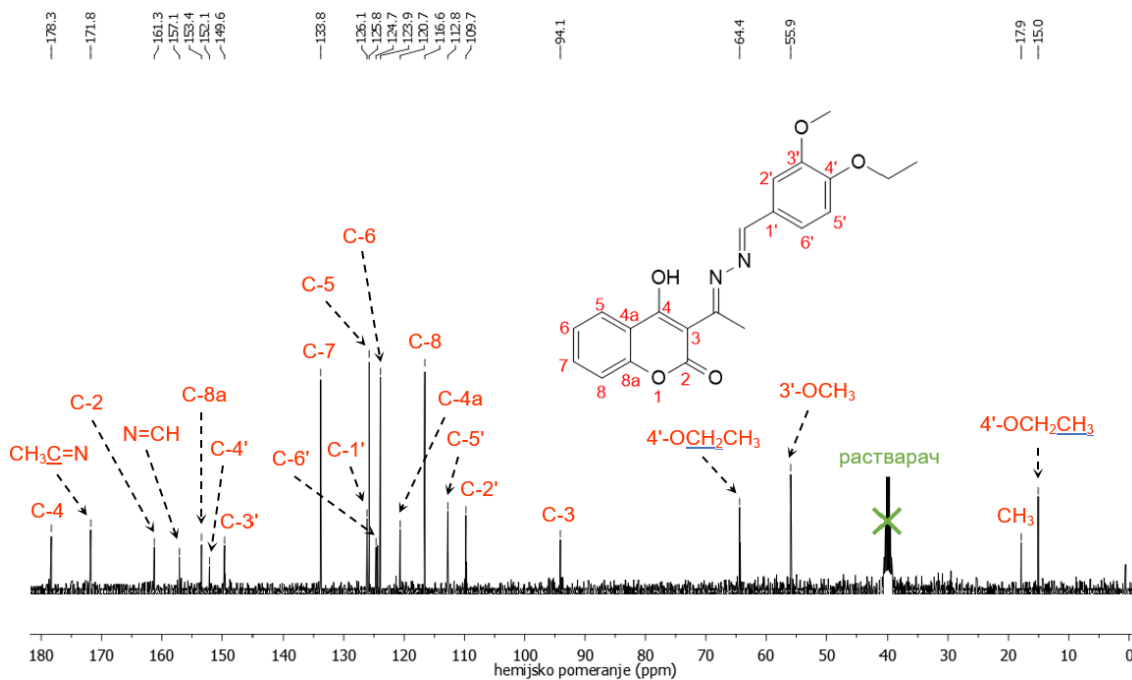
Прилог 60. NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромон-3-ил)этилиден]-2-(4-изопропилбензилиден)хидразина [208]



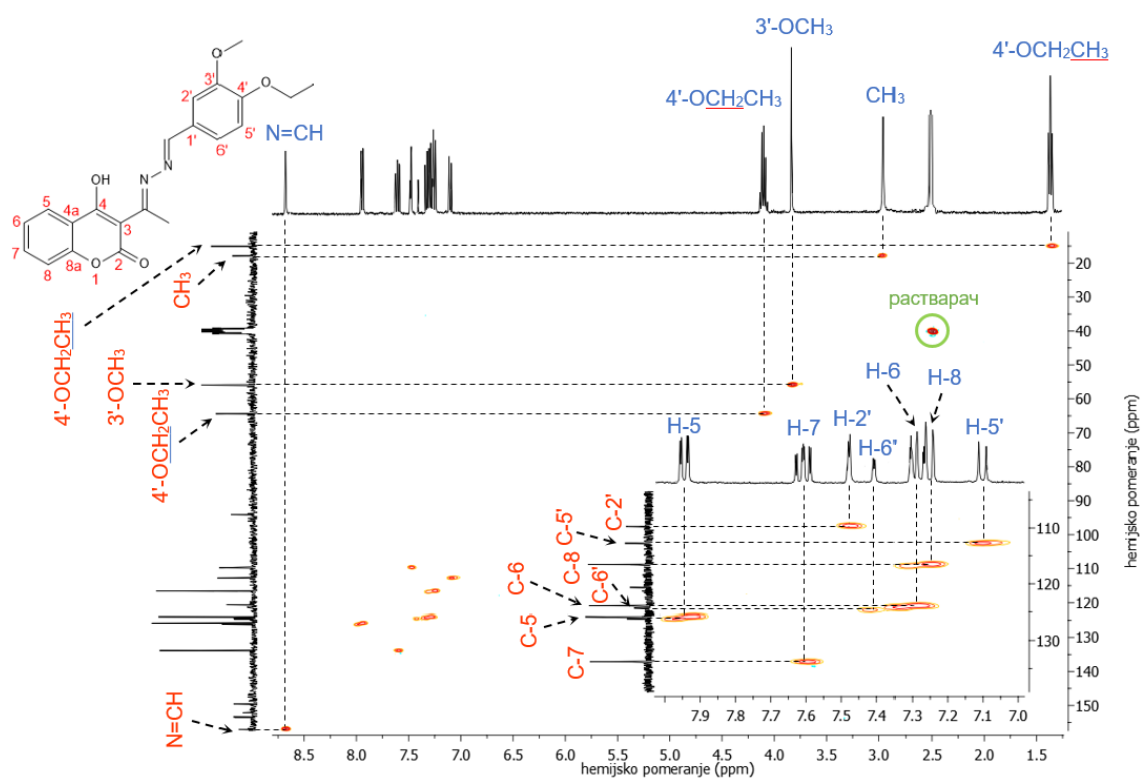
Прилог 61. IR спектар 1-[1-(4-hidroksi-2-okso-2H-xromen-3-il)etiliden]-2-(4-etoksi-3-metoksibenzyliden)hidrazina [209]



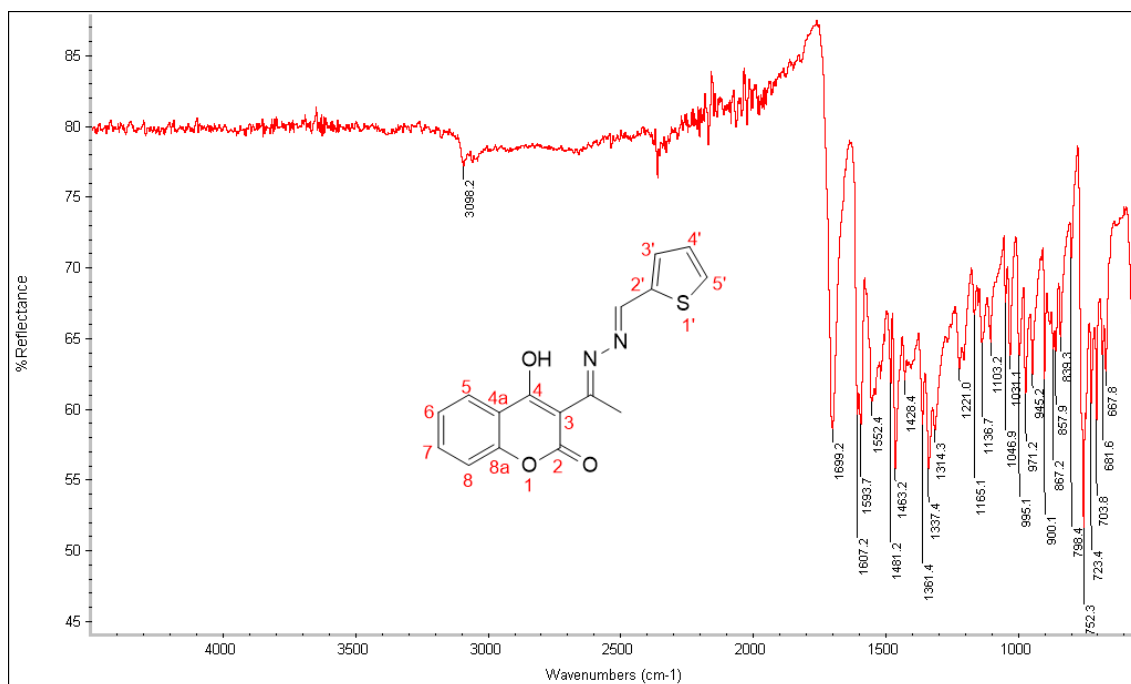
Прилог 62. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) спектар 1-[1-(4-hidroksi-2-okso-2H-xromen-3-il)etiliden]-2-(4-etoksi-3-metoksibenzyliden)hidrazina [209]



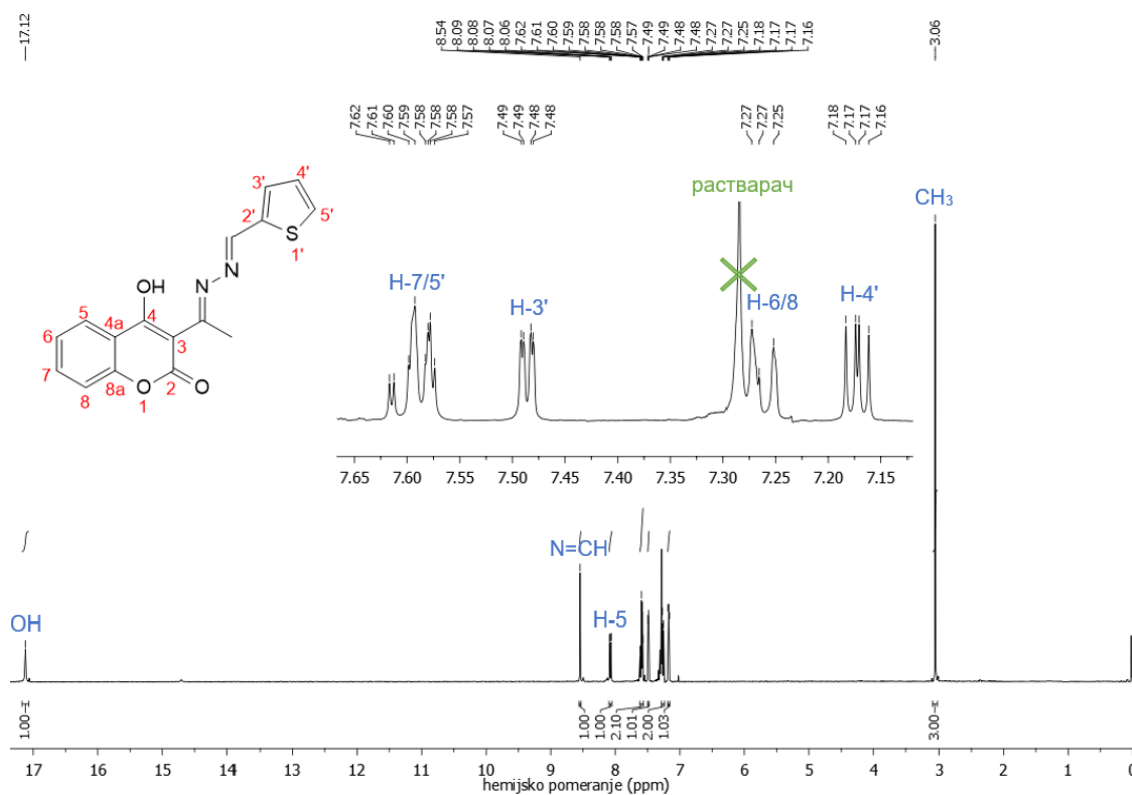
Прилог 63. ^{13}C NMR (100,6 МHz, $\text{DMSO}-d_6$) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-етокси-3-метоксибензилиден)хидразина [209]



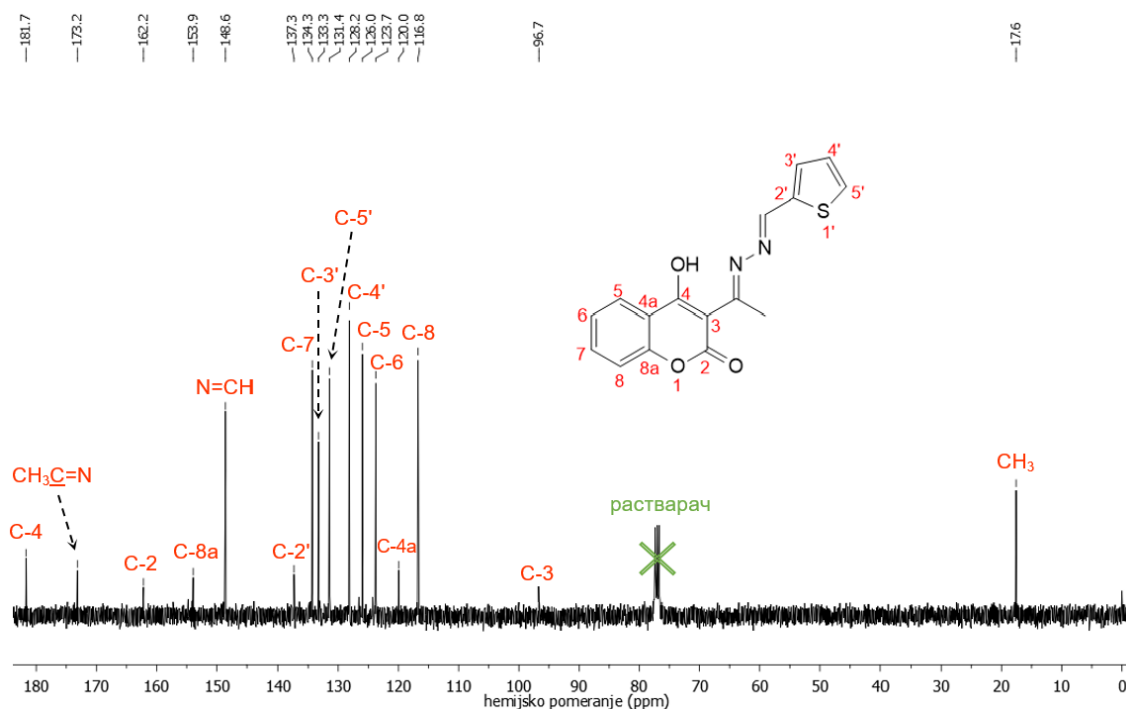
Прилог 64. HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(4-етокси-3-метоксибензилиден)хидразина [209]



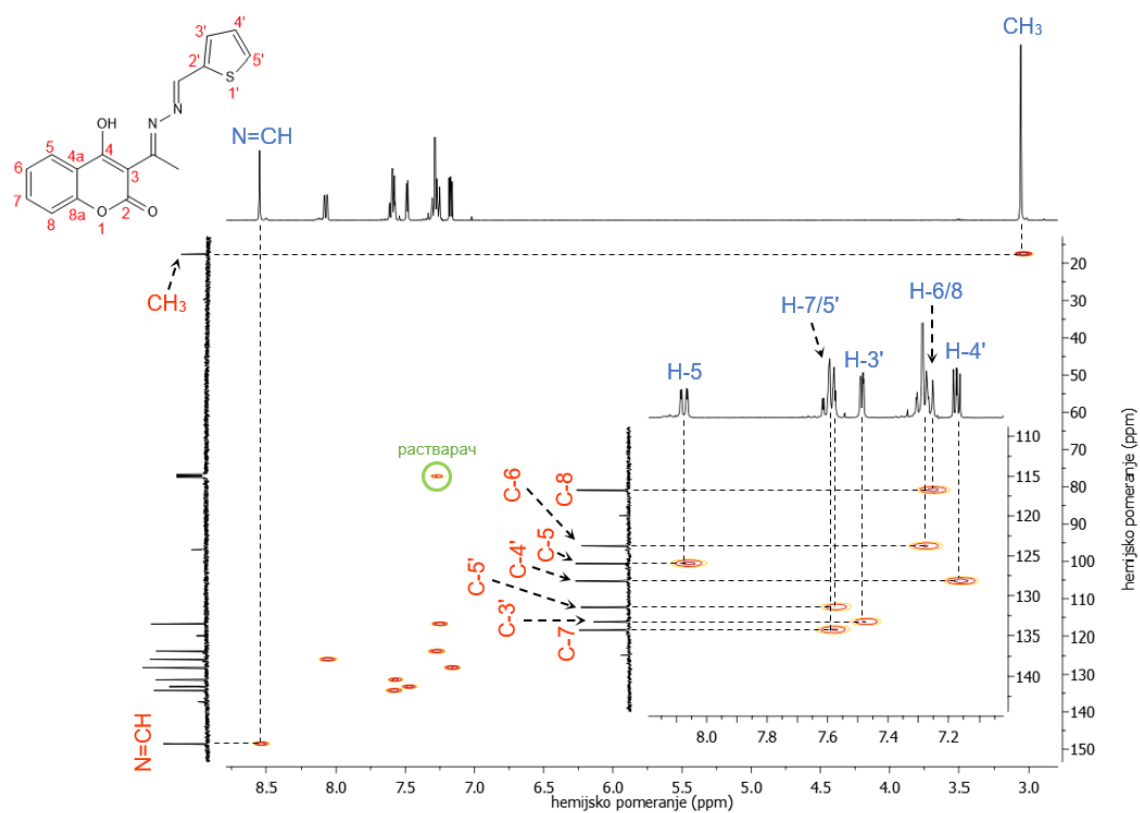
Прилог 67. IR спектар 1-[1-(4-hidroksi-2-okso-2H-xromen-3-il)etiliden]-2-(tiofen-2-il-2-metilen)hidrazina [210]



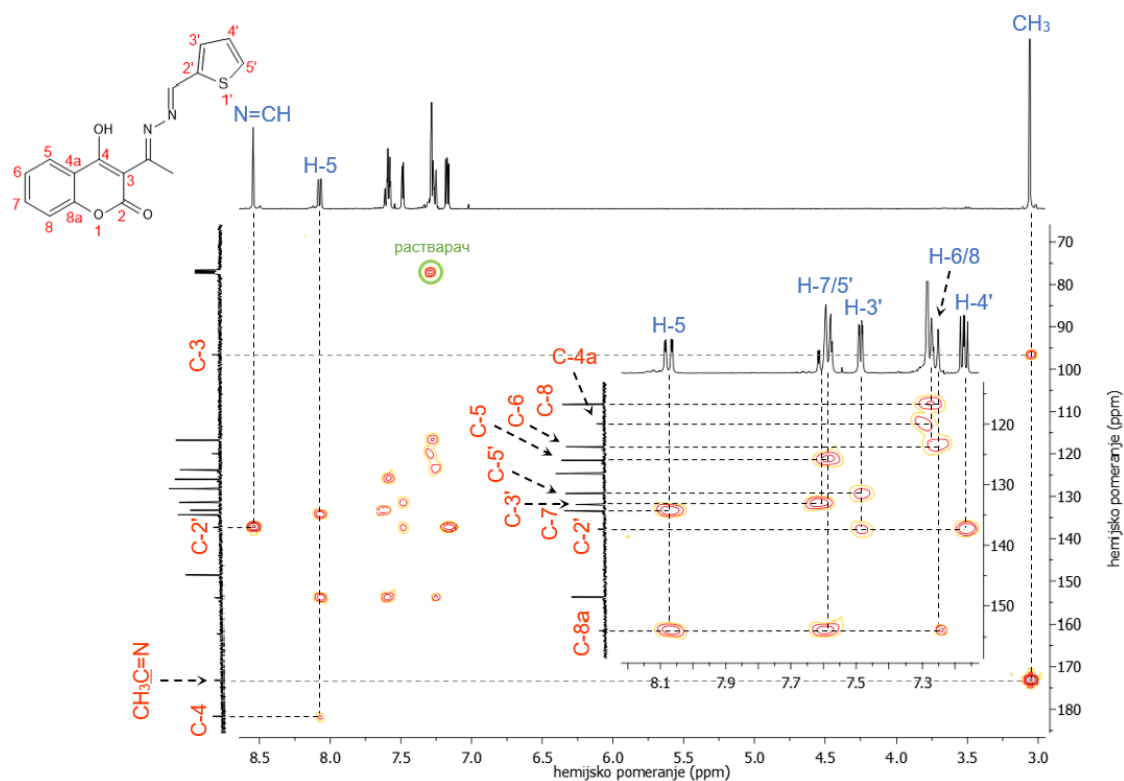
Прилог 68. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) спектар 1-[1-(4-hidroksi-2-okso-2H-xromen-3-il)etiliden]-2-(tiofen-2-il-2-metilen)hidrazina [210]



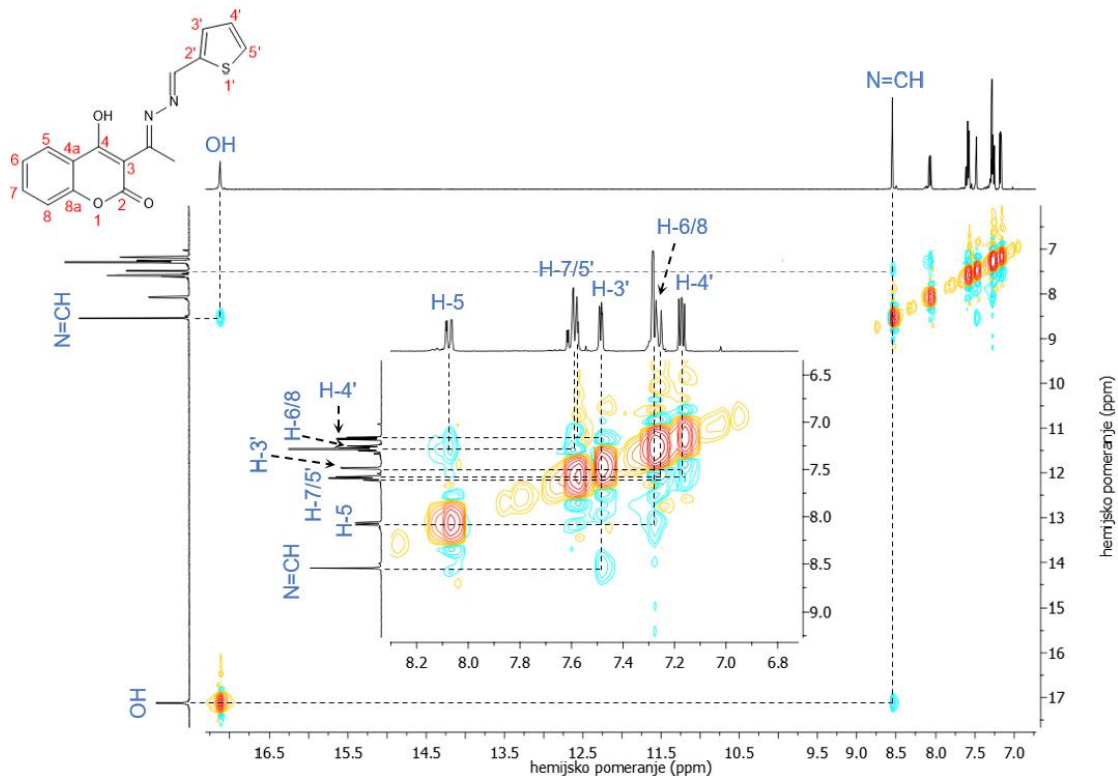
Прилог 69. ^{13}C -NMR (100,6 MHz, CDCl_3) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(тиофен-2-ил-2-метилен)хидразина [210]



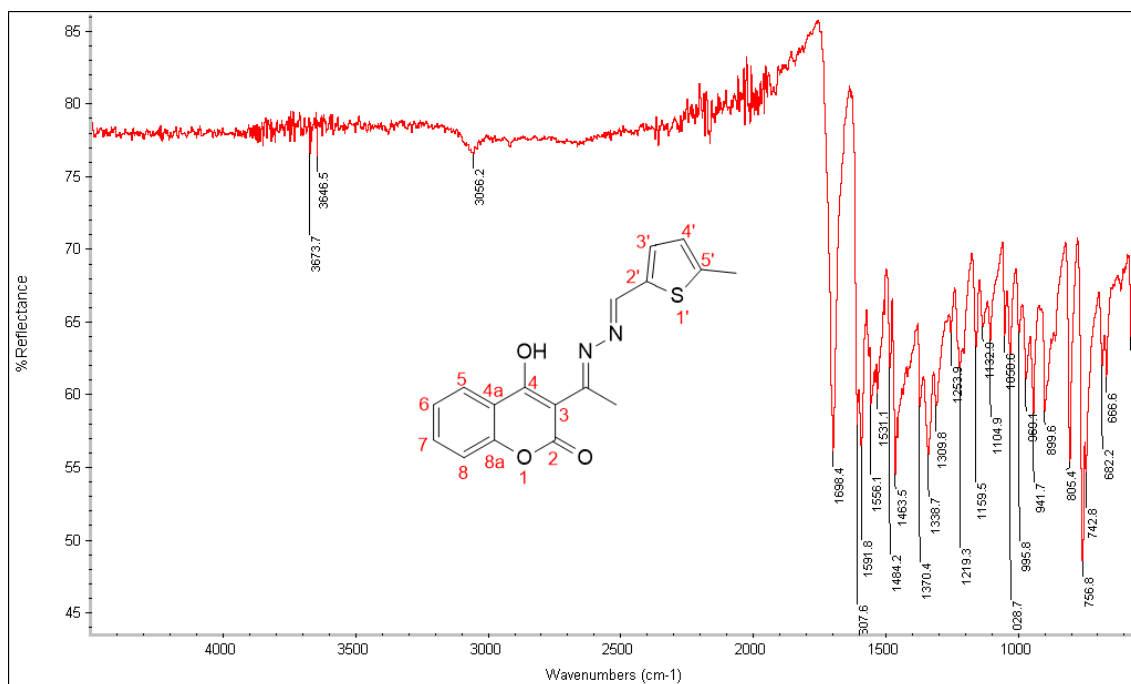
Прилог 70. HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(тиофен-2-ил-2-метилен)хидразина [210]



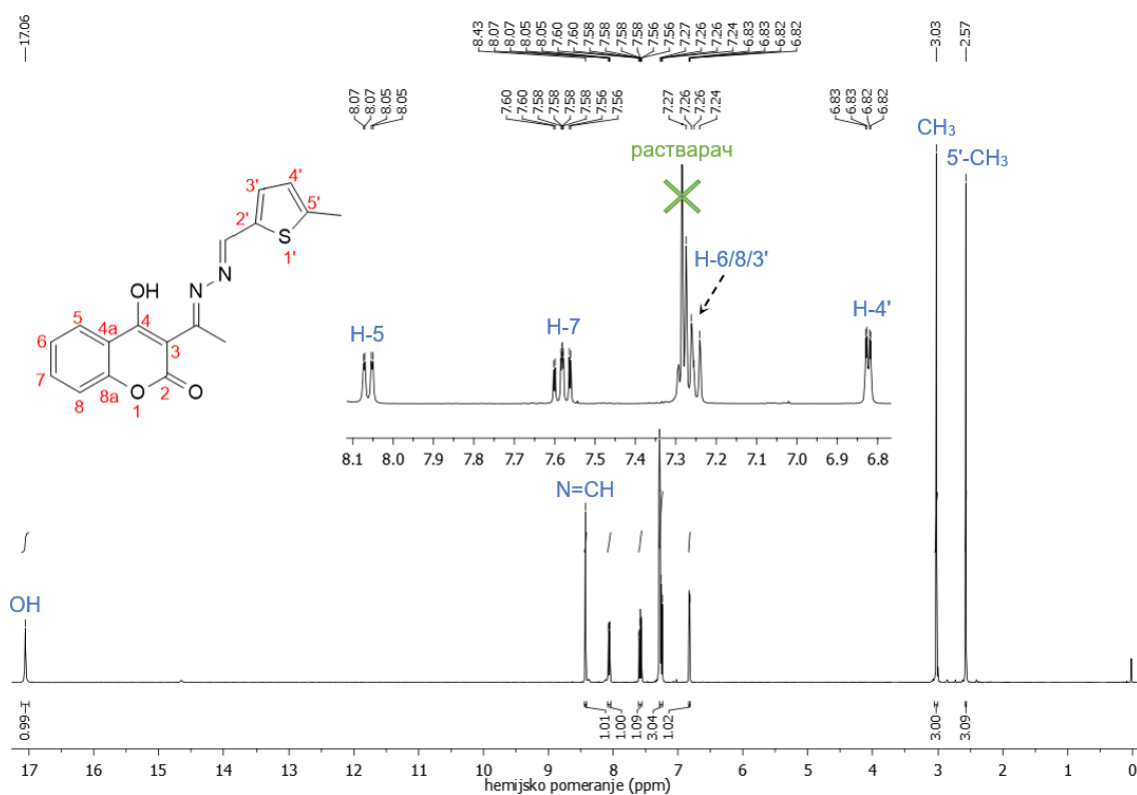
Прилог 71. HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(тиофен-2-ил-2-метилен)хидразина [210]



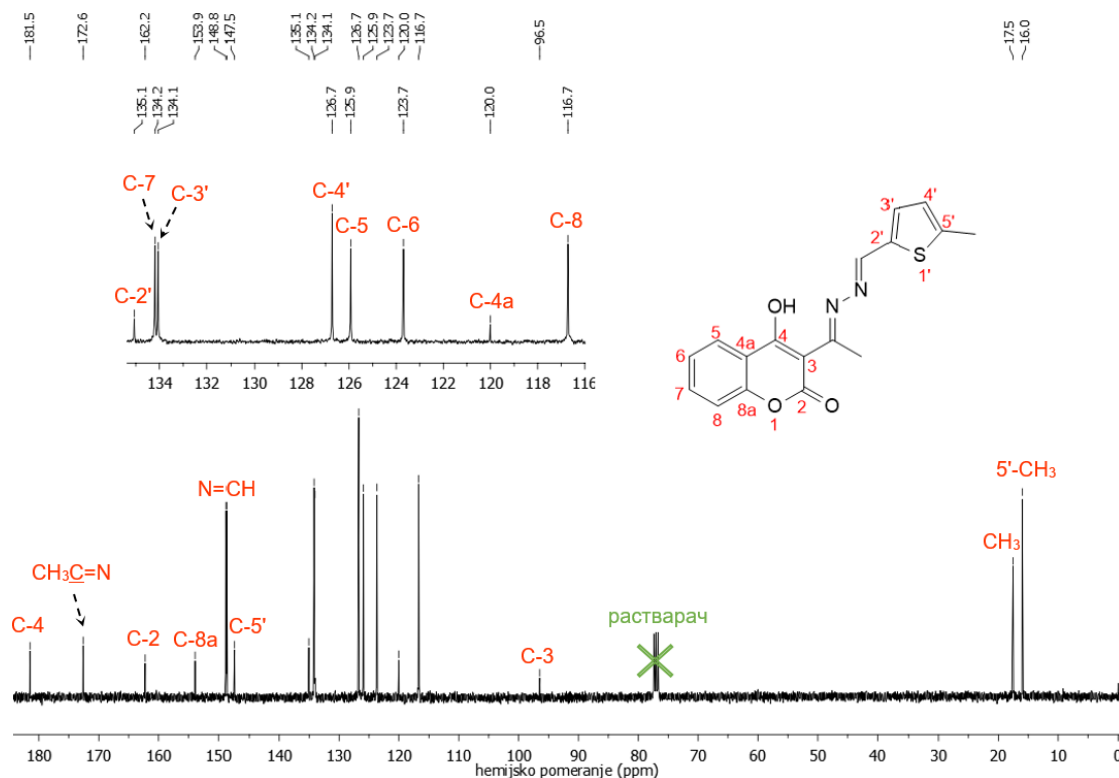
Прилог 72. NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(тиофен-2-ил-2-метилен)хидразина [210]



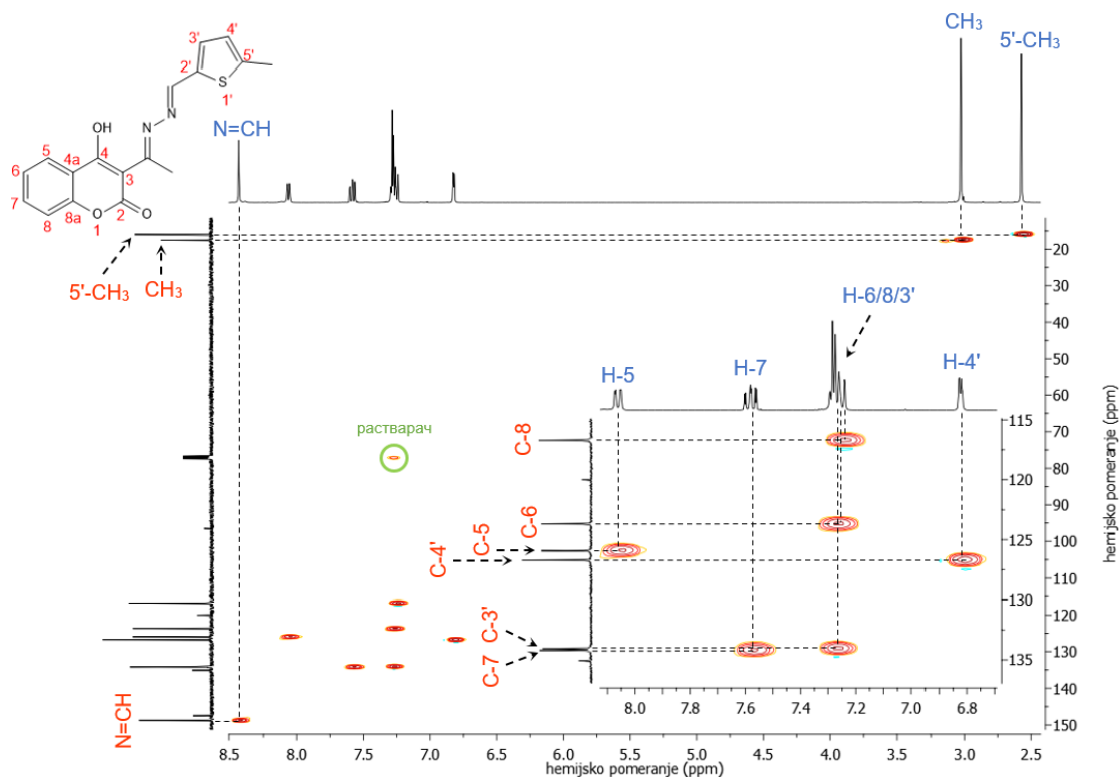
Прилог 73. IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромон-3-ил)этилиден]-2-(5-метилтиофен-2-ил-2-метил)гидразина [211]



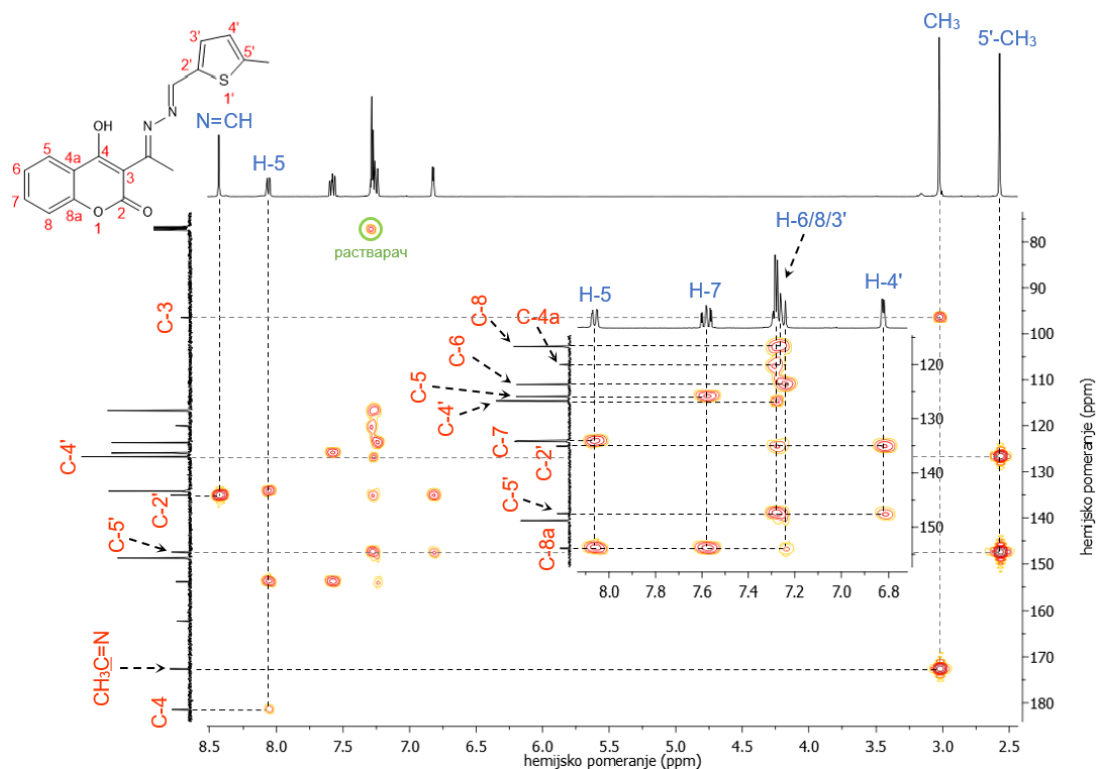
Прилог 74. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромон-3-ил)этилиден]-2-(5-метилтиофен-2-ил-2-метил)гидразина [211]



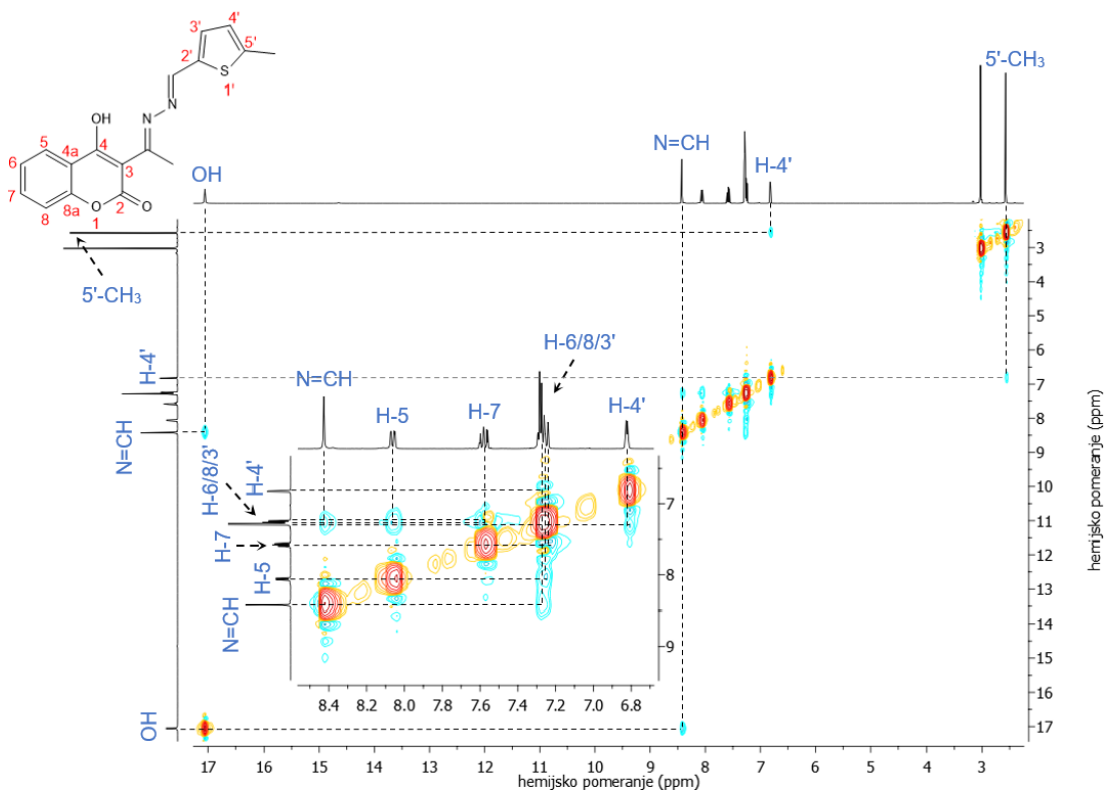
Прилог 75. ^{13}C -NMR (100,6 MHz, CDCl_3) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(5-метилтиофен-2-ил-2-метил)хидразина [211]



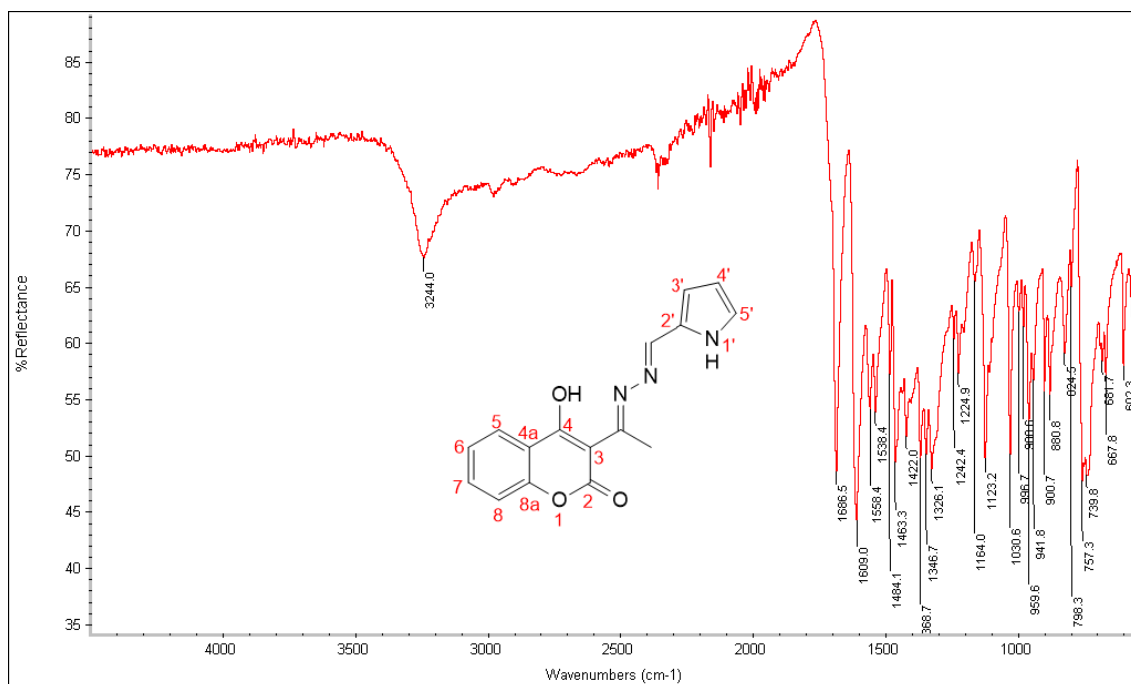
Прилог 76. HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(5-метилтиофен-2-ил-2-метил)хидразина [211]



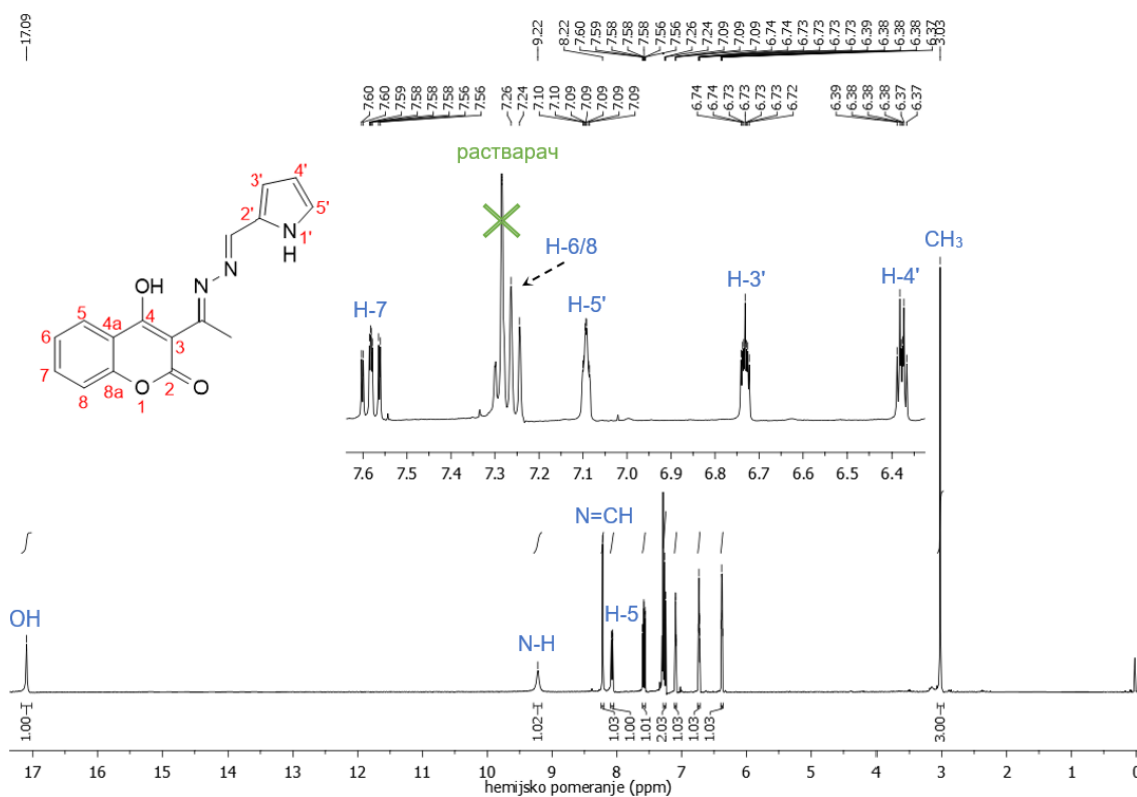
Прилог 77. HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(5-метилтиофен-2-ил-2-метилен)хидразина [211]



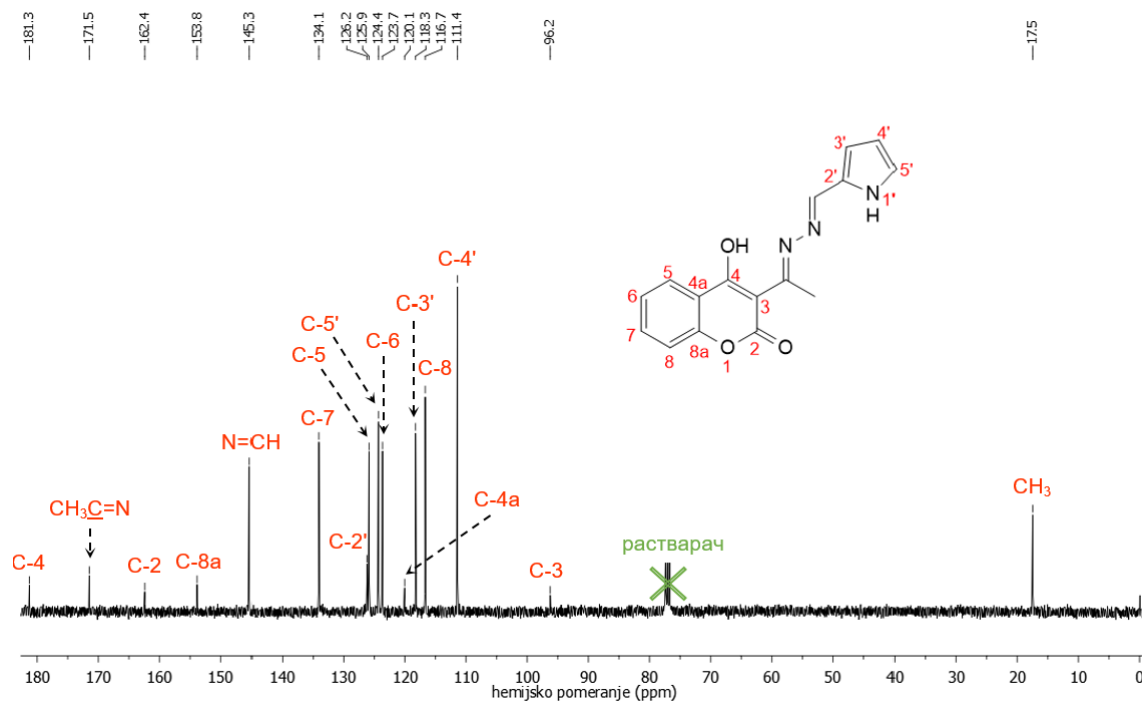
Прилог 78. NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(5-метилтиофен-2-ил-2-метилен)хидразина [211]



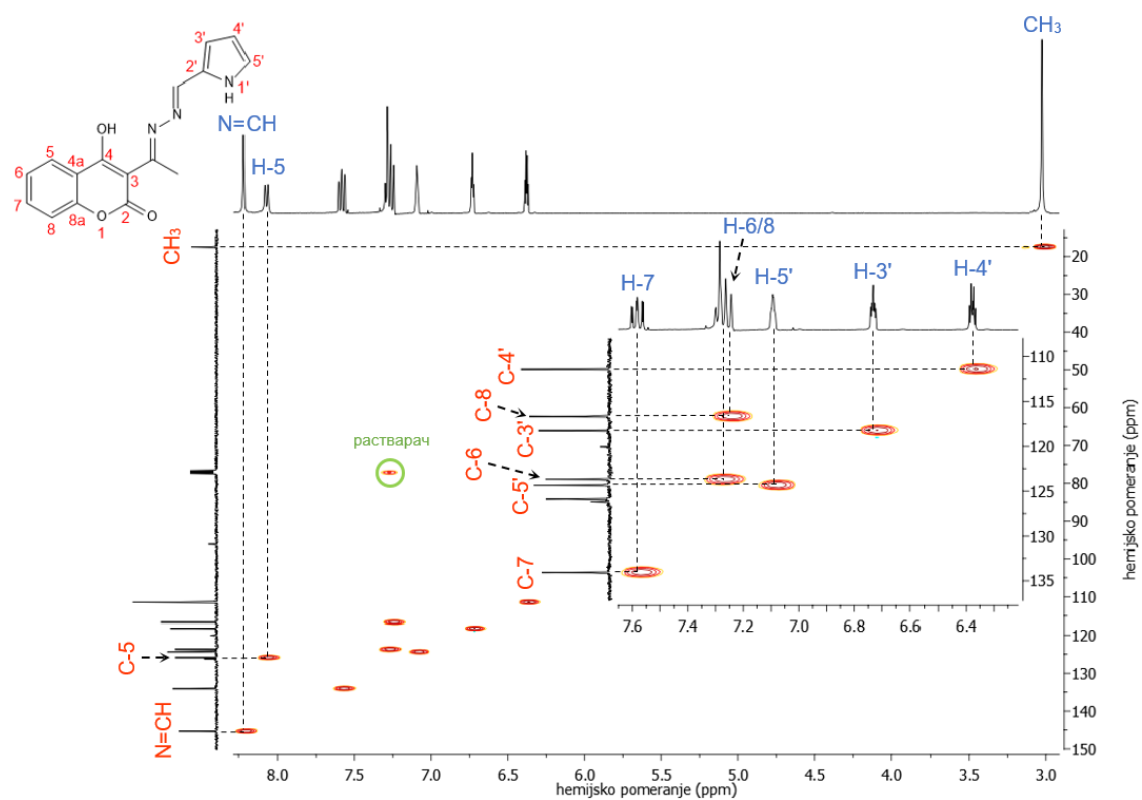
Прилог 79. IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромн-3-ил)етилиден]-2-(пирол-2-ил-2-метилен)хидразина [212]



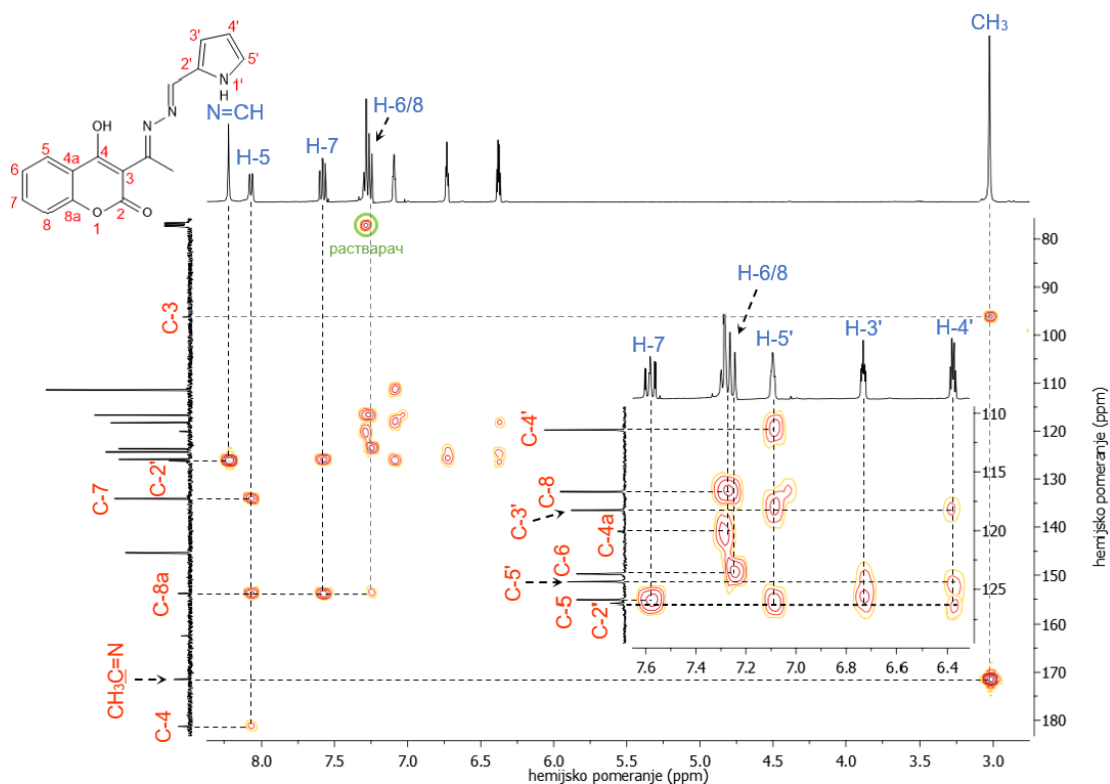
Прилог 80. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромн-3-ил)етилиден]-2-(пирол-2-ил-2-метилен)хидразина [212]



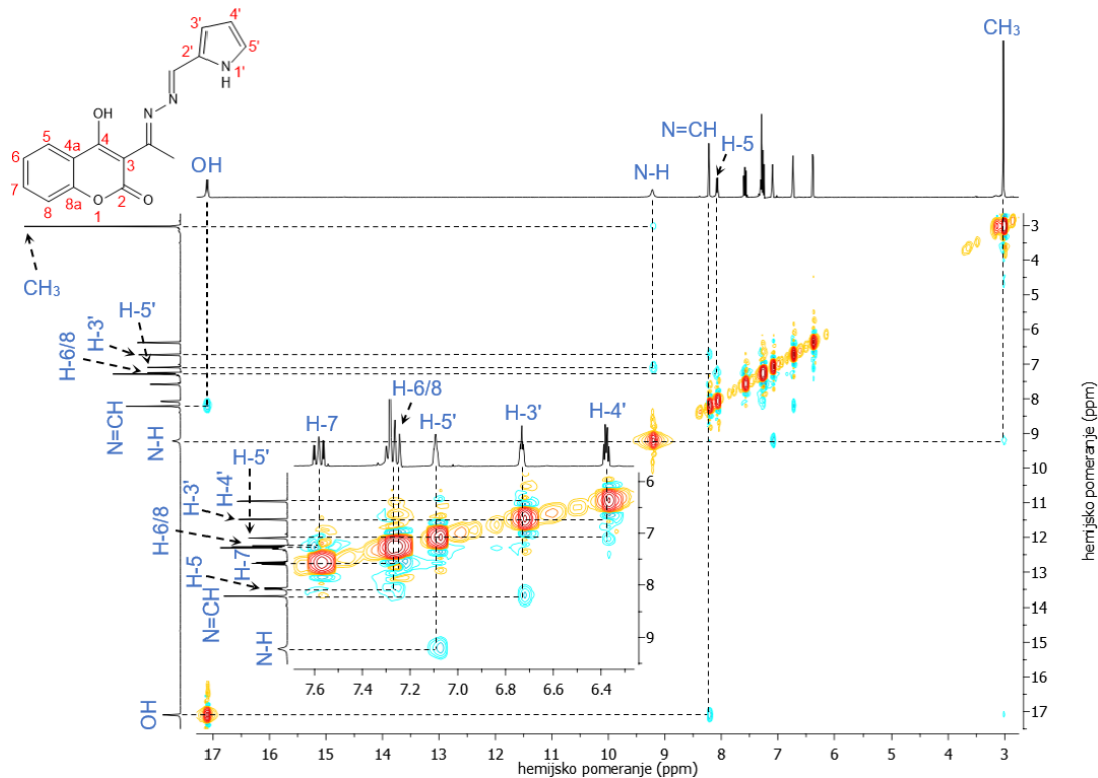
Прилог 81. ^{13}C -NMR (100,6 MHz, CDCl_3) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(пирол-2-ил-2-метилен)хидразина [212]



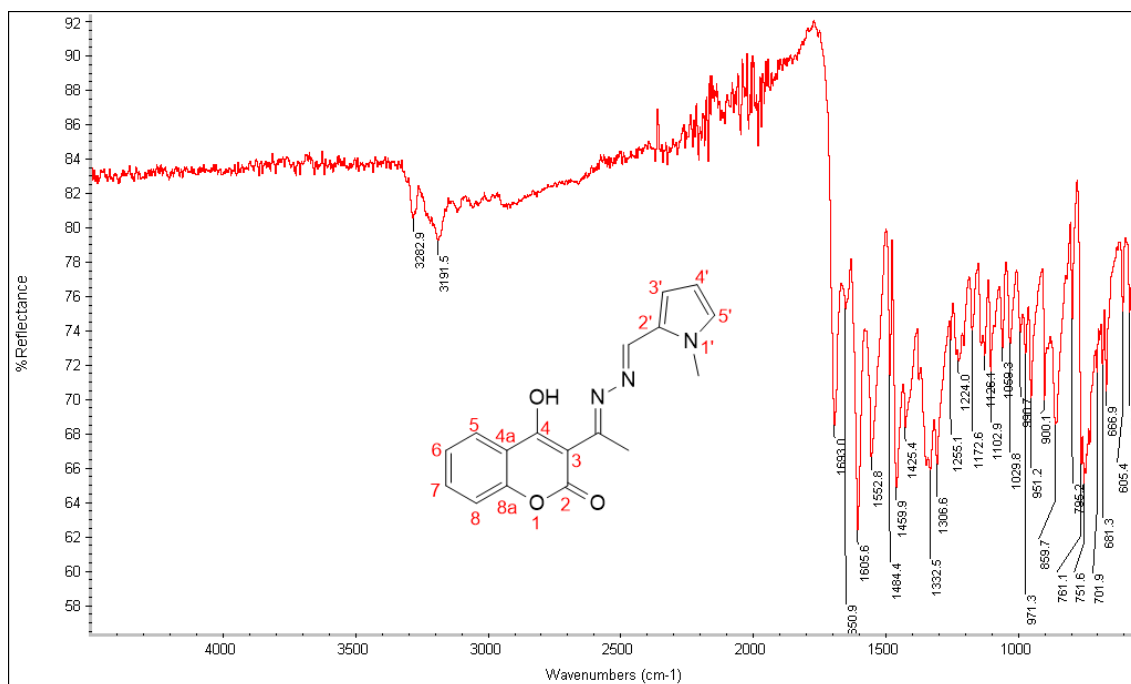
Прилог 82. HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(пирол-2-ил-2-метилен)хидразина [212]



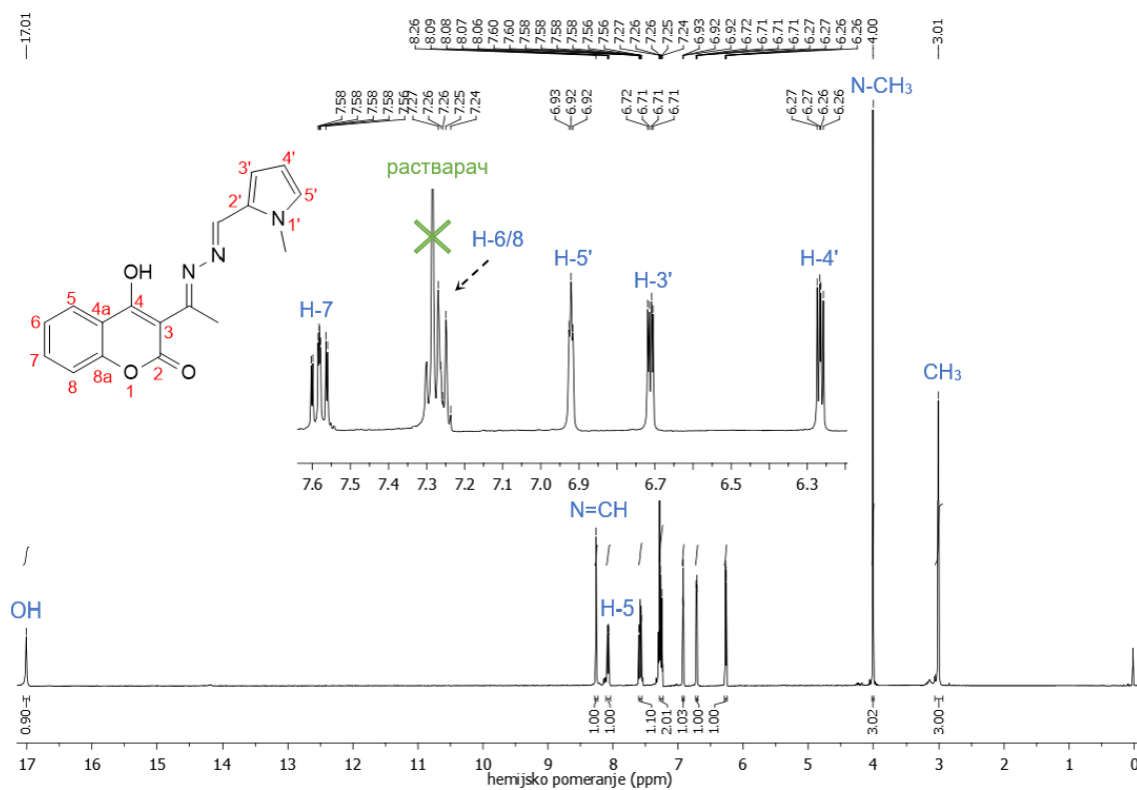
Прилог 83. HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромон-3-ил)этилиден]-2-(пирол-2-ил-2-метилен)хидразина [212]



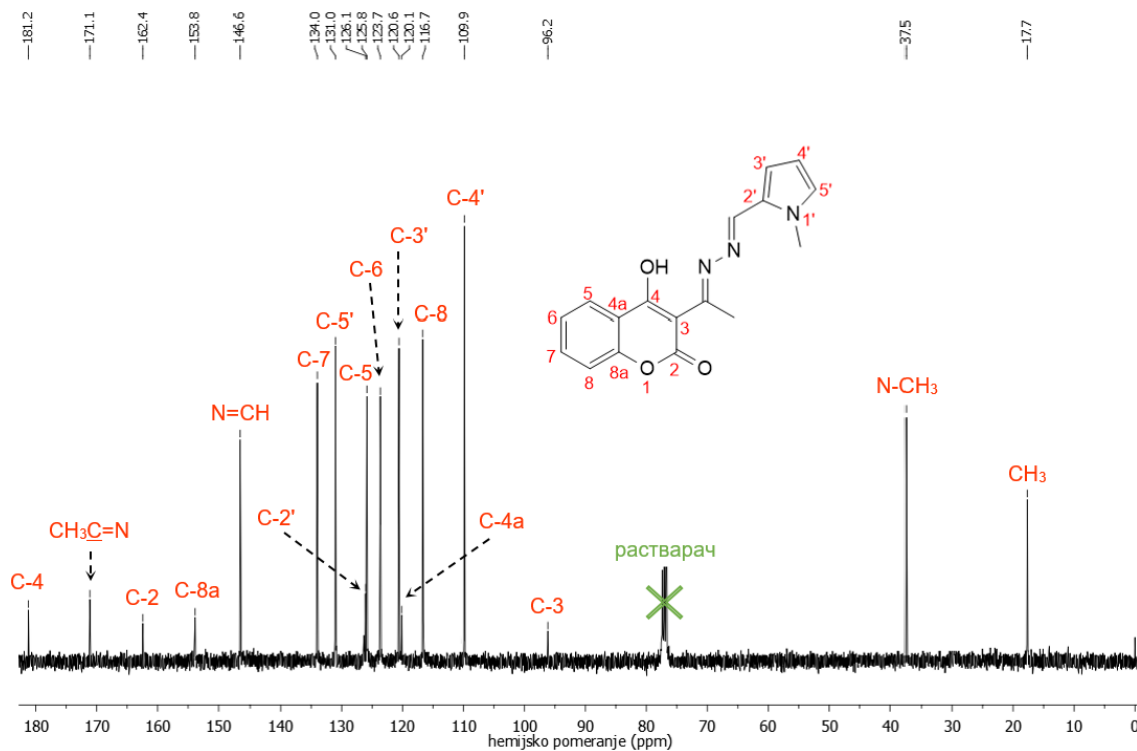
Прилог 84. NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромон-3-ил)этилиден]-2-(пирол-2-ил-2-метилен)хидразина [212]



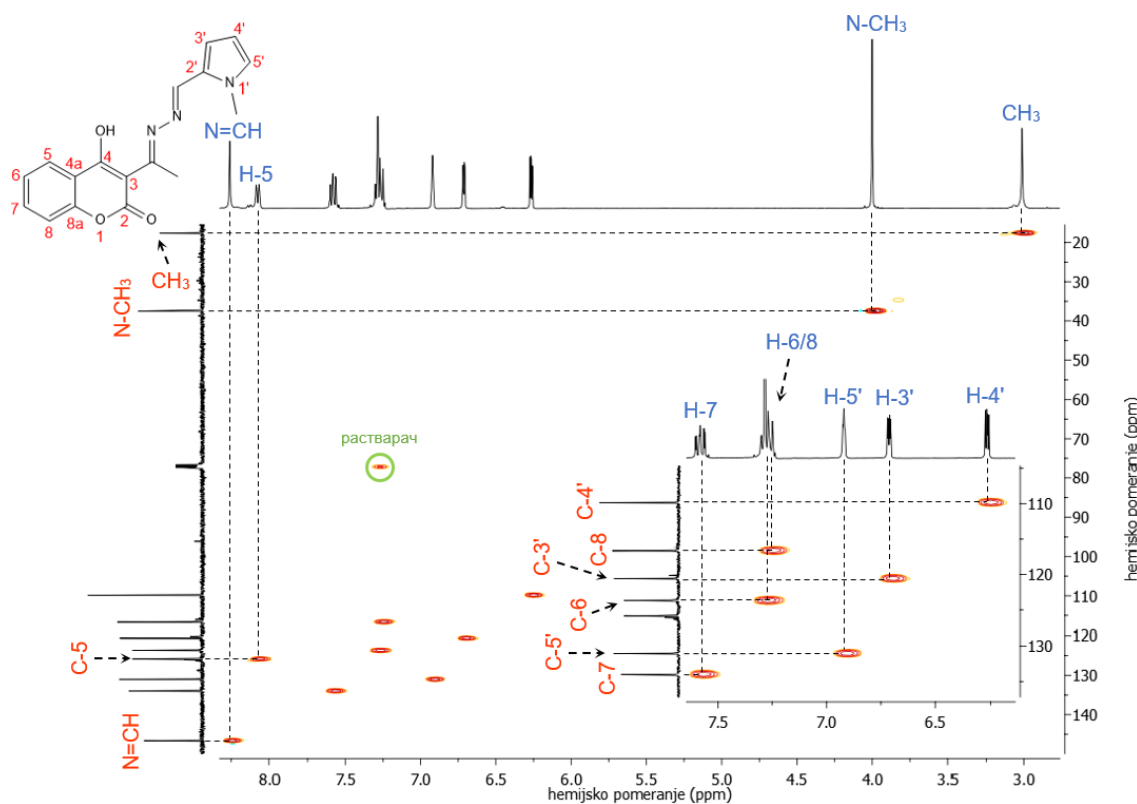
Прилог 85. IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромн-3-ил)етилиден]-2-(*N*-метилпирол-2-ил-2-метилен)хидразина [213]



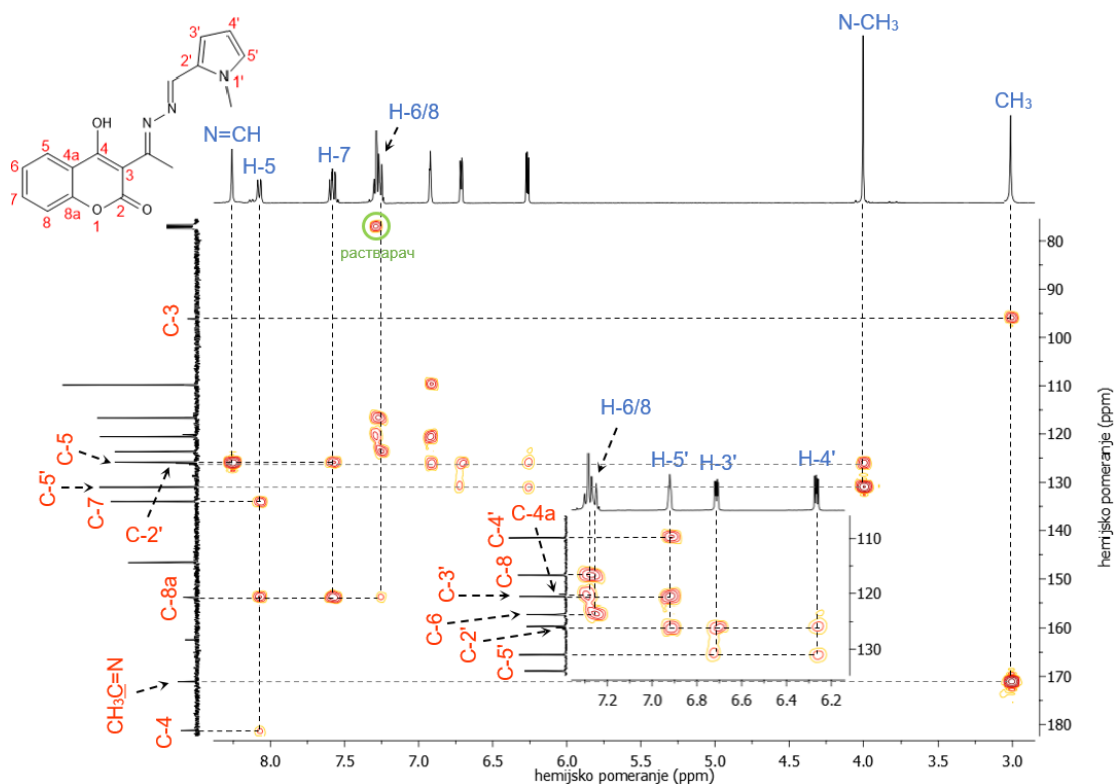
Прилог 86. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромн-3-ил)етилиден]-2-(*N*-метилпирол-2-ил-2-метилен)хидразина [213]



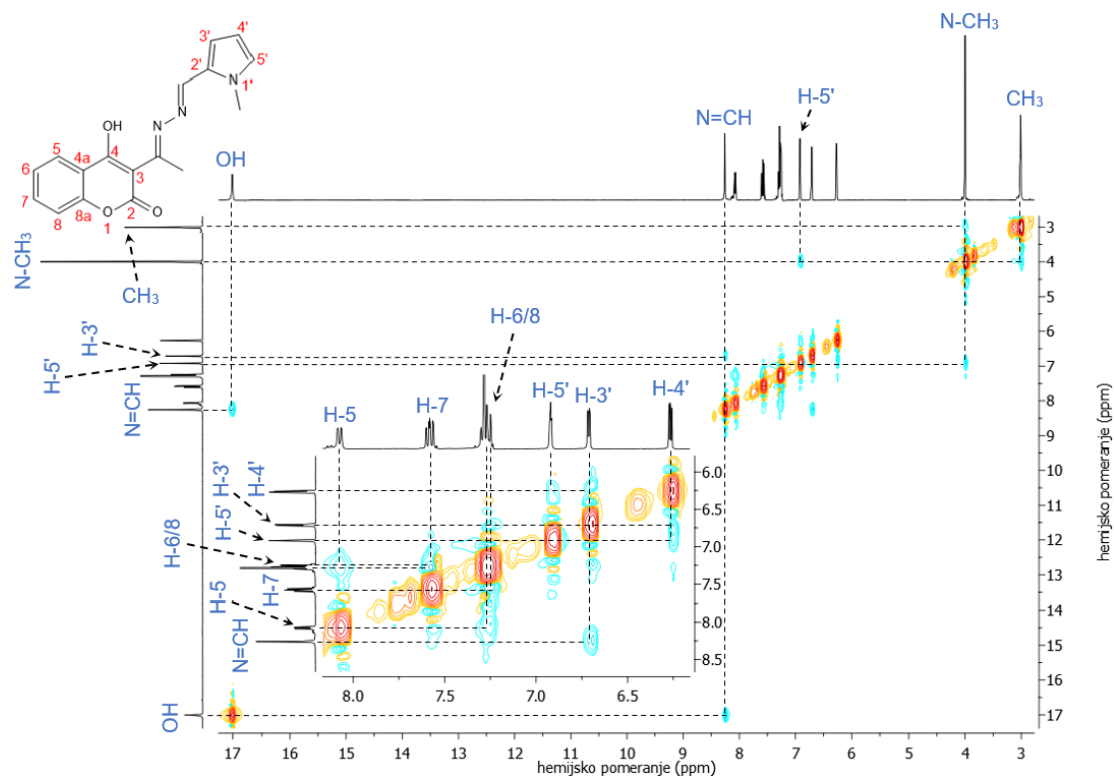
Прилог 87. ^{13}C -NMR (100,6 MHz, CDCl_3) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(*N*-метилпирол-2-ил-2-метилен)хидразина [213]



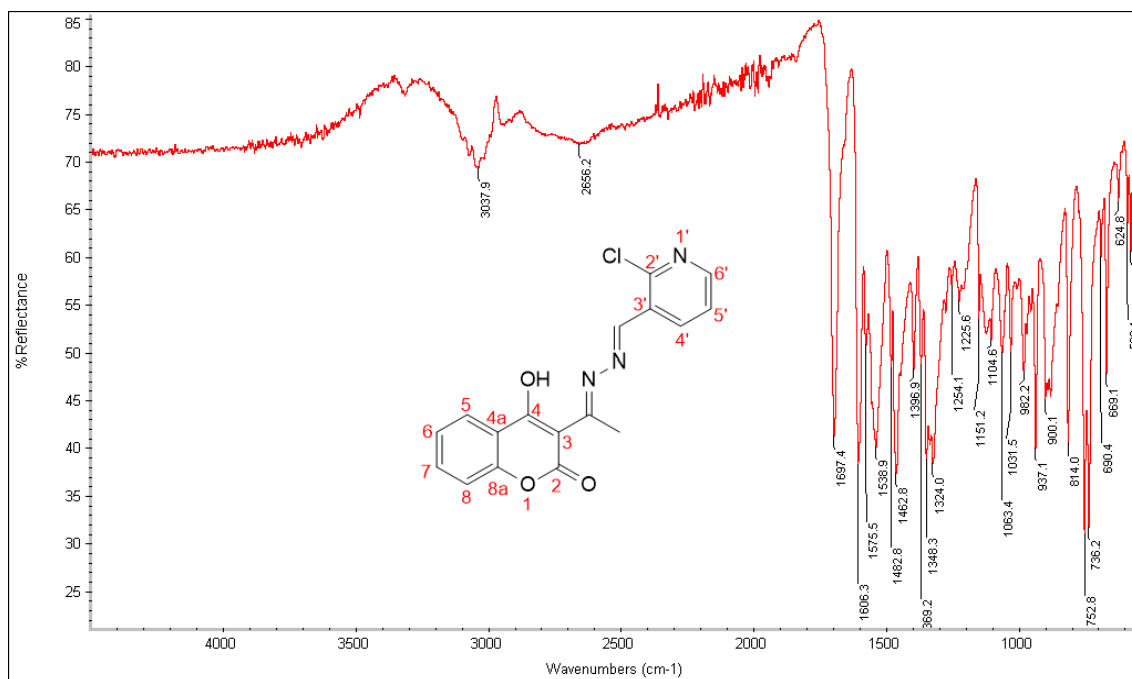
Прилог 88. HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(*N*-метилпирол-2-ил-2-метилен)хидразина [213]



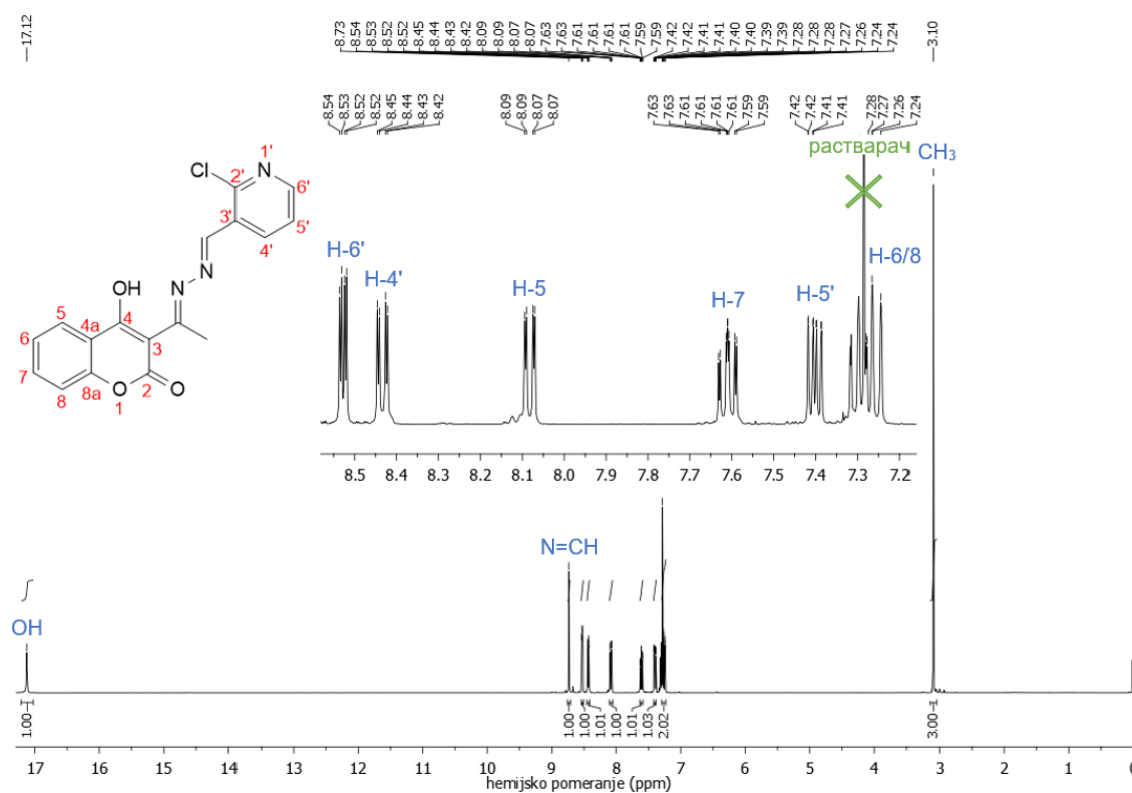
Прилог 89. HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(*N*-метилпирол-2-ил-2-метилен)хидразина [213]



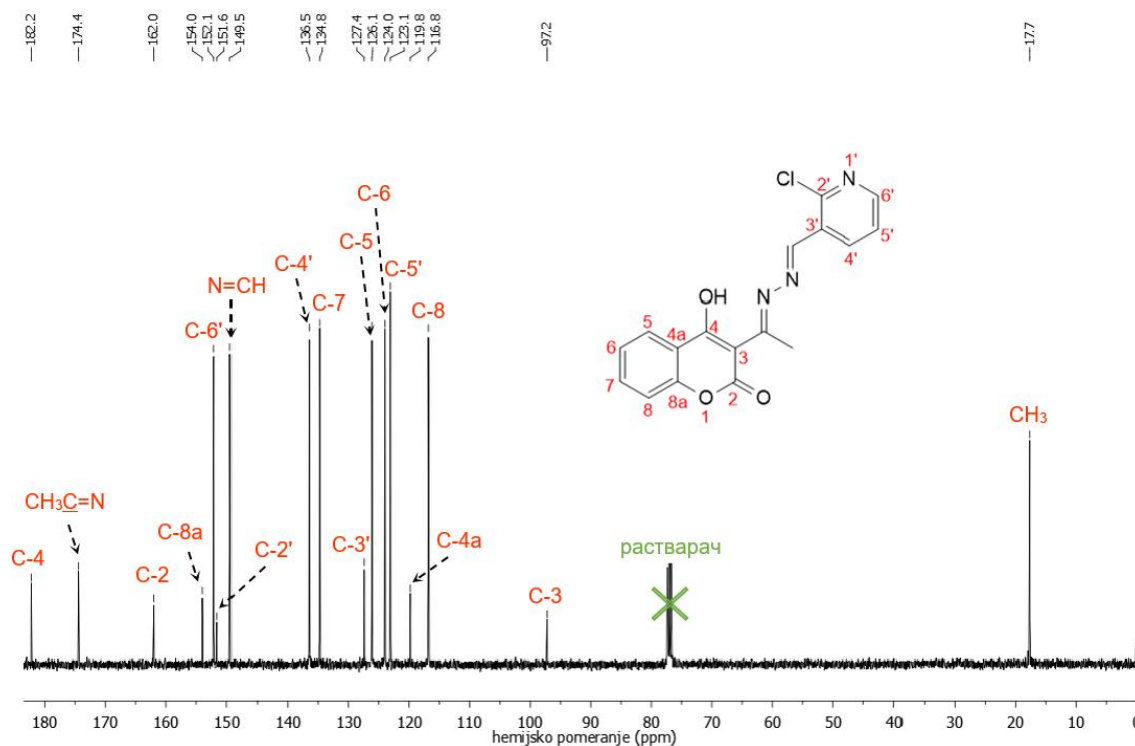
Прилог 90. NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(*N*-метилпирол-2-ил-2-метилен)хидразина [213]



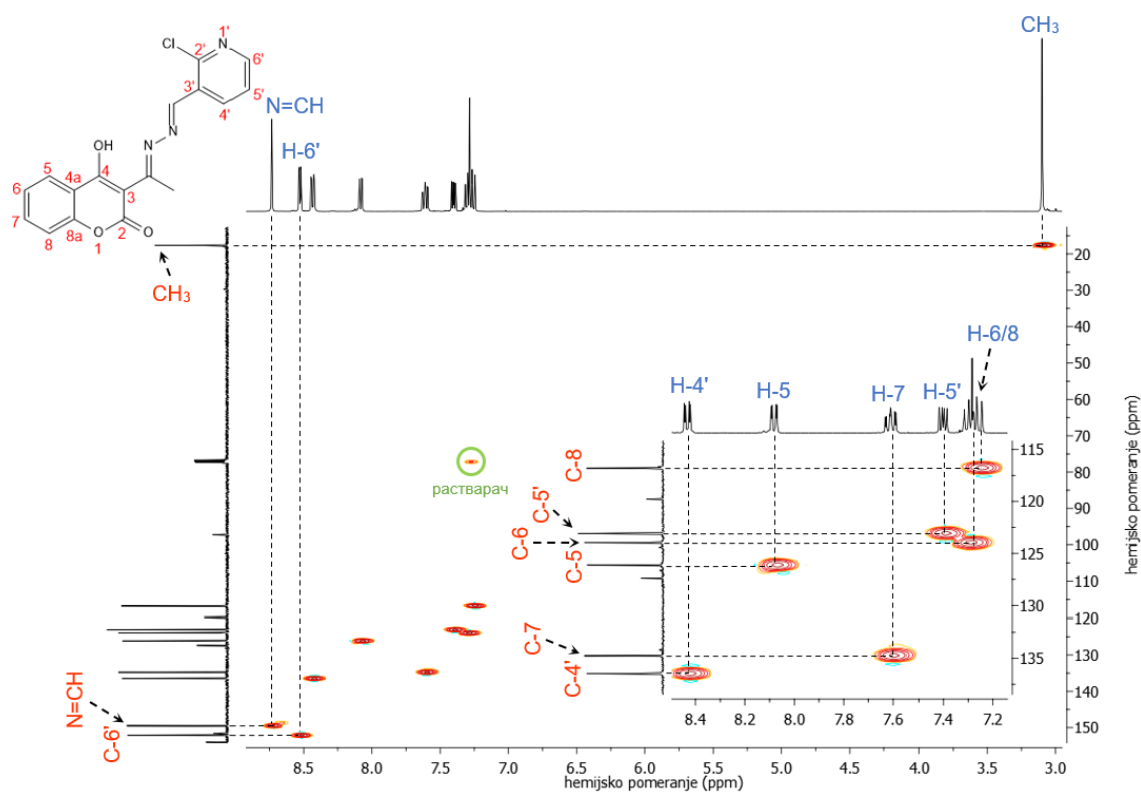
Прилог 91. IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(2-хлорпиридин-3-ил-3-метилен)хидразина [214]



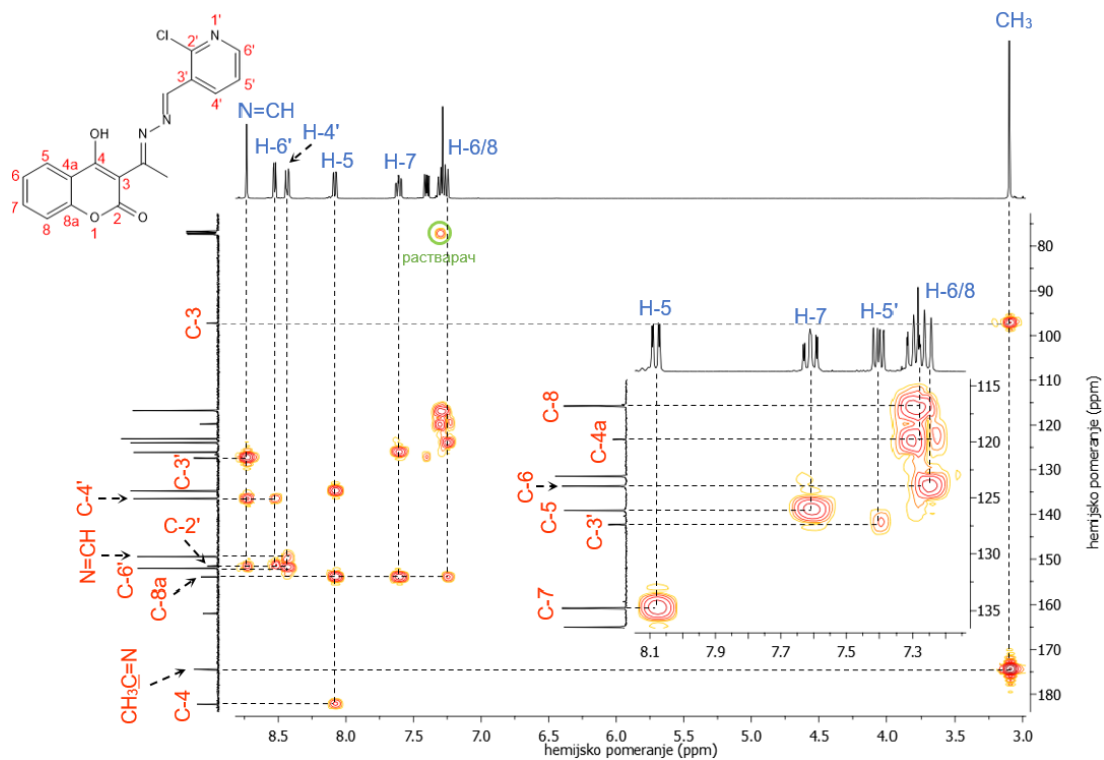
Прилог 92. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(2-хлорпиридин-3-ил-3-метилен)хидразина [214]



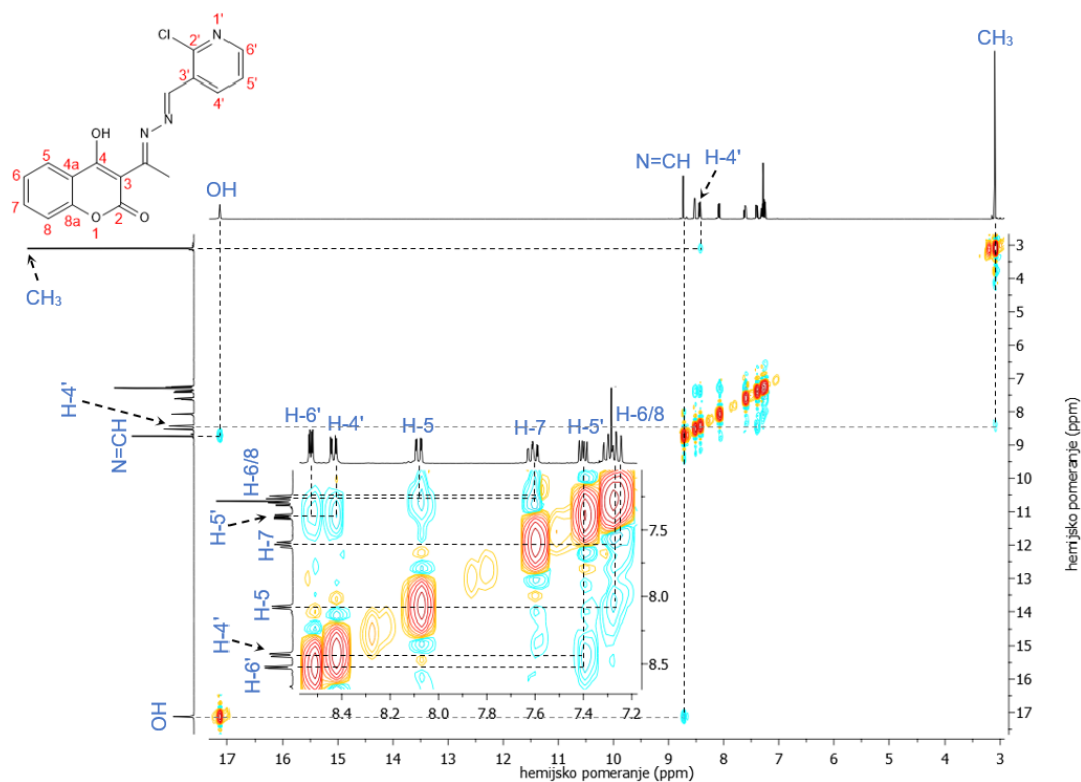
Прилог 93. ^{13}C -NMR (100,6 MHz, CDCl_3) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(2-хлорпиридин-3-ил-3-метил)хидразина [214]



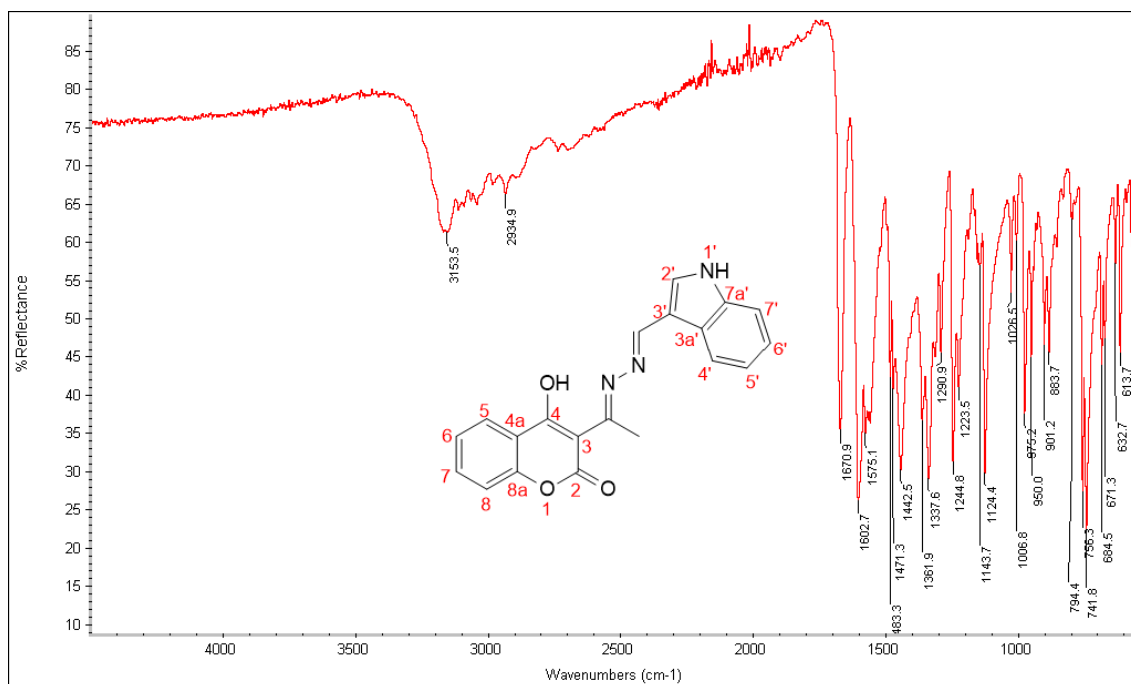
Прилог 94. HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(2-хлорпиридин-3-ил-3-метил)хидразина [214]



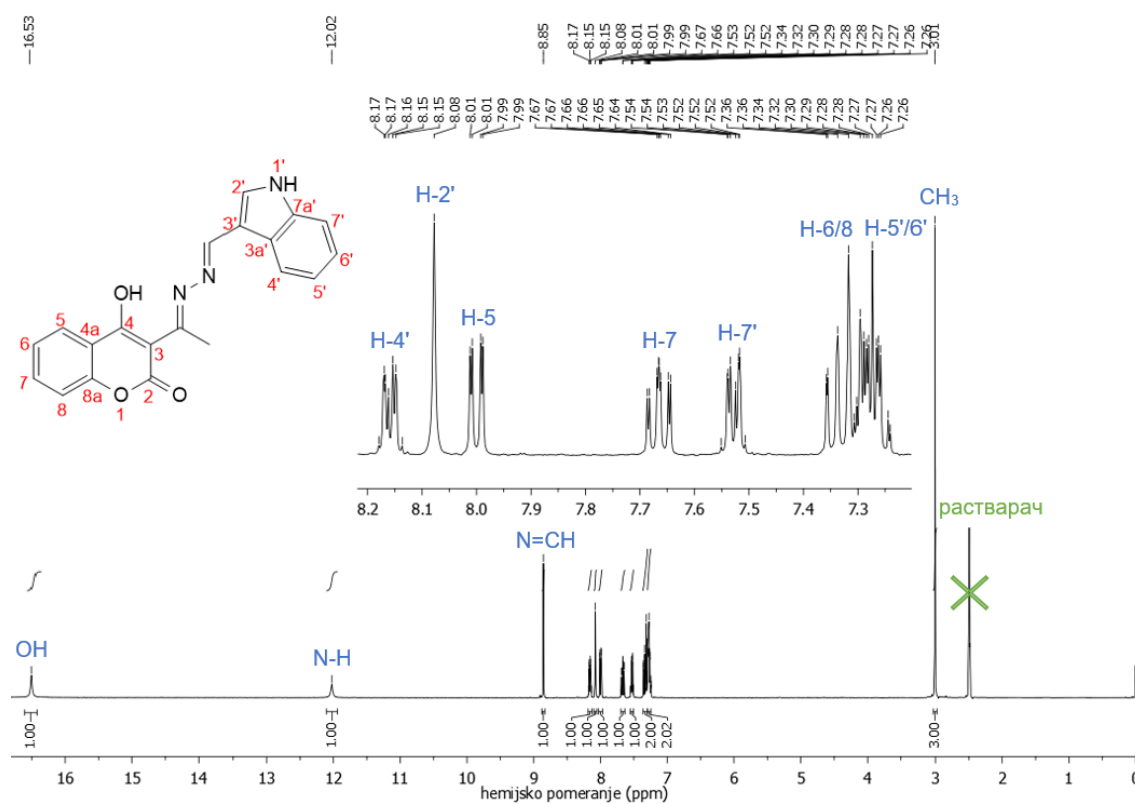
Прилог 95. HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(2-хлорпиридин-3-ил-3-метил)хидразина [214]



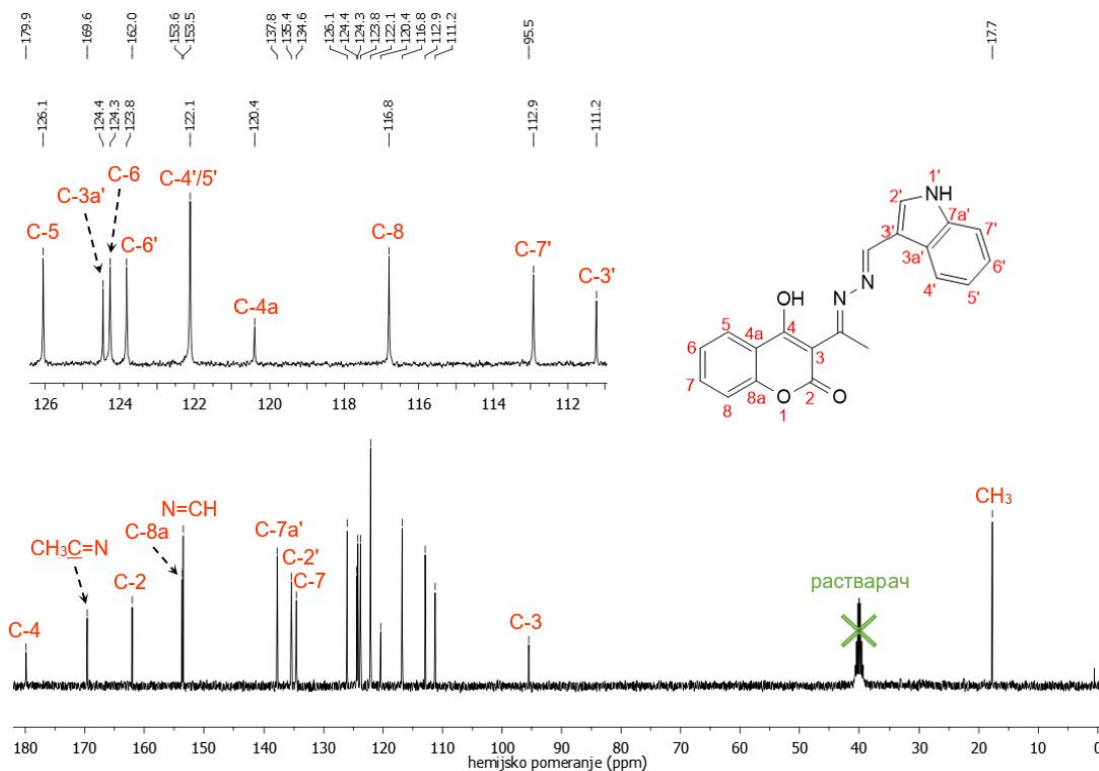
Прилог 96. NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(2-хлорпиридин-3-ил-3-метил)хидразина [214]



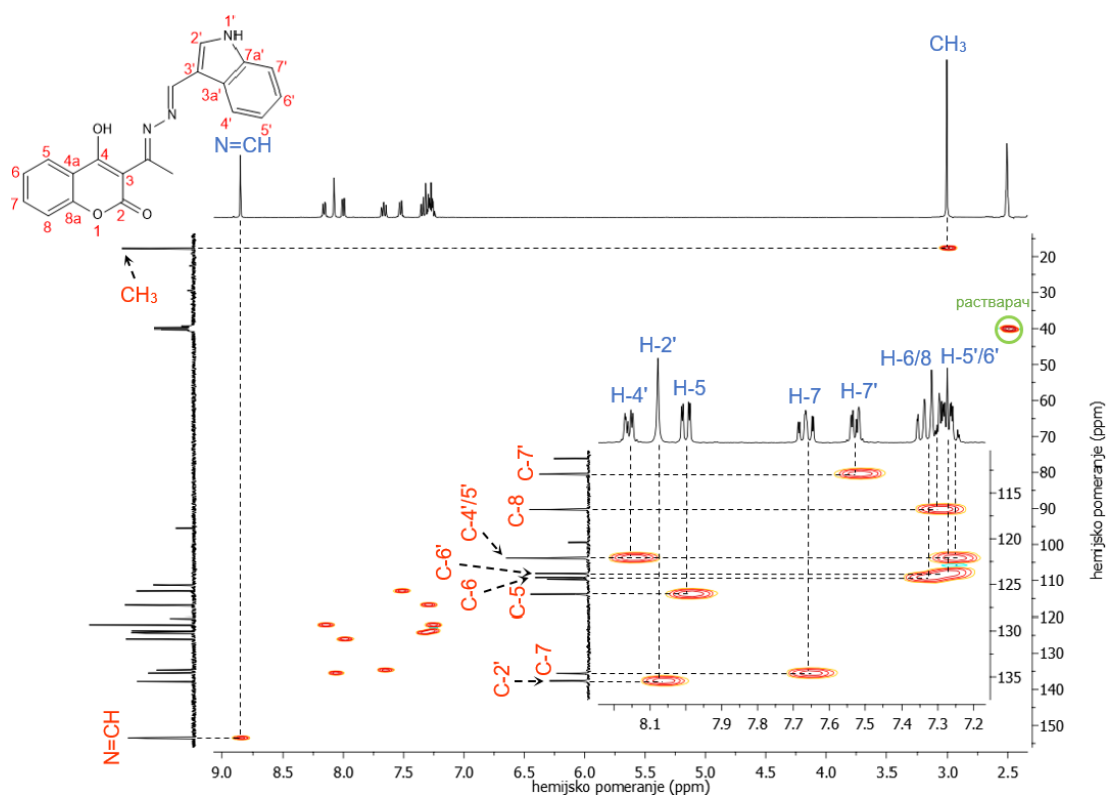
Прилог 97. IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромн-3-ил)етилиден]-2-(индол-3-ил-3-метилен)хидразина [215]



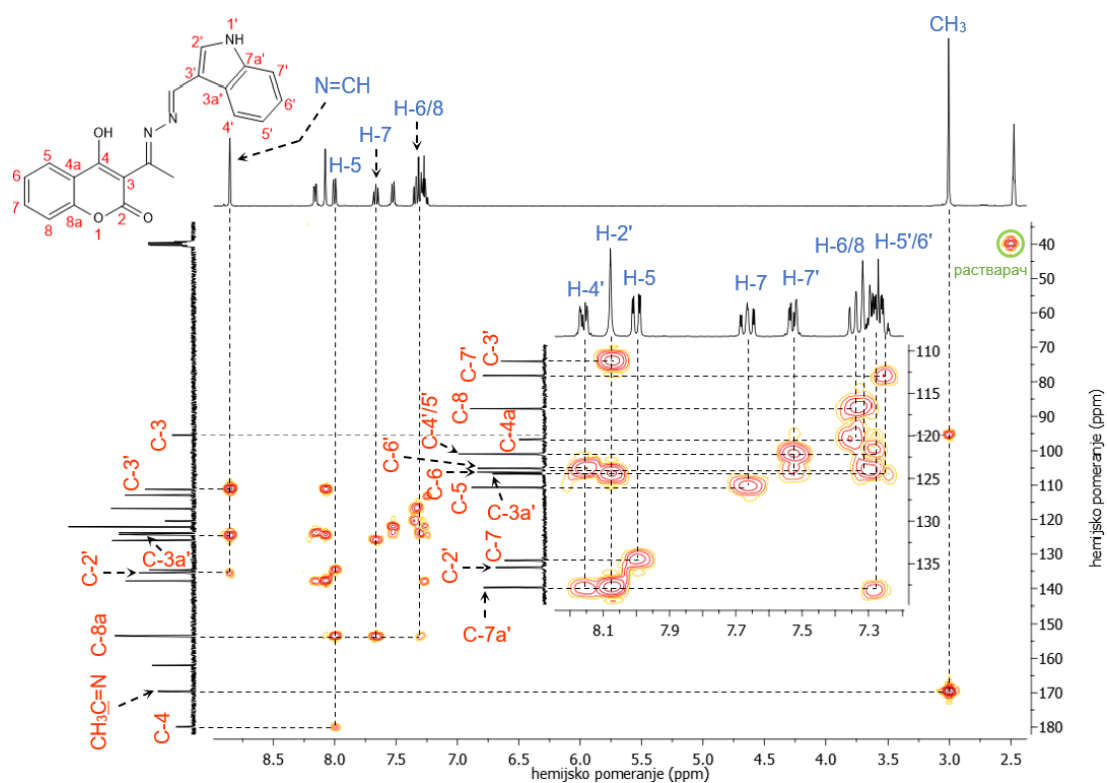
Прилог 98. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромн-3-ил)етилиден]-2-(индол-3-ил-3-метилен)хидразина [215]



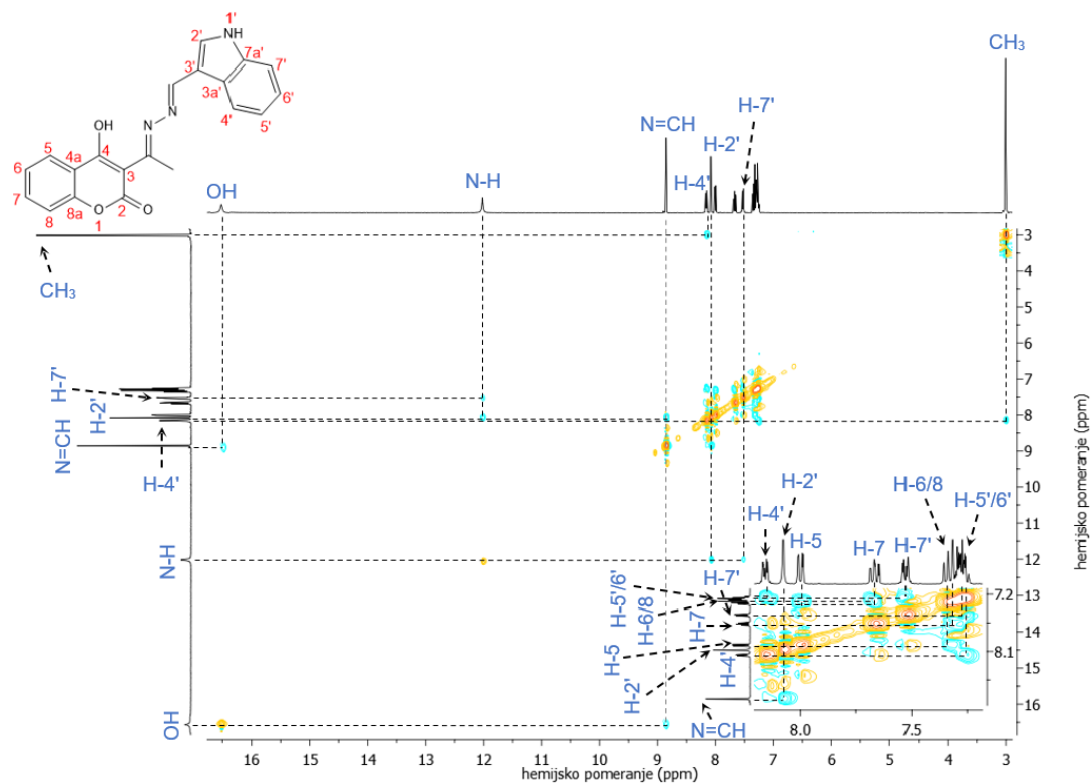
Прилог 99. ^{13}C -NMR (100,6 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(индол-3-ил-3-метилен)хидразина [215]



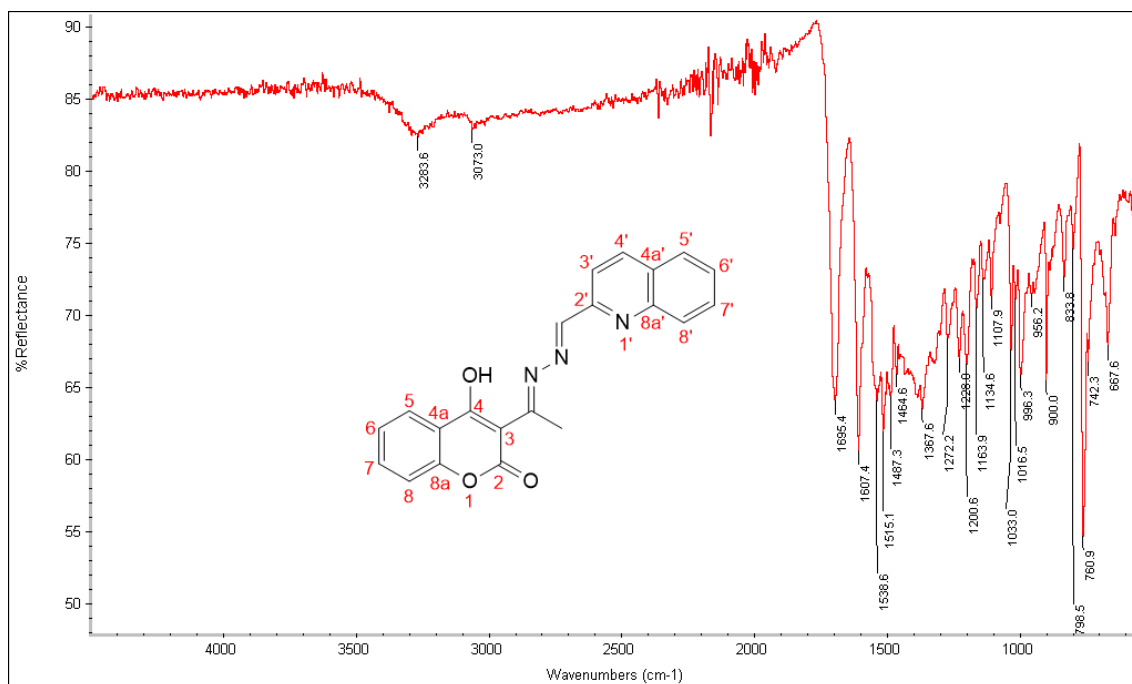
Прилог 100. HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]-2-(индол-3-ил-3-метилен)хидразина [215]



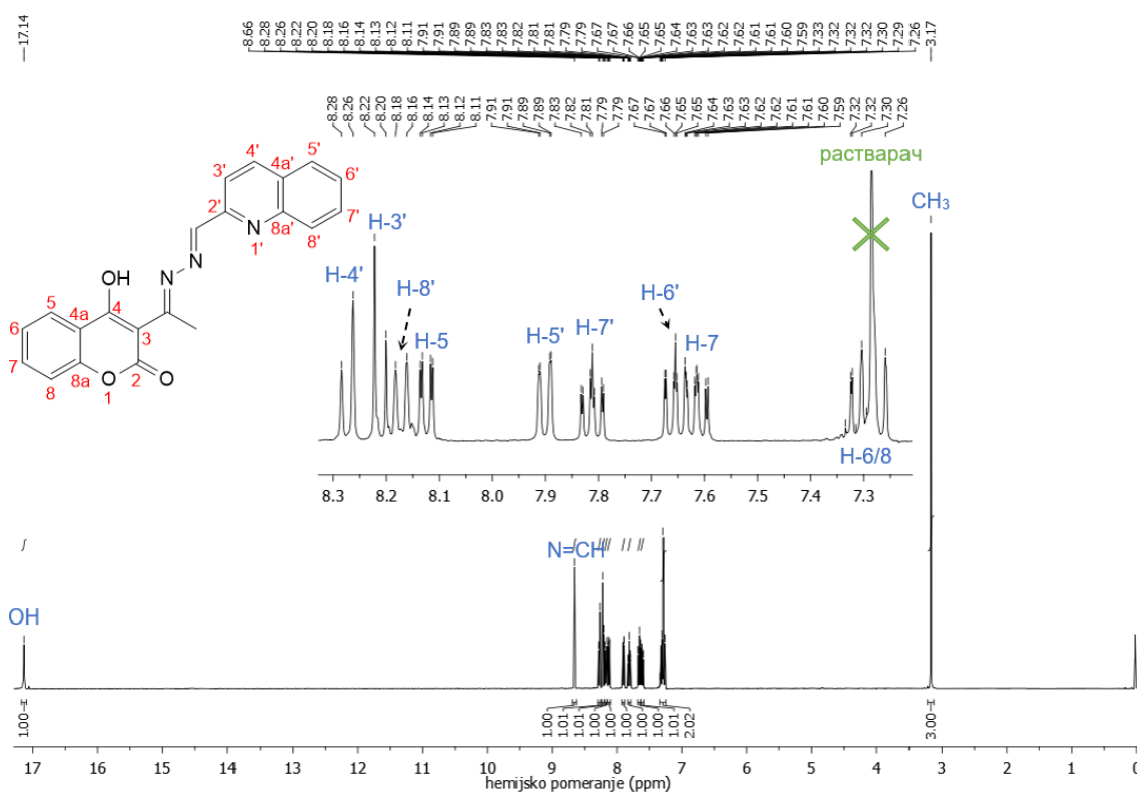
Прилог 101. HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(индол-3-ил-3-метилен)хидразина [215]



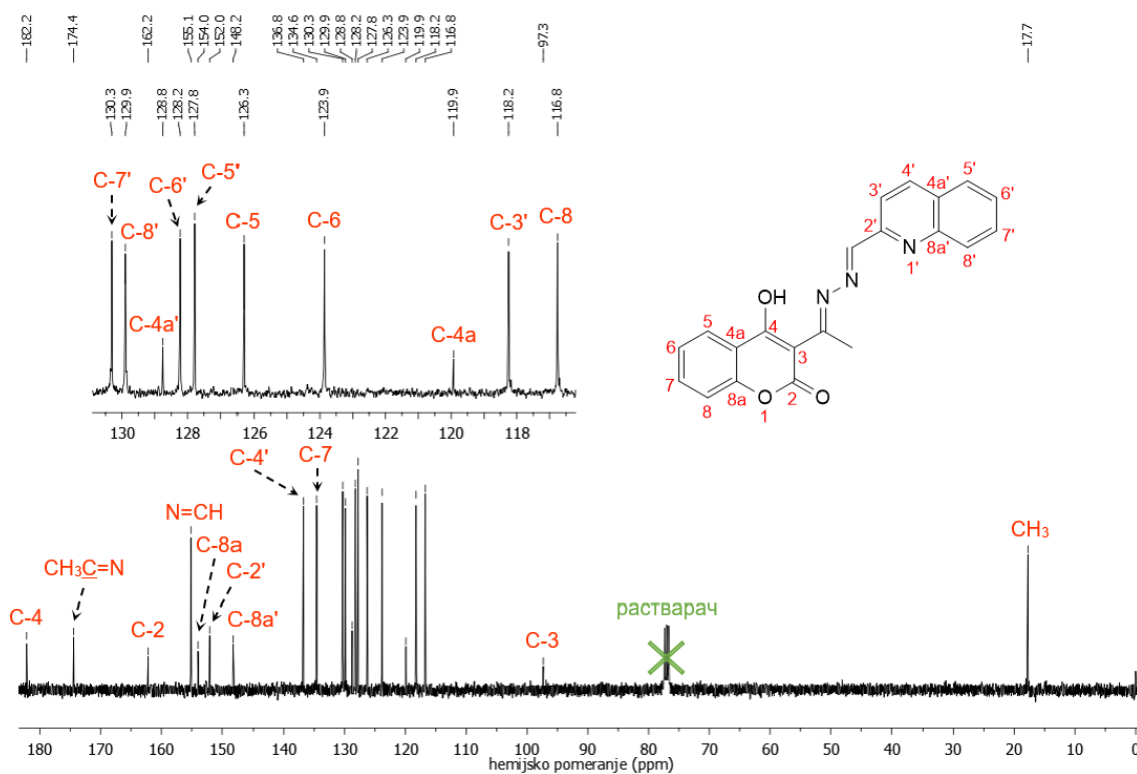
Прилог 102. NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(индол-3-ил-3-метилен)хидразина [215]



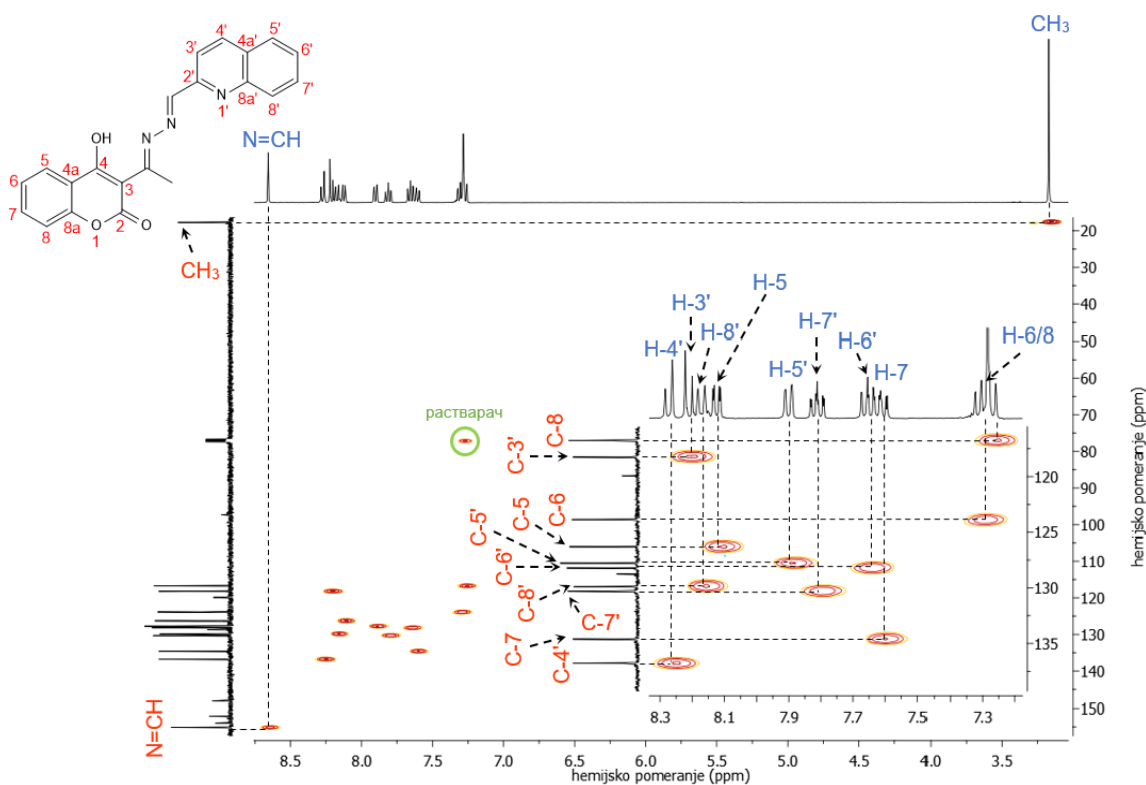
Прилог 103. IR спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромон-3-ил)етилиден]-2-(хинолин-2-ил-2-метил)хидразина [216]



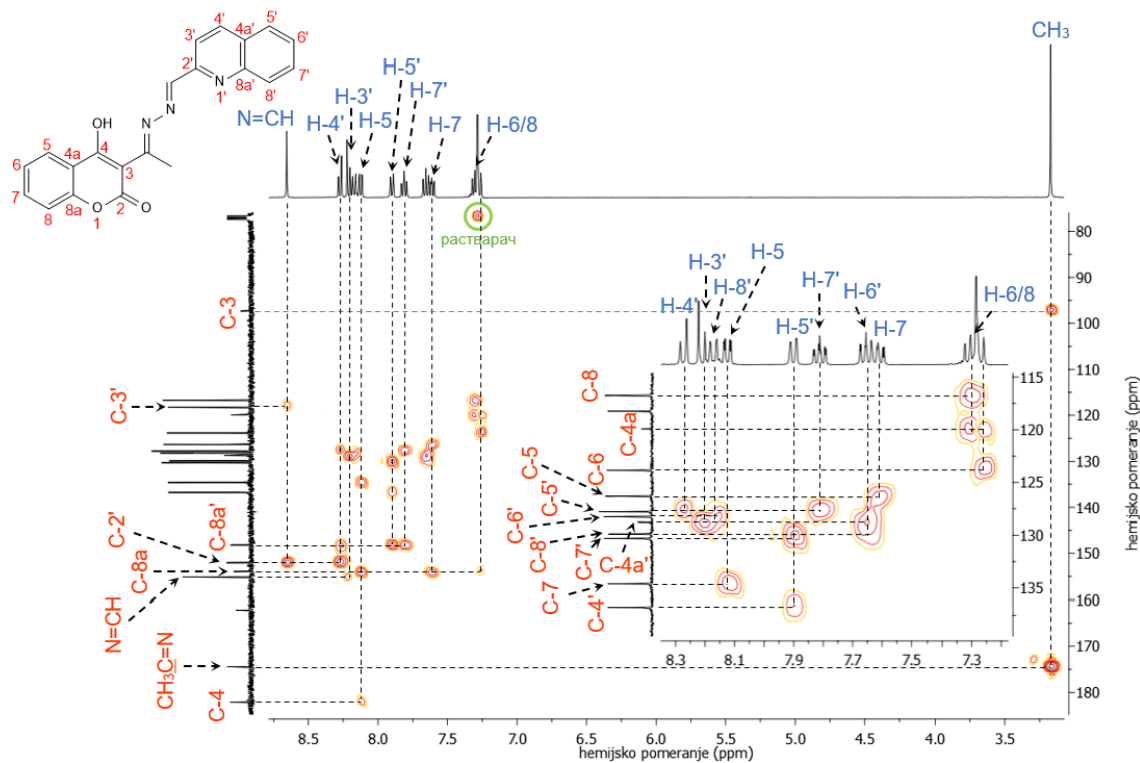
Прилог 104. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромон-3-ил)етилиден]-2-(хинолин-2-ил-2-метил)хидразина [216]



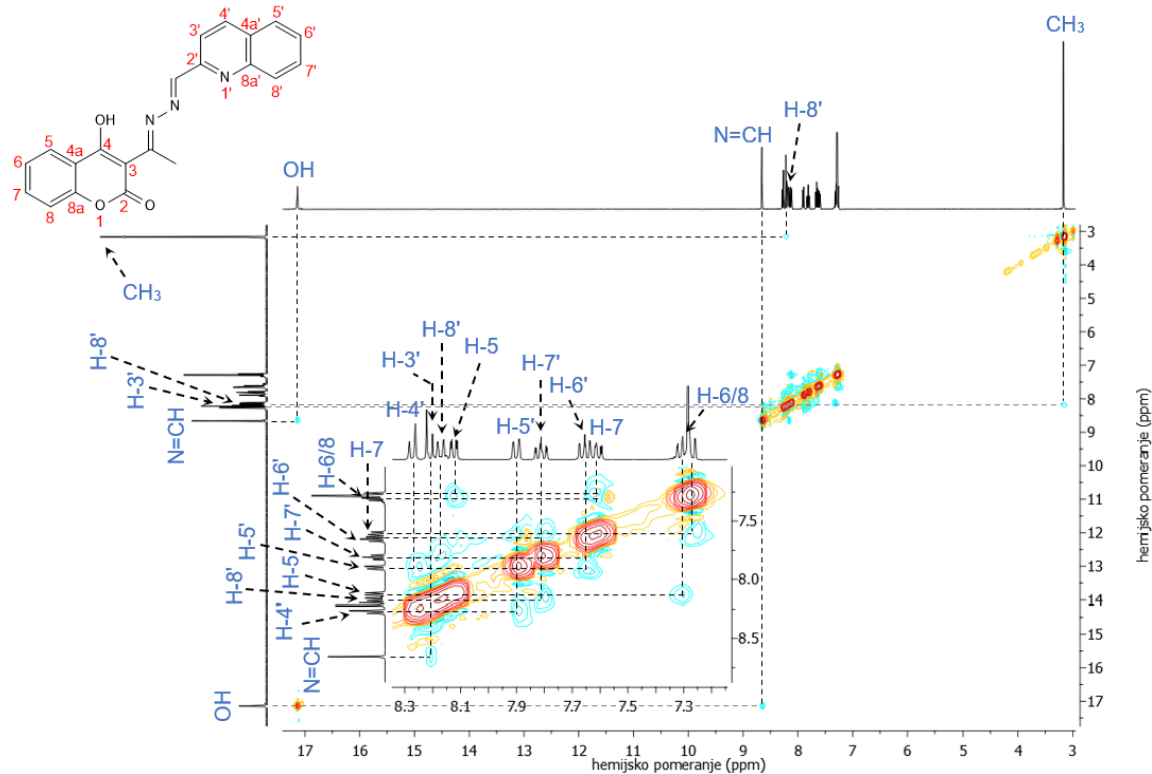
Прилог 105. ¹³C-NMR (100,6 MHz, CDCl₃) спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(хинолин-2-ил-2-метилен)хидразина [216]



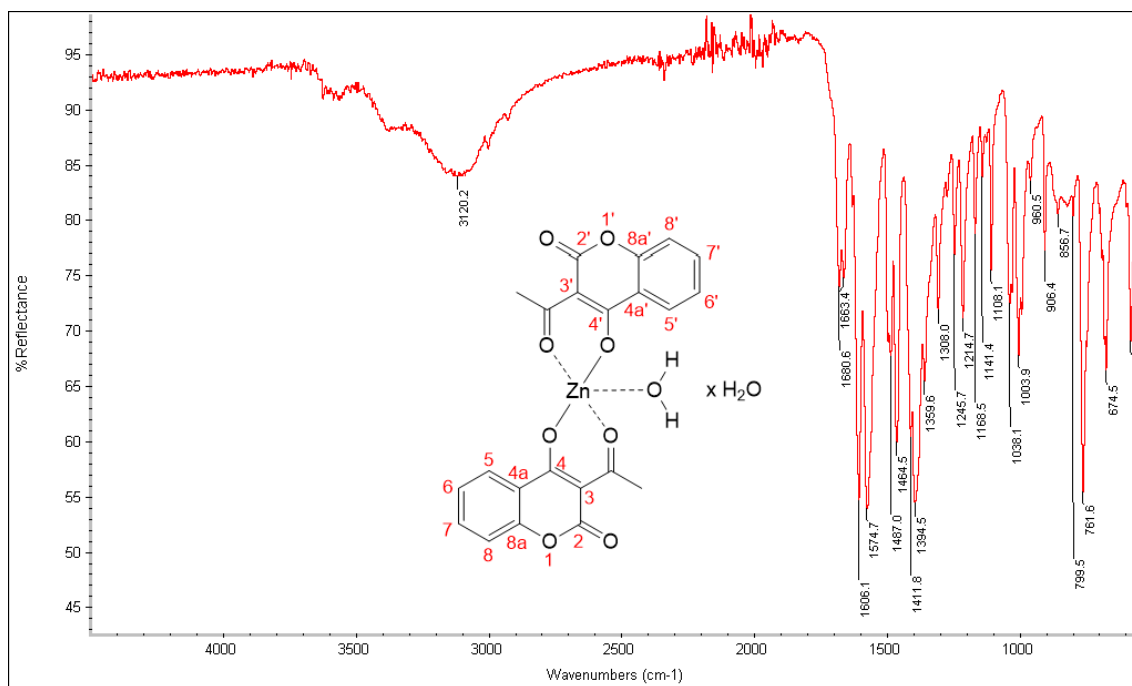
Прилог 106. HSQC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(хинолин-2-ил-2-метилен)хидразина [216]



Прилог 107. HMBC спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(хинолин-2-ил-2-метилен)хидразина [216]



Прилог 108. NOESY спектар 1-[1-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)етилиден]-2-(хинолин-2-ил-2-метилен)хидразина [216]



Прилог 109. IR спектар аква-bis(3-ацетил-4-хидрокси-2H-хромен-4-олато-к²O,O')цинк(II)-монохидрата [217]

Прилог 110. Атомске координате и изотропни параметри померања (\AA^2) за једињење [217]

	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	$U_{\text{iso}}^*/U_{\text{eq}}$
Zn1	0.64578 (2)	0.45085 (2)	0.31876 (2)	0.03222 (7)
O5	0.88543 (16)	0.41142 (14)	0.24433 (9)	0.0412 (3)
H51	0.885 (3)	0.484 (2)	0.2075 (14)	0.062*
H52	0.963 (3)	0.394 (2)	0.2786 (14)	0.062*
O6	0.8258 (2)	0.6787 (2)	0.13113 (11)	0.0631 (4)
H61	0.721 (2)	0.697 (3)	0.1523 (18)	0.095*
H62	0.828 (4)	0.679 (3)	0.0752 (12)	0.095*
C1A	0.84626 (19)	0.53114 (16)	0.60594 (11)	0.0284 (3)
O1A	0.63360 (15)	0.63037 (12)	0.38425 (8)	0.0383 (3)
C2A	0.76168 (18)	0.51316 (15)	0.52628 (10)	0.0268 (3)
O2A	0.69653 (15)	0.33663 (11)	0.44329 (7)	0.0351 (2)
C3A	0.75927 (18)	0.36873 (16)	0.51207 (10)	0.0261 (3)
O3A	0.91778 (15)	0.41036 (11)	0.66749 (8)	0.0355 (2)
C4A	0.83525 (19)	0.24585 (16)	0.58178 (10)	0.0277 (3)
O4A	0.86649 (15)	0.64478 (12)	0.62606 (8)	0.0379 (3)
C5A	0.8381 (2)	0.10082 (17)	0.57375 (11)	0.0353 (3)
H5A	0.783221	0.081383	0.525214	0.042*
C6A	0.9214 (3)	-0.01307 (18)	0.63698 (13)	0.0438 (4)
H6A	0.922986	-0.109284	0.631047	0.0438 (4)
C7A	1.0034 (3)	0.01503 (19)	0.70989 (13)	0.0487 (4)
H7A	1.061444	-0.062836	0.751797	0.0487 (4)
C8A	0.9993 (3)	0.15703 (19)	0.72055 (12)	0.0440 (4)
H8A	1.051910	0.176358	0.770056	0.053*
C9A	0.9152 (2)	0.27041 (16)	0.65606 (11)	0.0301 (3)
C10A	0.68387 (19)	0.64137 (16)	0.46167 (11)	0.0290 (3)
C11A	0.6554 (2)	0.79602 (17)	0.48405 (12)	0.0396 (4)
H11A	0.767134	0.816615	0.481088	0.059*
H11B	0.596719	0.806339	0.546828	0.059*
H11C	0.584082	0.864031	0.438566	0.059*
C1B	0.2877 (2)	0.40832 (18)	0.07839 (11)	0.0363 (3)
O1B	0.54969 (16)	0.29418 (12)	0.28331 (8)	0.0408 (3)
C2B	0.38591 (19)	0.42133 (16)	0.15440 (10)	0.0294 (3)
O2B	0.49580 (17)	0.58689 (12)	0.22434 (9)	0.0436 (3)
C3B	0.4114 (2)	0.56015 (17)	0.16212 (11)	0.0307 (3)
O3B	0.22826 (17)	0.52896 (13)	0.01383 (8)	0.0436 (3)
C4B	0.3360 (2)	0.68528 (17)	0.09369 (11)	0.0316 (3)
O4B	0.2517 (2)	0.29949 (14)	0.06270 (10)	0.0570 (4)
C5B	0.3493 (2)	0.82744 (18)	0.09750 (13)	0.0420 (4)
H5B	0.405406	0.844835	0.146260	0.050*
C6B	0.2813 (3)	0.94102 (19)	0.03072 (14)	0.0480 (4)
H6B	0.291807	1.034792	0.033830	0.058*
C7B	0.1960 (3)	0.9157 (2)	-0.04217 (14)	0.0489 (4)
H7B	0.150559	0.992899	-0.087929	0.059*
C8B	0.1785 (3)	0.7779 (2)	-0.04703 (13)	0.0461 (4)
H8B	0.120541	0.761230	-0.095233	0.055*
C9B	0.2488 (2)	0.66443 (17)	0.02127 (11)	0.0345 (3)
C10B	0.4564 (2)	0.29226 (17)	0.21940 (11)	0.0323 (3)
C11B	0.4232 (3)	0.14676 (19)	0.21550 (14)	0.0488 (5)
H11D	0.298512	0.158792	0.220803	0.073*
H11E	0.474722	0.077847	0.267085	0.073*
H11F	0.475076	0.110278	0.156102	0.073*

Прилог 111. Анизотропни параметри померања (Å^2) за једињење [217]

	U_{11}	U_{22}	U_{33}	U_{12}	U_{13}	U_{23}
Zn1	0.03995 (11)	0.03259 (11)	0.02833 (10)	-0.01270 (8)	-0.01512 (7)	-0.00105 (7)
O5	0.0430 (7)	0.0483 (7)	0.0378 (7)	-0.0169 (6)	-0.0121 (5)	-0.0065 (5)
O6	0.0863 (11)	0.0765 (10)	0.0426 (8)	-0.0447 (9)	-0.0244 (8)	0.0033 (7)
C1A	0.0275 (7)	0.0285 (7)	0.0306 (7)	-0.0073 (6)	-0.0069 (6)	-0.0050 (6)
O1A	0.0516 (7)	0.0303 (6)	0.0346 (6)	-0.0081 (5)	-0.0192 (5)	-0.0019 (5)
C2A	0.0272 (7)	0.0271 (7)	0.0278 (7)	-0.0078 (6)	-0.0073 (6)	-0.0040 (6)
O2A	0.0498 (6)	0.0313 (6)	0.0314 (6)	-0.0176 (5)	-0.0180 (5)	-0.0009 (4)
C3A	0.0264 (7)	0.0296 (7)	0.0245 (7)	-0.0097 (6)	-0.0047 (5)	-0.0035 (6)
O3A	0.0488 (6)	0.0299 (5)	0.0333 (6)	-0.0134 (5)	-0.0201 (5)	-0.0017 (4)
C4A	0.0308 (7)	0.0283 (7)	0.0252 (7)	-0.0099 (6)	-0.0043 (6)	-0.0022 (6)
O4A	0.0456 (6)	0.0293 (6)	0.0452 (7)	-0.0123 (5)	-0.0191 (5)	-0.0076 (5)
C5A	0.0462 (9)	0.0312 (8)	0.0325 (8)	-0.0146 (7)	-0.0082 (7)	-0.0042 (6)
C6A	0.0644 (11)	0.0281 (8)	0.0404 (9)	-0.0151 (8)	-0.0096 (8)	-0.0002 (7)
C7A	0.0720 (13)	0.0328 (9)	0.0396 (10)	-0.0116 (8)	-0.0199 (9)	0.0086 (7)
C8A	0.0621 (11)	0.0401 (9)	0.0332 (9)	-0.0153 (8)	-0.0226 (8)	0.0034 (7)
C9A	0.0364 (8)	0.0279 (7)	0.0279 (7)	-0.0107 (6)	-0.0070 (6)	-0.0020 (6)
C10A	0.0284 (7)	0.0296 (7)	0.0306 (8)	-0.0086 (6)	-0.0057 (6)	-0.0042 (6)
C11A	0.0506 (10)	0.0269 (8)	0.0420 (9)	-0.0080 (7)	-0.0149 (8)	-0.0024 (7)
C1B	0.0434 (9)	0.0380 (8)	0.0328 (8)	-0.0156 (7)	-0.0112 (7)	-0.0054 (7)
O1B	0.0555 (7)	0.0373 (6)	0.0373 (6)	-0.0215 (5)	-0.0223 (5)	0.0046 (5)
C2B	0.0323 (7)	0.0329 (8)	0.0265 (7)	-0.0118 (6)	-0.0072 (6)	-0.0048 (6)
O2B	0.0608 (8)	0.0313 (6)	0.0467 (7)	-0.0145 (5)	-0.0336 (6)	-0.0012 (5)
C3B	0.0320 (7)	0.0329 (8)	0.0293 (8)	-0.0086 (6)	-0.0092 (6)	-0.0057 (6)
O3B	0.0619 (8)	0.0374 (6)	0.0388 (6)	-0.0166 (5)	-0.0276 (6)	-0.0016 (5)
C4B	0.0333 (8)	0.0318 (8)	0.0304 (8)	-0.0074 (6)	-0.0091 (6)	-0.0038 (6)
O4B	0.0878 (10)	0.0443 (7)	0.0551 (8)	-0.0328 (7)	-0.0381 (7)	0.0003 (6)
C5B	0.0492 (10)	0.0353 (9)	0.0458 (10)	-0.0117 (7)	-0.0192 (8)	-0.0053 (7)
C6B	0.0587 (11)	0.0328 (9)	0.0530 (11)	-0.0110 (8)	-0.0158 (9)	-0.0007 (8)
C7B	0.0601 (11)	0.0392 (9)	0.0432 (10)	-0.0067 (8)	-0.0181 (9)	0.0057 (8)
C8B	0.0575 (11)	0.0457 (10)	0.0364 (9)	-0.0112 (8)	-0.0216 (8)	-0.0005 (7)
C9B	0.0388 (8)	0.0347 (8)	0.0320 (8)	-0.0100 (6)	-0.0100 (6)	-0.0047 (6)
C10B	0.0379 (8)	0.0365 (8)	0.0277 (7)	-0.0168 (7)	-0.0044 (6)	-0.0050 (6)
C11B	0.0741 (13)	0.0384 (9)	0.0444 (10)	-0.0285 (9)	-0.0222 (9)	0.0031 (8)

Прилог 112. Углови ($^{\circ}$) веза за једињење [217]

Веза	Угао	Веза	Угао
O2A-Zn1-O2B	155.61 (5)	H11A-C11A-H11B	109.5
O2A-Zn1-O1B	90.18 (4)	C10A-C11A-H11C	109.5
O2B-Zn1-O1B	85.87 (4)	H11A-C11A-H11C	109.5
O2A-Zn1-O5	103.16 (5)	H11B-C11A-H11C	109.5
O2B-Zn1-O5	101.20 (5)	O4B-C1B-O3B	113.35 (14)
O1B-Zn1-O5	102.33 (5)	O4B-C1B-C2B	127.43 (15)
O2A-Zn1-O1A	85.68 (4)	O3B-C1B-C2B	119.21 (13)
O2B-Zn1-O1A	87.62 (4)	C10B-O1B-Zn1	132.93 (10)
O1B-Zn1-O1A	154.53 (5)	C3B-C2B-C10B	121.86 (13)
O5-Zn1-O1A	103.08 (5)	C3B-C2B-C1B	118.98 (13)
Zn1-O5-H51	106.8 (16)	C10B-C2B-C1B	119.16 (13)
Zn1-O5-H52	111.7 (16)	C3B-O2B-Zn1	130.37 (10)
H51-O5-H52	110.9 (19)	O2B-C3B-C2B	125.63 (14)
H61-O6-H62	107 (2)	O2B-C3B-C4B	115.83 (13)
O4A-C1A-O3A	112.99 (13)	C2B-C3B-C4B	118.55 (13)
O4A-C1A-C2A	127.49 (14)	C9B-O3B-C1B	122.50 (12)
O3A-C1A-C2A	119.51 (12)	C9B-C4B-C5B	117.78 (14)
C10A-O1A-Zn1	131.55 (10)	C9B-C4B-C3B	119.56 (14)
C3A-C2A-C1A	119.02 (13)	C5B-C4B-C3B	122.66 (14)
C3A-C2A-C10A	121.41 (13)	C6B-C5B-C4B	121.03 (16)
C1A-C2A-C10A	119.56 (13)	C6B-C5B-H5B	119.5
C3A-O2A-Zn1	129.17 (10)	C4B-C5B-H5B	119.5
O2A-C3A-C2A	125.54 (13)	C5B-C6B-C7B	119.71 (16)
O2A-C3A-C4A	116.24 (12)	C5B-C6B-H6B	120.1
C2A-C3A-C4A	118.21 (12)	C7B-C6B-H6B	120.1
C1A-O3A-C9A	122.59 (11)	C8B-C7B-C6B	120.64 (16)
C9A-C4A-C5A	117.98 (13)	C8B-C7B-H7B	119.7
C9A-C4A-C3A	119.81 (13)	C6B-C7B-H7B	119.7
C5A-C4A-C3A	122.14 (13)	C7B-C8B-C9B	118.65 (16)
C6A-C5A-C4A	120.45 (15)	C7B-C8B-H8B	120.7
C6A-C5A-H5A	119.8	C9B-C8B-H8B	120.7
C4A-C5A-H5A	119.8	O3B-C9B-C4B	121.07 (14)
C5A-C6A-C7A	120.15 (15)	O3B-C9B-C8B	116.75 (14)
C5A-C6A-H6A	119.9	C4B-C9B-C8B	122.18 (15)
C7A-C6A-H6A	119.9	O1B-C10B-C2B	122.35 (13)
C8A-C7A-C6A	120.54 (16)	O1B-C10B-C11B	115.01 (14)
C8A-C7A-H7A	119.7	C2B-C10B-C11B	122.64 (14)
C6A-C7A-H7A	119.7	C10B-C11B-H11D	109.5
C7A-C8A-C9A	118.53 (15)	C10B-C11B-H11E	109.5
C7A-C8A-H8A	120.7	H11D-C11B-H11E	109.5
C9A-C8A-H8A	120.7	C10B-C11B-H11F	109.5
O3A-C9A-C8A	116.90 (13)	H11D-C11B-H11F	109.5
O3A-C9A-C4A	120.77 (13)	H11E-C11B-H11F	109.5
C8A-C9A-C4A	122.32 (14)	O4A-C1A-C2A-C3A	176.73 (15)
O1A-C10A-C2A	122.19 (13)	O3A-C1A-C2A-C3A	-1.8 (2)
O1A-C10A-C11A	115.44 (13)	O4A-C1A-C2A-C10A	-2.2 (2)
C2A-C10A-C11A	122.36 (13)	O3A-C1A-C2A-C10A	179.23 (13)
C10A-C11A-H11A	109.5	Zn1-O2A-C3A-C2A	19.1 (2)
C10A-C11A-H11B	109.5	Zn1-O2A-C3A-C4A	-160.71 (10)
C1A-C2A-C3A-O2A	-176.88 (14)	O3B-C1B-C2B-C10B	-176.81 (14)
C10A-C2A-3A-O2A	2.1 (2)	Zn1-O2B-C3B-C2B	9.3 (3)
C1A-C2A-C3A-C4A	3.0 (2)	Zn1-O2B-C3B-C4B	-170.64 (11)
C10A-C2A-3A-C4A	-178.09 (13)	C10B-C2B-C3B-O2B	0.1 (3)
O4A-C1A-O3A-C9A	-177.70 (13)	C1B-C2B-C3B-O2B	-179.28 (16)

C2A-C1A-O3A-C9A	1.0 (2)	C10B-C2B-C3B-C4B	-179.99 (14)
O2A-C3A-C4A-C9A	176.40 (13)	C1B-C2B-C3B-C4B	0.7 (2)
C2A-C3A-C4A-C9A	-3.5 (2)	O4B-C1B-O3B-C9B	177.14 (16)
O2A-C3A-C4A-C5A	-0.3 (2)	C2B-C1B-O3B-C9B	-3.9 (2)
C2A-C3A-C4A-C5A	179.79 (14)	O2B-C3B-C4B-C9B	177.25 (15)
C9A-C4A-C5A-C6A	-1.3 (2)	C2B-C3B-C4B-C9B	-2.7 (2)
C3A-C4A-C5A-C6A	175.49 (15)	O2B-C3B-C4B-C5B	-2.2 (2)
C4A-C5A-C6A-C7A	0.2 (3)	C2B-C3B-C4B-C5B	177.88 (15)
C5A-C6A-C7A-C8A	1.2 (3)	C9B-C4B-C5B-C6B	-1.2 (3)
C6A-C7A-C8A-C9A	-1.3 (3)	C3B-C4B-C5B-C6B	178.19 (17)
C1A-O3A-C9A-C8A	177.01 (15)	C4B-C5B-C6B-C7B	0.4 (3)
C1A-O3A-C9A-C4A	-1.5 (2)	C5B-C6B-C7B-C8B	0.5 (3)
C7A-C8A-C9A-O3A	-178.36 (16)	C6B-C7B-C8B-C9B	-0.7 (3)
C7A-C8A-C9A-C4A	0.2 (3)	C1B-O3B-C9B-C4B	1.9 (2)
C5A-C4A-C9A-O3A	179.62 (14)	C1B-O3B-C9B-C8B	-178.25 (16)
C3A-C4A-C9A-O3A	2.7 (2)	C5B-C4B-C9B-O3B	-179.03 (15)
C5A-C4A-C9A-C8A	1.1 (2)	C3B-C4B-C9B-O3B	1.5 (2)
C3A-C4A-C9A-C8A	-175.73 (15)	C5B-C4B-C9B-C8B	1.1 (3)
Zn1-O1A-C10A-C2A	-2.7 (2)	C3B-C4B-C9B-C8B	-178.35 (16)
Zn1-O1A-C10A-C11A	178.31 (11)	C7B-C8B-C9B-O3B	179.96 (17)
C3A-C2A-C10A-O1A	-10.2 (2)	C7B-C8B-C9B-C4B	-0.2 (3)
C1A-C2A-C10A-O1A	168.77 (14)	Zn1-O1B-C10B-C2B	-3.3 (2)
C3A-C2A-C10A-C11A	168.72 (14)	Zn1-O1B-C10B-C11B	176.75 (12)
C1A-C2A-C10A-C11A	-12.3 (2)	C3B-C2B-C10B-O1B	-3.1 (2)
O4B-C1B-C2B-C3B	-178.67 (18)	C1B-C2B-C10B-O1B	176.25 (15)
O3B-C1B-C2B-C3B	2.6 (2)	C3B-C2B-C10B-C11B	176.82 (16)
O4B-C1B-C2B-C10B	2.0 (3)	C1B-2B-C10B-C11B	-3.8 (2)

8. БИОГРАФИЈА АУТОРА

Миленко Ристић је рођен 13.01.1991. године у Приштини. Основну школу је завршио у Севцу 2006. године, а гимназију општег смера у Штрпцу 2010. године. Носилац је дипломе „Вук Караџић“, а као најбољи ђак гимназије позван је на пријем код престолонаследника Александра II Карађорђевића на Белом Двору у Београду, где му је уручена Похвалница за исказани изванредни успех у завршеном средњем образовању.

На Одсеку за хемију, Природно-математичког факултета у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици, уписао се школске 2010/11. године, где је и дипломирао 2014. године са просечном оценом 9,42 и оценом 10 на дипломском раду. Носилац је дипломе „Истакнути студент“ коју Универзитет у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици додељује најбољим студентима. Школске 2014/15. године уписао је мастер академске студије на Одсеку за хемију истог факултета, а 2015. године је одбранио мастер рад са оценом 10 и просечном оценом 10 током мастер студија. Докторске академске студије на Одсеку за хемију истог факултета уписао је школске 2015/16. године и положио је све испите предвиђене студијском програмом са просечном оценом 10.

У звање асистента за ужу научну област Органска хемија и биохемија Природно-математичког факултета у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици изабран је 2016. године. Од 2019. године ангажован је на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја под називом: „Комбинаторне библиотеке хетерогених катализатора, природних производа, модификованих природних производа и њихових аналога: пут ка новим биолошки активним агенсима“.

Аутор је и коаутор више научних радова публикованих у међународним и домаћим часописима, као и радова презентованих на међународним и домаћим конференцијама.

9. ИЗЈАВЕ АУТОРА

Изјава о ауторству

Потписани: Миленко Ристић

број индекса: 4/2015

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Мешовити азини 3-ацетил-4-хидроксикумарина и (хетеро)арил-алдехида: синтеза, спектрална карактеризација и фармаколошка активност

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Косовској Митровици, _____

Потпис докторанда

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора: Миленко Ристић

Број индекса: 4/2015

Студијски програм: Хемија, модул органска хемија

Наслов рада: Мешовити азини 3-ацетил-4-хидроксикумарина и (хетеро)арил-алдехида: синтеза, спектрална карактеризација и фармаколошка активност

Ментор: Др Биљана Декић, редовни професор

Потписани: Миленко Ристић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици.

У Косовској Митровици, _____

Потпис докторанда

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици и Национални репозиторијум докторских дисертација унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Мешовити азини 3-ацетил-4-хидроксикумарина и (хетеро)арил-алдехида: синтеза, спектрална карактеризација и фармаколошка активност

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици и Национални репозиторијум докторских дисертација могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Косовској Митровици, _____

Потпис докторанда

1. Ауторство – Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.