



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Петар Б. Станић

**АЛКЕНИЛСКИ И АРИЛИДЕНСКИ
2-ТИОХИДАНТОИНИ: СИНТЕЗА, КИНЕТИКА И
МЕХАНИЗАМ НАСТАЈАЊА, БИОЛОШКА И
ЕЛЕКТРОХЕМИЈСКА ЕВАЛУАЦИЈА,
КООРДИНАЦИОНИ ПОТЕНЦИЈАЛ**

докторска дисертација

Крагујевац, 2024.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE

Petar B. Stanić

**ALKENYL AND ARYLIDENE 2-THIOHYDANTOINS:
SYNTHESIS, KINETICS AND MECHANISM OF
FORMATION, BIOLOGICAL AND ELECTROCHEMICAL
EVALUATION, COORDINATION POTENTIAL**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2024

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Аутор
Име и презиме: Петар Станић
Датум и место рођења: 03.10.1993. године, Крагујевац (Србија)
Садашње запослење: Истраживач-сарадник, Институт за информационе технологије, Крагујевац, Универзитет у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: Алкенилски и арилиденски 2-тиохидантоини: Синтеза, кинетика и механизам настајања, биолошка и електрохемијска евалуација, координациони потенцијал
Број страница: 191
Број слика: 71, број схема: 88, број табела: 20
Број библиографских података: 556
Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Органска хемија, 547.31(043.3)
Коментори: др Марија Живковић, ванредни професор, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу; др Дејан Миленковић, виши научни сарадник, Институт за информационе технологије, Крагујевац, Универзитет у Крагујевцу
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 14.10.2020. године
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-01-920/9, 09.12.2020. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
1. др Марија Живковић, доцент, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Органска хемија, коментор
2. др Дејан Миленковић, виши научни сарадник, Институт за информационе технологије, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Хемија, коментор
3. др Милан Јоксовић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Органска хемија, председник комисије
4. др Александар Павић, виши научни сарадник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду, ужа научна област: Биологија
5. др Наташа Вукићевић, научни сарадник, Институт за хемију, технологију и металургију, Универзитет у Београду, ужа научна област: Хемија
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
1. др Милан Јоксовић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Органска хемија, председник комисије
2. др Јована Мушкиња, научни сарадник, Институт за информационе технологије, Крагујевац, Универзитет у Крагујевцу, научна област: Хемија
3. др Александар Павић, виши научни сарадник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду, научна област: Биологија
4. др Наташа Петровић, виши научни сарадник, Институт за хемију, технологију и металургију, Универзитет у Београду, научна област: Хемија
5. др Горан Јањић, научни саветник, Институт за хемију, технологију и металургију, Универзитет у Београду, научна област: Хемија
Датум одбране дисертације:

ЗАХВАЛНИЦА

Пре свега, желим искрено да изразим огромну захвалност менторки, др Марији Живковић, чије су смернице, помоћ и подршка биле огроман ветар у леђа приликом целокупног процеса израде ове дисертације.

Захваљујем се др Милану Јоксовићу, редовном професору Природно-математичког факултета у Крагујевцу, на корисним сугестијама, које су помогле да ова дисертација поприми коначни облик.

Такође, захваљујем се др Јовани Мушкињи, научном сараднику Института за информационе технологије, Крагујевац, на детаљном читању рукописа дисертације и конструктивним коментарима који су допринели побољшању њеног квалитета.

Пуно се захваљујем др Александру Павићу, вишем научном сараднику Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, пре свега на лепој и врло продуктивној сарадњи, из које су проистекли врло битни резултати. Затим, др Павићу сам захвалан на свим коментарима и сугестијама које је пружио приликом читања рукописа дисертације, који су за мене били изазовни, јер су ме натерали да науку сагледам из другог, мени до сад непознатог угла.

Велику захвалност дугујем др Наташи Петровић, вишем научном сараднику Института за хемију, технологију и металургију, под чијим је руковођењем извршена електрохемијска евалуација антикорозивних својстава синтетисаних тиохидантоина у циљу процене могућности њихове примене у инхибирању корозије челика. Резултати добијени под вођством др Наташе Петровић су дали овој дисертацији потпуно нову димензију и дозу мултидисциплинарности, која ју је заиста уздигла на виши ниво.

Огромну захвалност дугујем др Горану Јањићу, научном саветнику Института за хемију, технологију и металургију, на предивној сарадњи, несебичном залагању и саветима, који су ми много помогли и оспособили ме да у материју уђем дубље и детаљније и заокружим целину ове дисертације на много бољи начин.

Неизмерно сам захвалам својим пријатељима на пруженој подршци, а највише мојој мајци, којој дугујем све и без које апсолутно ништа од овога не би било могуће.

АПСТРАКТ

Истраживања у склопу ове докторске дисертације су била фокусирана на синтезу две серије нових алкенилских деривата 2-тиохидаптоина из α -аминокиселина и арилиденских деривата 2-тиохидаптоина из ароматичних алдехида.

Кинетика и механизам настајања аминокиселинских деривата 2-тиохидаптоина у реакцији метил естра неколико изабраних α -аминокиселина са алил-изотиоцијанатом испитивани су помоћу ^1H NMR спектроскопије и теорије функционала густине.

Антимеланогена активност новосинтетисаних деривата 2-тиохидаптоина, као и њихова токсичност, испитиване су *in vivo* на моделу ембриона зебрице, у циљу одређивања могућности њихове примене у третману поремећаја хиперпигментације коже код човека. У циљу одређивања потенцијалних таргета инхибитора меланогенезе, примењен је молекулски докинг.

Антикорозивна својства четири арилиденска деривата 2-тиохидаптоина **6a-g** су испитивана на меком челику у 0,5 М HCl гравиметријским, електрохемијским и микроскопским методама у циљу развијања нових потенцијалних инхибитора корозије меког челика.

Координациони потенцијал одабраних деривата 2-тиохидаптоина је испитиван у реакцијама са цисплатином и солима Pd(II), праћеним ^1H NMR спектроскопијом у DMSO- d_6 као растварачу, као и употребом теорије функционала густине. Одређени су начин координовања, ред и механизам реакције, а испитиван је утицај DMSO на ове реакције. Урађена је молекулска докинг анализа претпостављених комплекса са ДНК као таргетом, у циљу предвиђања њихове антитуморске активности.

На крају, испитивана је реакција арилиденског деривата **6b** са *trans*-[CuCl₂(dmsO)₂]_n комплексом. Уместо добијања одговарајућег тиохидаптоинског комплекса бакра, одиграла се изомеризација *trans*-[CuCl₂(dmsO)₂]_n до динуклеарног *cis*-[CuCl(dmsO)₂](μ -Cl)]₂. Испитиван је утицај деривата **6b** на изомеризацију.

КЉУЧНЕ РЕЧИ:

2-тиохидаптоин, кинетика и механизам, NMR спектроскопија, теорија функционала густине, инхибиција меланогенезе, инхибиција корозије, координација, молекулски докинг

ABSTRACT

Research within the framework of this dissertation was focused on the synthesis of two series of novel alkenyl 2-thiohydantoin derivatives from α -amino acids and arylidene 2-thiohydantoin derivatives from aromatic aldehydes.

Kinetics and mechanism of formation of amino acid derived 2-thiohydantoins in the reaction of methyl esters of some selected amino acids with allyl isothiocyanate were studied by ^1H NMR spectroscopy and density functional theory.

The antimelanogenic activity of the obtained 2-thiohydantoin derivatives, as well as their toxicity, was tested *in vivo* using the zebrafish model, in order to address the possibility of their application in the treatment of skin hyperpigmentation disorders. Molecular docking was performed on selected biological targets.

The anticorrosive activity of four arylidene 2-thiohydantoin derivatives was tested by gravimetric, electrochemical and microscopic methods on mild steel in 0.5 M HCl to develop new potential corrosion inhibitors for mild steel.

The coordination potential of some selected derivatives was studied in reactions with cisplatin and Pd(II) salts, monitored by ^1H NMR spectroscopy in DMSO- d_6 , and also by using density functional theory. The coordination modes, the reaction order, the mechanism and the influence of DMSO have been determined. Molecular docking of the proposed complexes with DNA, as a potential target, was performed in order to predict their antitumor activities.

The reaction of one arylidene derivative with the *trans*- $[\text{CuCl}_2(\text{dmsO})_2]_n$ complex was studied. Instead of obtaining the corresponding copper 2-thiohydantoin complex, isomerization of *trans*- $[\text{CuCl}_2(\text{dmsO})_2]_n$ to dinuclear *cis*- $[\{\text{CuCl}(\text{dmsO})_2\}(\mu\text{-Cl})]_2$ was observed. Influence of the 2-thiohydantoin derivative on the isomerization was examined.

KEY WORDS:

2-thiohydantoin, kinetics and mechanism, NMR spectroscopy, density functional theory, melanogenesis inhibition, corrosion inhibition, coordination, molecular docking

САДРЖАЈ

1. ОПШТИ ДЕО.....	1
1.1. Увод.....	2
1.2. Откриће и структура хидантоина.....	3
1.2.1. Тиохидантоини, псеудотиохидантоини и селенохидантоини.....	4
1.3. Налажење хидантоина у природи.....	5
1.4. Биолошка активност хидантоина и њихова примена у медицини.....	6
1.5. Друге примене хидантоина.....	11
1.6. Физичке особине хидантоина.....	12
1.7. Хемијске особине хидантоина.....	12
1.7.1. Таутомерни облици хидантоина.....	12
1.7.2. Киселост хидантоина.....	13
1.7.3. Хидролиза.....	13
1.7.4. Увођење супституената у хидантоински прстен.....	14
1.7.4.1. Супституција на азотима у положајима 1 и 3.....	14
1.7.4.2. Супституција на угљенику у положају 5.....	15
1.7.4.3. Реакције у положајима 2 и 4.....	17
1.7.4.4. Утицај супституената на стабилност хидантоинског прстена.....	18
1.7.5. Редукција.....	19
1.7.6. Фотолиза.....	20
1.7.7. Реакције са јонима метала, грађење комплекса.....	20
1.8. Синтеза хидантоина.....	27
1.8.1. Синтеза хидантоина из аминокиселина и алкалних цијаната и тиоцијаната.....	27
1.8.2. Синтеза из аминокиселина и алкил или арил изоцијаната и изотиоцијаната.....	30
1.8.3. Синтеза из аминокиселина и урее и њених деривата.....	31
1.8.4. Синтеза из α -хидроксикиселина или α -хидроксинитрила и урее.....	32
1.8.5. Синтеза из урее и α -дикарбонилних једињења.....	32
1.8.6. Синтеза из урее и незасићених киселина.....	34
1.8.7. Синтеза из аминокиселина и карбамата.....	35
1.8.8. Синтеза из изоцијаната и изотиоцијаната изведених из аминокиселина и амина.....	35
1.8.9. Синтеза из аминокиселина и фозгена.....	37
1.8.10. Синтеза из естара аминокиселина и алкил-хлорформијата.....	39
1.8.11. Синтеза из амида аминокиселина и алкил-хлорформијата.....	39
1.8.12. Синтеза из хлорацетилкарбамата и амина.....	41
1.8.13. Синтеза из бромацетилурее.....	42
1.8.14. Синтеза из цијаноацетамида и алкалних хипохлорита.....	42
1.8.15. Бучерер-Бергсова (Bücherer-Bergs) синтеза из карбонилних једињења..	42
1.8.16. Превођење других хетероцикличних једињења у хидантоине.....	45
1.8.17. Синтеза хидантоина из азотних база нуклеотида.....	47
1.8.18. Синтеза хидантоина из тиохидантоина.....	48

2. НАШИ РАДОВИ.....	50
2.1. Синтеза деривата 2-тиохидантоина.....	51
2.1.1. Синтеза и карактеризација алкенилских деривата 2-тиохидантоина из α -аминокиселина.....	51
2.1.2. Синтеза и карактеризација арилиденских деривата 2-тиохидантоина из ароматичних алдехида.....	57
2.2. Кинетика и механизам настајања алкенилских деривата 2-тиохидантоина из α -аминокиселина.....	61
2.2.1. Примена NMR спектроскопије у испитивању кинетике и механизма реакција.....	61
2.2.2. Примена теоријских метода у испитивању кинетике и механизма реакција.....	62
2.2.2.1. Теорија функционала густине.....	63
2.2.2.2. Базисни скупови.....	64
2.2.2.3. Солватациони модели.....	65
2.2.2.4. Примена теорије функционала густине у анализи хидантоина.....	65
2.2.3. ^1H NMR кинетичко испитивање механизма настајања деривата 2-тиохидантоина у реакцијама метил естара α -аминокиселина и алил-изотиоцијаната.....	66
2.2.4. Квантно-механичко испитивање механизма реакција настајања деривата 2-тиохидантоина из метил естара α -аминокиселина и алил-изотиоцијаната.....	70
2.3. Антимеланогена активност синтетисаних деривата 2-тиохидантоина.....	78
2.3.1. Испитивање антимеланогене активности синтетисаних деривата 2-тиохидантоина <i>in vivo</i> на моделу ембриона зебрице (<i>Danio rerio</i>).....	81
2.3.2. Молекулски докинг.....	83
2.4. Арилиденски деривати 2-тиохидантоина као инхибитори корозије меког челика у киселој средини.....	93
2.4.1. Потенциодинамичка поларизациона мерења.....	93
2.4.2. Потенциостатска електрохемијска импедансна спектроскопија.....	96
2.4.3. Гравиметријска мерења.....	99
2.4.4. Испитивање морфологије и састава површине меког челика.....	100
2.5. Координациони потенцијал одабраних синтетисаних деривата 2-тиохидантоина.....	101
2.5.1. Испитивање реакција цисплатине и аминокиселинских деривата 2-тиохидантоина са сумпором у бочном низу.....	102
2.5.1.1. ^1H NMR студија реакција деривата 2-тиохидантоина 3ж и 3з са цисплатином.....	102
2.5.1.2. Одређивање механизма реакција деривата тioxидантоина 3ж и 3з са цисплатином на основу концентрације реактанта и потенцијалних производа.....	106
2.5.1.3. Рачунање промене Гибсове слободне енергије реакције цисплатине са тioxидантоином 3ж	108
2.5.1.4. Одређивање механизма реакције тioxидантоина 3ж и 3з са цисплатином на основу реда реакције.....	109

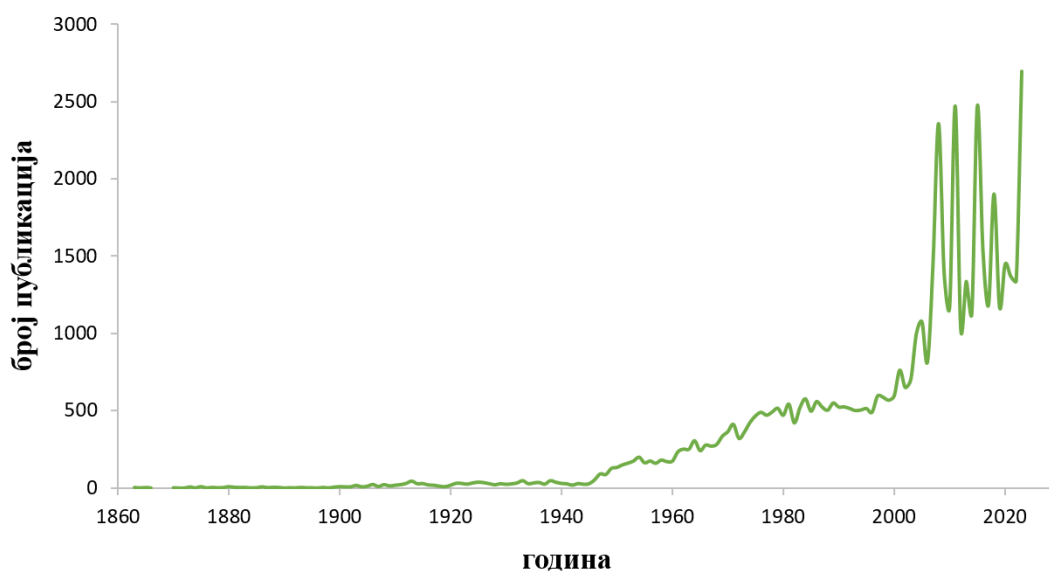
2.5.1.5.	Рачунање енергије стабилности за координовање DMSO у комплексу насталом у реакцији цисплатине са тиохидантоином Зз	113
2.5.1.6.	Координовање DMSO за платину, квантно-механички, кинетички и кристалографски аспекти.....	114
2.5.1.7.	Структура комплекса платине са тиохидантоинима Зж и Зз	124
2.5.1.8.	Резултати молекулског докинга.....	127
2.5.2.	Испитивање реакција арилиденског деривата 2-тиохидантоина ба са солима паладијума(II).....	130
2.5.2.1.	Реакција арилиденског деривата 2-тиохидантоина ба са <i>cis</i> -[PdCl ₂ (dmsо-S) ₂].....	130
2.5.2.2.	Реакција арилиденског деривата 2-тиохидантоина ба са PdCl ₂ ...	134
2.5.2.3.	Реакција арилиденског деривата 2-тиохидантоина ба са K ₂ [PdCl ₄].....	136
2.5.3.	Реакција арилиденског деривата 2-тиохидантоина бб са полимерним <i>trans</i> -[CuCl ₂ (dmsо) ₂] _n комплексом: неочекивана изомеризација до динуклеарног <i>cis</i> -[CuCl(dmsо) ₂] ₂ (μ ₂ -Cl) ₂].....	136
2.5.3.1.	Добијање <i>cis</i> -[CuCl(dmsо) ₂] ₂ (μ ₂ -Cl) ₂] комплекса.....	137
2.5.3.2.	Дескрипција кристалне структуре <i>cis</i> -[CuCl(dmsо) ₂] ₂ (μ ₂ -Cl) ₂] комплекса.....	137
2.5.3.3.	Изомеризација и стабилност <i>cis</i> -[CuCl(dmsо) ₂] ₂ (μ ₂ -Cl) ₂] комплекса.....	141
2.5.3.4.	Одређивање антимикуробне активности <i>cis</i> -[CuCl(dmsо) ₂] ₂ (μ ₂ -Cl) ₂].....	142
3.	ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО.....	143
3.1.	Опште напомене.....	144
3.2.	Опште синтетичке процедуре.....	144
3.2.1.	Синтеза метил естара аминокиселина (2а-љ).....	144
3.2.2.	Синтеза алкенилских аминокиселинских деривата 2-тиохидантоина (3а-љ).....	144
3.2.3.	Синтеза <i>O</i> -алкил деривата ванилина (4ђ-љ).....	148
3.2.4.	Синтеза арилиденских деривата 2-тиохидантоина (ба-љ).....	148
3.2.5.	Синтеза <i>cis</i> -[CuCl(dmsо) ₂] ₂ (μ ₂ -Cl) ₂].....	153
3.3.	¹ H NMR експерименти.....	153
3.3.1.	¹ H NMR кинетичка мерења реакције метил естара аминокиселина са алил-изотиоцијанатом.....	153
3.3.2.	¹ H NMR кинетичка мерења реакције цисплатине и тиохидантоина Зж и Зз	153
3.3.3.	¹ H NMR кинетичка мерења реакције тиохидантоина ба и соли паладијума(II).....	154
3.4.	Рачунарске методе.....	154
3.4.1.	Квантно-механички прорачуни.....	154
3.4.2.	Молекулски докинг.....	154
3.5.	Биолошке методе.....	156
3.5.1.	Одређивање антимикуробне активности.....	156
3.5.2.	Евалуација токсичности <i>in vivo</i> на моделу ембриона зебрице (<i>Danio rerio</i>).....	156

3.5.2.1. Материјал и методе.....	156
3.5.2.2. Испитивање акутне токсичности на ембрионима зебрице – <i>Fish Embryo Acute Toxicity Assay</i> (FET тест).....	157
3.5.3. Испитивање инхибиције меланогенезе <i>in vivo</i> на моделу зебрице.....	158
3.6. Методе за испитивање антикорозивне активности.....	159
3.6.1. Електрохемијска мерења.....	159
3.6.2. Гравиметријска мерења.....	160
3.6.3. Микроскопске методе.....	160
4. ЗАКЉУЧАК.....	161
5. ЛИТЕРАТУРА.....	165
6. ПРИЛОГ.....	186
7. БИОГРАФИЈА.....	191

1. ОПШТИ ДЕО

1.1. Увод

Хидантоин или имидазолидин-2,4-дион (Слика 2, лево) је петочлано хетероциклично једињење и представља један од оксидованих облика имидазолидина са цикличном уреидном структуром.¹⁻⁵ Уопштено, када се говори о хидантоинима, мисли се на ширу класу једињења која садрже хидантоинско језгро у свом скелету. Како хидантоински прстен садржи пет положаја за дериватизацију, класу хидантоина чини јако велики број структурно различитих једињења. Поред тога што их ово чини веома синтетички атрактивним, хидантоини су последњих деценија били у интензивном фокусу биолошких и фармаколошких истраживања.⁶ Иако је сам хидантоин откривен пре више од 150 година, интересовање за хидантоине не опада и има јасну тенденцију раста, нарочито у задњих пар деценија, што се може видети по броју публикација, приказаним на Слици 1.⁷



Слика 1. Број публикација које помињу хидантоине по годинама, од открића самог хидантоина до данас.

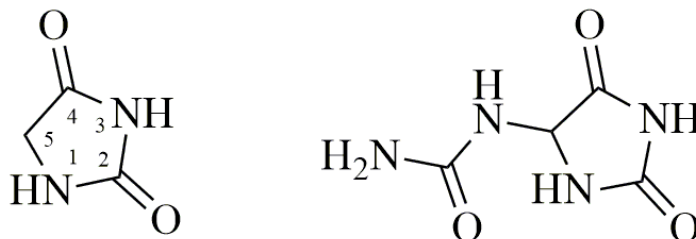
Хидантоини показују широк спектар биолошких активности, као што су антимикробно,⁸ антитуморско,^{9,10} антиинфламаторно,¹¹ антиконвулзивно,¹² и анти-HIV¹³ дејство. Комерцијализовани су као лекови и користе се у клиничкој пракси као антиконвулзанти,¹⁴ нестероидни антиандрогени у третману рака простате,^{15,16} мишићни релаксанти,¹⁷ и антибиотици.¹⁸

Поред клиничке примене, хидантоини су нашли примену у козметици као антимикробни презервативи¹⁹ и у пољопривреди као пестициди²⁰ и стимулатори раста корења. Користе се у текстилној индустрији, затим у процесима производње метала и пластике, као и у разним другим гранама индустрије.²¹

Многобројне примене хидантоина су добар показатељ потенцијала ове велике класе једињења. Из овог разлога се истраживачке групе широм света и дан данас, чак више од 150 година од открића хидантоина, још увек баве овом тематиком, у циљу развијања нових медицинских и индустријских примена ових једињења.

1.2. Откриће и структура хидантоина

Хидантоин је 1861. године открио Адолф фон Бајер (Adolf von Baeyer), немачки хемичар, који је познат по синтези индига,²² као и развијању номенклатуре за циклична једињења, која је касније усвојена као део IUPAC (од енгл. International Union of Pure and Applied Chemistry) номенклатуре за органска једињења. Бајер је хидантоин изоловао као један од редукционих производа алантоина, током испитивања мокраћне киселине.²³ Молекул је добио овакав назив јер је добијен редукцијом, односно „хидрогенолизом“ алантоина (Слика 2).



Слика 2. Структуре хидантоина (лево) и алантоина (десно).²

Бајер је такође објавио да се хидантоин може добити и редукцијом алоксанске киселине јодоводоником,²⁴ а три године касније га је синтетисао и из бромацетилурее.²⁵ Структуру хидантоина какву данас користимо је први предложио Штрекер (Strecker) 1870. године, објаснивши да се производ синтезе хидантоина из бромацетилурее, у алкохолном раствору амонијака, најбоље може описати структуром цикличног уреида (Схема 1).²⁶

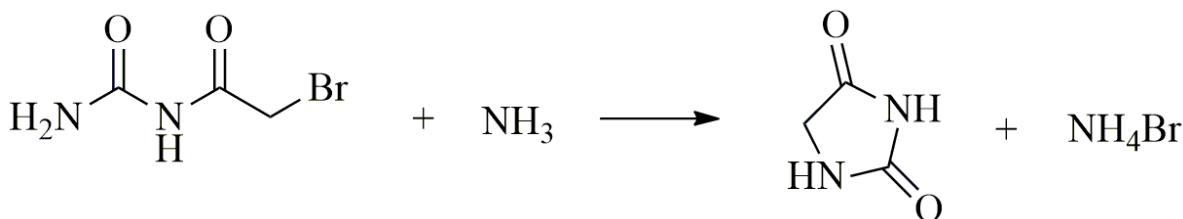


Схема 1. Синтеза хидантоина из бромацетилурее.

Штрекер је окарактерисао и структуру хидантоинске киселине. Пошто је било познато да хидантоинска киселина садржи два водоника и један кисеоник више од хидантоина, претпоставио је да се добија раскидањем везе у прстену и симултаном адицијом молекула воде (Схема 2).

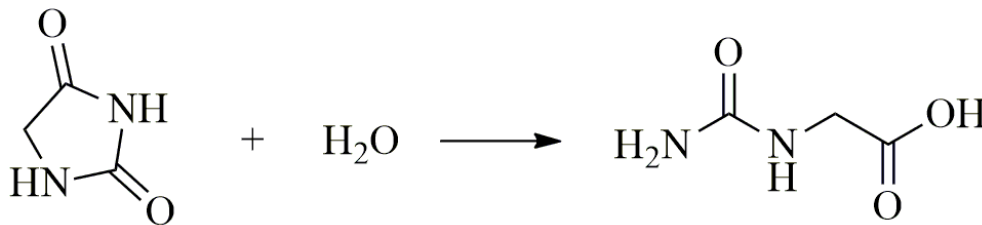
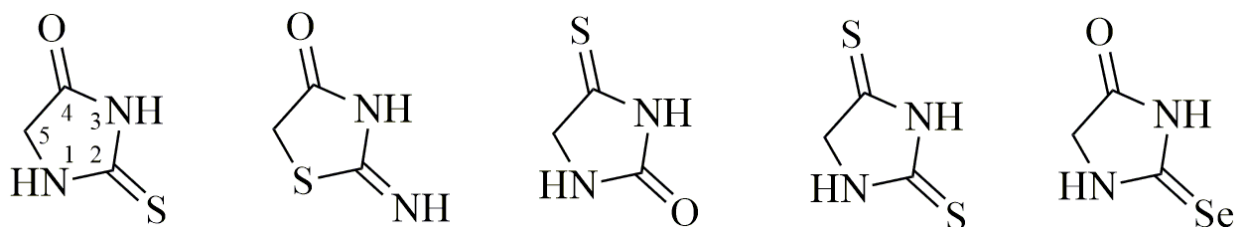


Схема 2. Реакција добијања хидантоинске киселине.

1.2.1. Тиохидантоини, псеудотиохидантоини и селенохидантоини

Класу једињења јако сродну хидантоинима представљају 2-тиохидантоини (Слика 3),²⁷ који имају сумпор уместо кисеоника везаног за угљеник у положају 2. Ова два типа једињења су хемијски јако слична и подлежу аналогним реакцијама у присуству истих или сличних реагенаса. Штавише, 2-тиохидантоин и његови деривати се могу превести у одговарајуће хидантоине. Ово је нарочито значајно јер су тиохидантоини кинетички реактивнији и често се лакше добијају и изолују. Поред 2-тиохидантоина, познати су псеудотиохидантоини, 4-тиохидантоини и 2,4-дитиохидантоини (Слика 3), који такође имају особине сличне као хидантоини.



Слика 3. Структуре 2-тиохидантоина, псеудотиохидантоина, 4-тиохидантоина, 2,4-дитиохидантоина и 2-селенохидантоина.

Псеудотиохидантоини се понекад добијају као међупроизводи приликом добијања 2-тиохидантоина. Разлику између 2-тиохидантоина и псеудотиохидантоина, су уочили Либерман (Liebermann) и Ланге (Lange).²⁸ Главна метода за добијање псеудотиохидантоина је заснована на реакцији тиоурее и хлорсирћетне киселине. Овај поступак је испитиван у разним истраживањима и прво се веровало да у њему долази до грађења 2-тиохидантоина.²⁹⁻³² Нађено је да ова једињења дају неочекиване производе када се хидролизују,³³ оксидују,³⁴ или третирају оксидима метала у намери да се десулфуризују.²⁹ Хидролизом дифенил деривата псеудотиохидантоина до анилина и тиогликолне киселине Либерман и Ланге су потврдили да се у испитиваној реакцији добија псеудотиохидантоин, а не 2-тиохидантоин и да је производ реакције погрешно формулисан.²⁸

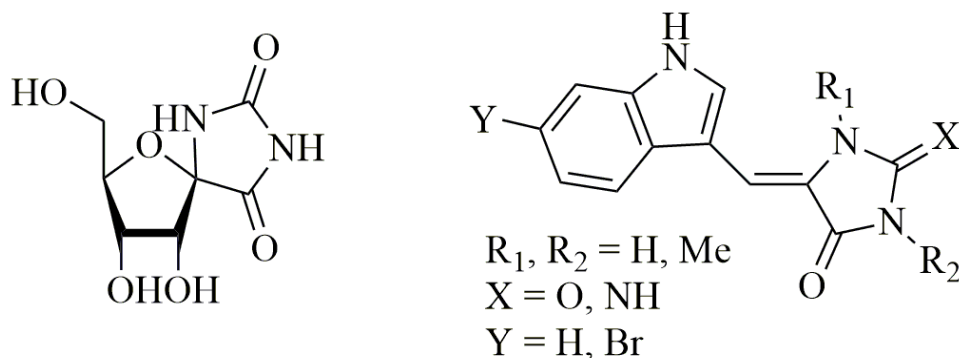
Најмлађи из породице хидантоина, 2-селенохидантоин, представља аналог са селеном уместо кисеоника у положају 2 (Слика 3) и први пут је синтетисан из селеноурее и хлорсирћетне киселине.³⁵ Хемија селенохидантоина је још увек релативно неистражена, углавном због веровања да су једињења селена токсична и да их треба класификовати као биолошке отрове, а не као једињења од биолошког, медицинског и терапеутског интереса. Овакво веровање је потпуно одбачено открићем биолошки значајних ензима који се налазе у ћелијама, а који садрже селеноцистеин и селенометионин, а, као што су глицин редуктаза,³⁶ глутатион пероксидаза,³⁷ тиоредоксин редуктаза,³⁸ киназе³⁹ и разни други. Начини за синтезу селенохидантоина су ограничени и они се углавном добијају реакцијом арил и алкил изоселеноцијаната и естара аминокиселина.⁴⁰ Постоје и други начини за добијање селенохидантоина, али је за њих неопходна употреба неуобичајених и ретко доступних селенских реагенаса, као што су натријум-селенид, фосфор-селенид и др.^{41,42}

1.3. Налажење хидантоина у природи

Хидантоини су присутни у веома различитим природним изворима. Сам хидантоин је нађен у пупољцима оријенталног платана (лат. *Platanus orientalis*)⁴³ и белим младицама шећерне репе (лат. *Beta vulgaris*),⁴⁴ док је метилхидантоин изолован из хуманог тестикуларног екстракта који је садржао пресорне супстанце.⁴⁵ Утврђено је да се после уношења већих количина аминокиселина, међу којима су саркозин⁴⁶ и тирозин,⁴⁷ у урину налазе хидантоин и хидантоинска киселина, који се могу добити у реакцији ових аминокиселина са уреом. Дакин (Dakin) је у својим радовима нагласио могућност да су методе изоловања одговорне за њихово стварање.⁴⁸ Како се хидантоини лако добијају из аминокиселина, Липих (Lippich) и Џонсон (Johnson) су претпоставили да се хидантоинске киселине⁴⁹ и хидантоини⁵⁰ налазе унутар структура протеина. Џонсон је пронашао да се при алкалној хидролизи протеина ослобађа пет пута више угљен-диоксида него при киселој хидролизи, што указује на уреидну структуру отпорну на киселу средину, која одговара хидантоинима. Ову идеју, да се хидантоинско језгро може инкорпорирати као градивни елемент унутар структуре протеина, додатно подржава чињеница да је изолован дериват хидантоина, α -амино- ϵ -хидантоинкапронска киселина, из желатина хидролизом у воденом/алкохолном раствору хлороводоника.⁵¹ Исти дериват хидантоина је такође добијен хидролизом казеина под сличним условима.

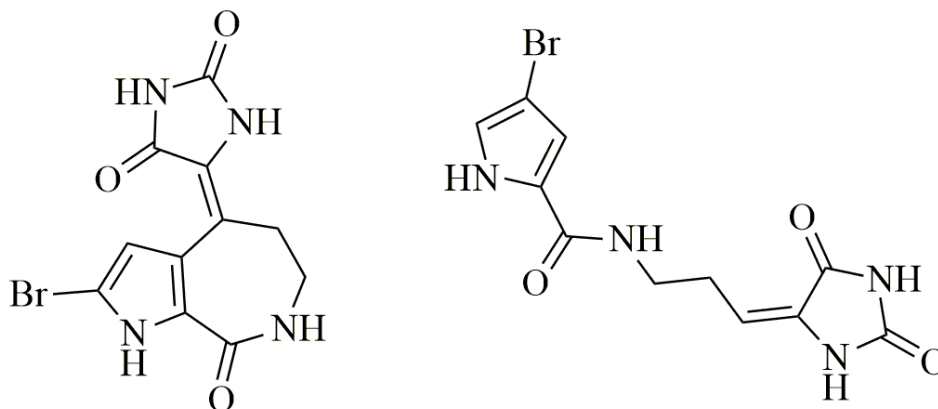
Постоји одређен број алкалоидних природних производа са хидантоинским језгром изолованих из морских организама и неких бактерија. Један од њих, назван хидантоцидин (Слика 4, лево), изолован је из бактерије *Streptomyces hygrosopicus*.⁵² Хидантоцидин садржи хидантоинско језгро везано у аномерном положају пентозе, дајући хиралан центар у положају 5 хидантоина. Главни изазов при синтези хидантоцидина је управо стереохемијска контрола тог хиралног центра.⁵³

Аплисинопсини (Слика 4, десно) су група индолских алкалоида са хидантоинским или 2-иминохидантоинским језгром. Изоловани су из морских сунђера, саса, пужева и корала.⁵⁴ Аплисинопсини се могу синтетисати кондензацијом индол-3-карбоксалдехида и 1,3-диметилхидантоина, где супституент за азоту у положају 1 диктира грађење *E* или *Z* аплисинопсина. Природни производи овог типа могу да садрже и бром као супституент на индолском прстену, док га синтетички аплисинопсини не садрже.



Слика 4. Структуре хидантоцидина (лево) и аплисинопсина (десно).

(*E*)-Аксинохидантоин (Слика 5, лево) и муканадин В (Слика 5, десно) су хидантоински природни производи, изоловани из морских сунђера, који не садрже хиралне центре, али, као аплисинопсини, садрже егзоцикличне двоструке везе у положају 5.⁵



Слика 5. Структуре (*E*)-аксинохидантоина (лево) и муканадина В (десно).

1.4. Биолошка активност хидантоина и њихова примена у медицини

Истраживања спроведена од половине прошлог века до данас на испитивању биолошких активности једињења која садрже хидантоинско језгро су показала да она поседују широк спектар активности,⁶ као што су антитуморско,^{9,55-59} антиинфламаторно,^{11,60} антидијабетско,⁶¹ антимикробно,^{8,62-64} адреноцептор модулирајуће,⁶⁵⁻⁶⁷ антифиброзно,⁶⁸ антиконвулзивно^{12,69} и анти-НIV дејство.^{13,70}

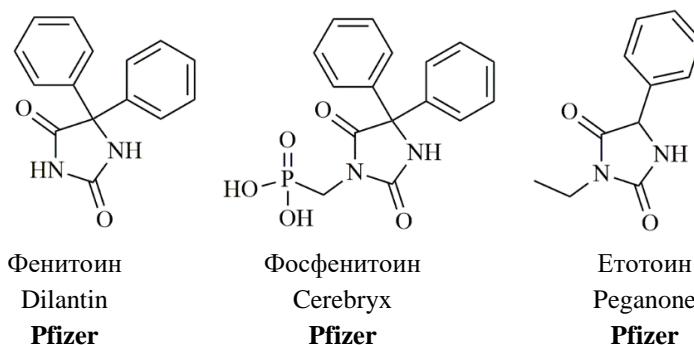
Хидантоини су познати антиконвулзанти у клиничкој пракси и користе се у третману епилепсије. Први хидантоин широко примењен у медицини је 5-етил-5-фенилхидантоин, познат као нирванол. Овај хидантоин, прво коришћен као хипнотик,⁷¹ има исти интензитет деловања као фенобарбитал (5-етил-5-фенилбарбитурат), али је мање токсичан. Нирванол је коришћен и у третману хореје, јер се сматрало да је безопасан у ретким, неучесталим дозама.⁷² Ипак, учестала нежељена дејства, као што су висока температура и ангиоедем, који се чак понекад у року од 24 часа ширио по читавом телу, су довели до његовог повлачења из употребе.⁷³

Најчешће коришћен хидантоински антиконвулзанти и свакако најпознатији међу хидантоинским лековима је фенитоин, 5,5-дифенилхидантоин (Слика 6), познат још по именима дилантин (Dilantin, Pfizer) и епанутин (Epanutin, Parke-Davis).¹⁴ Натријумова со фенитоина, која се чешће употребљава, је позната под називима натријум-дифенилхидантоат, дилантин натријум, фенитоин натријум или дифантоин. Такође се користи у облику калцијумове соли или у комбинацији са натријум-бикарбонатом под именом зентропил (Zentropil, Sandoz Pharma). Мерит (Merritt) и Путнам (Putnam) су први предложили употребу дилантина у третману епилепсије.⁷⁴ Они су испитали разне фенол деривате за антиконвулзивну активност и нашли су да је дифенилхидантоин најефикаснији антиконвулзанти, са најмањим хипнотичким дејством од свих тестираних једињења.⁷⁵ После додатних клиничких испитивања,⁷⁶ убачен је 1939. године од стране Америчког медицинског друштва (American Medical Association) на листу нових незваничних лекова.⁷⁷ Као и код нирванола, примењена су одређена нежељена дејства, као што су атаксија, диплопија, нистагмус, мучнина и недостатак витамина С.⁷⁸⁻⁸¹ Дилантин је предложен и за

коришћење у третману хипоксије, мања кисеоника насталог због боравка на великим надморским висинама.⁸²

Откриће наркотичког и хипнотичког дејства нирванола је довело до испитивања разних 5,5-дисупституисаних хидантоина, сличне физиолошке активности. Испитивањем серије 5,5-диалкил хидантоина је нађено да је 5,5-дипропилхидантоин добар хипнотик са малом токсичношћу, док 5,5-диизобутилхидантоин има малу активност.⁸³ Међу 5-алкил-5-фенилхидантоинима, пропил и изобутил деривати имају приближну наркотичку активност као нирванол, док изопропил и *n*-бутил нису активни. Показано је да је 5-фенил-5-метилхидантоин приближно ефикасан као нирванол, а упола мање токсичан, а да је 5,5-циклопентилметилхидантоин токсичан као нирванол, а потпуно неактиван као хипнотик. Испитивањем серије фенилалкилхидантоина уочено је да су етил и пропил деривати ефикасни хипнотици, али се активност смањује са повећањем алкил групе.⁸⁴ Покушаји да се фенил група замени нафтил или фенантрин групом, у циљу добијања активнијих, а мање токсичних деривата, су били неуспешни. Није нађено да дифенилхидантоин има наркотичко дејство. Док је дилантин нашао примену углавном у третману епилепсије, многи други хидантоини су такође испитивани као могући антиконвулзанти. Од ових деривата, најбоље су се показали 5-фенил-5-фенилетилхидантоин, 5-фенил-5-пропоксиметилхидантоин и 5-фенил-5-изопроксиметилхидантоин, 5,5-диизобутилхидантоин, 3-метил-5-етил-5-фенилхидантоин и 5-алкил-5-(2-тиенил)хидантоини.⁸⁵

Поред фенитоина, у комерцијалну употребу је ушао и његов пролек који је растворан у води, фосфенитоин (Слика 6), у облику своје натријумове соли (компанија Erfa) 2000. године, а затим под именом Cerebryx (компанија Pfizer) 2013. године. Етотоин (3-етил-5-фенилхидантоин, Слика 6) је антиепилептик комерцијализован као Peganone (компанија Recordati) још 1957. године. Његов главни метаболит је 5-фенилхидантоин, чији је механизам деловања аналоган фенитоину. Ипак, за разлику од фенитоина, етотоин не подиже нормални праг напада, већ га стабилизује и спречава ширење напада.



Слика 6. Хидантини у клиничкој употреби као антиконвулзанти.

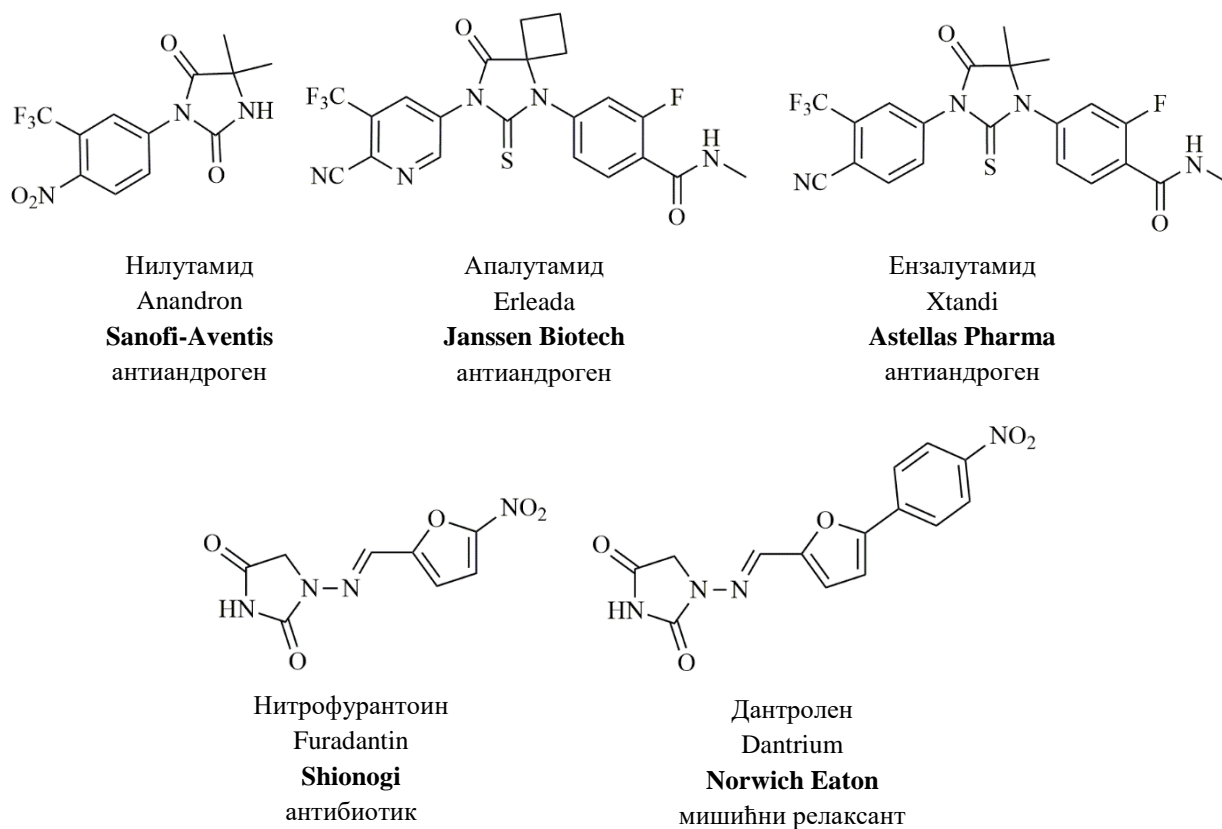
Поред употребе као антиконвулзанти, хидантоини су у клиничкој пракси нашли и друге примене. Нилутамид (Слика 7) је нестероидни антиандроген који се користи у третману рака простате. Комерцијализован је као Anandron (компанија Sanofi-Aventis) 1996. године.¹⁵ Његова синтеза обухвата *N*3-алкиловање 5,5-диметилхидантоина са 4-нитро-3-трифлуорометилфенил-хлоридом у присуству бакар(I)-оксида. Његов афинитет према андрогеним рецепторима доводи до блокирања адреналних и простатних андрогена и инхибира раст ткива простате.

Апалутамид (Слика 7) је нестероидни антиандроген друге генерације, дериват нилутамида, који се такође користи у третману рака простате.¹⁶ Комерцијализован је под називом Erleada од стране Janssen Biotech компаније. Користи се уз кастрацију у третману неметастатског рака простате отпорног на кастрацију.⁸⁶

Ензалутамид (Слика 7) је такође нестероидни антиандроген друге генерације, дериват нилутамида, који се користи у третману рака простате.^{87,88} Комерцијализован је под називом Xtandi од стране Astellas Pharma компаније. Користи се уз кастрацију при лечењу метастатског рака простате отпорног на кастрацију,⁸⁹ неметастатског рака простате отпорног на кастрацију⁹⁰ и метастатског рака простате осетљивог на кастрацију.⁹¹

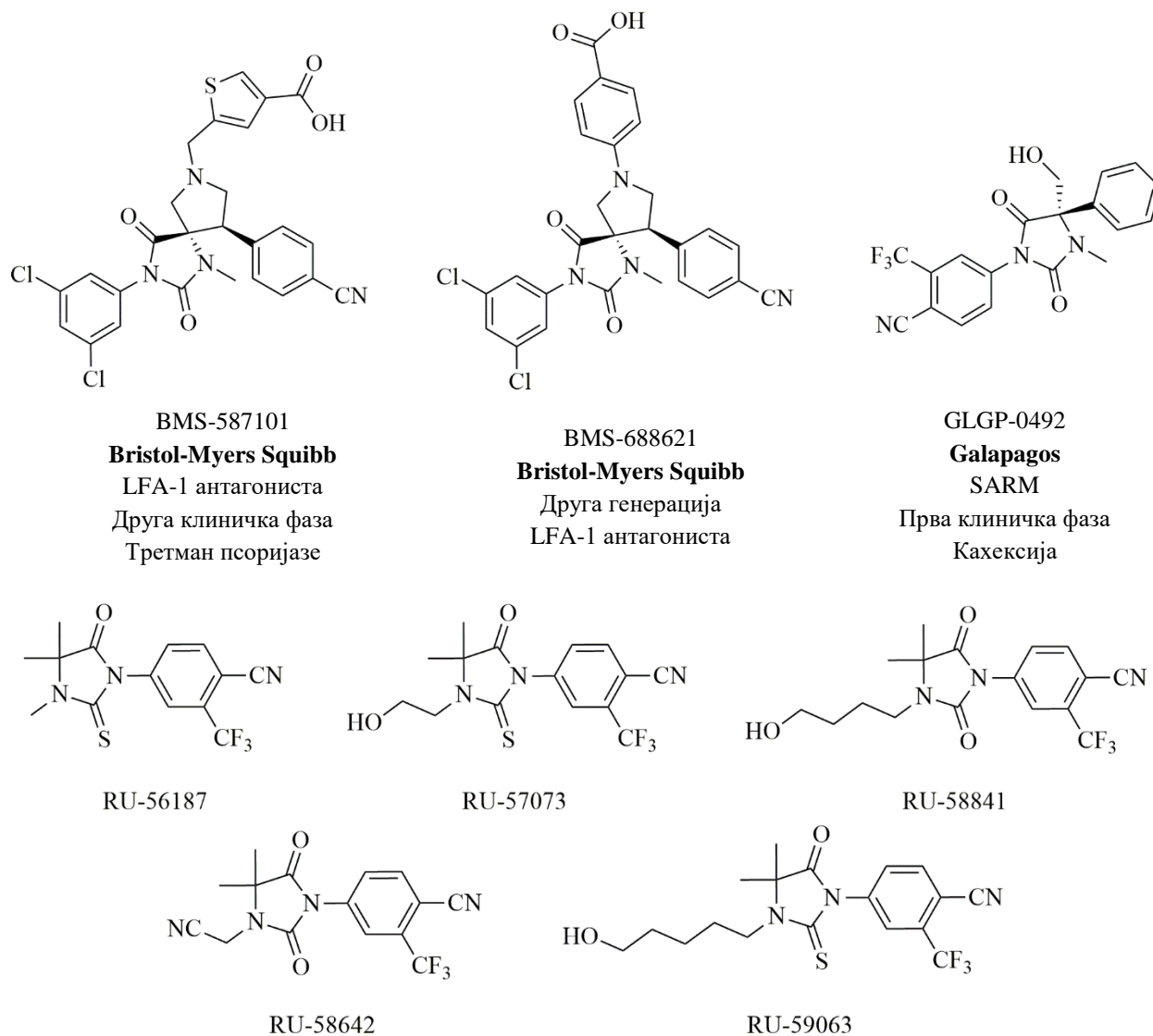
Осим претходно наведених биолошких активности, неки хидантоини су показали да имају и антибактеријско дејство. Нитрофурантоин (Слика 7), кога је прво комерцијализовала компанија Shionogi Inc. под именом Furadantin 1953. године, још увек представља једини клинички одобрени хидантоински антибиотик. Овај антибиотик се користи у третману инфекција уринарног тракта, изазваних како Грам-позитивним, тако и Грам-негативним бактеријама. Механизам његовог деловања обухвата редукацију од стране ензима, као што су бактеријски флавопротеини, при чему се стварају реактивни интермедијери који оштећују ДНК и протеине самих бактерија.

Дантролен (Слика 7) је структурни аналог нитрофурантоина. Комерцијализован је као Dantrium од стране компаније Norwich Eaton 1979. године и користи се као мишићни релаксант, као и за спречавање малигне хипертермије.



Слика 7. Остали хидантоини у клиничкој употреби.

Поред хидантоина који се већ налазе у клиничкој пракси, неки деривати хидантоина се налазе у клиничким истраживањима. BMS-587101 (Слика 8) је спироциклични хидантоин развијен од стране Bristol-Myers Squibb компаније који показује биолошку активност у домену функције леукоцита као антиген-1 (LFA-1) антагониста.⁹² Овај кандидат је стигао до друге фазе клиничких испитивања у третману умерене и тешке псоријазе. Затим, клинички кандидат, LFA-1 антагониста друге генерације, BMS-688521 (Слика 8), поседује четири до осам пута већу активност *in vitro* и *ex vivo* у односу на BMS-587101, највише због додатних интеракција са жељеним рецептором.⁹³ За сада нису започета клиничка испитивања на овом једињењу.



Слика 8. Структуре хидантоина у клиничким истраживањима.

GLGP-0492 или 3-(3-цијано-2-трифлуорометилфенил)-5-хидроксиметил-1-метил-5-фенилхидантоин (Слика 8) је развила компанија Galapagos. Ово једињење је синтетисано Бучерер-Бергсовом (Bücheler-Bergs) реакцијом праћеном дуплом супституцијом азотових атома и прошло је кроз прву фазу клиничких испитивања 2012. године.⁹⁴ Тестирано је као

селективни модулатор андрогених рецептора (SARM, од енгл. Selective Androgen Receptor Modulator) који треба да помогне при синтези мишићних протеина у случају кахексије, губљења мишићне масе и телесне тежине повезаних са канцером, хроничном опструктивном болести плућа, сидом, имобилизацијом или старошћу. Сагледане су безбедност и фармакокинетика лека и клиничка испитивања за кахексију су прекинута. Међутим, GLGP-0492 је показао значајне преклиничке резултате у испитивању примене у третману Дишенове (Duchenne) мишићне дистрофије, али клиничка испитивања још увек нису отпочела.

RU-56187, RU-57073, RU-58841, RU-58642 и RU-59063, су *N*-супституисани арил(тио)хидантоински нестероидни антиандрогени који, осим RU-58841, никада нису комерцијализовани, јер нису прошли даље од прве фазе клиничких студија (Слика 8).⁹⁵⁻⁹⁸ RU-56187 поседује 92% афинитета према андрогеном рецептору у односу на тестостерон и благи афинитет према неким другим рецепторима стероидних хормона.⁹⁸ RU-56187 је три до десет пута потентнији антиандроген од бикалутамида и нилутамида *in vivo* код животиња.⁹⁵ RU-57073 има 163% афинитета према андрогеном рецептору у односу на тестостерон.⁹⁵ RU-58642 је у тренутку открића био један од најпотентнијих антиандрогена.⁹⁷ Испитивана је могућност његове топикалне примене у лечењу андрогене алопеције, али су ова испитивања заустављена након прве клиничке фазе.⁹⁹ RU-59063 има врло велики афинитет према људским андрогеним рецепторима, чак осам пута већи него тестостерон.⁹⁸ RU-58841 је направила француска фармацеутска компанија „Roussel Uclaf“ и испитиване су могућности његове топикалне примене у лечењу андроген-зависних стања, као што су акне, опадање косе, као и претерани раст косе.⁹⁶ Иако RU-58841 није прошао све фазе клиничких испитивања и није званично одобрен терапеутик, на тржишту се могу наћи разни производи који га садрже, чији произвођачи тврде да се могу користити за лечење опадања косе.

Поред наведених биолошких активности, хидантоини су показали и антитуморску активност. Они остварују своју антитуморску активност на разне начине, укључујући антипролиферативно дејство,¹⁰⁰⁻¹⁰² инхибицију сиртуина,¹⁰³ инхибицију анти-апоптотичких протеина Bcl-2 (од енгл. B-cell lymphoma-2),¹⁰⁴ модулацију андрогених рецептора,^{94,105} инхибицију NADPH оксидазе,¹⁰⁶ инхибицију моторних кинезина,¹⁰⁷ пролил хидроксилазе,¹⁰⁸ као и Р-гликопротеина MDR (од енгл. multidrug resistance) ефлуксне пумпе Т-ћелијског лимфома.¹⁰⁹ Одређени деривати тиохидантоина су се показали као ефикасни инхибитори изоцитрат дехидрогеназе (активни у наномоларним концентрацијама)¹¹⁰ и ДНК топоизомераза (са 5-6 пута већом специфичношћу од камптотецина, познатог инхибитора).¹¹¹

Хидантоини су се показали и као ефикасни антиинфламаторни агенси. Инфламација је комплексан биолошки одговор васкуларног ткива на штетне стимулансе и хидантоини могу показати антиинфламаторну активност на више начина, као што су инхибиција конвертујућег ензима фактора-алфа некрозе тумора,¹¹² инхибиција аргинин деиминазе¹¹³ и инхибиција матрикс металопротеиназе 13.¹¹⁴

Хидантоини су се такође показали као потентни агенси против неких метаболичких болести, као што су болести јетре и дијабетес мелитус тип 2. Ефикасни су антагонисти фарнезоид X рецептора (од енгл. farnesoid X receptor)¹¹⁵ и рецептора X јетре (од енгл. liver X receptor)¹¹⁶ и инхибитори натријум глукоза котранспортера 2¹¹⁷ и тирозин фосфатазе 18.¹¹⁸

Као што је раније поменуто, (тио)хидантоини поседују и одређена антимикробна својства. Показују антибактеријску активност против клинички релевантних Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија, као што су метицилин резистентни *Staphylococcus aureus*, метицилин резистентни *Staphylococcus epidermidis*, ванкомицин резистентни

Enterococcus faecalis, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* и *Acinetobacter baumannii*.^{8,119–122} Механизам њиховог деловања обухвата компромитовање бактеријских мембрана, инхибицију антибиотичке ефлуксне пумпе,¹²³ као и инхибицију с-ди-АМР синтазе.^{124,125}

Поред антибактеријске активности, деривати (тио)хидантоина су показали антипаразитска својства, као што су активности према плазмодијуму (лат. *Plasmodium*, изазивач маларије)¹²⁶ и *Trypanosoma brucei* (трипанозомијаза, болест спавања).¹²⁷

Такође, неки деривати хидантоина показују и антифунгалну активност.^{128,129} Хлордантоин, 5-(1-етилпентил)-3-(трихлорометил)тио)хидантоин, је антифунгални агенс коришћен шездесетих година прошлог века за лечење површинске вагиналне кандидијазе.^{130,131} Комерцијализован је под именом Sporostacin од стране компаније Ortho Pharmaceutical и коришћен топикално у облику креме. Убрзо је, међутим, повучен из употребе због проналаска ефикаснијих антифунгалних агенаса,¹³² као и због честе појаве нежељених ефеката, као што је алергијски дерматитис.¹³³ Данас се ниједан хидантоин не налази у употреби као антифунгални агенс.

Биолошке активности 2-селенохидантоина, најмлађих чланова породице хидантоина су најмање истражене. Деривати 2-селенохидантоина показују антитуморску активност, која је повезана са антиоксидативним особинама које потичу од атома селена у њиховој структури.¹³⁴ Показују активност сличну глутатион пероксидази, при чему смањују количину пероксида. Поред тога, постоји могућност примене 2-селенохидантоинских агенаса у лечењу хроничних кардиоваскуларних болести изазваних недостатком селена.¹³⁵

Познато је и да хибридни деривати хидантоина, који у својој структури поред хидантоинског језгра садрже и друге фармакофоре, показују одређене биолошке активности. Међу њима се налазе деривати као што су барбитуратни хидантоини,¹³⁶ 5-сулфаниламидохидантоини,¹²⁸ *p*-фенолхидантоини¹³⁷ и хидантоини изведени из кининских алкалоида.¹³⁸ На пример, 2-бакармеркапто-3-фенилхидантоин-5-сирћетна киселина представља агенс са могућом применом у третману туберкулозе и неких заразних болести.¹³⁹

На крају, деривати 2-тиохидантоина су показали антимеланогену активност кроз инхибицију тирозиназе.^{140,141} Показали су већу ефикасност инхибиције од којичне киселине, познатог инхибитора, који се користи у козметици за избелјивање коже. Њихова способност инхибиције меланогенезе отвара могућност стварања нових агенаса у третману хиперпигментационих поремећаја коже. До сада ниједан дериват хидантоина није коришћен у ову сврху. Како постоји потреба за новим, ефикаснијим и безбеднијим агенсима у третману хиперпигментационих поремећаја коже, део истраживања унутар ове дисертације се управо бави темом антимеланогене активности деривата 2-тиохидантоина. Ова тема је детаљније дискутована заједно са резултатима у поглављу 2.3.

1.5. Друге примене хидантоина

Хидантоини и тиохидантоини су осим медицинске нашли и разне друге примене. Хидантоини растворни у води су нашли примену у штампању текстила,^{142,143} као катализатори у полимеризацији 1,3-бутадиенских угљоводоника¹⁴⁴ и у добијању смола и пластичних маса са формалдехидом.¹⁴⁵ Индоксил и индиго се добијају из 1-фенилхидантоина са оксидом метала¹⁴⁶ или са алкалним хидроксидима или амидима.¹⁴⁷ Хидролизом 1-фенилхидантоина се добија *N*-фенилглицин, који се даље преводи у индоксил

и индиго. Пропионски дериват хидантоина је ефикасан стимулатор раста корења, скоро ефикасан као хетероауксин (3-индолсирћетна киселина), мада одговарајући 2-тиохидантоин не показује овај ефекат.

Хлоровани хидантоини се могу користити као средства за избељивање, антисептици и гермициди.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ Из хлорованих хидантоина се може добити гермицидна смеша за испирање, стабилна током дужих временских периода када се складишти у чврстом стању чак и на вишим температурама и већој влажности. Она задржава своја гермицидна својства и у присуству базних детерџената.¹⁵¹ Хлоровани хидантоини се још користе као катализатори у полимеризацији метил-метакрилата,¹⁵² стабилизатори полимера винил-хлорида¹⁵³ и у пептизацији угљоводоника диенског типа.¹⁵⁴ Дитиохидантоини су нашли примену као инхибитори корозије метала при пикловању, инсектициди и интермедијери приликом добијања смола.¹⁵⁵ Хидантоини поседују и одређена фотофизичка својства због којих су нашли примену као оптички реагенси. 2-Тиохидантоини се користе као реагенси за флуоресцентно означавање протеина,¹⁵⁶ као и флуоресцентни сензори за катјоне^{157,158} и анјоне,¹⁵⁹ док се хидантоини користе као флуоресцентни биосензори за гуанинске базе.¹⁶⁰

1.6. Физичке особине хидантоина

Хидантоин је бела, чврста, кристална супстанца са високом тачком топљења (217-218 °C). Деривати хидантоина са супституисаним атомима азота имају ниже тачке топљења од несупституисаних, због умањене способности грађења интермолекулских водоничних веза и већег удела неполарних интеракција, које су по природи слабије од водоничних веза.²

Хидрофилност хидантоина потиче од присуства поларних група унутар њихове структуре у прстену, па су зато добро растворљиви у топлој води, етанолу, сирћетној киселини и алкалијама.² Хидрофилност се смањује увођењем неполарних супституената, па се вишеструко супституисани хидантоини растварају у органским растварачима. Тиохидантоини су мање растворни од својих кисеоничних аналога (поготово супституисани) и растварају се у уобичајеним органским растварачима.

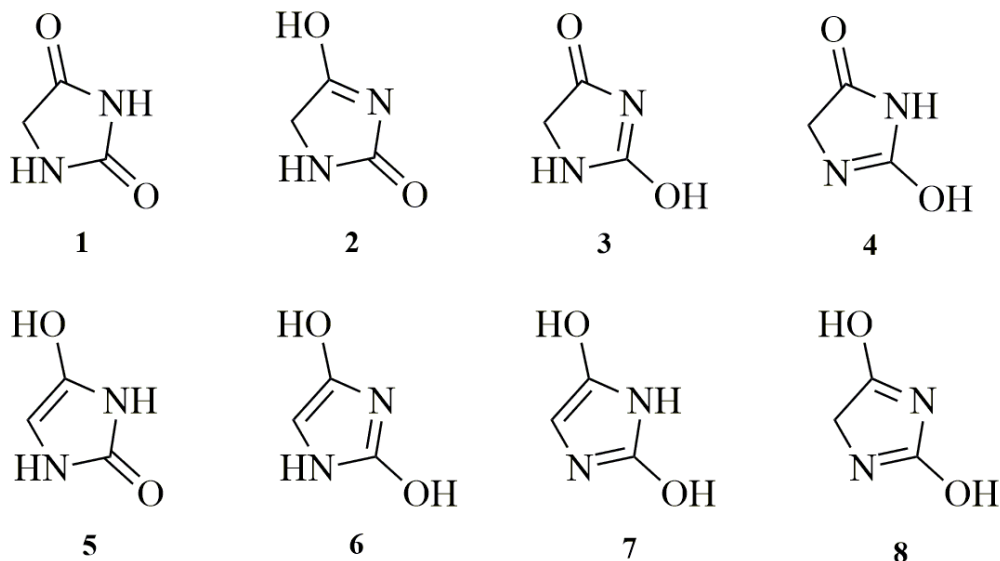
1.7. Хемијске особине хидантоина

1.7.1. Таутомерни облици хидантоина

Одређени типови реакција хидантоина се могу објаснити постојањем таутомерних облика. Ови таутомерни облици обухватају амидо-индол и кето-енолне таутомере приказане на Слици 9.

Неки од ових облика, поготово **3** и **4**, су од нарочитог значаја при објашњавању реакција 2-тиохидантоина. Облици **5**, **6** и **7**, у којима је присутна енолизација на положајима 4 и 5, се користе за објашњавање рацемизације оптички активних хидантоина са асиметричним C5 угљениковим атомом.

Очигледно је да 2-тиохидантоини лако прелазе у облик **3**, пошто се алкиловањем 2-тиохидантоина добијају 2-алкилмеркапто деривати.¹⁶¹ Потпуна разлика у апсорпционим спектрима 2-тиохидантоина и хидантоина показује да они имају различите облике, највероватније **1** и **3**.



Слика 9. Таутомерни облици хидантоина.

1.7.2. Киселост хидантоина

Хидантоини су слабе киселине чија киселост потиче од дисоцијације протона везаног за азот у положају 3, јер је у том случају могућа максимална делокализација негативне шарже.² Незасићени хидантоини, као што су 5-арилден или 5-етоксикарбонил-метилиденхидантоини могу да се депротонују на азоту у положају 1, градећи анјон који се може делокализovati преко супституента у положају 5.¹⁶²

Пошто је тиокарбонилна група јача електрон-привлачна група од карбонилне, 2-тиохидантоини ($pK_a = 8,5$) су мало јаче киселине од хидантоина ($pK_a = 9,12$).¹⁶³ 4-тиохидантоини су слабије киселине од 2-тиохидантоина, док су 2,4-дитиохидантоини јаче.¹⁶⁴ Алкил супституенти на положајима 1 и 5 не утичу значајно на константу киселости, док арил и неки други електрон-привлачни супституенти повећавају киселост хидантоина.^{2,165} 3-Супституисани хидантоини не показују никакву киселост у воденим алкалијама, док су 3-супституисани тиохидантоини јако слабе киселине ($pK_a \sim 11$).

1.7.3. Хидролиза

Дугогодишња испитивања односа цикличних и ацикличних уреида су довела до сазнања да су циклични стабилни у присуству разблажене хлороводоничне киселине и преводе се у ацикличне у базној средини. Повратни процес, циклизација, врши се у разблаженом раствору минералне киселине (Схема 3).

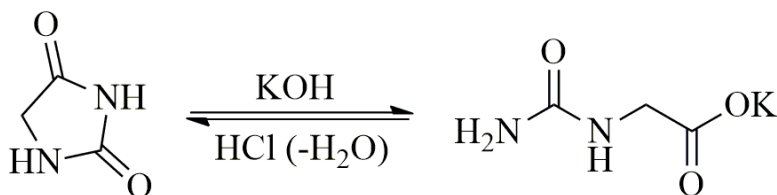


Схема 3. Хидролиза/циклизација хидантоина.

Када се хидантоини дуго загревају са великим вишком јаке базе у воденој средини, добијају се α -аминокиселине, па и оне које је често тешко добити другим методама (Схема 4). Недостатак ове процедуре је то што се не добијају оптички чисте аминокиселине, већ рацемске смеше.²

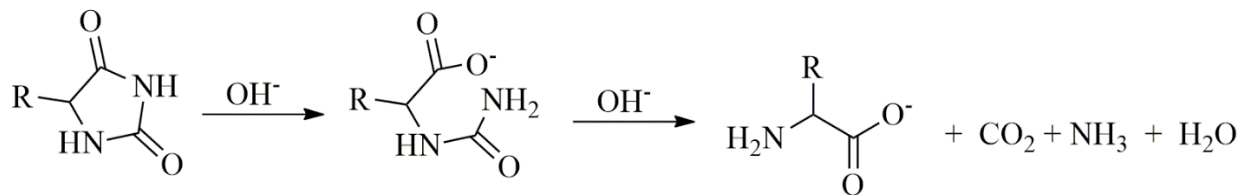


Схема 4. Хидролиза хидантоина до α -аминокиселина.

1.7.4. Увођење супституената у хидантоински прстен

1.7.4.1. Супституција на азотима у положајима 1 и 3

N-Супституисани хидантоини се генерално припремају синтезом из једињења које садржи одговарајући супституент већ везан за азот. Ипак, супституенте је могуће и накнадно увести у дате положаје. Постоје одређена ограничења, пошто се хидантоини супституисани у положају 1 не могу добити директним алкиловањем. *N*3-Арил хидантоини се такође добијају другим методама, углавном из арил-изоцијаната и аминокиселина.

Хидантоини се могу алкиловати у положају 3 алкил-халогенидима у алкалном раствору. Загревањем 5-фенилхидантоина са метил-јодидом у присуству једног еквивалента калијум-хидроксида у метанолу, добија се 3-метил-5-фенилхидантоин (Схема 5).¹⁶⁶

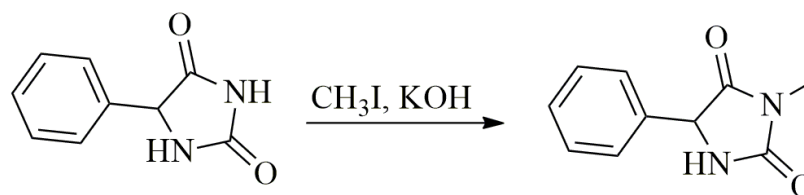


Схема 5. Метиловање 5-фенилхидантоина у положају 3.

Док се *N*3 алкиловање одвија лако, увођење супституента у положај 1, реакцијом са алкил-халогенидом у алкалном раствору, не може се извести код хидантоина који немају двоструку везу или фенил групу на *C*5 атому. Када су овакве групе присутне на *C*5 атому, *N*1 положај се активира и може бити алкилован.¹⁶⁶ *N*3 положај је ипак још увек активнији. Када се користи један еквивалент метил-јодида и базе, алкиловање се врши само у положају 3. Међутим, када се користе 2 еквивалента, добија се 1,3 диметил производ.¹⁶⁷ *N*3-Метил-5-бензалхидантоин има кисели карактер док *N*1-метил-5-бензилхидантоин нема. Могу се увести различите групе у положај 1 у реакцији незасићеног деривата хидантоина 3-метил-5-бензалхидантоинског типа и различитих халогенских деривата. На пример, етил-(3-метил-5-анизалхидантоин-1-ацетат) се добија у реакцији 3-метил-5-анизалхидантоина и етил-хлорацетата у алкохолном раствору (Схема 6).

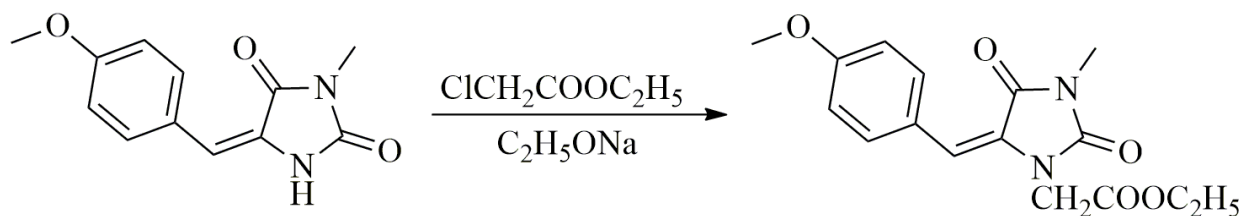


Схема 6. *N1* алкиловање, синтеза етил-(3-метил-5-анизалхидантоин-1-ацетата).

Реакција са формалдехидом не прати уобичајени ток *C5* кондензације која се иначе одиграва код ароматичних алдехида, али укључује супституцију у положају 1.⁵⁷ Када се 5,5-дисупституисани хидантоини третирају формалдехидом у присуству концентроване хлороводоничне киселине добија се 1,1'-метилендихидантоин (Схема 7).¹⁶⁸

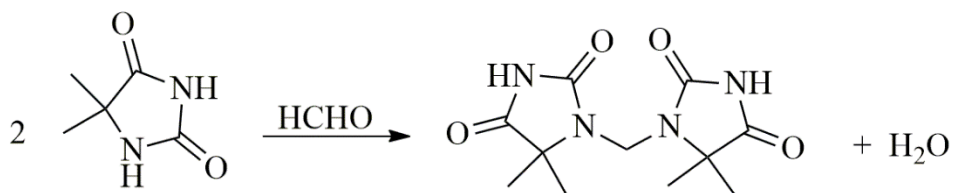


Схема 7. Реакција са формалдехидом, добијање 1,1'-метилендихидантоина.

1.7.4.2. Супституција на угљенику у положају 5

Многи *C5* супституисани хидантоини се добијају коришћењем одговарајућих супституисаних једињења у разним синтезама које доводе до грађења хидантоина. Међутим, могу се добити и директном кондензацијом хидантоина или супституисаних хидантоина који имају слободну метиленску групу у положају 5 са ароматичним алдехидима или другим једињењима која реагују са активираним метиленским групама. На пример, хидантоин се може кондензовати са бензалдехидом, дајући 5-бензалхидантоин (Схема 8).¹⁶⁹

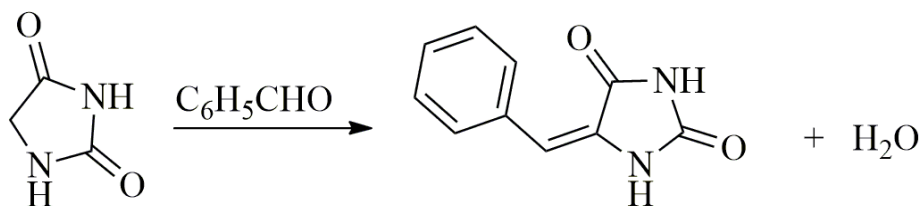


Схема 8. Кондензација хидантоина и бензалдехида.

2-Тиохидантоини такође подлежу кондензацији овог типа и често се брже и лакше кондензују од одговарајућих хидантоина.¹⁷⁰ Супституисани алдехиди, као што је фенилацеталдехид и *p*-метоксифенилацеталдехид се неће кондензовати са хидантоинима. Хептанал се може кондензовати. Успешне кондензације су извршене и са α,β -незасићеним алдехидима, циметалдехидом и α -хидрокси метиленфенилацеталдехидом.

Кондензацијом 2-тиохидантоина са различитим ароматичним нитрозо и изонитрозо једињењима се добијају интензивно обојена једињења растворна у разблаженим алкалијама.¹⁷¹ На пример, загревањем 2-тиохидантоина у ацетанхидридном раствору нитрозобензена добија се кондензациони производ тамно браон боје (Схема 9).

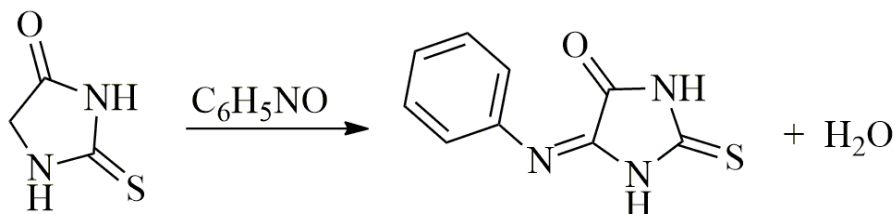


Схема 9. Кондензација 2-тиохидантоина и нитрозобензена.

Бромовањем хидантоина који има један несупституисан водоников атом у положају 5, замењује се тај водоник. Ако је структура групе везане у положају 5 таква да то дозвољава, елиминисаће се бромоводоник и настаће незасићени дериват хидантоина (Схема 10).¹⁷²

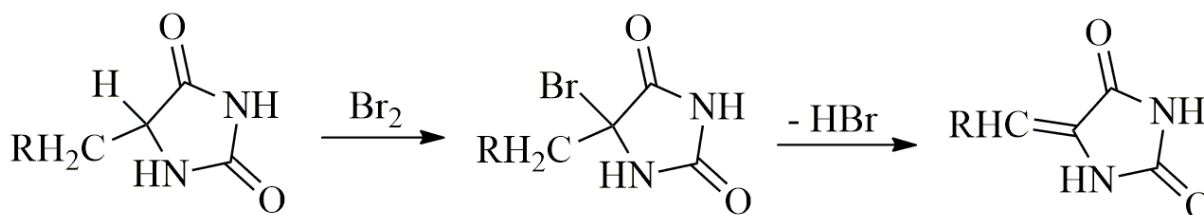


Схема 10. Бромовање хидантоина, добијање C5 незасићеног деривата.^{2,172}

Када се бромује 5-фенилхидантоин у сирћетној киселини, настаје 5-бром-5-фенилхидантоин. Његовом хидролизом у врућој води настаје 5-фенил-5-хидроксихидантоин (Схема 11).

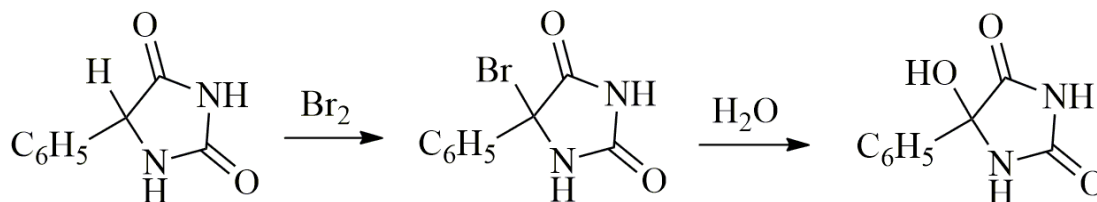


Схема 11. Бромовање и хидролиза хидантоина, настајање хидрокси деривата.

Када се користи пола еквивалента брома у реакцији са 5-фенилхидантоином, добија се производ који садржи два хидантоинска прстена повезана преко положаја 5 и 1 (Схема 12).

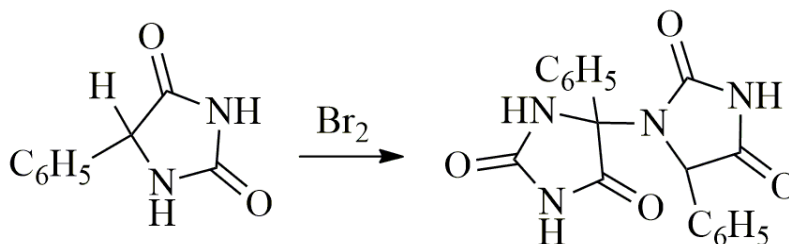


Схема 12. Бромовање хидантоина, добијање спојеног дихидантоина.

Бром се користи и за оксидацију хидантоина до парабанске киселине.¹⁷³ Хидантоин се загрева са бромном водом у затвореној цеви (Схема 13). Супституција у положају 5 повећава отпорност хидантоина према оксидацији. 5,5-Дифенилхидантоин се може рекристалисати из концентроване азотне киселине.

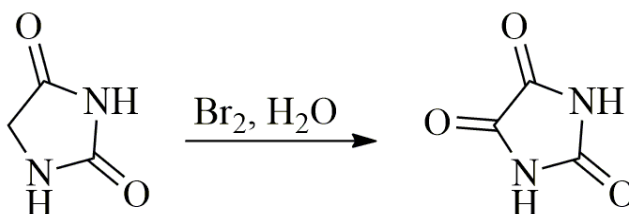


Схема 13. Оксидација хидантоина до парабанске киселине.

1.7.4.3. Реакције у положајима 2 и 4

Реакцијом 2-тиохидантоина и 2,4-дитиохидантоина са алкилујућим агенсима добијају се 2-алкилмеркапто деривати. Аналогни хидантоини обично не реагују формирањем 2-енол деривата, већ се алкиловање врши само на азотовом атому. Добијање 2-алкилмеркаптохидантоина указује на то да 2-тиохидантоини постоје у таутомерним формама (Схема 14).

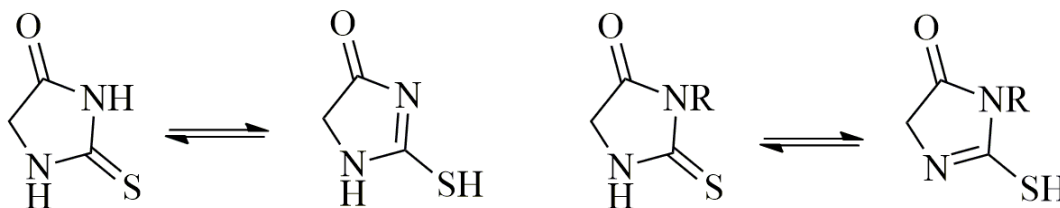


Схема 14. Таутомерне форме 2-тиохидантоина.

Такви 2-алкилмеркапто деривати су прво добијени из серије *N*3-арилтиохидантоина у реакцији са метил-јодидом у алкохолном калијум-хидроксиду (Схема 15).¹⁷⁴

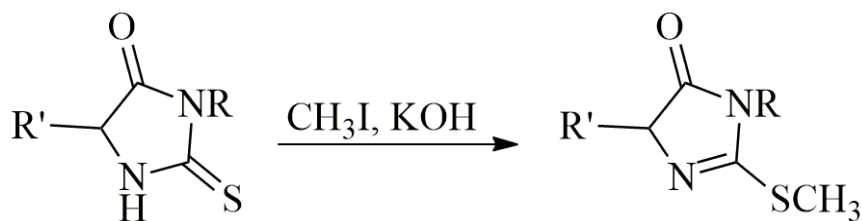


Схема 15. Алкиловање положаја 4, добијање 2-алкилмеркапто деривата.

Кисеоник у положају 4 хидантоина може да реагује са амино групом. Ово је показано на примеру 5-(2-аминобензал)хидантоина, пошто је примећено да он спонтано прелази у дериват хинолина (Схема 16).¹⁷⁵

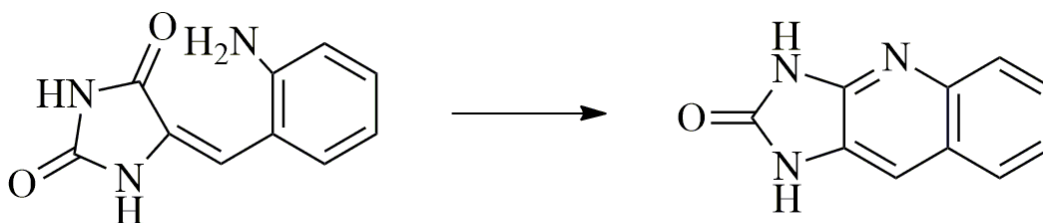


Схема 16. Добијање деривата хинолина.

1.7.4.4. Утицај супституената на стабилност хидантоинског прстена

Генерално је правило да су супституисани хидантоини много стабилнији од несупституисаних у присуству разних хидролитичких и оксидационих агенаса. Овај пораст у стабилности се може постићи супституцијом било на азотовим атомима, било у положају 5.

Супституција у положају 1 је нарочито погодна у овом смислу. Ово је илустровано чињеницом да хидантоинска киселина изведена из N1 супституисаних хидантоина лакше циклизује. Присуство супституента на оба азотова атома додатно повећава стабилност хидантоина. Могуће је изоловати уреидну киселину саркозина,¹⁷⁶ док фенилаланинуреидо дериват саркозина циклизује толико брзо да је могуће изоловати само фенилхидантоин.¹⁷⁷

Присуство супституента само у положају 3 такође повећава стабилност резултујућег хидантоина, пошто фенилтиокарбамидо деривати α -аминокиселина лако подлежу циклизацији до 3-фенил-2-тиохидантоина, док се етил-тиохидантоинати не могу превести у 2-хидантоине.¹⁷⁸ Већа стабилност N1 деривата показана је чињеницом да 1-хидантоинсирћетна киселина теже хидролизује у воденом раствору амонијака од изомерне 3-хидантоинсирћетне киселине.¹⁷⁹

Поређена је отпорност серије 5-супституисаних хидантоина на базну хидролизу.¹⁸⁰ Утврђен је следећи редослед хидантоина по растућој стабилности: 5,5-циклопропанспирохидантоин, хидантоин, 5,5-циклобутанспирохидантоин, 5-метилхидантоин, 5,5-диметилхидантоин и 5,5-диетилхидантоин. За супституцију у положају 5 је нађено да утиче и на брзину каталитичке оксидације. Испитивани хидантоини, поређани по опадајућим брзинама оксидације, тј. по растућој стабилности су: 5-фенилхидантоин, хидантоин, 5-метилхидантоин, 5-бензилхидантоин.

Даљи доказ ефекта 5-супституената на стабилност хидантоина је понашање неких хидантоинских киселина које у теорији могу да дају два производа, један који има супституент у положају 5 и други који нема. Хидантоинска киселина изведена из 5-*p*-хидроксибензилхидантоин-3-сирћетне киселине у разблаженим алкалијама циклизује дајући само аналогни 5-супституисан хидантоин, а не изомерну хидантоин-3-*p*-хидроксибензилсирћетну киселину (Схема 17).¹⁸¹

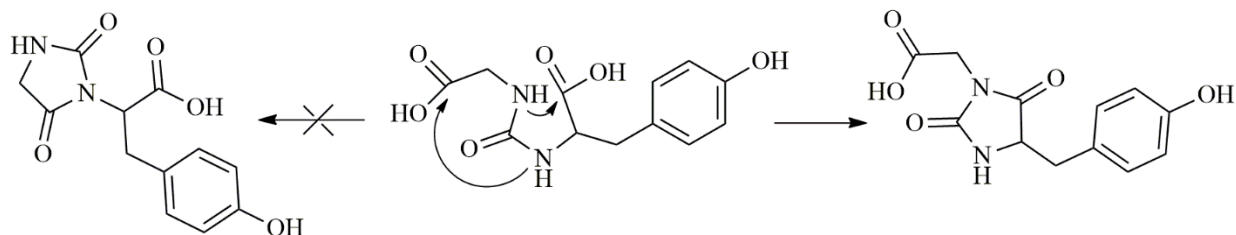


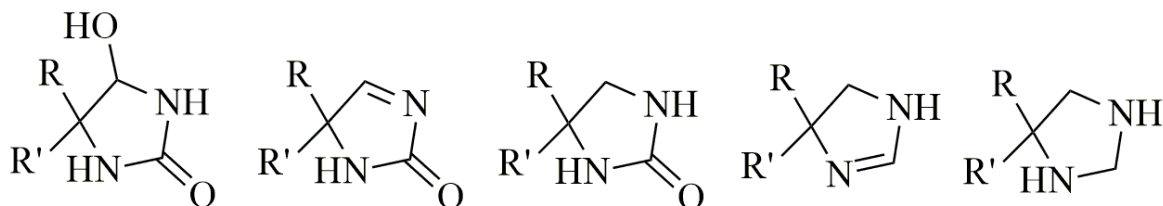
Схема 17. Циклизација 5-супституисане хидантоинске киселине.

Незасићење у положају 5 такође додатно повећава стабилност хидантоина према базној хидролизи. 5-Бензал-1-метилхидантоин теже хидролизује од 5-бензил-1-метилхидантоина.¹⁸² Слично томе, незасићени кондензациони производи 2-тиохидантоина и алдехида су значајно отпорнији према базама него несупституисан 2-тиохидантоин.¹⁸³

Док су сви хидантоини мање или више нестабилни у присуству алкалија, присуство супституената на било ком од азотових атома, као и на C5 угљениковом атому значајно повећава стабилност према киселој хидролизи. Хидантоини који поседују супституент само у положају 5, као што је 5-*p*-хидроксибензилхидантоин, се могу разградити кључањем у концентрованој јодоводоничној киселини,¹⁸⁴ док се 3,5-дисупституисани хидантоин, као што је 5-бензилхидантоин-3-сирћетна киселина, може хидролизовати у концентрованој хлороводоничној киселини на 145 °C.¹⁸⁵ Међутим, сви покушаји хидролизе 1,3,5-трисупституисаног деривата хидантоина, 3-метил-5-*p*-хидроксибензилхидантоин-1-сирћетне киселине, су били неуспешни.¹⁸⁶ Овај хидантоин је потпуно регенерисан после загревања са концентрованом хлороводоничном киселином и црвеним фосфором на 200 °C, 6-8 часова.

1.7.5. Редуција

Приликом редуције хидантоина углавном се користе литијум-алуминијумхидрид и натријум-борхидрид. Реакциони услови и супституција у положајима 1, 3 и 5 диктирају структуру производа редуције (Слика 10).²



Слика 10. Производи редуције хидантоина.²

Ако се редукција врши на собној температури, добијају се 4-хидрокси-2-имидазолидинони или одговарајући дехидратациони производи,^{2,187} а док се приликом загревања под рефлуксом добијају 2-имидазолидинони, имидазоли или имидазолидини.^{2,188}

1.7.6. Фотолиза

Хидантоини, као и друга хетероциклична једињења која поседују NCO групу су подложни фотолитичкој деградацији прстена. При фотохемијском отварању 5,5-диметилхидантоина, озрачивањем се у првом кораку врши хомолиза C4-C5 везе (Схема 18).¹⁸⁹

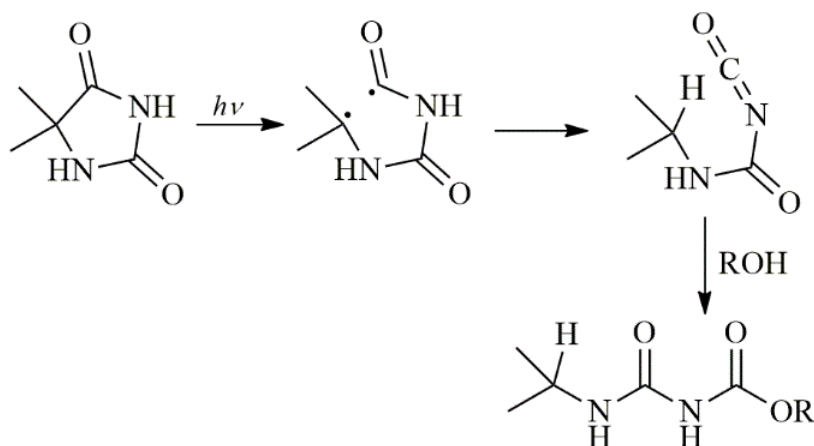


Схема 18. Фотохемијско отварање прстена 5,5-диметилхидантоина.

Ако се реакција врши у присуству бензофенона, долази до апстракције атома водоника из положаја 5 и добијени радикал се куплује са радикалом насталим из бензофенона (Схема 19).¹⁹⁰

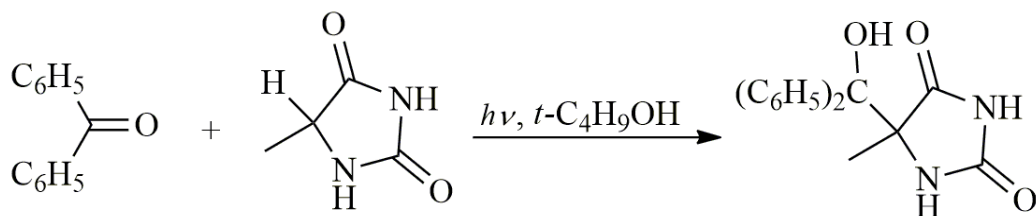


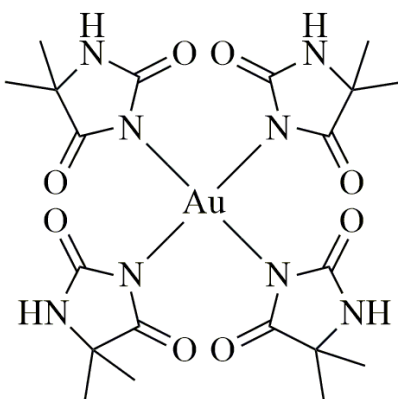
Схема 19. Фотохемијска реакција хидантоина и бензофенона.

1.7.7. Реакције са јонима метала, грађење комплекса

Хидантоини и тиохидантоини су врло погодни лиганди, како због хетероатома у прстену, тако и због хетероатома присутних у бочним низовима својих деривата. Атоми азота и (тио)карбонилне групе у прстену омогућују грађење координационих веза са великим бројем јона метала, тврђих, меких и граничних Луисових (Lewis) киселина. Такође, хетероатоми у бочним низовима њихових деривата обезбеђују додатна места за везивање и

могућност грађења комплекса разних структура, као што су хелатни, полинуклеарни и комплекси са мостним лигандима.

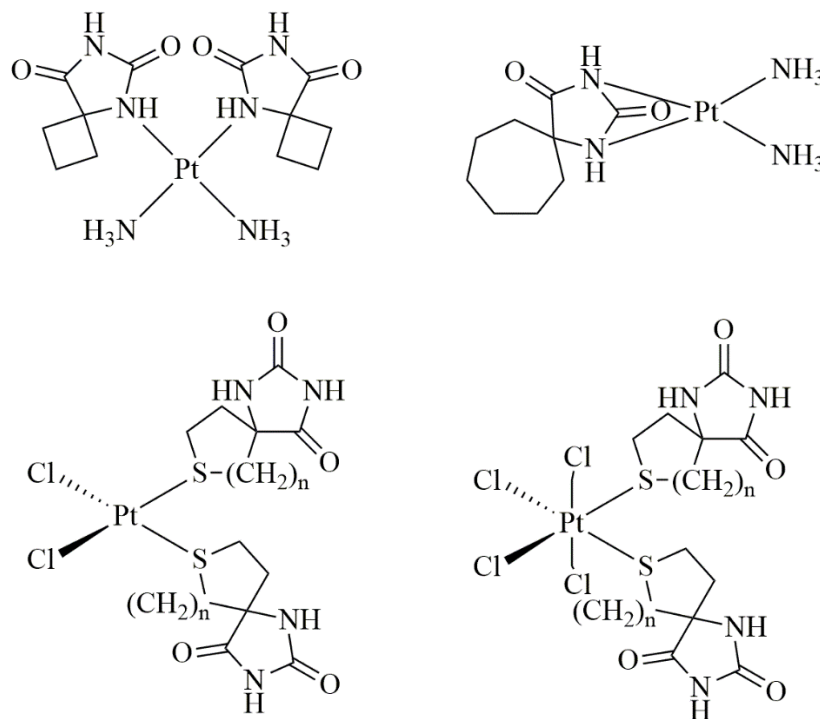
Пре свега, сам хидантоин, иако је дериват имидазола, гради комплексе са начином координације другачијим од имидазола, у зависности од рН средине. Наиме, хидантоини се у базној средини комплексирају са јонима метала као органски анјони, док се имидазоли комплексирају као неутрални молекули. Разлика лежи у структури прстена и две електрон-привлачне карбонилне групе које се налазе са обе стране азота у положају 3, које чине да се хидантоини, несупституисани у положају 3, понашају као киселине, а не базе као имидазоли. Хидантоини, несупституисани у положају 3, су слабе киселине са pK_a од 8,93, што је приближно фенолима.¹⁹¹ Управо је киселост хидантоина одговорна за нуклеофилност азотових атома у прстену и зато је, као што је већ напоменуто, супституција у положају 3 преферирана, јер је јонизовани азот N3 нуклеофилнији. Хидантоини се могу координовати за металне јоне преко азота, градећи монодентатне и бидентатне комплексе. Познато је да хидантоин може градити монодентатне комплексе, везане преко азота N3 за метале, као што су злато(I), кадмијум(II), кобалт(II), никл(II), бакар(II) и цинк(II).¹⁹² Један пример оваквог монодентатног комплекса се може видети на Слици 11, где је злато(III) координовано са четири молекула 5,5-диметилхидантоина преко азота N3.¹⁹³



Слика 11. Структура Au(III) комплекса 5,5-диметилхидантоина.

Спироциклични деривати хидантоина могу градити монодентатне и бидентатне комплексе у реакцији са цисплатином, у зависности од величине прстена. На примерима приказаним на Слици 12 се могу видети структуре таквих комплекса. Два молекула хидантоина са четворочланим спироцикличним прстеном се монодентатно везују за платину у *cis* положају преко азота N1, док је структура другог комплекса са седмочланим спироцикличним хидантоином таква, да је један молекул хидантоина везан бидентатно преко оба азота у прстену, вероватно зато што величина прстена не дозвољава везивање два молекула.¹⁹⁴ Оба комплекса су показала цитотоксичну активност на панели хуманих туморских ћелијских линија, а запажено је да изазивају апоптозу акутних (HL-60) и хроничних (BV-173) мијелоидних леукемијских ћелијских линија. Ови комплекси су, такође, показали знатно нижу нефротоксичност од цисплатине и оксалиплатине, па се сматра да ови спирохидантоински комплекси платине(II) могу потенцијално наћи примену као антинеоплазматични агенси. Међутим, када се унутар спироцикличног прстена нађе атом сумпора, координација платине се врши преко њега, што се може видети на примеру комплекса добијених у реакцији оваквог деривата хидантоина са платином(II) и

платином(IV) (Слика 12). Резултујући комплекси садрже два молекула деривата хидантоина, монодентатно везана преко сумпора у *cis* положају.



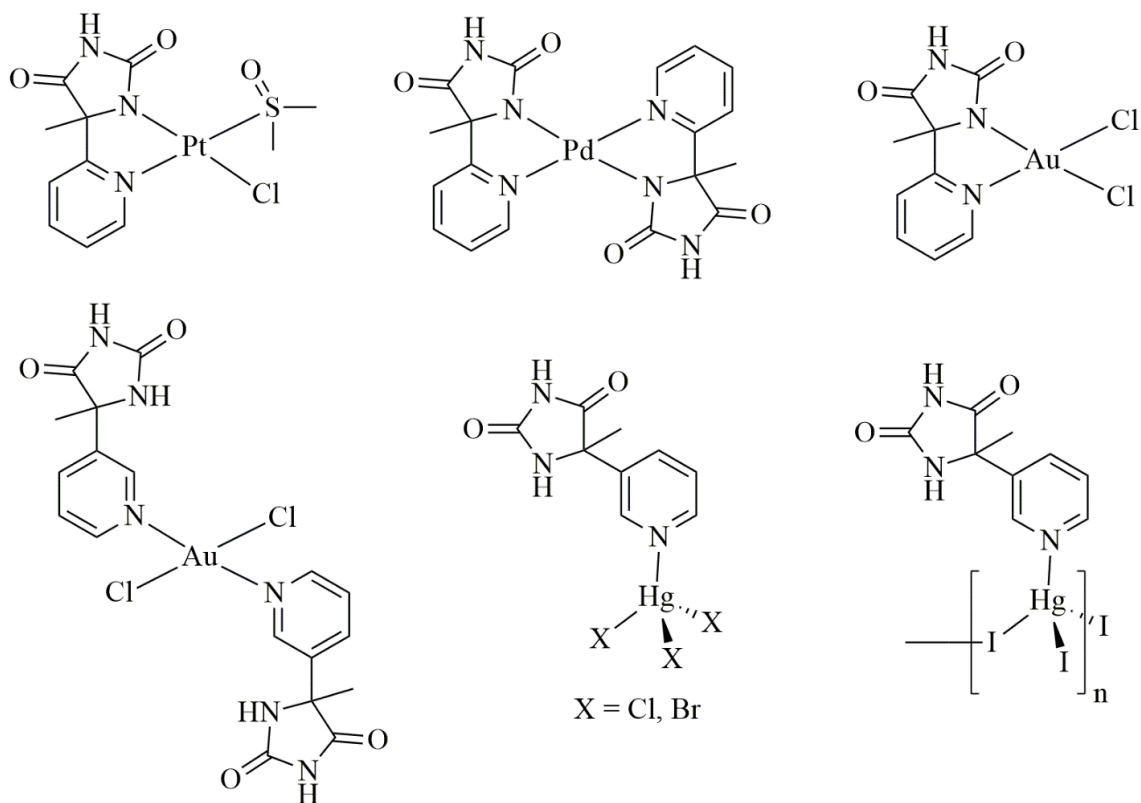
Слика 12. Структуре Pt(II) и Pt(IV) комплекса спироцикличних деривата хидантоина.

5-Метил-5-пиридинилхидантоин и његови деривати су искоришћени за добијање комплекса са разним металима, као што су платина(II), паладијум(II),¹⁹⁵⁻²⁰⁰ злато(III)²⁰¹ и жива(II).^{202,203} У зависности од положаја пиридинског прстена у односу на хидантоинско језгро, 5-метил-5-пиридинилхидантоин може градити монодентатне или бидентатне комплексе (Слика 13).

Платина(II) и паладијум(II) са 5-метил-5-(2-пиридинил)хидантоином граде хелатне комплексе, где су платина и паладијум везани бидентатно преко пиридинског азота и азота N1 у хидантоинском прстену. Ови комплекси поседују умерену антибактеријску активност, а испитивањем цитотоксичности ових комплекса на ћелијским линијама хуманог аденокарцинома дојке (MCF-7) и хуманог карцинома плућа (A-549) запажена је активност наведеног комплекса платине на MCF-7.¹⁹⁸

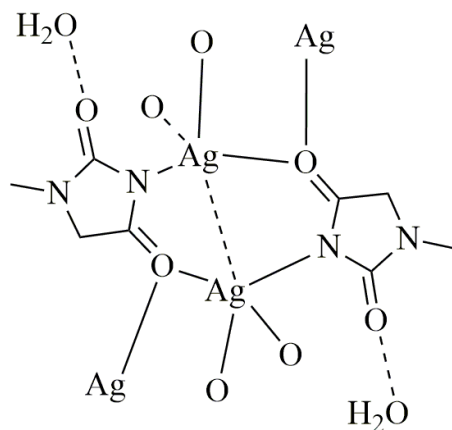
Злато(III) такође гради бидентатно координован хелатни комплекс са 5-метил-5-(2-пиридинил)хидантоином, везаним преко пиридинског азота и азота N1 хидантоинског прстена. 5-Метил-5-(3-пиридинил)хидантоин и 5-метил-5-(4-пиридинил)хидантоин, ипак, се координују монодентатно, само преко пиридинског азота.²⁰¹ Ови комплекси поседују умерену антибактеријску активност, а запажен је и дозно завистан цитотоксични ефекат на ћелијским линијама хуманог аденокарцинома дојке (MCF-7) и хуманог карцинома плућа (A-549).

Жива(II) са 5-метил-5-(4-пиридинил)хидантоином такође гради монодентатне комплексе.²⁰³ Интересантно је да се коришћењем јодида уместо хлорида и бромиди добија полимерни комплекс са јодидима као мостним лигандима. Ови комплекси су показали изузетну антибактеријску активност.



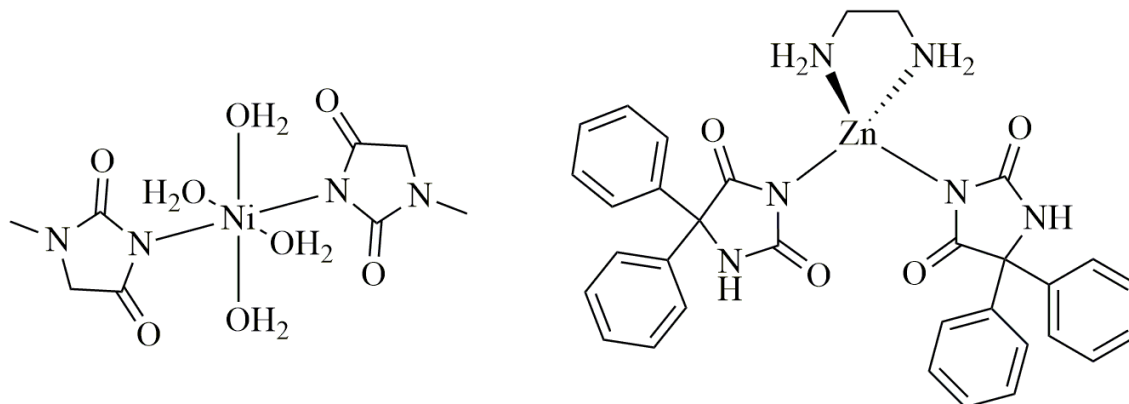
Слика 13. Pt(II), Pd(II), Au(III) и Hg(II) комплекси 5-метил-5-пиридинилхидантоина.

Синтетисани су и неки комплекси сребра(I) са хидантоином, 1-метилхидантоином, 5,5-диметилхидантоином и алантоином.²⁰⁴ Сребро је у овим комплексима координовано за хидантоински прстен преко азота N3 и карбонилног кисеоника у положају 4 (Слика 14). Ови комплекси хидантоина су показали знатну цитотоксичну активност, изузев комплекса са алантоином, чија се смањена цитотоксичност приписује координацији за азот из бочног низа.



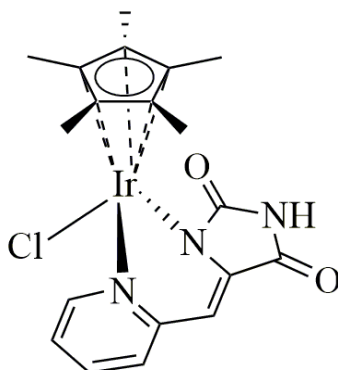
Слика 14. Молекулско паковање Ag(I) комплекса 1-метилхидантоина.

Познати су и неки хидантоински комплекси никла(II)²⁰⁵ и цинка(II).²⁰⁶ Никл и цинк су у овим комплексима координовани преко азота N3 (Слика 15).



Слика 15. Ni(II) и Zn(II) комплекси деривата хидантоина.

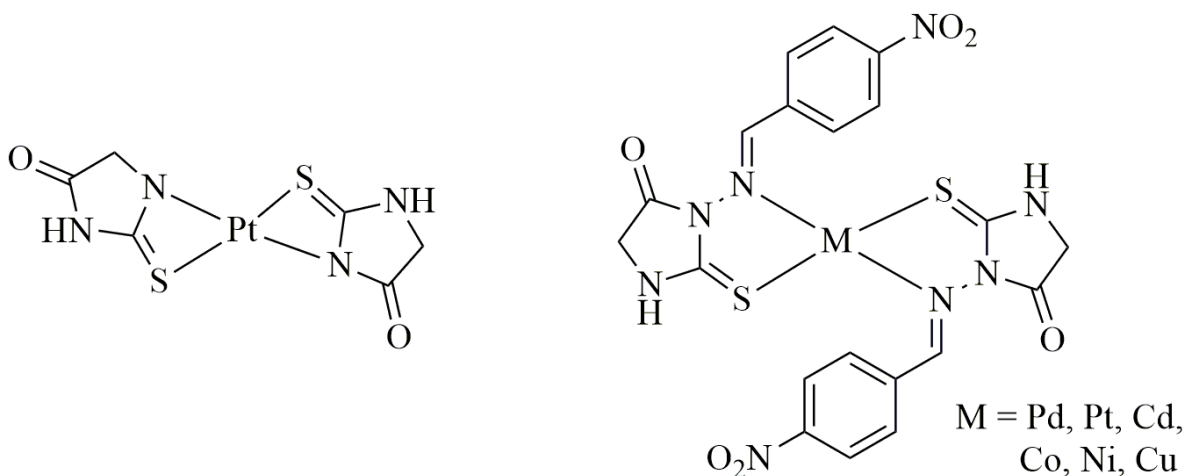
Органометални комплекс иридијума(III) са 5-(2-пиридинилметилен)хидантоином у структури, везаним бидентатно преко два азота, је синтетисан и испитиване су његове каталитичке особине у реакцији *N*-бензиловања амина бензил алкохолем (Слика 16).²⁰⁷



Слика 16. Ir(III) комплекс 5-(2-пиридинилметилен)хидантоина.

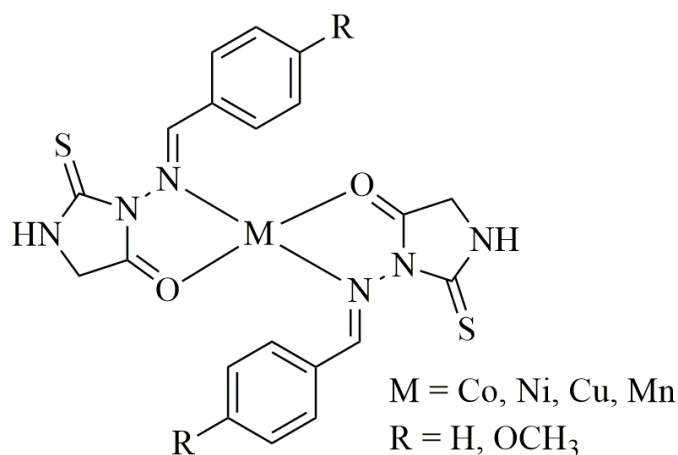
За разлику од хидантоина, 2-тиохидантоини у својој структури имају тиокарбонилни сумпор у положају 2, који представља додатно координационо место за меке и граничне Луисове киселине. Ово се јасно може видети на примеру комплекса платине и 2-тиохидантоина (Слика 17).²⁰⁸ За разлику од хидантоина, који са меким киселинама гради монодентатно координоване комплексе преко азота, 2-тиохидантоин са меким киселинама, као што су паладијум и платина, гради бидентатно координоване хелатне комплексе, везане преко азота и тиокарбонилног сумпора. Међутим, када је присутан азот на неком другом положају, довољно блиском у односу на сумпор за бидентатно везивање, меке и граничне киселине ће се радије везати за њега, него за азот из тиохидантоинског прстена. Ово се може уочити у структурама паладијум(II), платина(IV), кадмијум(II), кобалт(II), никл(II) и бакар(II) комплекса 3-((4-нитрофенил)метилен)амино-2-тиоксоимидазолидин-4-она, на Слици 15.²⁰⁹ Сви метали су бидентатно координовани за тиокарбонилни сумпор и азот из бочног низа. Добијени комплекси су показали способност активације или инхибиције

глутамат-оксалацетат трансферазе и глутамат-пируват трансферазе. Такође, нађено је да неки Pd(II) комплекси арилиденских деривата 2-тиохидаптоина са овим типом координације поседују изражену цитотоксичну активност.²¹⁰



Слика 17. Структуре Pt(II) комплекса 2-тиохидаптоина и Pd(II), Pt(IV), Cd(II), Co(II), Ni(II) и Cu(II) комплекса 3-((4-нитрофенил)метилен)амино-2-тиоксоимидазолидин-4-она.

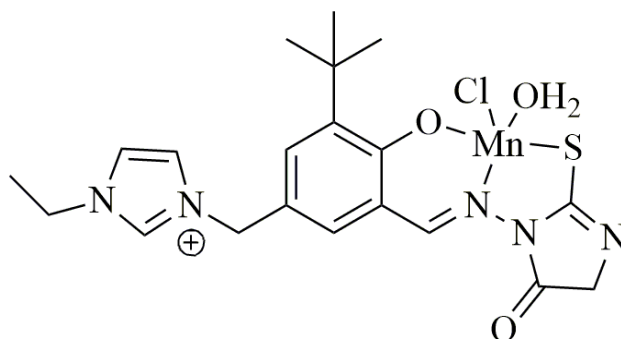
Граничне и тврде Луисове киселине могу са дериватима 2-тиохидаптоина градити и комплексе координоване преко кисеоника, што се може и видети у структури комплекса кобалта(II), никла(II), бакра(II) и мангана(II) приказаних на Слици 18. Сви метали су бидентатно везани за арилиденски дериват 2-тиохидаптоина преко карбонилног кисеоника и азота из бочног низа.²¹¹



Слика 18. Структура Co(II), Ni(II), Cu(II) и Mn(II) комплекса арилиденског деривата 2-тиохидаптоина.

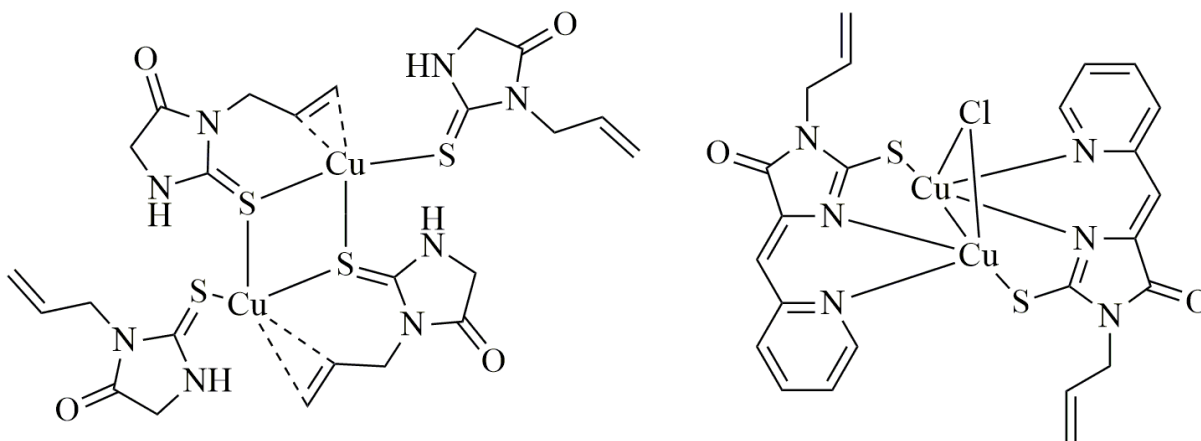
Ако структура деривата 2-тиохидаптоина садржи више погодних доносних атома, и они могу учествовати у грађењу полидентатног комплекса, што је случај са тридентатно координованим манган(II) комплексом 1-етил-3-(4-хидрокси-3-*tert*-бутил-5-(((тиохи-

дантоин-1-ил)имино)метил)бензил)имидазолијум соли (Слика 19). У резултујућем комплексу је манган координован преко сумпора тиохидантоинског прстена, као и азота и фенолног кисеоника из бочног низа. Добијени комплекс је показао антибактеријску активност, као и врло изражену цитотоксичност на ћелијској линији карцинома јетре (НерG2), чак већу од клинички коришћеног лека, винбластина.²¹²



Слика 19. Структура полидентатног Mn(II) тиохидантоинског комплекса.

Познати су и неки тиохидантоински π -комплекси, као што је бакар(II) комплекс 3-алил-2-тиохидантоина (Слика 20, лево). Бакар је поред тиокарбонилног сумпора координован и за π -везу алил групе.²¹³ Направљени су и окарактерисани бакар(II) комплекси арилиденских деривата 2-тиохидантоина са израженом цитотоксичном активношћу, чак бољом од цисплатине на тестираним ћелијским линијама.²¹⁴ Бакар је у структури ових комплекса везан за тиокарбонилни сумпор једног молекула тиохидантоина и азотове атоме (N3 из тиохидантоинског прстена и пиридинског прстена бочног низа) другог молекула тиохидантоина (Слика 20, десно).



Слика 20. Структуре Cu(II) тиохидантоинских комплекса.

Неки арилиденски деривати 2-тиохидантоина се могу превести у одговарајуће деривате хидантоина приликом реакције комплексирања са бакар(II)-хлорид дихидратом (Схема 20).²¹⁵ Претпоставља се да се хидантоин добија у реакцији нуклеофилне супституције тиокарбонилног сумпора са молекулом воде из бакар(II)-хлорид дихидрата, катализованом бакар(II)-јоном. Први корак у реакцији комплексирања бакра(II) је

координовање за пиридински и тиохидантоински N1 азот, што доводи до повећане електрофилности тиокарбонилног угљеника. Након елиминације хлорида, нуклеофилног напада молекула воде на тиокарбонилни угљеник и раскидања C-S везе, добија се бакар(II) комплекс одговарајућег деривата хидантоина.

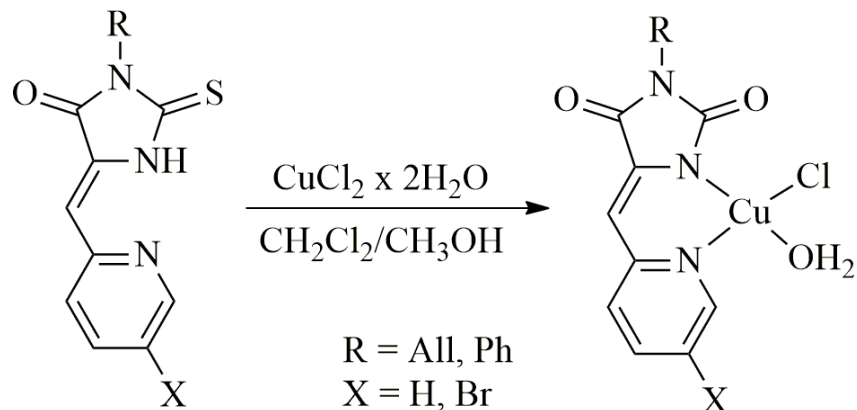


Схема 20. Превођење деривата тиохидантоина у дериват хидантоина у реакцији комплексирања са бакар(II)-хлорид дихидратом.

1.8. Синтеза хидантоина

1.8.1. Синтеза хидантоина из аминокиселина и алкалних цијаната и тиоцијаната

Једна од метода синтезе хидантоина која је нашла широку примену је реакција α -аминокиселина и калијум-цијаната. Ова реакција, коју је први описао Урех (Urech),²¹⁶ је примењена за синтезу великог броја хидантоина са супституентима у положају 5, као и неког мањег броја хидантоина са супституентима у положају 1. Када α -аминокиселина реагује са калијум-цијанатом у воденом раствору, производ је генерално калијумова со α -уреидо или хидантоинске киселине. Претпоставља се да прво настаје супституисани амонијум-цијанат, који потом подлеже уреидном премештању, градећи со хидантоинске киселине (Схема 21).

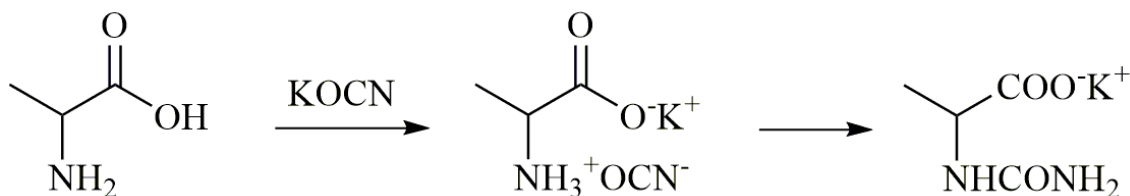


Схема 21. Добијање хидантоинске киселине из α -аминокиселине.

Слободне хидантоинске киселине се могу исталожити, из воденог раствора њихових калијумових соли, додатком минералне киселине. Најчешће коришћена метода превођења хидантоинских киселина или њених естара, у одговарајући циклични анхидрид или хидантоин, обухвата загревање са 25% хлороводоничном киселином. Користећи ову методу,

добијени су скоро квантитативни приноси хидантоина из хидрохлорида етил естра глицина (Схема 22).²¹⁷

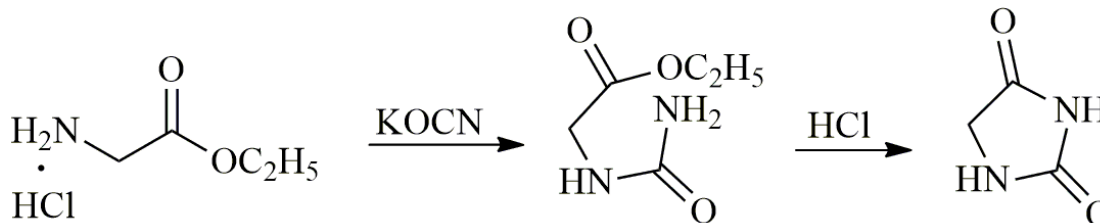


Схема 22. Синтеза хидантоина из хидрохлорида етил естра глицина.

α -Угљеников атом аминокиселине након циклизације постаје угљеник у положају 5 хидантоинског прстена, а бочни низ аминокиселине постаје C5 супституент награђеног хидантоина. Слично томе, N1 супституисани хидантоин се добија ако употребљена α -аминокиселина има супституент на аминском азоту. На пример, из аланина се добија 5-метилхидантоин, док се из саркозина, тј. *N*-метилглицина, добија 1-метилхидантоин (Схема 23).

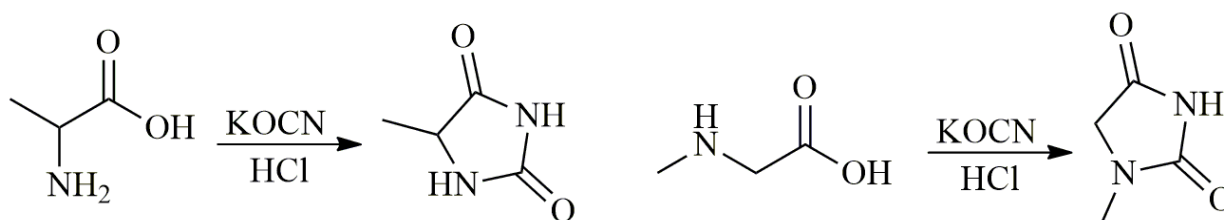


Схема 23. Добијање 5-метилхидантоина (лево) и 1-метилхидантоина (десно).

Ова генерална метода је коришћена у реакцијама са великим бројем α -аминокиселина, као и одређеним амидима и нитрилама. Предложено је коришћење ове методе за одвајање аминокиселина насталих хидролизом протеина.²¹⁸ Могуће је одвајање једноставнијих моноамино монокарбоксилних киселина, које је обично тешко изоловати због растворљивости у води. Одговарајући деривати хидантоина су много мање растворни у води и могу се одвојити фракционом кристализацијом.

У најчешће коришћеној методи за превођење α -аминокиселина у деривате хидантоина, где аминокиселине рефлукују са калијум-цијанатом, вишак минералне киселине се додаје врућем раствору и хидантоин се таложи када се раствор охлади.²¹⁹ Ова процедура има више модификација и не користе се увек слободне аминокиселине. Реакција се изводи у раствору амонијум-сулфата,¹⁷⁶ а може се користити и глацијална сирћетна киселина као растварач.²²⁰ Ако се користи сулфат или хидрохлорид аминокиселине, није потребно додавати минералну киселину. Такође, препоручује се коришћење етил или бутил естера аминокиселина.²¹⁷

Понекад је уместо α -аминокиселина пожељно користити њихове амиде²²¹ или нитриле.²²² Генералну методу превођења супституисаних нитрила у одговарајуће C5 супституисане хидантоине је развио Рид (Read).²²² Глацијална сирћетна киселина је добар растварач за реакцију нитрила са калијум-цијанатом, а хидролиза резултујућег α -уреидо нитрила и затварање хидантоинског прстена се одиграва уз загревање са минералном киселином (Схема 24).

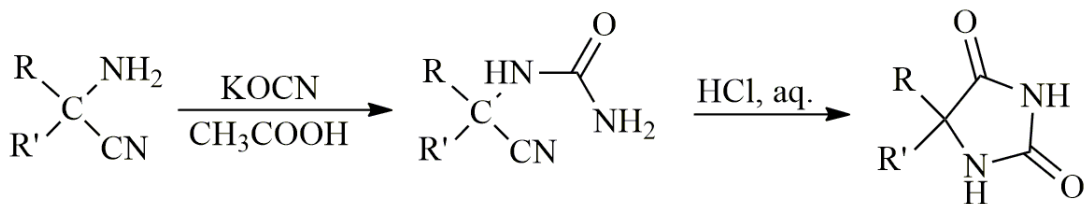


Схема 24. Добијање хидантоина из нитрила аминокиселина.

Реакција калијум-тиоцијаната и α -аминокиселина је аналогна реакцији са калијум-цијанатом, с тим што као производи настају 2-тиоохидантоини. 2-Теоохидантоин настаје када се загревају хидрохлорид етил естра глицина и калијум-тиоцијанат на 140-150 °C без растварача.²²³ Етил-тиоохидантоат је такође изолован из реакционе смеше. Ипак, етил-тиоохидантоат не подлеже реакцији затварања тиоохидантоинског прстена, што указује да није интермедијер у грађењу 2-тиоохидантоина. Тиоохидантоинска киселина се добија загревањем глицина са калијум-тиоцијанатом у раствору ацетанхидрида, а 2-тиоохидантоин се може добити даљим загревањем тиоохидантоинске киселине са хлороводоничном киселином. Пошто је било немогуће да се циклизује етил-тиоохидантоат са минералном киселином, закључено је да је „тиоохидантоинска киселина“ заправо 1-ацетил-2-тиоохидантоин, који се загревањем са хлороводоничном киселином хидролизује, дајући сирћетну киселину и 2-тиоохидантоин (Схема 25).

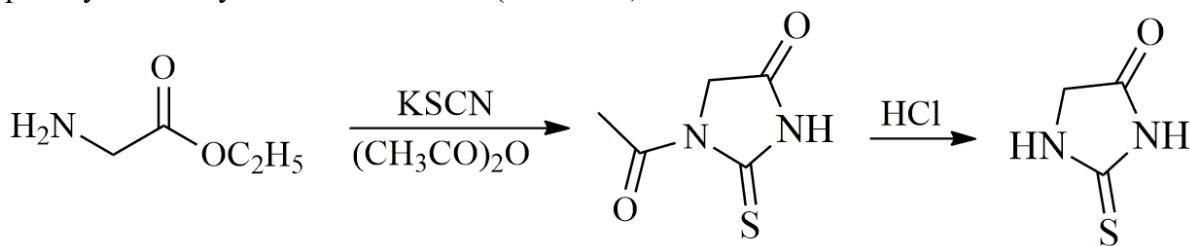


Схема 25. Добијање 1-ацетил-2-тиоохидантоина и његова хидролиза.

Ова реакција тече боље и уз практично квантитативан принос 2-тиоохидантоина када се уместо калијум-тиоцијаната користи амонијум-тиоцијанат.²²⁴ Реакција се не одвија грађењем тиоуреа, него преко веома реактивне тиоцијанатне киселине, која се много лакше гради из амонијум-тиоцијаната, него из било које соли метала и тиоцијанатне киселине. Тиоцијанатна киселина затим реагује са N -ациламинским киселином. Механизам укључује формирање интермедијера, цикличног анхидрида N -ациламинским киселине, а затим настајање ацилизотиоцијаната, који потом подлеже интрамолекулском премештању, градећи 1-ацил-2-тиоохидантоин (Схема 26).

Овај тип синтезе хидантоина, који укључује амонијум-тиоцијанат, је успешно употребљен не само за серију α -аминокиселина и њихових N -ацил деривата, већ и одређених пептида.²²⁵ Када се пептид конвертује у дериват тиоохидантоина, нападнута је терминална аминокиселина са слободном карбоксилном групом, а остатак пептидног ланца је везан за тиоохидантоин у положају 1 амидном везом. Такав дериват хидантоина се лако хидролизује разблаженим алкалијама, дајући 2-тиоохидантоин и пептид који садржи једну аминокиселину мање од полазног пептида. Дакле, ова процедура обезбеђује методу за систематску деградацију полипептида и одеђивање њихових структура.

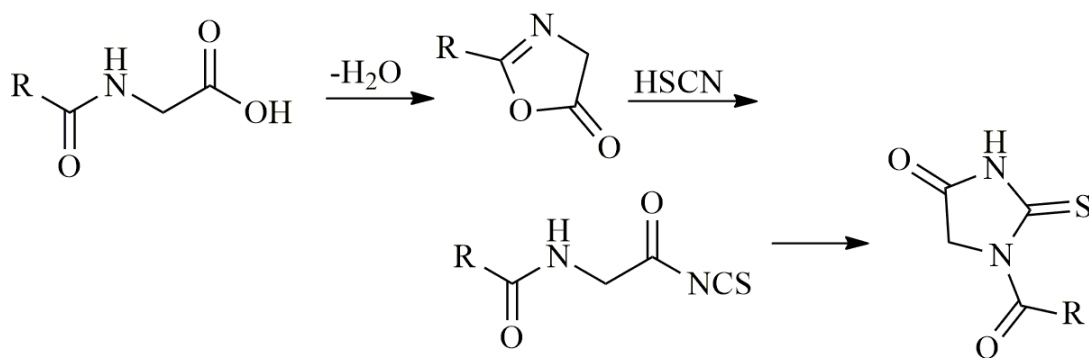


Схема 26. Механизам грађења 1-ацил-2-тиохидантоина.

1.8.2. Синтеза из аминокиселина и алкил или арил изоцијаната и изотиоцијаната

Алкил и арил изоцијанати и изотиоцијанати, пре свега фенил-изоцијанат и фенил-изотиоцијанат, нашли су широку примену у синтези хидантоина и 2-тиохидантоина из α -аминокиселина (Схема 27).^{178,226,227} Други изоцијанати и изотиоцијанати који се користе за припремање деривата хидантоина су α -нафтил-изоцијанат,¹⁷⁴ изохексил-изоцијанат,¹³⁶ *o*- и *m*-толил-изотиоцијанат,¹⁷⁴ метил-изотиоцијанат,¹⁷⁴ *p*-метоксифенил-изотиоцијанат,⁴⁵ ксиллил- и алил-изотиоцијанат,¹⁷⁴ бензоил-изотиоцијанат,²²⁸ тетраацетилглукозоизотиоцијанат,²²⁹ изоцијанати антрацена, 1,2-бензантрена,²³⁰ 3,4-бензопирена,²³¹ и *p,p'*-диаминодифенилсулфона.²³² Пошто су хидантоини добијени коришћењем ових реагенаса супституисани у положају N3, нарочито су корисни када је овај тип деривата потребан.

Реакција α -аминокиселина и оваквих изоцијаната се генерално изводи у базном воденом раствору, из кога се добијена уреидо киселина обично таложи додатком минералне киселине. У неким случајевима, ипак, се хидантоин добија закишељавањем базне реакционе смеше.¹⁷⁸ Користе се и естри аминокиселина, уз етар као растварач, при чему се добијају одговарајући естри уреидо киселина.²³³ Слободна хидантоинска киселина и њени естри се лако преводе у хидантоине и 2-тиохидантоине загревањем са минералном киселином.²²⁰ Скорије, је развијена нова механохемијска процедура за добијање разних хидантоинских деривата из естара природних аминокиселина без растварача.²³⁴ Ови услови су довели до побољшања у реакционом времену и приносу.

Аминонитрили реагују на сличан начин са изоцијанатима, градећи уреидо деривате, који се могу превести у хидантоине алкохолним хлороводоником.^{235,236}

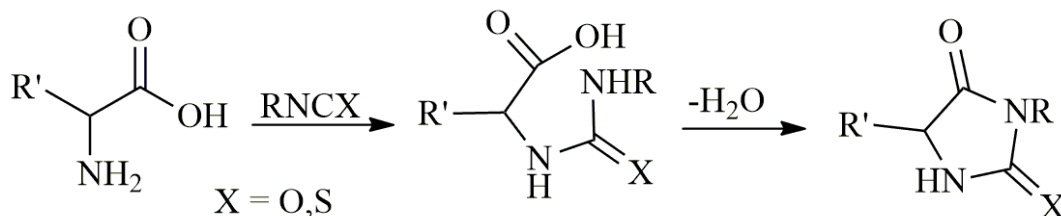


Схема 27. Добијање хидантоина и 2-тиохидантоина из алкил/арил изо(тио)цијаната.

Овај тип реакције су користили Бергман (Bergmann) и његови сарадници при испитивању структуре полипептида.²³⁷ Фенил-изоотиоцијанат напада терминалну аминокиселинску групу пептида. На пример, када се глицил-серин третира фенил-изоотиоцијанатом у базном раствору и производ реакције третира хлороводоничном киселином, добијају се 3-фенилхидантоин и серин (Схема 28).

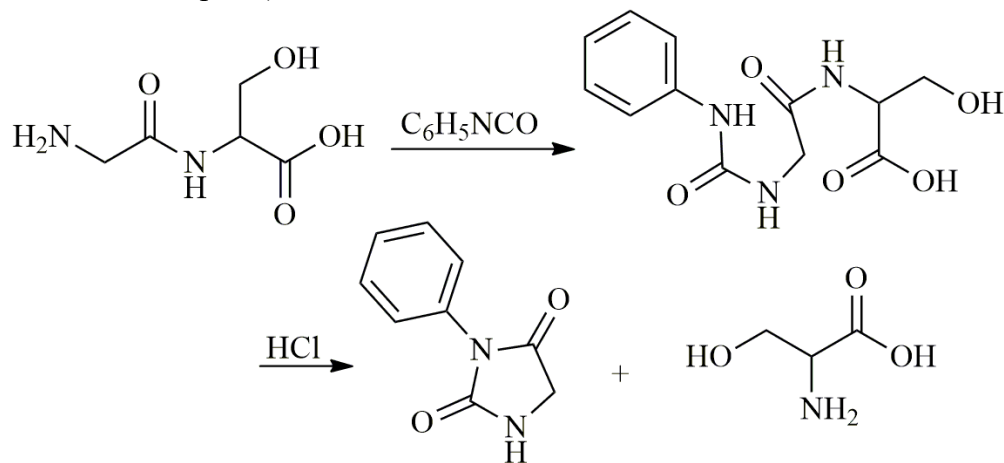


Схема 28. Реакција глицил-серина и фенил-изоотиоцијаната.

Модификацијом Бергманове методе, Едман (Edman) је развио методу за секвенцирање аминокиселина у пептидима.²³⁸ Уместо фенилизоотиоцијаната користи се фенилизотиоцијанат у благо базној средини, који реагује са неутралном аминокиселинском групом N -терминуса, градећи одговарајући 3-фенил-2-тиохидаантоин и скраћујући пептид за ту једну аминокиселину. Процедура се може поновити да би се идентификовала следећа аминокиселина. Помоћу ове методе, назване „Едмановом деградацијом“, могу се прецизно секвенцирати пептиди до 30 аминокиселинских јединица, а главна предност ове методе је што користи само 10-100 пикомола пептида. Ова процедура је чак и аутоматизована да би се убрзао процес.²³⁹ Велики недостатак ове методе је што се не може прецизно применити на пептиде дуже од 30 аминокиселина. Пошто ова процедура раскида пептиде са N -терминуса, додатни ограничавајући фактор је тај што се не може применити на пептиде где је аминокиселинска група заштићена (ацилована, на пример). Такође, секвенцирање није могуће ако се наиђе на аминокиселину која нема аминокиселинску групу у α положају, као што је β -аспарагинска киселина, јер се не гради стабилан циклични 2-тиохидаантоински производ. Додатно, Едмановом деградацијом се не може одредити положај сулфидних мостова. Иако се Едманова деградација углавном данас не користи због наведених ограничења, она је од великог значаја не само као метода за секвенцирање протеина, већ и за хемију хидантоина у целости.

1.8.3. Синтеза из аминокиселина и уреје и њених деривата

Уреа и њени деривати се користе у разним реакцијама синтезе хидантоина, а већина њих је са α -аминокиселинама.²⁴⁰ Када се уреа и N -етилглицин загревају на 120-125 °C, добија се амонијак и 1-етилхидантоин (Схема 29).

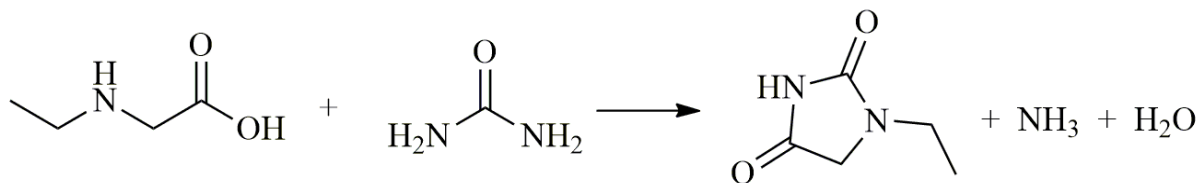


Схема 29. Синтеза 1-етилхидантоина из уреје и *N*-етилглицина.

Принос 5-метилхидантоина добијеног загревањем аланина и уреје је око 15-20%,¹⁷² док је синтеза истог хидантоина из аланина и калијум-цијаната дала скоро квантитативне приносе. Хидантоинске киселине, а преко њих и хидантоини, могу се добити у бољим приносима кључањем аминокиселина у раствору баријум-хидроксида са вишком уреје. Одговарајући хидантоини се добијају загревањем баријумових соли хидантоинских киселина са разблаженом сумпорном киселином. Реакција између уреје и α -аминокиселина је могућа у воденој средини, а уреја се може заменити гуанидином.

Могу се користити и деривати уреје у синтези хидантоина из α -аминокиселина. Нитроуреа се може користити уместо уреје.²⁴¹ Одлични приноси хидантоина се добијају из нитроуреје и глицина. Хидантоини се могу припремити и реакцијом аминокиселина и изотиоуреје и цијанамида. Када се одређене уреидо киселине, као што је хидантоинска киселина или цитрулин, загревају у воденој средини, уз пуфер на рН 7 са α -аминокиселинама, аминокиселине се преводе у одговарајуће хидантоинске киселине.²⁴²

1.8.4. Синтеза из α -хидроксикиселина или α -хидроксинитрила и уреје

Осим α -аминокиселина, α -хидроксикиселине и нитрили реагују са уреом, градећи хидантоинске киселине или хидантоине.²⁴³ Реакције тог типа су испитане са фенилсирћетном киселином, 5-хидроксихидантоин-5-карбоксилном киселином, која гради спиро-5,5'-дихидантоин и са цијанхидрином RCHOHCN типа, где је R алифатична група са најмање два угљеникова атома, фенилна група или $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}=\text{CH}$ - радикал. Главни производ реакције уреје и цијанхидрина је α -уреидонитрил. Када се он загрева са разблаженом минералном киселином, одвија се хидролиза нитрилне групе и затварање прстена до хидантоина. На овај начин се добија 5-фенилхидантоин из цијанхидрина бензалдехида (Схема 30).

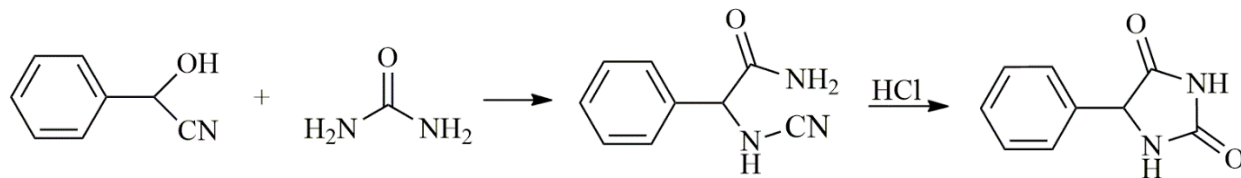


Схема 30. Синтеза 5-фенилхидантоина из цијанхидринабензалдехида.

1.8.5. Синтеза из уреје и α -дикарбонилних једињења

Уреа реагује и са једињењима која садрже две суседне карбонилне групе, као што су глиоксал, бензил и α -кето киселине дајући производе који се лако преводе у хидантоине.²⁴⁴ У синтези хидантоина из уреје и глиоксала, добијен је гликоурил као интермедијер.¹⁷³ Када

се гликоурил загрева са разблаженом хлороводоничном киселином, издваја се уреа и добија се хидантоин у добром приносу (Схема 31).

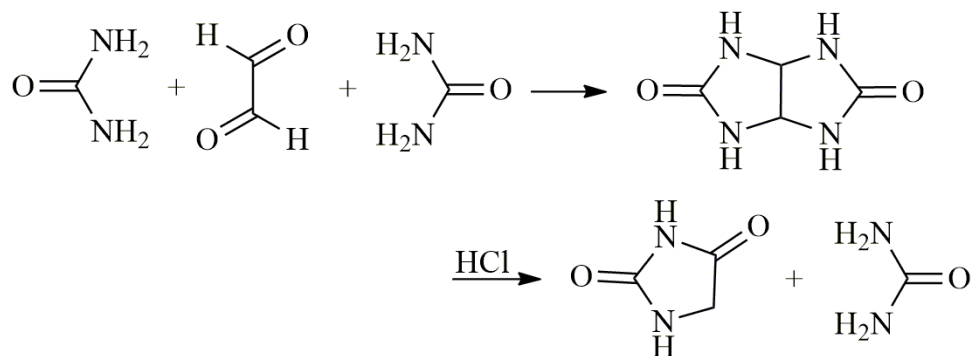


Схема 31. Синтеза хидантоина из уреје и глиоксала.

Даљим проучавањем ове реакције је успешно изоловано дихидрокси једињење као интермедијер, које, када се загрева са киселином, гради хидантоин пинаколским премештањем (Схема 32).²⁴⁴ Настајање истог интермедијера је претпостављено у синтези хидантоина из натријум-дихидроксиартартата и уреје. Када се ова смеша загрева са разблаженом хлороводоничном киселином, ослобађа се вода и ствара хидантоин.

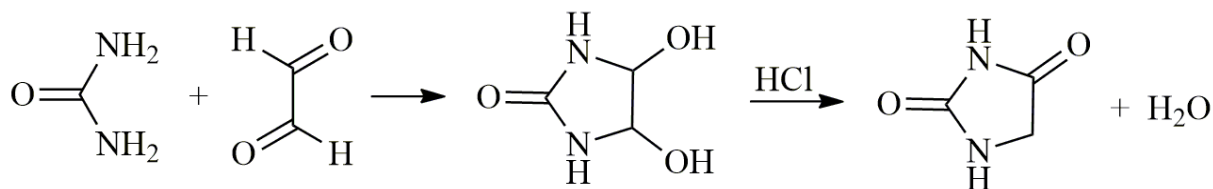


Схема 32. Добијање хидантоина преко дихидрокси интермедијера.

Ако се уместо уреје користи метилуреа, настају два изомерна диметилгликоурила и оба се разлажу додавањем хлороводоничне киселине, дајући смешу 1- и 3-метилхидантоина. Метилглиоксал и фенилглиоксал реагују слично као глиоксал.²⁴⁵

Реакцију бензила и уреје је детаљно проучавао Билц (Biltz), који је ову реакцију искористио за синтетисање 5,5-диарилхидантоина.^{246,247} Ова реакција се може изводити и са супституисаним уреама, као и са тиоуреама, што води до грађења 3- и 1,3-супституисаних хидантоина. Могу се користити и други α -дикетони, или се бензил може заменити бензоином и алкалним хипохлоритом као оксидационим средством.²⁴⁶ Чињеница да се исти хидантоин, 1,3-диметил-5,5-дифенилхидантоин, добија у реакцији N,N' -диметилуреје са бензилном киселином, као и са бензилом²⁴⁷ показује да се у реакцији уреје са бензилом одвија пинаколско премештање. Билц је предложио механизам приказан у Схеми 33.²⁴⁷ Реакцијом уреје са α -кето киселинама се такође могу добити деривати хидантоина, али није развијена генерална препаративна метода.

Развијена су разна побољшања оригиналне Билцове процедуре. Нови услови обухватају коришћење хетерогених катализатора^{248,249} или модерних технологија, као што су микроталасно зрачење^{250,251} и ултразвучно озрачивање.²⁵²⁻²⁵⁴ Развијене су и методе без растварача, међу којима је значајна метода у којој се бензил, уреа и NaOH мешају тучком у авану.²⁵⁵ Ипак, у овој методи се не може применити млин с куглама.²³⁴

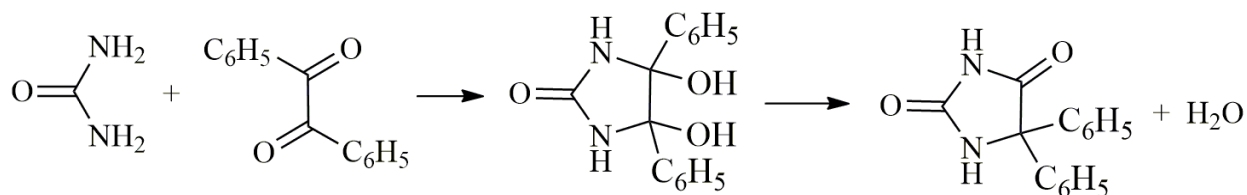


Схема 33. Пинаколско премештање и добијање 5,5-дифенилхидантоина.

1.8.6. Синтеза из уреје и незасићених киселина

Одређене незасићене киселине могу градити хидантоине у реакцији са уреом. У присуству натријум-етоксида у алкохолном раствору, уреа реагује са диетил-малеатом, градећи уреид, који, када се третира разблаженом хлороводоничном киселином даје смешу етил-(хидантоин-5-ацетата) и његовог карбамидо деривата (Схема 34).²⁵⁶

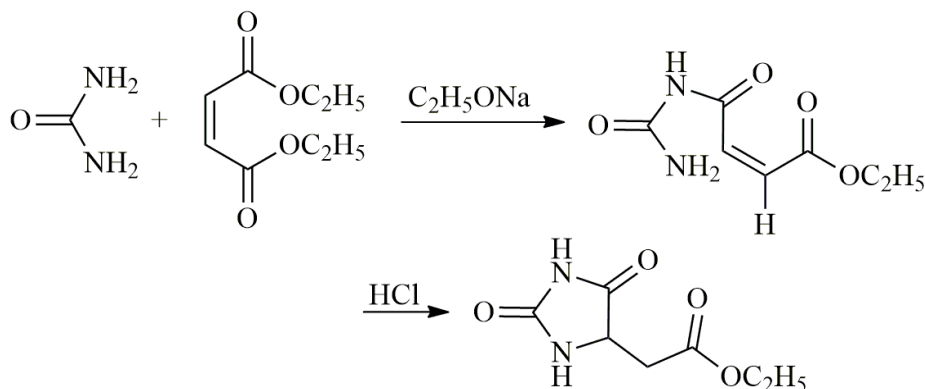


Схема 34. Синтеза хидантоина из диетил-малеата.

Треба нагласити да се реакцијом малеинске и фумарне киселине са тиоуреом не добија 2-тиохидантоин, него псевдотиохидантоин. Штавише, реакцијом уреје и етил-цинамата не добија се 5-бензилхидантоин, него 4-фенилдихидроурацил.

Ацетиленска, фенилпропинска киселина, реагује у форми естра са уреом у присуству натријум-етоксида, дајући 5-бензалхидантоин (Схема 35).²⁵⁷ Коришћењем тиоуреје се добија 5-бензал-2-тиохидантоин.

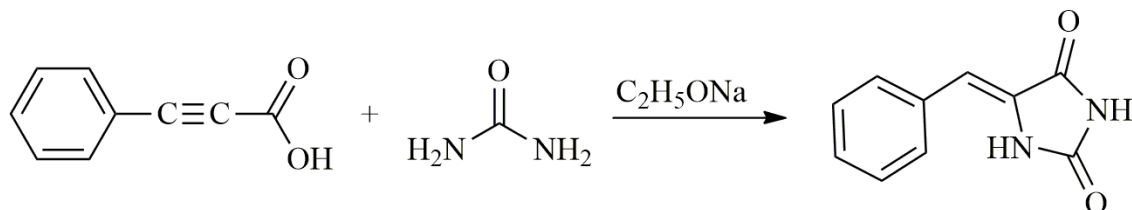


Схема 35. Синтеза 5-бензалхидантоина из фенилпропинске киселине.

1.8.7. Синтеза из аминокиселина и карбамата

Хидантоинске киселине и хидантоини се из α -аминокиселина углавном праве са цијанатима, изоцијанатима и уреом, а постоји и мали број других метода.²⁵⁸ Међутим, откривено је се хидантоин може добити и у реакцији натријум-карбамата са етил естром глицина (Схема 36).

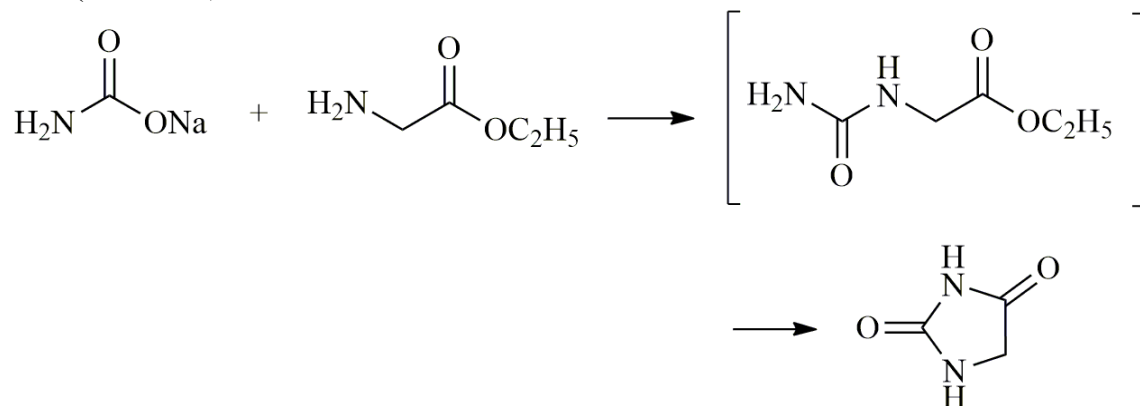


Схема 36. Синтеза хидантоина из карбамата.

Изоамилкарбамат се може користити за прављење хидантоинске киселине из леуцина. Аминокиселина је третирана вишком карбамата у кључалом баријум-хидроксиду.

Дитиоуретани могу реаговати на сличан начин као α -аминокиселине. На пример, из етил-(*N*-бензоилдитиокарбамата) и глицина добија се бензоилтиохидантоинска киселина, која загревањем са хлороводоничном киселином прелази у бензоеву киселину и 2-тиохидантоин (Схема 37).

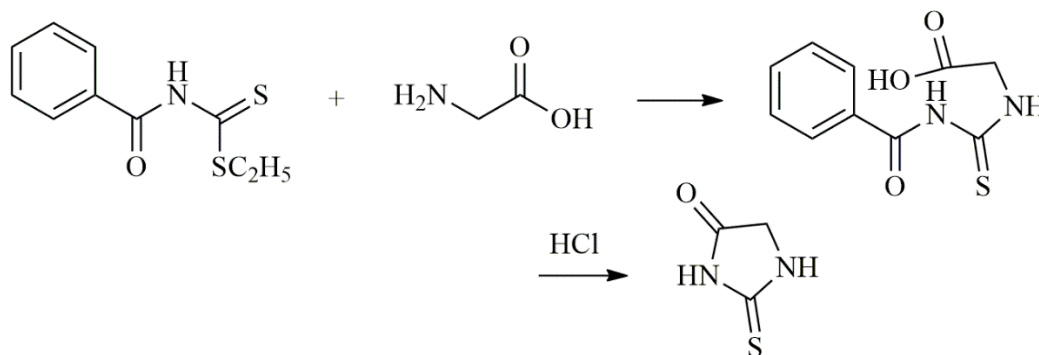


Схема 37. Синтеза тиохидантоина из дитиокарбамата и глицина.

1.8.8. Синтеза из изоцијаната и изотиоцијаната изведених из аминокиселина и амина

Одређени изоцијанати и изотиоцијанати, изведени из α -аминокиселина, могу се употребити за синтезу хидантоина коришћењем фозгена и тиофозгена. Ова једињења могу да реагују са амонијаком, аминима и α -аминокиселинама, дајући карбамидне киселине које се могу превести у хидантоине.⁶⁵ На пример, етил-(α -изотиоцијанопропионат), направљен из тиофозгена и аланина, са анилином даје исти фенолтиохидантоински естар који се добија третирањем етил естра аланина фенол-изотиоцијанатом (Схема 38).

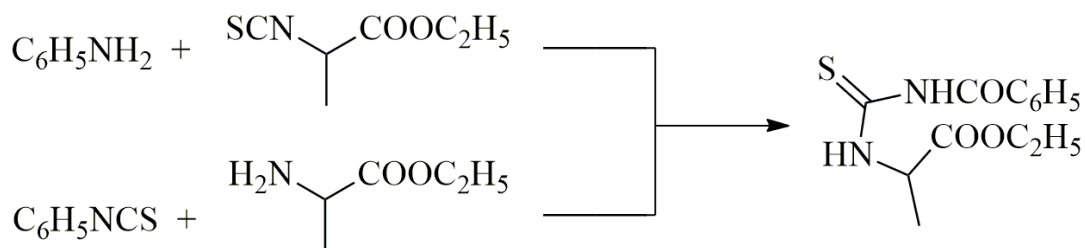


Схема 38. Добијање фенилтиохидантоинског естра из анилина и фенил-изотиоцијаната.

Показано је да се реакција етил-изоцијаноацетата и амонијака одвија преко интермедијерног амида изотиоцијаносирћетне киселине уместо, преко етил-тиохидантоата.²⁵⁹ Доказ овог механизма је чињеница да етил-тиохидантоат не циклизује до 2-тиохидантоина, као и да анилид изотиоцијаносирћетне киселине спонтано циклизује, дајући 3-фенил-2-тиохидантоин (Схема 39).

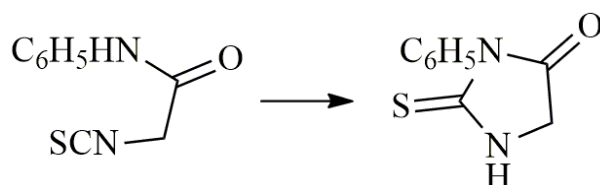


Схема 39. Циклизација анилида изотиоцијаносирћетне киселине.

Синтетисани су и други супституисани изотиоцијанати на исти начин.²⁶⁰ Треба нагласити да тиоцијаносирћетни естар реагује са амонијаком, дајући псеудо-тиохидантоин и да тиоцијаноацетанилид циклизује до супституисаног псеудотио-хидантоина.

Реакцијом изоцијаносирћетних естара са аминокиселинама се добија још једна класа деривата уреје, карбонилбисаминокиселине или симетричне карбамидодисирћетне киселине, које су од нарочитог значаја за прављење 3-хидантоинсирћетних киселина. Прво објављено једињење овог типа је синтетисано из етил-изотиоцијано-ацетата и тирозина (Схема 40).²⁶¹

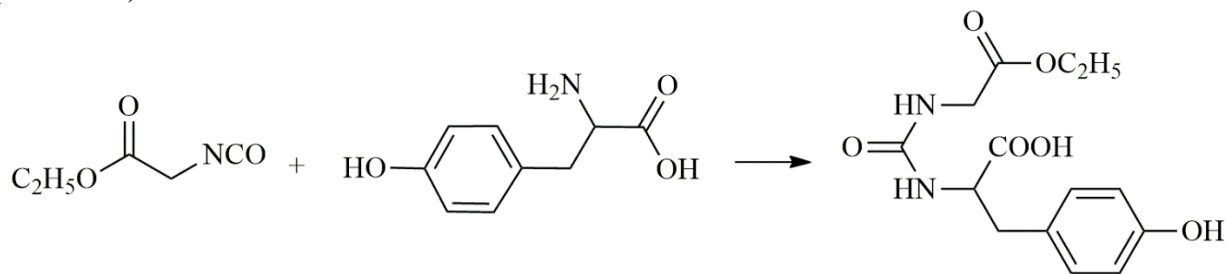


Схема 40. Синтеза карбонилбисаминокиселине из етил-изотиоцијаноацетата и тирозина.

Када се загревају са разблаженом минералном киселином, ова једињења циклизују градећи супституисане хидантоине. На пример, 2-тиохидантоин-3-сирћетна киселина је направљена третирањем интермедијерног производа реакције етил естра глицина и етил-изотиоцијаната са разблаженом хлороводоничном киселином (Схема 41).

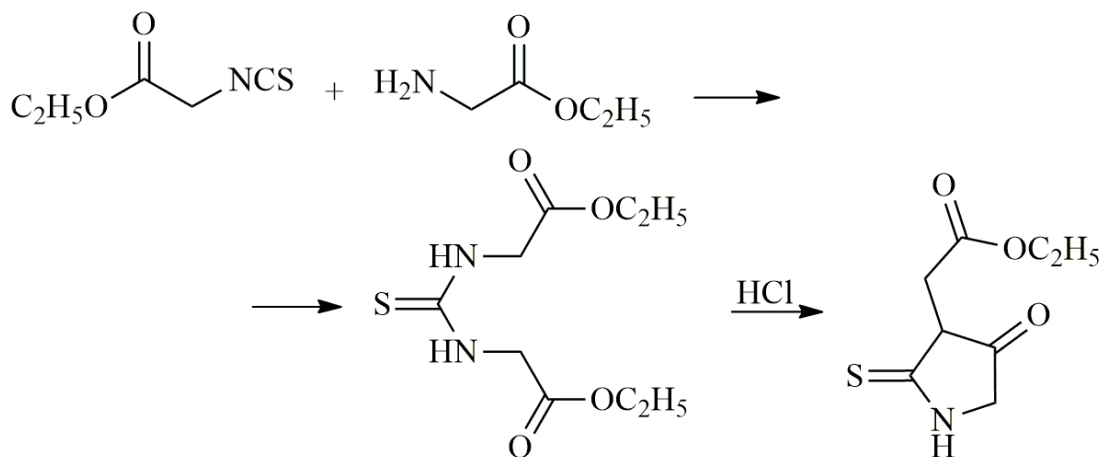


Схема 41. Синтеза 2-тиохидантоин-3-сирћетне киселине.

1.8.9. Синтеза из аминокиселина и фозгена

Естри симетричних карбонилбисаминокиселина се могу добити директно из естара аминокиселина и фозгена. Такви естри су прављени из естара глицина, аланина, фенилаланина и аминомалонске киселине. Из фенилаланина се, на пример, могу добити карбонилбисфенилаланин и 5-бензилхидантоин-3-бензилсирћетна киселина (Схема 42).²⁶²

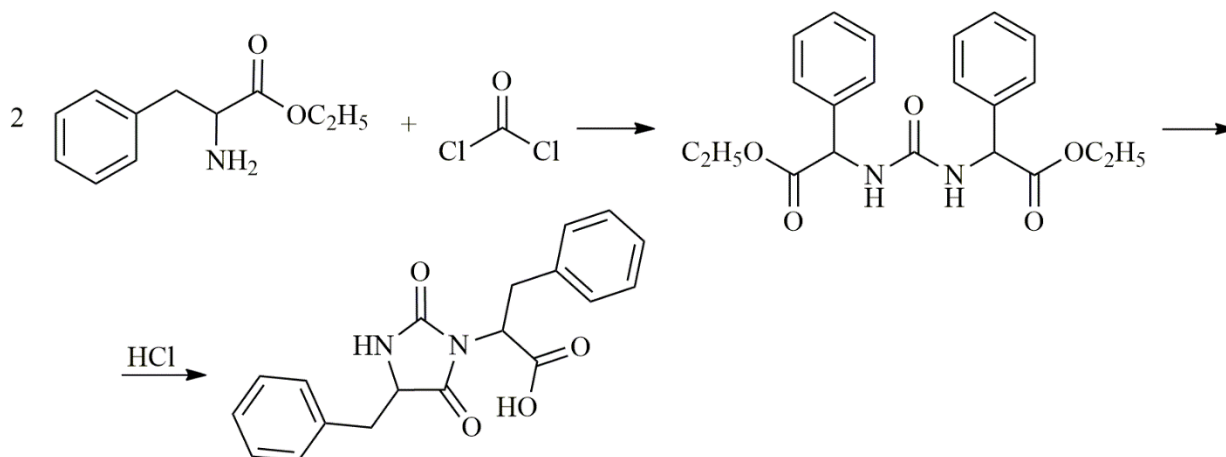


Схема 42. Добијање 5-бензилхидантоин-3-бензилсирћетне киселине.

Ова метода је примењива и за добијање 2-тиохидантоин-3-сирћетне киселине.²⁶³ Естри аминокиселина реагују са угљен-дисулфидом у присуству натријум-бикарбоната уместо са фозгеном и резултујуће дисупституисане тиоурее се третирају алкохолним амонијаком да би циклизовале.

Када естри одређених *N*-супституисаних α -аминокиселина реагују са фозгеном, настаје *N*-хлорформил дериват уместо уреида. На пример, естар *N*-фенилглицина са фозгеном даје *N*-хлорформил дериват, који са анилином даје дифенил дериват етилхидантоата. Овај хидантоатни естар прелази у 1,2-дифенилхидантоин када се загрева у кључалом етанолу (Схема 43).²⁶⁴

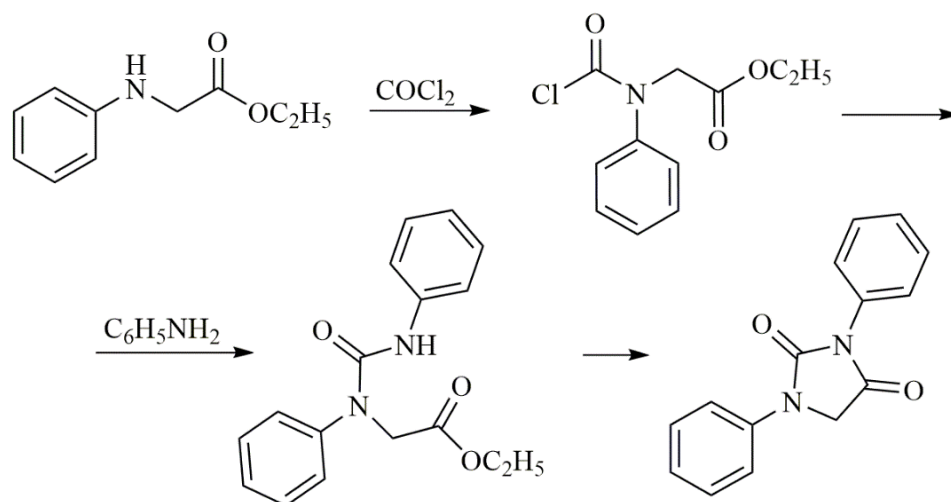


Схема 43. Реакција етил естра *N*-фенилглицина и фозгена са анилином.

Реакцијом фозгена и диметилиминодиацетата се добијају два различита производа, у зависности од експерименталних услова. Један од њих је *N*-хлорформил дериват, а други диметилкарбонилдииминодиацетат.¹⁷⁹ *N*-хлорформил дериват се лако преводи у етил-(хидантоин-1-ацетат) прво третманом са алкохолним амонијаком, формирајући диамид уреидодисирћетне киселине, затим са хлороводоничном киселином, па са алкохолним раствором хлороводоника (Схема 44).

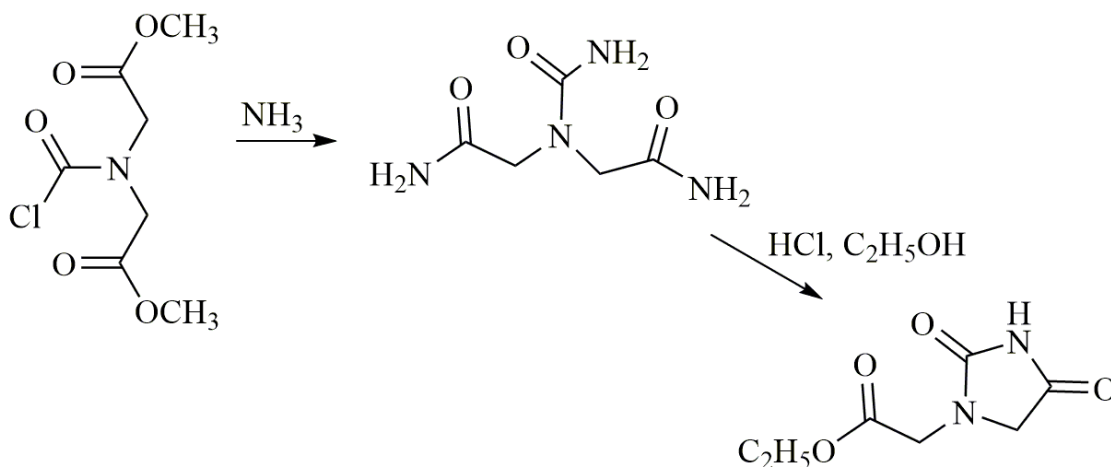


Схема 44. Превођење *N*-хлорформил деривата у етил-(хидантоин-1-ацетат).

Током добијања 3-*p*-карбоксифенилхидантоина из *N*-глицил-*p*-аминобензојеве киселине и фозгена (Схема 45), хидантоин се добија директно. Иако није изолован никакав интермедијер, реакција се вероватно одвија путем приказаним на Схеми 44, грађењем *N*-хлорформил деривата пре грађења цикличне уреидне структуре.

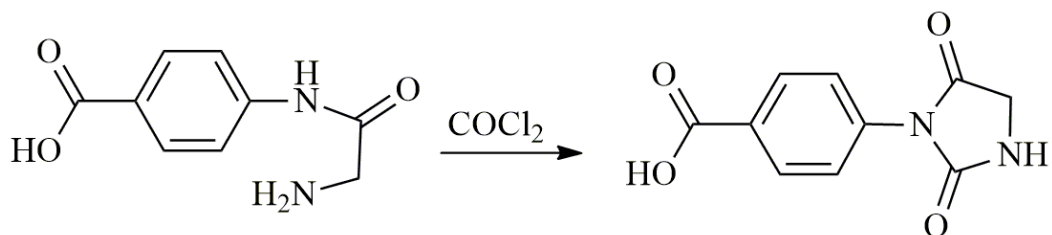


Схема 45. Добијање 3-*p*-карбоксифенилхидантоина.

1.8.10. Синтеза из естара аминокиселина и алкил-хлорформијата

Реакцијом естара α -аминокиселина и етил-хлорформијата се добијају деривати *N*-карбоксиаминокиселина.²⁶⁵ Када се резултујући карбаматоацетатни естар загрева са амонијаком или примарним амином, добија се супституисани хидантоин.¹⁷⁹ На пример, реакцијом етил-(α -карбамато- α -фенилбутирата) и метиламина у алкохолу под притиском се добија 5-етил-5-фенил-3-метилхидантоин (Схема 46).²⁶⁶

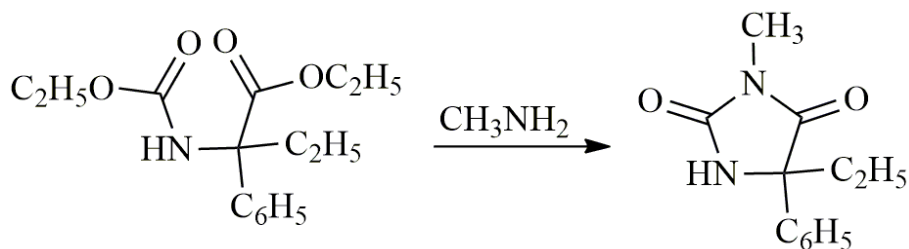


Схема 46. Добијање 5-етил-5-фенил-3-метилхидантоина.

1.8.11. Синтеза из амида аминокиселина и алкил-хлорформијата

Када амид α -аминокиселине реагује са етил-хлорформијатом, градећи *N*-карбетокси дериват, даљи третман са амонијаком није неопходан да би настао дериват хидантоина. Ова метода синтезе хидантоина из амида *N*-карбетоксиаминокиселина је нашла општу примену у синтези разних деривата хидантоина. Циклизација ових једињења се изводи са разблаженим воденим или алкохолним раствором алкалија. Коришћење киселине доводи до хидролизе амида уместо циклизације. Овом методом је направљен хидантоин из глицинамида (Схема 47),²⁶⁷ 5-метилхидантоин из аланина, као и 5-етилхидантоин, 5-изобутилхидантоин и 5-бензилхидантоин из одговарајућих аминокиселина.

Синтетисани су и неки други хидантоини овом методом, као што су 5-фенилхидантоин, 1-фенилхидантоин, 5-хидантоинкарбоксамид, 1-хидантоин-сирћетна киселина и разни други. Било који супституент на амидном азоту се појављује у положају N3 хидантоина. На пример, карбетокси дериват анилида *N*-фенилглицина награђује 1,3-дифенилхидантоин (Схема 48). Други *N*3-супституисани хидантоини се могу такође синтетисати на сличан начин.

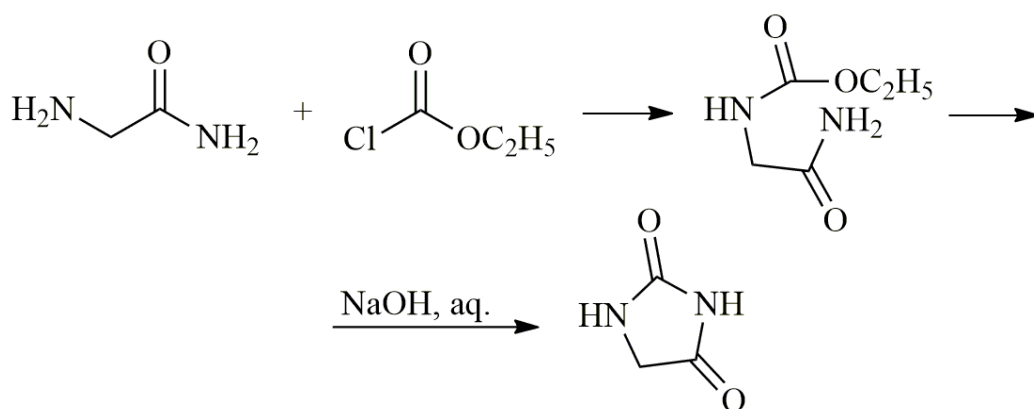


Схема 47. Синтеза хидантоина из глицинамида.

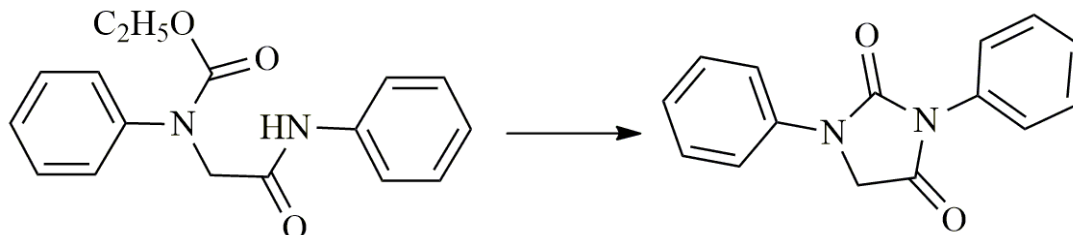


Схема 48. Синтеза 1,3-дифенилхидантоина из деривата *N*-фенилглицина.

У сличној реакцији се хидантоин добија директно из амида α -аминокиселине. Амид α -аминокиселине реагује са фозгеном, оксалил-хлоридом или дифенил-карбонатом (Схема 49). Употребом угљен-дисулфида се добија одговарајући 2-тиохидантоин.²⁶⁸

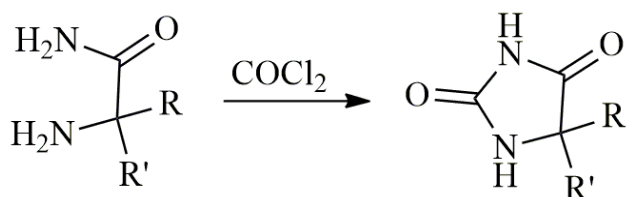


Схема 49. Реакција амида α -аминокиселине са фозгеном.

Процедура прављења амида карбетоксиаминокиселина се може модификовати тако да се нитрил α -аминокиселине третира хлорформијатом. Парцијалном хидролизом добијеног карбетоксиаминонитрила се добија амид карбетоксиаминокиселине. Ако се карбетоксиаминоацетонитрил третира водоник-сулфидом, настаје тиоамид, који циклизује до 4-тиохидантоина. Серија 4-тиохидантоина је синтетисана на овај начин (Схема 50).²⁶⁹

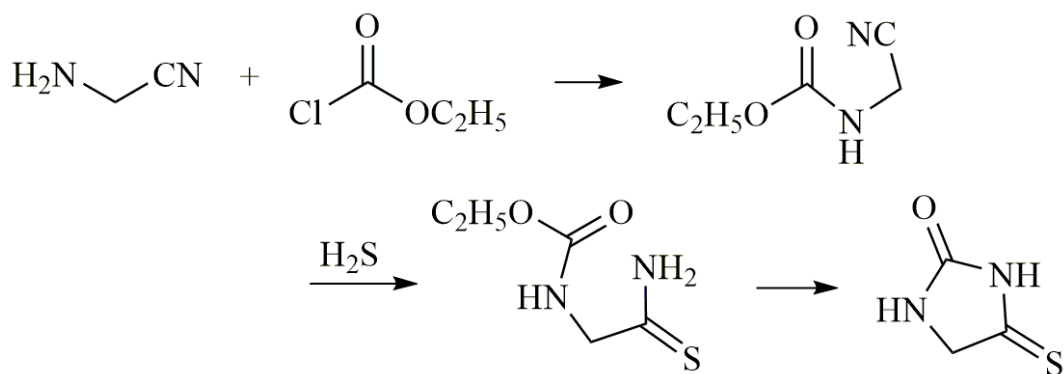


Схема 50. Добијање 4-тиохидаптоина из нирила α -аминокиселина.

1.8.12. Синтеза из хлорацетилкарбамата и амина

Слична метода претходној, само што се затварање прстена не одвија између атома N1 и C2, него између атома C2 и N3, је синтеза 1-фенилхидаптоина из хлорацетил-карбамата и анилина.²⁷⁰ Показано је да анилин прво реагује са хлорацетилкарбаматом дајући *N*-фенилглицинкарбамат, који се даље загревањем преводи у 1-фенилхидаптоин (Схема 51).

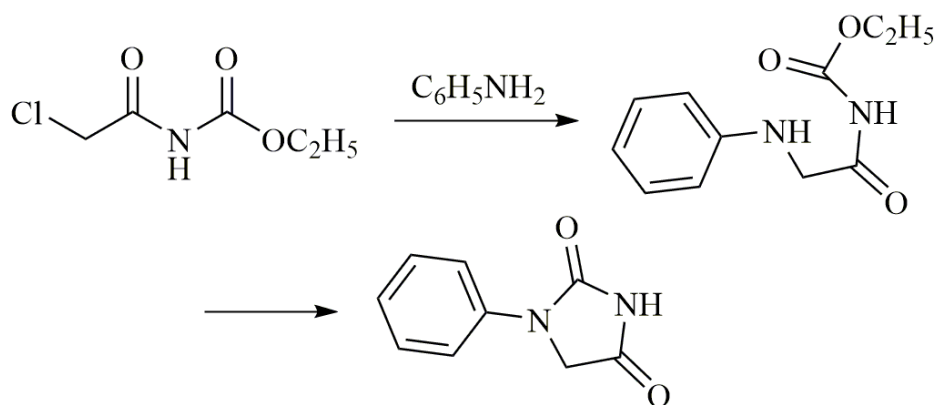


Схема 51. Синтеза 1-фенилхидаптоина из анилина и хлорацетилкарбамата.

Анилин у овој реакцији могу заменити други ароматични амини. Одговарајући амид, *N*-фенилглицилура се такође преводи у 1-фенилхидаптоин (Схема 52).

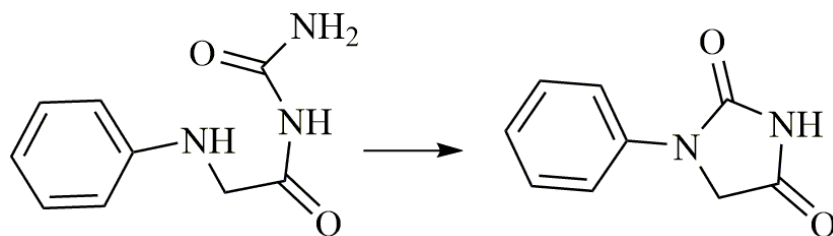


Схема 52. Преводјење *N*-фенилглицилурае у 1-фенилхидаптоин.

1.8.13. Синтеза из бромацетилурее

Иако је Бајерова синтеза хидантоина из бромацетилурее²³ од историјског значаја, показало се да није од практичног значаја, због разних потешкоћа при извођењу реакције, а и приноси су јако ниски. Превођење одређених супституисаних 5-бромбарбитурата у хидантоине загревањем са алкалијом се претпоставља да иде преко интермедијерних деривата бромацетил урее.²⁷¹

1.8.14. Синтеза из цијаноацетамида и алкалних хипохлорита

Синтеза хидантоина деловањем алкалних хипохлорита на дисупституисане цијаноацетамиде је нашла примену у добијању 5,5-дисупституисаних хидантоина.²⁷² Ова реакција није примењива за добијање несупституисаних хидантоина. Током реакције амидна група подлеже Хофмановој деградацији до изоцијанидне групе, која одмах реагује са амидном групом награђеном парцијалном хидролизом цијанидне групе (Схема 53).

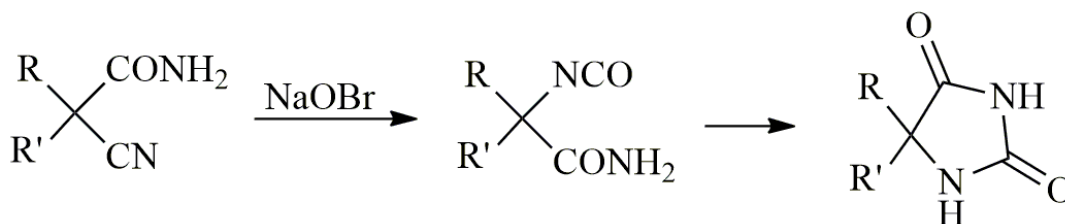


Схема 53. Синтеза хидантоина из цијаноацетамида.

Уместо цијаноацетамида може се користити супституисани малонамид,¹⁸⁰ али се добија мали принос хидантоинске киселине.

1.8.15. Бучерер-Бергсова (Bücherer-Bergs) синтеза из карбонилних једињења

Веома значајна метода добијања хидантоина је синтеза 5-супституисаних хидантоина из алдехида и кетона са калијум-цијанидом и амонијум-карбонатом (Схема 54). Ова метода је генерално примењива на карбонилна једињења и користи се за њихову идентификацију.²⁷³ Процедура је таква да се карбонилни дериват загрева са два мола калијум-цијанида и четири мола амонијум-карбоната два сата у 50% алкохолу, после чега се хидантоин издваја хлађењем.

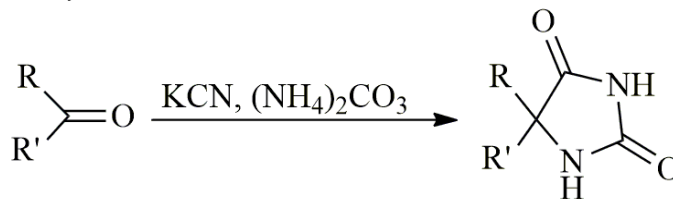


Схема 54. Синтеза 5-супституисаних хидантоина из карбонилних једињења.²⁷³

Ова метода је примењива на многа карбонилна једињења, осим на формалдехид, одређене незасићене алдехиде, неке хидрокси и нитроарил алдехиде, бисдиметиламиноацетон и пирогрођану киселину.

Реакције овог типа су први пут изучаване када је примећен 5,5-диметилхидантоин, заједно са мноштвом других једињења, у смеси ацетона и цијановодоничне киселине, која је била изложена сунчевој светлости у периоду од пет до седам месеци.²⁷⁴ Бергс је направио серију 5-супституисаних хидантоина из одговарајућих алдехида или кетона, третирајући их калијум-цијанидом, амонијум-карбонатом и угљен-диоксидом под притиском од неколико атмосфера на 80 °С, 4-6 сати.²⁷⁵ Даљим проучавањем реакције је предложен механизам приказан на Схеми 55.

Бучерер и његови сарадници су добили дериват хидантоина као споредни производ при добијању цијанхидрина циклохексанона.²⁷⁶ Пронашли су да цијанхидрин реагује са амонијум-карбонатом, дајући хидантоин и да се реакција одвија на собној температури, али не на температури вишој од 60-70 °С. Реакција се изводи у воденом раствору или у бензену, а употреба угљен-диоксида под притиском није потребна.

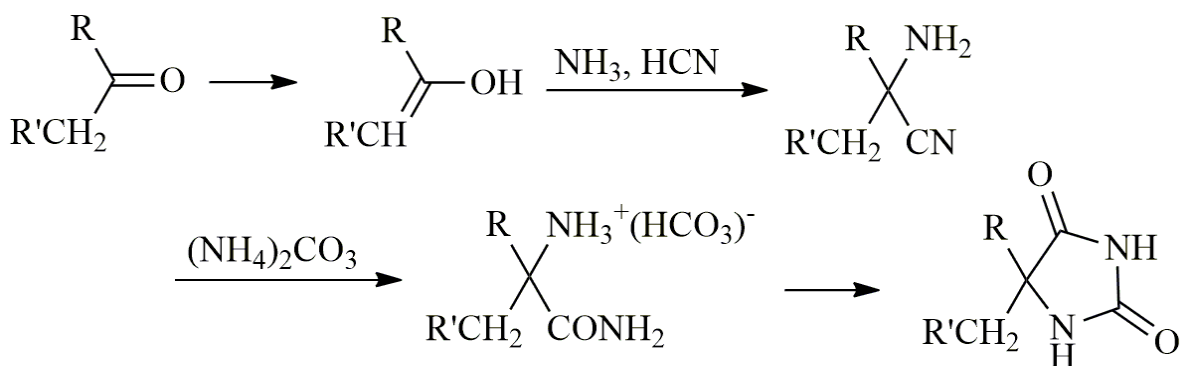


Схема 55. Механизам реакције добијања хидантоина из карбонилних једињења.

Механизам настајања хидантоина из цијанхидрина су проучавали Бучерер и Штајнер (Steiner).²⁷⁷ Пронашли су да цијанхидрини реагују подједнако добро са амонијум-карбонатом као и са амонијум-карбаматом и да α -аминонитрили дају скоро квантитативне приносе хидантоина када се третирају угљен-диоксидом у воденој средини. Предложен је механизам приказан на Схеми 56.

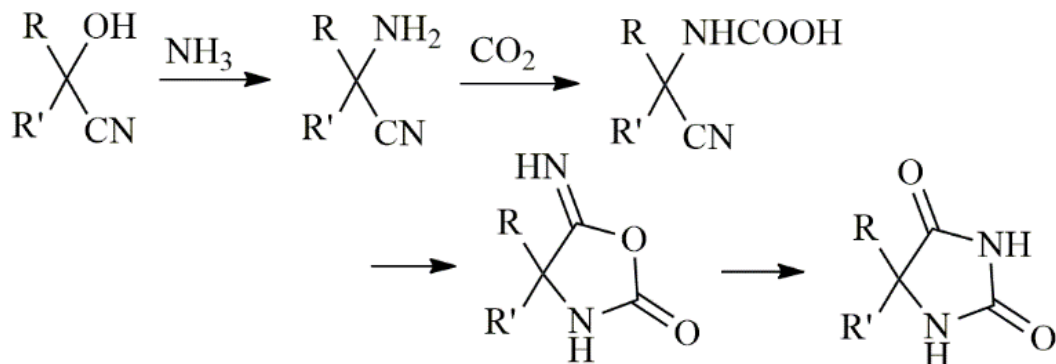


Схема 56. Механизам добијања хидантоина из цијанхидрина.

Процедуру је даље модификовао Бучерер и пронашао да је 50% алкохол одличан растварач за ову реакцију.²⁷⁸ Под овим условима, алдехиди, који су раније давали лоше резултате, су добро реаговали, док су кетони давали одличне приносе хидантоина.

Оригинална Бергсова процедура је искоришћена за синтезу великог броја хидантоина као интермедијера у синтези нових α -аминокиселина.²⁷⁹ Ова процедура је искоришћена за синтезу и неких других хидантоина, али је генерално замењена једноставнијом методом коју је развио Бучерер.

Бучерерова модификација Бергсове синтезе је примењена на велики број карбонилних једињења свих типова.²⁸⁰ Нађено је да одређена једињења, нарочито аминокетони, која нису могла да се преведу у хидантоине Бергсовом методом, дају добре резултате Бучереровом модификацијом. Реакција диарилкетона даје најбоље резултате када се ацетамид користи као растварач.²⁸⁰ Серија 5-(1-нафтил)-5-супституисаних хидантоина је направљена загревањем одговарајућих кетона са калијум-цијанидом и амонијум-карбонатом у ацетамиду под притиском.²⁸¹ Коришћени су и други растварачи, као што су етиленгликол, триметиленгликол, етаноламин и диоксан.

Ова генерална метода за добијање хидантоина је употребљена у разним другим истраживањима током низа година. Може се користити цијановодонична киселина уместо калијум-цијанида. Скоро квантитативни приноси чистог 5,5-диметилхидантоина се добијају када се ацетон, цијановодоник и амонијум-карбонат загревају на 60-66 °C у воденој средини.²⁸² Иако се реакција не може извести са формалдехидом, несупституисани хидантоин се може добити ако се аминоацетонитрил загрева са амонијум-карбонатом у воденој средини на 67-79 °C под притиском.²⁸³

Реакција α -аминонитрила са угљен-дисулфидом уместо угљен-диоксида доводи до добијања 2,4-дитиохидантоина. На пример, ацетонцијанхидрин се преводи у α -аминоизобутиронитрил, који реагује са угљен-дисулфидом, дајући 5,5-диметил-2,4-дитиохидантоин (Схема 57).²⁸⁴

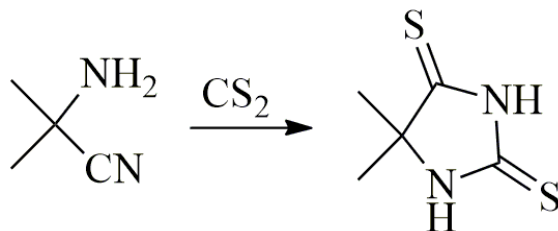


Схема 57. Добијање 5,5-диметил-2,4-дитиохидантоина из ацетонцијанхидрина.

Развијене су и новије модификације Бучерер-Бергсове реакције и проширен је спектар реактаната који се може применити у процедури овог типа. Предложено је стварање иминског интермедијера нуклеофилном адицијом органолитијума или Грињаревог реагенса на метиленазиридине²⁸⁵ или нитриле.²⁸⁶ Ова процедура је довела до синтезе нових 5,5-супституисаних хидантоина. У још једној варијацији ове процедуре, аминонитрили се добијају у реакцији кетона и течног амонијака у дихлорметану, катализованој са Ga(OTf)₃ на -78 °C, праћеној адицијом цијановодоника. Хидантоини се добијају увођењем гасовитог угљен-диоксида у присуству *N,N'*-диизопропилетиламина.²⁸⁷ Употреба органских растварача уместо смеше воде и етанола побољшава процедуру у смислу бољег растварања реактаната. Ипак, употреба галијумских Луисових база и гасовитог угљен-диоксида у строго анхидрованим условима може створити потешкоће. Развијена је и енантиоселективна

синтеза α,β -диаминоацетонитрила, који се могу употребити у реакцији Бучерер-Бергсовог типа без губитка енантимерне чистоће.²⁸⁸ Постигнута су и побољшања у реакционом времену, приносу и еколошки прихватљивијим условима реакције. У катализованој Бучерер-Бергсовој реакцији, у којој се користе Fe_3O_4 наночестице као обновљива Луисова киселина (до четири пута), катализује се грађење аминонитрила и адиција угљен-диоксида.²⁸⁹ Благи услови, поновно коришћење и лако уклањање катализатора, као и краће реакционо време су очигледна побољшања методе. Микроталасна технологија је омогућила да се реакционо време додатно смањи.²⁹⁰ Поређене су синтезе 5,5-дисупституисаних хидантоина под условима термалног загревања и микроталасног зрачења. Процедура са микроталасним зрачењем је довела до стварања жељених једињења у току неколико минута реакције у два пута већем приносу него процедура са термалним загревањем. Испитана је и интензивнија Бучерер-Бергсова реакција која коришћењем „flow“ методе скраћује реакционо време на мање од сат времена.²⁹¹

1.8.16. Превођење других хетероцикличних једињења у хидантоине

Хидантоини се могу припремити из разних других цикличних деривата урее, као што су алантоин, креатинин, парабанска киселина, пурини и пиримидини. Бајерово откриће хидантоина је резултат оваквог начина добијања.²³ Алантоин, деградациони производ мокраћне киселине, се третира јодоводоничном киселином, што резултује елиминацијом групе супституисане у положају 5 (Схема 58).

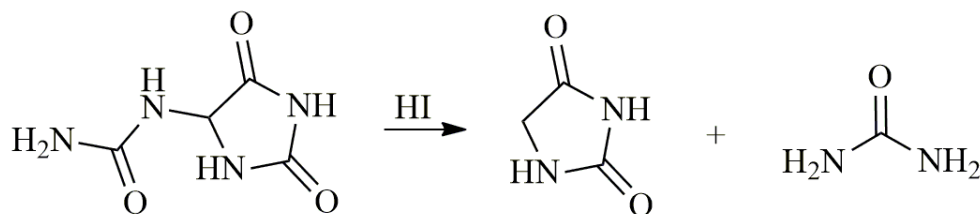


Схема 58. Добијање хидантоина из алантоина.

Редукцијом алантоина амалгамом натријума настаје гликоурил, који се може хидролизovati врелом хлороводоничном киселином до хидантоина или баријум-хидроксидом до хидантоинске киселине. Серија супституисаних хидантоина се тако може направити из деривата алантоина.²⁹²

Креатинин и његови 5-бензил и 5-бензал деривати се користе за добијање 1-метилхидантоина.²⁹³ Ова метода синтезе подразумева хидролизу имидне групе у положају С2 (Схема 59).

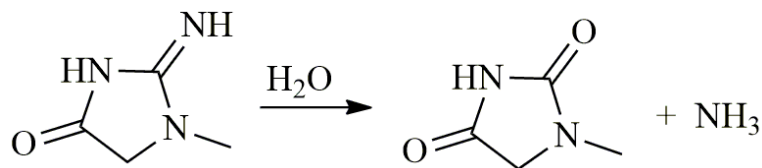


Схема 59. Синтеза 1-метилхидантоина из креатинина.

Хидантоине је могуће добити и редукцијом парабанске киселине, као и њених *N*-метил деривата. Електролитичком редукцијом парабанске киселине се директно добија

хидантоин,²⁹⁴ док се деловањем цинка и сумпорне киселине на 1,3-диметилпарабанску киселину добија 1,3-диметил-5-хидроксихидантоин, који се може редуковати јодоводничном киселином до 1,3-диметилхидантоина.²⁹⁵ Редуkcијом помоћу концентроване јодоводничне киселине се добија само диметилхидантоин, а не и интермедијерно хидрокси једињење (Схема 60).

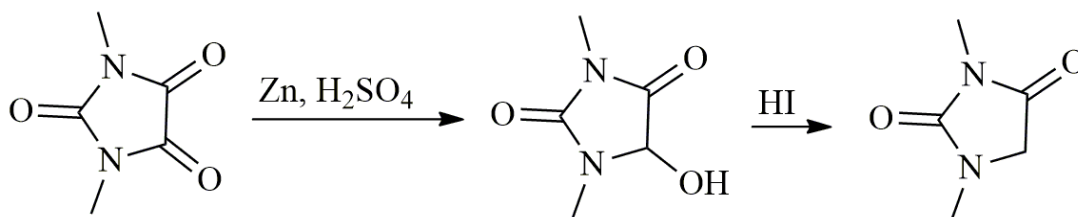


Схема 60. Добијање хидантоина редуkcијом парабанске киселине.

Оксидацијом деривата имидазола се могу добити одговарајући деривати хидантоина.²⁹⁶ 5,5-Диметилхидантоин се може синтетисати оксидацијом деривата имидазола, добијеног деловањем угљен-дисулфида и амонијака на ацетон (Схема 61).

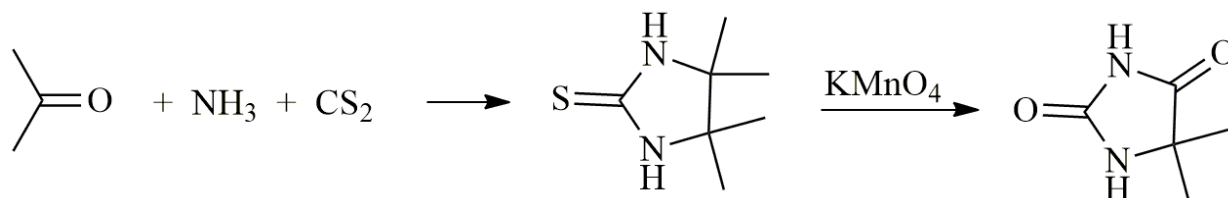


Схема 61. Синтеза хидантоина из деривата имидазола.

Убрзо након открића хидантоина 1861. године, Бајер је објавио да је направио исто једињење редуkcијом алоксанске киселине,²⁴ која се добија парцијалном хидролизом алоксана. Механизам ове реакције је разјашњен тек када су откривене структуре пиримидина и хидантоина. Утврђено је да је алоксанска киселина дериват хидантоина и да се метода добијања хидантоина из алоксана своди на превођење пиримидина у хидантоин (Схема 62).

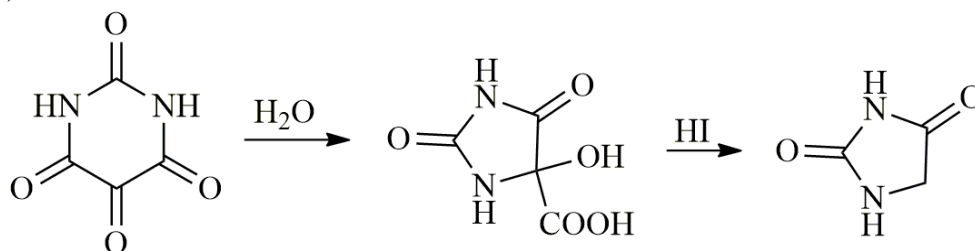


Схема 62. Добијање хидантоина из алоксана.

Неки други пиримидини се такође могу превести у хидантоине, као што су неки бромбарбитурати.²⁹⁷ Превођење у хидантоине се врши дејством алкалија и одвија се преко интермедијерног деривата бромацетилуреа, који затварањем прстена гради хидантоин (Схема 63).

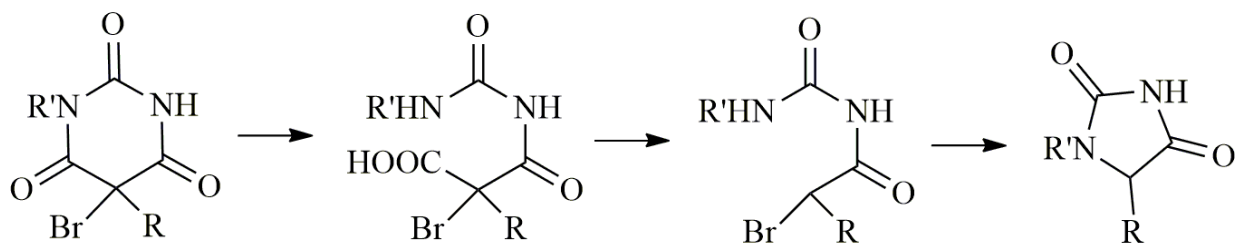


Схема 63. Добијање хидантоина из бромбарбитурата.

Када R' није водоник, у овој реакцији настају два изомерна хидантоина $N1$ супституисан (приказан на Схеми 63) и изомер у коме је R' у положају 3. У овој реакцији се такође добија и 2-имино-4-оксазолидон. Када се уместо водених алкалија користи алкохолни калијум-хидроксид, интермедијер, бромацетилуреа, се скоро потпуно преводи у производ.

Деградацијом деривата пурина, нарочито мокраћне киселине и њених деривата, се могу добити разни хидантоини.²⁹⁸ Коришћене су разне методе деградације, међу којима су оксидација, редукција и хидролиза киселинама или алкалијама. Из пурина су добијени многи необични хидантоини, које је иначе тешко добити. На пример, тетраметилспиро-5,5-дихидантоин је добијен оксидацијом тетраметилмокраћне киселине. Претпоставља се да се гради гликол као интермедијер, који даље пинаколским премештањем прелази у спиро-5,5-дихидантоин (Схема 64).

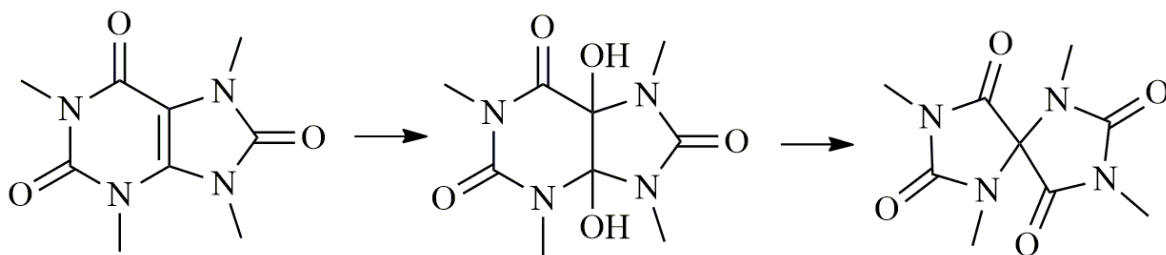


Схема 64. Добијање спиро-5,5-дихидантоина из тетраметилмокраћне киселине.

Бројни други деривати хидантоина су направљени деградацијом мокраћне киселине.²⁹⁹ Истраживања оксидације мокраћне киселине, у којима су атоми азота у положајима 1, 3 и 9 маркирани изотопом ^{16}N , су појаснила механизме деградације. Добијају се хидантоини који су формиран из уреидних група из петочланог и из шесточланог прстена, што је потврђено детектовањем маркираних азота.³⁰⁰

1.8.17. Синтеза хидантоина из азотних база нуклеотида

Оксидација ДНК, позната као оксидативни стрес, је појава која потиче из лакоће оксидације гуанина. Објављена су многа истраживања везана за оксидацију гуанозина синглетним кисеоником да би се разумео овај феномен, при чему су окарактерисани бројни метаболити главног оксидационог производа гуанозина, 8-оксо-7,8-дихидро-2,2-деоксигуанозина. Међу овим метаболитима се налазе и спироиминохидантоин (нађен у неутралној и базној средини) и гуанидинохидантоин (у киселој средини). Њихове карактеристике и механизми настајања су већином изучени (Схема 65).³⁰¹⁻³⁰⁷

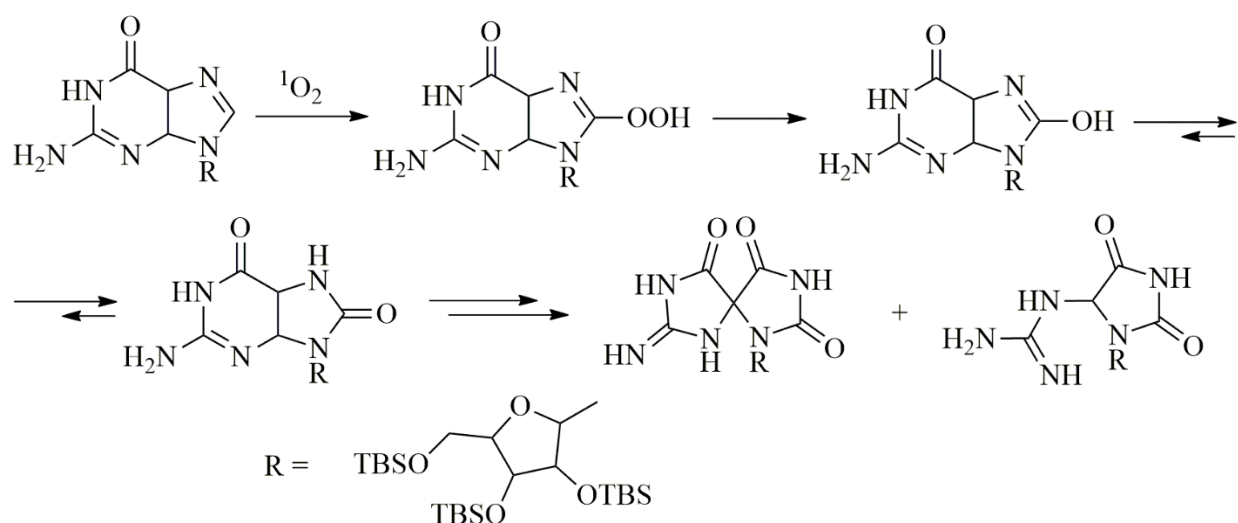


Схема 65. Разградња гуанозина деловањем синглетног кисеоника.

Описана је синтеза деривата спироиминодихидантоина,^{308,309} као и механизми оксидације два оксо аналога гуанозина, 5-хидроксиизоурата^{299,310,311} и кофеина.³¹² Процес оксидације цитозина води до грађења 5-хидроксихидантоинских нуклеозида (Схема 66).³¹³⁻³¹⁵

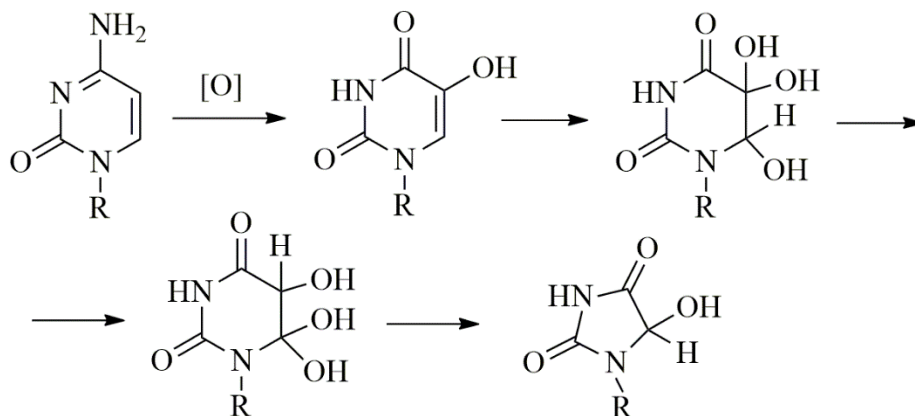


Схема 66. Оксидативни процес цитозина.

1.8.18. Синтеза хидантоина из тиохидантоина

Као што је већ напоменуто, тиохидантоини и њихови деривати се могу превести у одговарајуће хидантоине (Схема 67).^{2,316} Сумпорни хидантоини се често лакше добијају и изолују, а и реактивији су. Ово је значајно не само због лакшег добијања хидантоина, већ и због добијања неких хидантоина које није могуће добити директно.

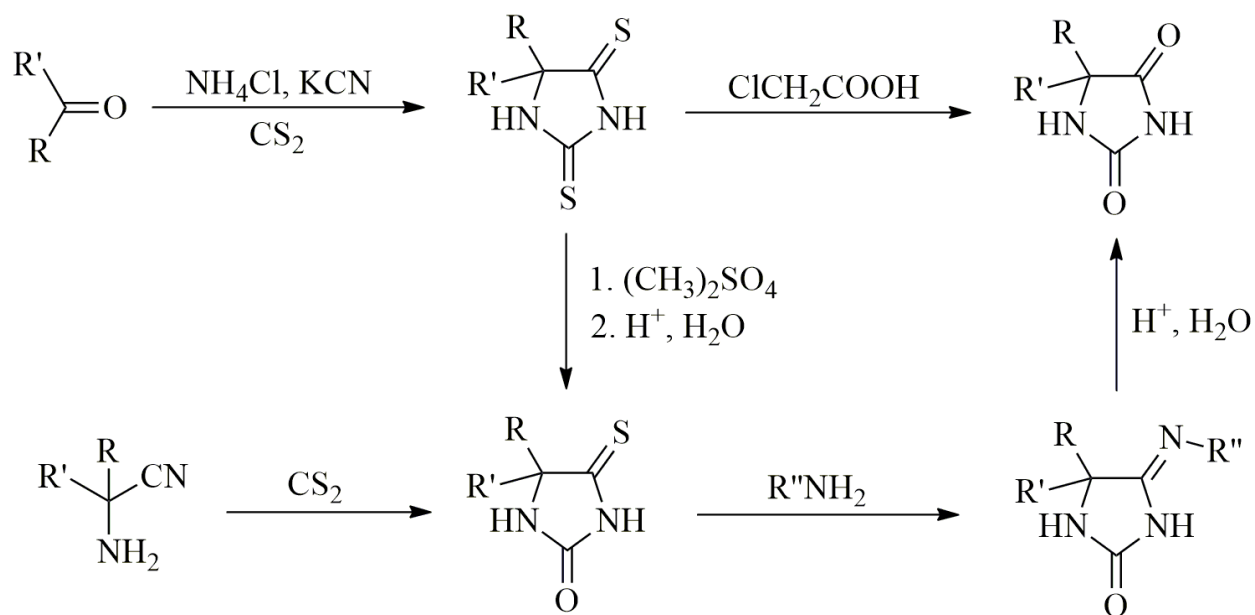


Схема 67. Добијање хидантоина из тиохидантоина.^{2,316}

2. НАШИ РАДОВИ

2.1. Синтеза деривата 2-тиохидантоина

2.1.1. Синтеза и карактеризација алкенилских деривата 2-тиохидантоина из α -аминокиселина

Постоји велики број синтетичких стратегија које доводе до грађења (тио)хидантоинског језгра, а једна од значајнијих и највише употребљаваних је добијање из аминокиселина.²⁷ Благи реакциони услови, високи приноси, лака обрада реакционе смеше и једноставна синтеза супституисаних и функционализованих деривата су главни разлози због којих је овај начин синтезе деривата (тио)хидантоина у широкој употреби. (Тео)хидантоини и аминокиселине су у овом смислу нераздвојни, јер, не само да се (тио)хидантоини добијају из аминокиселина, већ се и аминокиселине могу добити из (тио)хидантоина. Хидролизом (тио)хидантоина се могу добити супституисане, високо функционализоване и структурно комплексне аминокиселине, које је врло тешко или чак немогуће добити на други начин.³¹⁷

Осим што су синтетички атрактивни, хидантоини и тиюхидантоини добијени из аминокиселина поседују разне биолошке активности, као што су антимикробна,³¹⁸ антивирусна,³¹⁹ антитуморска³¹⁹ и антимуутагена.³²⁰ На основу претходно наведених чињеница је лако видети зашто су ови деривати хидантоина и даље предмет великог броја истраживања са циљем добијања нових биоактивних једињења и потенцијалних медицинских и терапеутских агенаса.

У Општем делу овог рада описани су различити начини на које се хидантоини могу добити из аминокиселина. Један од најефикаснијих и најпрактичнијих начина за добијање (тио)хидантоина из аминокиселина је реакција са алкил и арил изо(тио)цијанатима. У оквиру истраживања, чији су резултати приказани у овој дисертацији, синтетисана је серија алкенилских деривата 2-тиохидантоина, полазећи од разних α -аминокиселина, у реакцији са алил-изотиоцијанатом.

Први корак ове синтезе представља превођење α -аминокиселина **1a-љ** у метил естре **2a-љ**, метанолским HCl поступком са ацетил-хлоридом (Схема 68). Ацетил-хлорид у реакцији са метанолом генерише HCl и у оваквом хлороводоничном раствору метанола се α -аминокиселине лако преводе у одговарајуће хидрохлориде метил естара. Полазне α -аминокиселине се прво преводе у метил естре, јер оне саме не циклизују у реакцији са алил-изотиоцијанатом до деривата 2-тиохидантоина у овим условима, док метил естри подлежу реакцији циклизације до 2-тиохидантоина због лакше одлазеће метокси групе у својој структури. Овај поступак је једноставан, без грађења нуспроизвода, квантитативан и обрада реакционе смеше је проста, јер се упаравањем растварача отклањају све остале компоненте реакционе смеше осим производа. Чврсти хидрохлориди метил естара **2a-љ** се добијају у високим приносима (90 - 99%), без нечистоћа и као такви се могу даље користити без пречишћавања. Ова метода је поуздан начин за добијање метил естара великог броја аминокиселина. Метил естри аминокиселина се могу добити и коришћењем тионил-хлорида уместо ацетил-хлорида, мада његова употреба има одређене недостатке. Приликом обраде и упаравања реакционе смеше се често, уместо чврстог белог праха хидрохлорида метил естра аминокиселина, може добити густа, вискозна провидна течност, која стајањем очврсне. Снимањем ¹H NMR (нуклеарна магнетна резонанција) спектра овог остатка, уочено је да се неизреагована аминокиселина налази у смеси са метил естром, заједно са споредним производима. Ово је потврђено присуством карактеристичних сигнала ових

хемијских врста (протон на α -угљенику, на пример) у спектрима, што чини овај поступак непоузданим у поређењу са поступком са ацетил-хлоридом.

Други корак синтезе је реакција метил естара аминокиселина са алил-изотиоцијанатом. Хидрохлориди метил естара α -аминокиселина се прво ослобађају од HCl додатком триетиламина у вишку, јер је потребно да амино група аминокиселине буде депротонувана и слободна за реакцију нуклеофилне адиције. На крају, метил естри α -аминокиселина **2а-љ** реагују са алил-изотиоцијанатом, дајући одговарајуће деривате 2-тиохидантоина **3а-љ**.

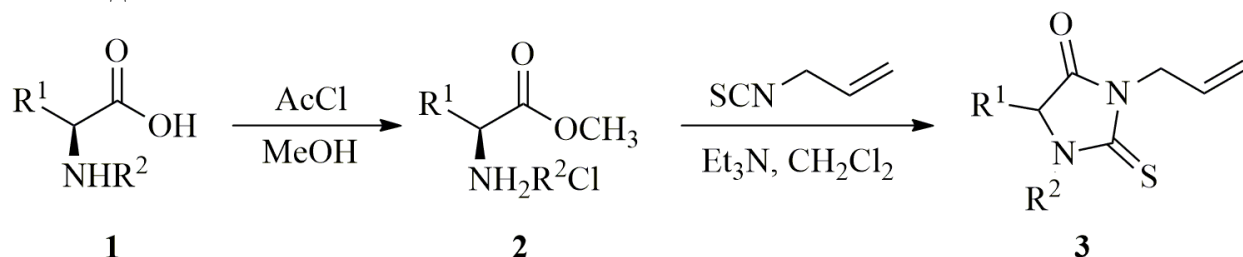


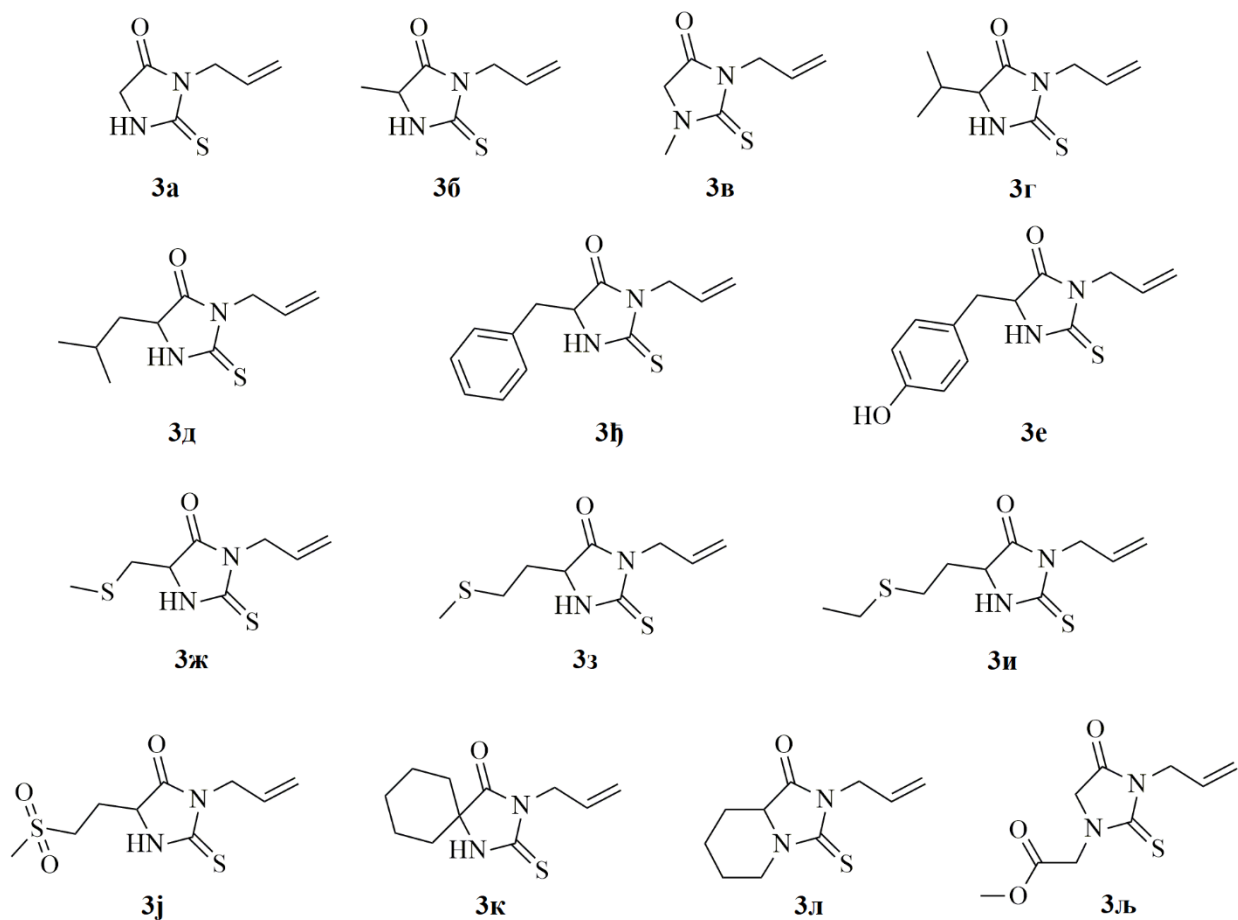
Схема 68. Синтеза деривата 2-тиохидантоина из α -аминокиселина.

Табела 1. Синтетисани алкенилски деривати 2-тиохидантоина **3а-љ**, структуре њихових супституената и приноси.

Производ	R ¹	R ²	Растварач	Принос (%)
3а	H	H	CHCl ₃	60
3б	Me	H	CH ₂ Cl ₂	51
3в	H	Me	CHCl ₃	97
3г	iPr	H	CH ₂ Cl ₂	81
3д	iBu	H	CH ₂ Cl ₂	96
3ђ	Bz	H	CHCl ₃	81
3е	4-OH-Bz	H	CHCl ₃	51
3ж	CH ₃ SCH ₂	H	CH ₂ Cl ₂	86
3з	CH ₃ SCH ₂ CH ₂	H	CH ₂ Cl ₂	82
3и	CH ₃ CH ₂ SCH ₂ CH ₂	H	CH ₂ Cl ₂	92
3ј	CH ₃ SO ₂ CH ₂ CH ₂	H	CHCl ₃	38
3к	-(CH ₂) ₅ -	H	CHCl ₃	90
3л	H	-(CH ₂) ₄ -	CH ₂ Cl ₂	86
3љ	H	CH ₃ OCOCH ₂	CH ₂ Cl ₂	54

Сви деривати 2-тиохидантоина **3а-љ** су добијени у добрим до одличним приносима, 51-97% (Табела 1, Слика 21). Од укупно четрнаест једињења из ове серије, седам су новосинтетисана (**3ж-љ**), а осталим седам су структуре биле већ познате (**3а-е**). Структуре и чистоћа свих производа су потврђени IR (од енгл. infrared spectroscopy) и NMR спектроскопијом, а спектрални подаци су приказани у Експерименталном делу. Одређени метил естри (**2а**, **2в**, **2ђ**, **2е**, **2ј** и **2к**) нису ступали у реакцију са алил-изотиоцијанатом у дихлорметану, али су зато реаговали и давали деривате 2-тиохидантоина у хлороформу (Табела 1). Ова разлика у реактивности највероватније потиче од разлике у поларности растварача. Још једна размотрена могућност је разлика у температури реакционе смеше, која

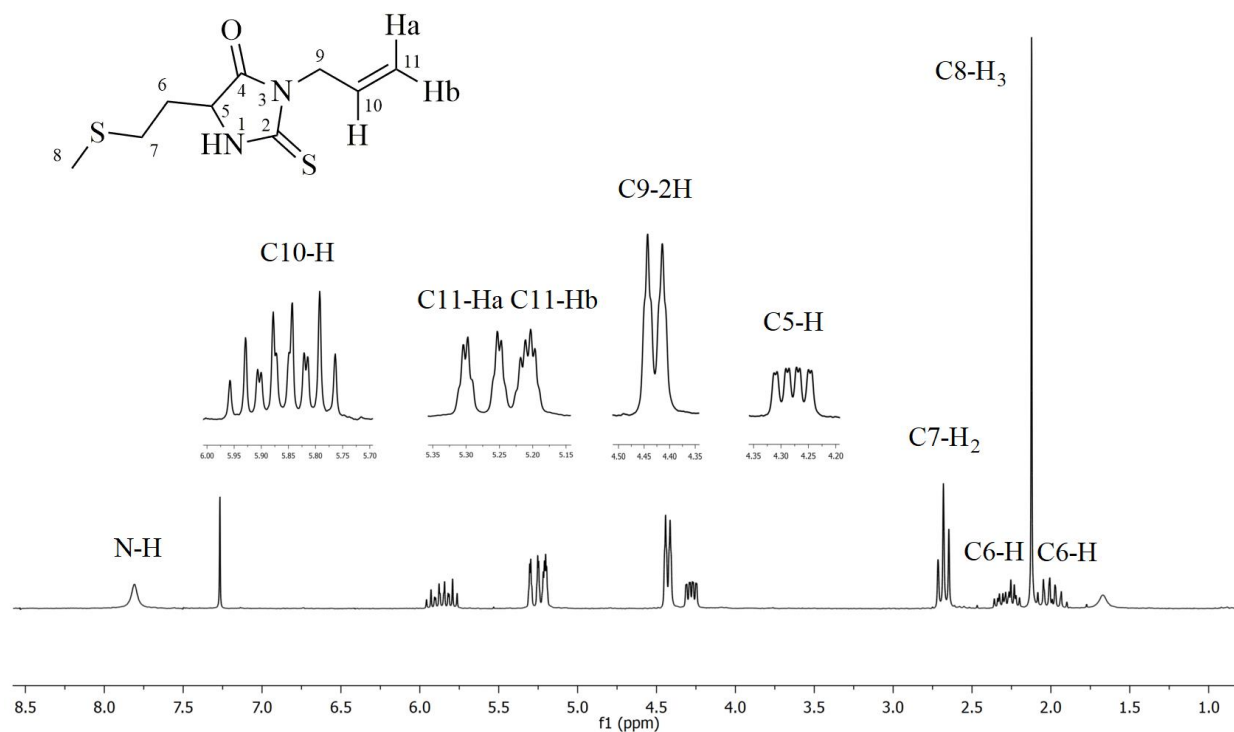
зависи од тачке кључања растварача, пошто су синтезе вршене под рефлуксом. Та могућност је касније елиминисана, јер су се у кинетичком NMR експерименту, описаном у једном од наредних поглавља, исте реакције одвијале и на собној температури, без кључања.



Слика 21. Структуре синтетисаних алкенилских деривата 2-тиохидаптоина 3а-љ.

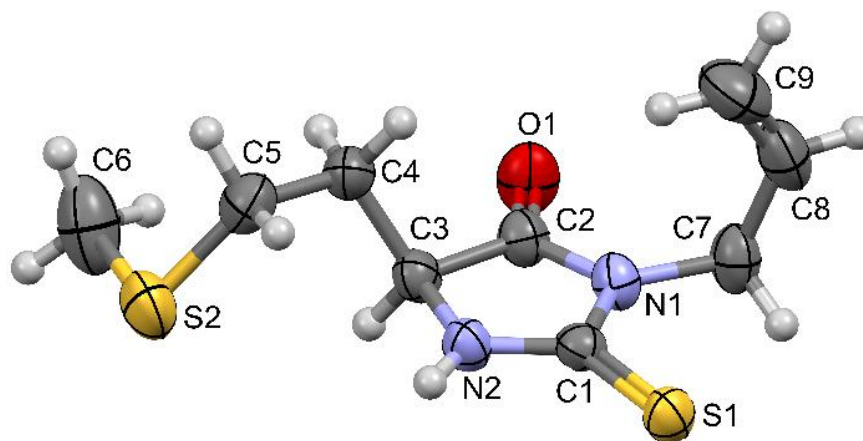
Синтетисани деривати 2-тиохидаптоина су структурно окарактерисани NMR и IR спектроскопијом. Протонски спектри свих једињења из ове серије садрже карактеристичне сигнале протона 2-тиохидаптоинског прстена и алилног супституента у положају 3, док се разликују по сигнаlima протона супституената у положајима 1 и 5. ^1H NMR спектар деривата 3з је приказан као пример на Слици 22. У спектрима свих једињења се изнад 7 ppm налази проширени синглет N-H протона 2-тиохидаптоинског језгра, осим деривата 3в, 3л и 3љ, који имају супституент на азоту у положају 1. У случају деривата 3з, овај сигнал се може уочити на 7,81 ppm (Слика 22). Карактеристични сигнали протона алилног супституента у положају 3 се уочавају у спектрима свих деривата. Највише померен, сигнал протона двостурке везе C10-H, се налази у спектру на 5,86 ppm у облику сложеног дублета дублета триплета. Сложеност овог сигнала потиче од спрезања протона C10-H са хемијски различитим протонима у својој околини. Триплети унутар овог сигнала потичу од спрезања са два хемијски идентична протона у положају 9 (вредност константе спрезања износи $J = 5,8$ Hz и карактеристична је за вицинално алифатично спрезање), док додатна цепања сигнала потичу од спрезања са два хемијски нееквивалентна протона у положају 11.

Константа спрезања са протоном H_b, у *cis* положају у односу на C10-H износи 10,2 Hz, док је константа спрезања са протоном H_a, у *trans* положају очекивано већа и износи 17,2 Hz. Мултиплет који потиче од протона двоструке везе у положају 11 се може уочити у спектру у области 5,18–5,32 ppm. Сам сигнал је врло сложен и не може се у потпуности разазнати, али се може, ради дискусије, сагледати као два дублета дублета за сваки од протона, који имају додатну фину структуру због алилног спрезања. Сигнал протона H_a је, као што је и очекивано, више померен (5,24-5,32 ppm) и више је поцепан, јер је у *trans* положају у односу на вицинални C10-H, док је H_b померен мало ниже (5,18-5,23 ppm), са очекиваним мањим цепањем сигнала, због *cis* положаја у односу на вицинални C10-H. Сигнал протона алилне CH₂ групе се налази на 4,43 ppm, привидно у облику дублета са константом спрезања од $J = 6,0$ Hz. Када се сигнал сагледа детаљније, уочава се да је он заправо дублет триплета, који има фину структуру због алилног спрезања. Сви спектри синтетисаних деривата садрже и сигнал протона у положају 5 тиохидантоинског прстена, мало изнад 4 ppm, изузев спироцикличног **3к**, који нема протон у овом положају. Мултиплицитет овог сигнала зависи од супституције у положају 5 и у случају једињења **3з**, налази се на 4,28 ppm у облику дублета дублета дублета, са константама спрезања $J = 1,2, 4,2$ и $7,4$ Hz. Протон C5-H кругог прстенастог система се различито спреже са вициналним протонима C6 атома и одатле потичу различите константе спрезања од 4,2 и 7,4 Hz, док константа од 1,2 Hz одговара даљинском спрезању са протонима у положају 7. Остали сигнали у спектру потичу од протона супституента у положају 5. Триплет на 2,68 ppm потиче од протона у положају 7, мултиплети на 2,18–2,34 ppm и 1,89-2,10 ppm потичу од протона у положају 6, док синглет на 2,12 ppm потиче од CH₃-S протона у положају 8. Резултати добијени из ¹³C NMR спектра су у сагласности са ¹H NMR спектрима.



Слика 22. ¹H NMR спектар деривата 2-тиохидантоина **3з**.

Углавном су сва једињења добијена у кристалном облику, али су само кристали деривата **3з** били погодни за рендгенску структурну анализу. Молекулска структура тиохидантоина **3з** је приказана на Слици 23. Све дужине веза, валенце и торзиони углови су у очекиваном опсегу, у поређењу са структурама у Кембрицовој бази структурних података (Cambridge structural database) са сличним структурним фрагментима.³²¹ Петочлани прстен 2-тиохидантоина је планаран, са алилним супституентом оријентисаним нормално на раван прстена (торзиони угао C1–N1–C7–C8 износи $-88.7(2)^\circ$).

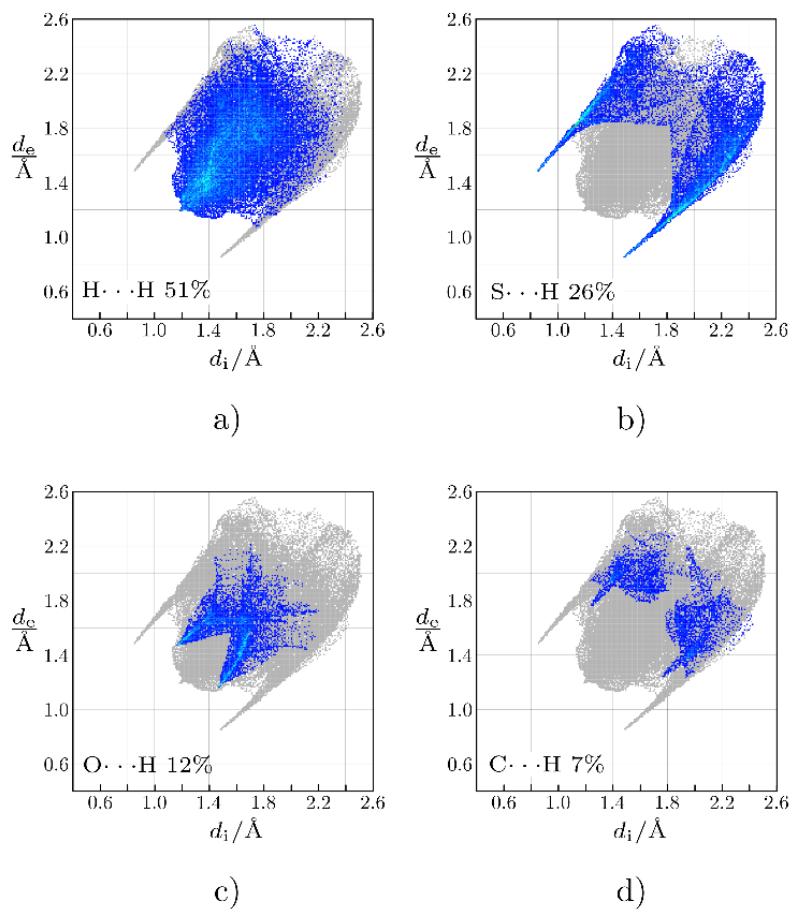


Слика 23. Молекулска структура тиохидантоина **3з**.

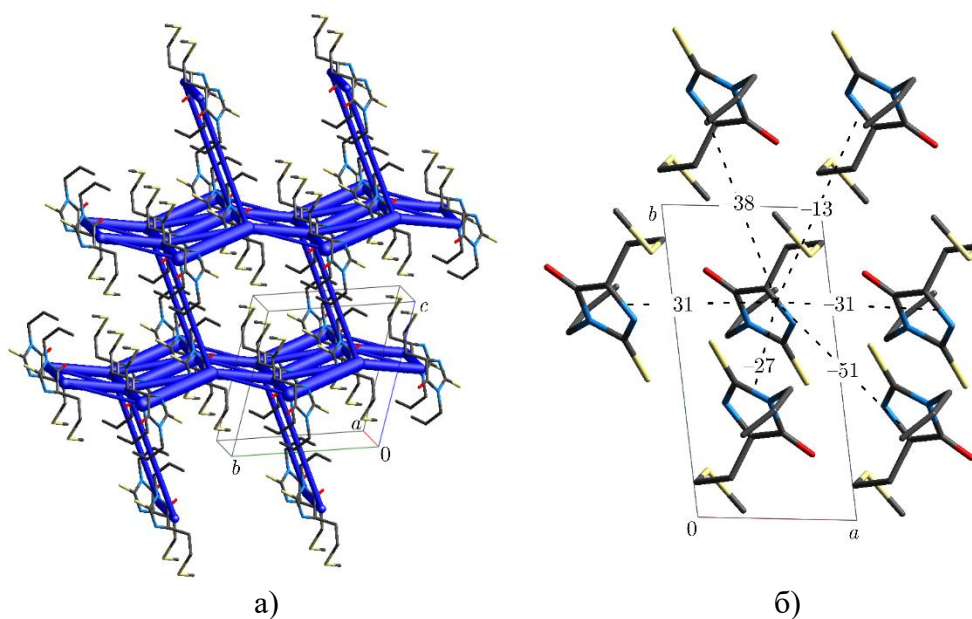
Хиршфелдовом (Hirshfeld) анализом површине (Слика 24) је откривено да се већина интермолекулских контаката налазе између водоникових атома (51%), затим S \cdots H (26%), O \cdots H (12%) и C \cdots H (7%). Рачунањем односа обогаћења³²² је показано да су сви контакти, осим H \cdots H ($E_{\text{HH}} = 0,9$), фаворизовани у кристалној структури ($E_{\text{OH}} = 5,8$, $E_{\text{SH}} = 1,2$, $E_{\text{CH}} = 1,2$). За највећи удео Хиршфелдове површине важи $d_{\text{norm}} \geq 0$, што значи да кристално паковање не обухвата пуно кратких интермолекулских контаката. Изузетак је N2–H2 \cdots S1ⁱ водонична веза (операција симетрије (i) $-x+2, -y+1, -z+1$).

У првој координационој сфери **3з** се налазе 14 молекула, између којих је остварено 11 засебних интермолекулских интеракција. Енергије ових интеракција су сумиране у Табели 2. Дисекцијом молекулског паковања по енергији се види да је структура слојевитог типа, што је и шематски приказано у енергетском оквиру на Слици 25а.

Сваки молекул је окружен са шест суседних молекула у кристалографској *ab* равни (Слика 25б). Најјача интеракција је остварена преко N2–H2 \cdots S1ⁱ водоничне везе (-51 kJ mol^{-1}), награђене између два инверзно повезана молекула. Висок електростатички допринос енергији стабилизације ове интеракције се очекује због велике електростатичке компатибилности међу молекулима. Друге интеракције у овој равни имају значајно већу дисперзију од електростатичке компоненте, али се не могу тачно приписати некој одређеној интеракцији атом-атом типа. Енергије ових интеракција су у опсегу -13 до -38 kJ mol^{-1} . Постоји само једна интеракција између слојева са енергијом упоредивом са интеракцијама унутар слојева (-20 kJ mol^{-1}). Ова интеракција има сличан допринос електростатичке и дисперзионе компоненте.



Слика 24. „Fingerprint“ дијаграми тиохидантоина 33.



Слика 25. а) Енергетски оквир. б) Фрагмент молекулског паковања у кристалографској ab равни (атоми водоника нису приказани); енергије интеракција су приказане у kJ mol^{-1} .

Табела 2. Енергије интермолекулских интеракција засебних молекулских парова пре координационе сфере Zz , израчунате $CE-B3LYP$ моделом.

N	Операције симетрије	R / Å	E / kJ mol ⁻¹				
			E _{ele}	E _{pol}	E _{dis}	E _{rep}	E _{tot}
1	-x, -y, -z	6,13	-71,4	-14,3	-23,7	90,8	-50,6
1	-x, -y, -z	6,39	-17,0	-5,6	-28,7	15,1	-37,8
2	x, y, z	5,32	-11,4	-5,8	-34,1	24,0	-31,2
1	-x, -y, -z	4,94	-15,5	-4,0	-30,6	30,5	-27,2
1	-x, -y, -z	9,78	-14,0	-2,9	-17,3	18,7	-20,4
1	-x, -y, -z	6,58	1,2	-2,0	-22,0	9,7	-13,4
1	-x, -y, -z	12,13	-4,2	-0,7	-7,6	6,4	-7,6
2	x, y, z	10,93	-0,0	-0,3	-5,5	3,3	-2,9
2	x, y, z	11,16	0,1	-0,1	-2,3	0,3	-1,8
1	-x, -y, -z	10,77	1,9	-0,2	-4,1	0,3	-1,5
1	-x, -y, -z	12,95	2,0	-0,4	-3,2	1,9	0,2

N је број интеракција; R је раздаљина између молекулских центроида. Одговарајуће операције симетрије просторне групе су наведене без translације. Укупна енергија је израчуната сабирањем индивидуалних компоненти: $E_{tot} = k_{ele}E_{ele} + k_{pol}E_{pol} + k_{dis}E_{dis} + k_{rep}E_{rep}$, где су $k_{ele} = 1,057$, $k_{pol} = 0,740$, $k_{dis} = 0,871$ и $k_{rep} = 0,618$.

2.1.2. Синтеза и карактеризација арилиденских деривата 2-тиохидаптоина из ароматичних алдехида

Поред деривата тиохидаптоина добијених из α -аминокиселина, још једну значајну групу деривата представљају арилиденски (тио)хидаптоини, који се издвајају због разних биолошких активности које поседују, као што су антимикуробна,¹²⁴ антифунгална,¹⁷⁰ антитуморска,³²³ антиконвулзивна,³²⁴ примена у третману различитих метаболичких поремећаја,¹¹⁸ инхибиција тирозиназе и синтезе меланина,¹⁴⁰ адреноцептор антагонистичка активност³²⁵ итд. Неки арилиденски деривати хидантоина су, између осталог, одобрени за клиничку употребу, као што је већ поменуто у Општем делу (њихове структуре су приказане на Слици 6). Нитрофурантоин је орални антибиотик који се користи за лечење инфекција уринарног тракта. Дантролен је мишићни релаксант и он је примарни лек који се користи у третману и превенцији малигне хипертермије, малигног неуролептичког синдрома, мишићног спастичитета и тровања 2,4-динитрофенолом.

Потрага за новим биолошки активним једињењима често почиње од супстрата који су већ показали одређене биолошке активности. Комбиновањем више фармакофора у један молекул у циљу добијања нових биоактивних структура се могу потенцијално побољшати већ постојеће биолошке активности полазних структура или чак добити потпуно нове активности. Ванилин (4-хидрокси-3-метоксибензалдехид) је метаболит и главни састојак

екстракта ваниле, једног од најпопуларнијег и највише коришћеног адитива у прехранбеној индустрији.³²⁶ Осим што је познат по пријатном укусу и мирису, ванилин и његови деривати су познати по бројним биолошким активностима, као што су антиканцер,³²⁷ неуропротективна,³²⁸ антимикуробна,³²⁹ антиоксидативна,³³⁰ примена у лечењу Алцхајмерове болести³³¹ итд. На основу претходно наведених чињеница, један од циљева наших истраживања је био синтеза серије ванилинских деривата 2-тиохидантоина и испитивање њихових биолошких активности.

У Општем делу ове дисертације су кроз поглавља приказани различити начини за добијање арилиденских тиюхидантоина. Такође, приказано је да поред аминокиселина, један од најчешћих супстрата за добијање тиюхидантоина представљају карбонилна једињења. Постоје разни начини за добијање тиюхидантоина из карбонилних једињења, а један од њих, коришћен у оквиру овог истраживања, је реакција ароматичних алдехида и тиосемикарбазида, деривата тиоурее (Схема 69).

У првом кораку синтезе, полазећи од ароматичних алдехида **4а-љ**, у реакцији са тиосемикарбазидом у метанолу добијају се тиосемикарбазони **5а-љ**. Након тога, добијени тиосемикарбазони **5а-љ** даље реагују са етил-хлорацетатом у присуству анхидрованог натријум-ацетата у метанолу, дајући коначне арилиденске деривате 2-тиохидантоина **6а-љ**. Сви деривати 2-тиохидантоина су добијени у добрим до одличним приносима (Табела 3, Слика 26), а њихова структура и чистоћа су потврђени IR и NMR спектроскопијом (спектрални подаци ових једињења су дати у Експерименталном делу). Од четрнаест једињења у овој серији, девет је новосинтетисано (**6ђ-љ**). У раније описаним процедурама се тиосемикарбазони таложе, одвајају, испирају, пречишћавају и прекристалишу пре даљих хемијских трансформација. Међутим, није примећена никаква значајна разлика у приносима и току реакције када је додавање етил-хлорацетата вршено *in situ*, што представља благо побољшање у односу на претходно објављену процедуру²¹⁰ у смислу времена, једноставности поступка и материјалних ресурса.

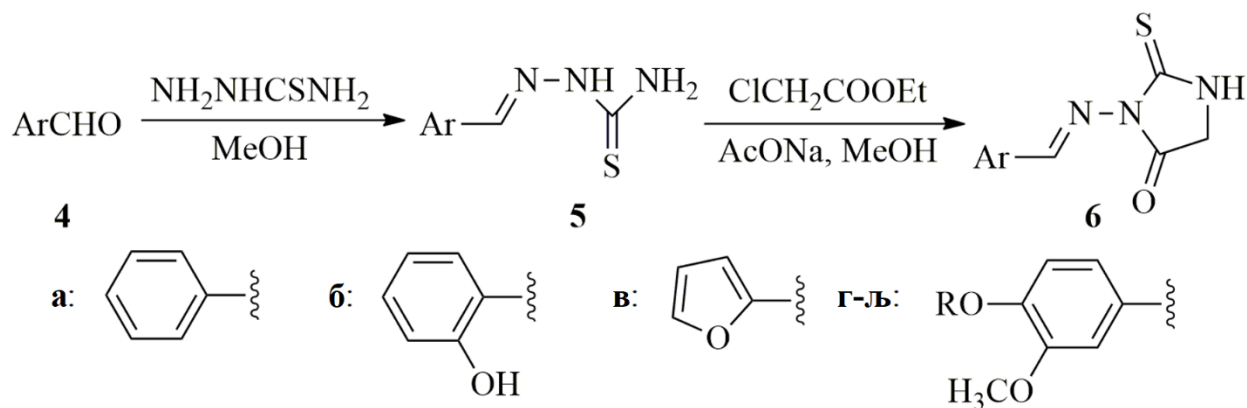
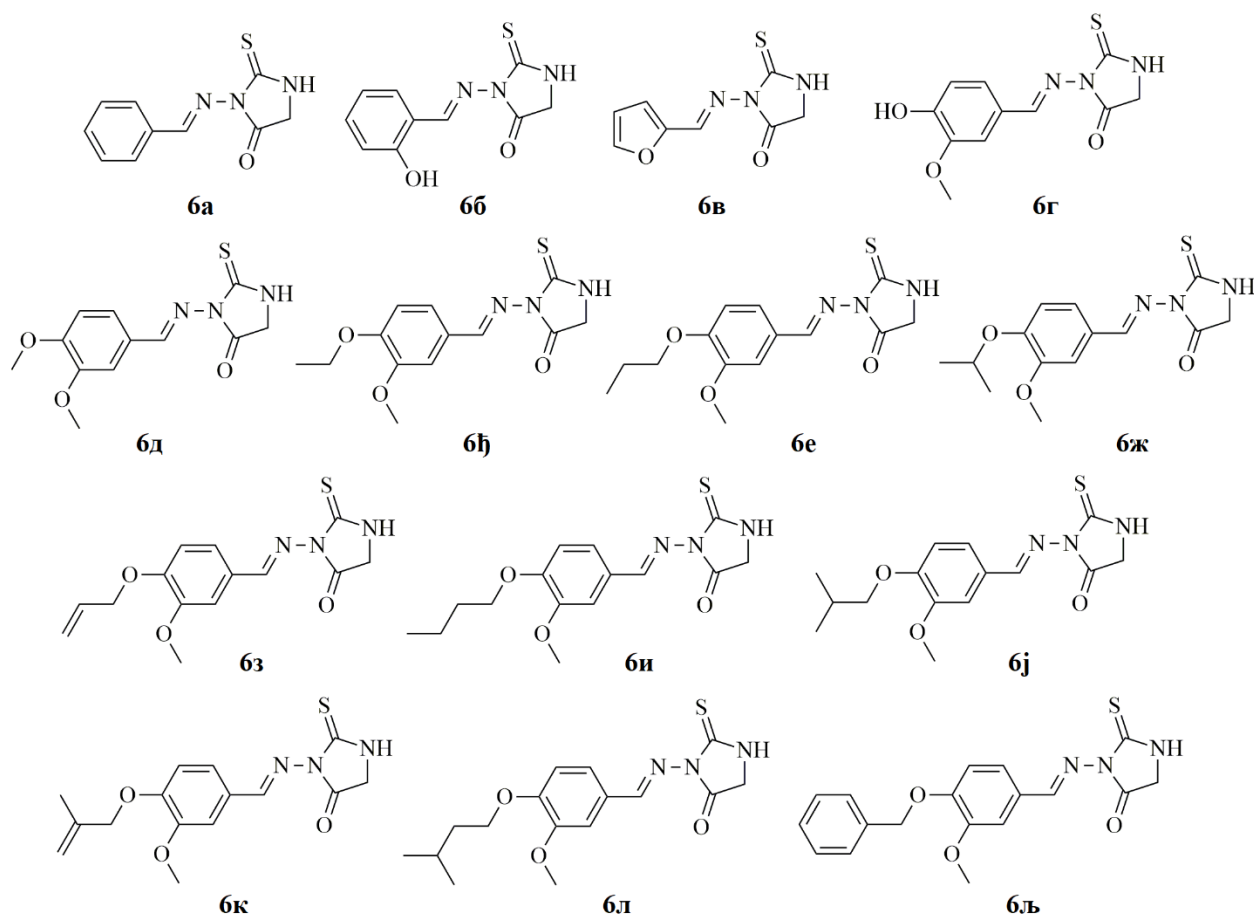


Схема 69. Синтеза арилиденских деривата 2-тиохидантоина.

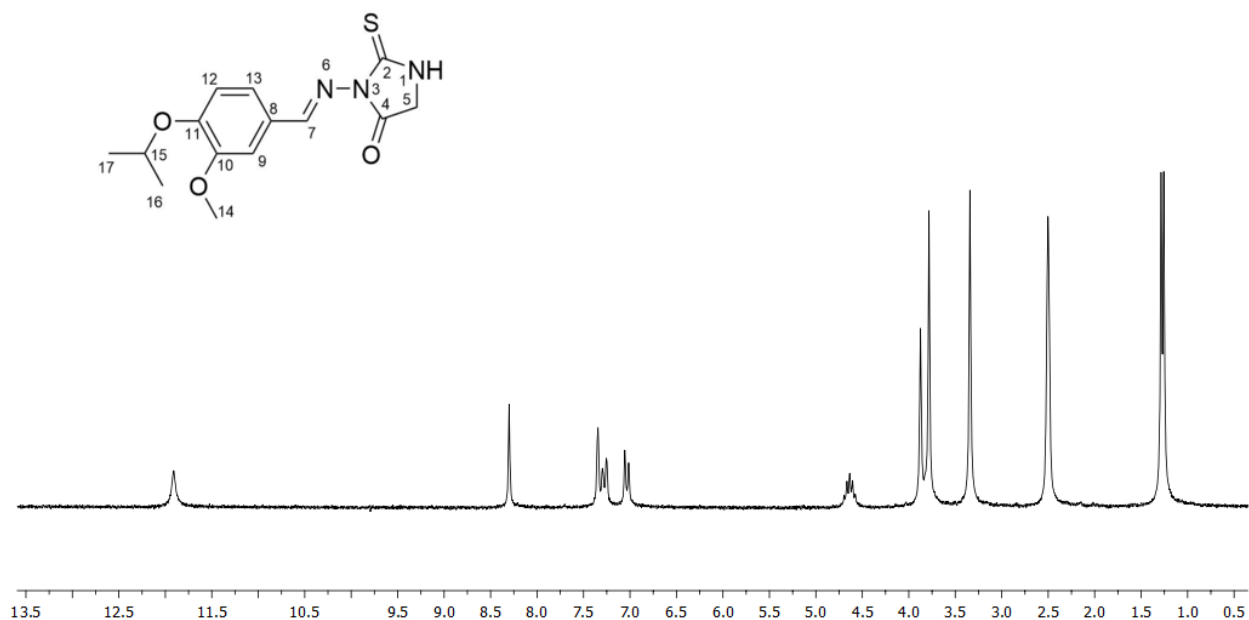
Табела 3. Синтетисани арилиденски деривати 2-тиохидаптоина ба-љ.

Производ	R	Принос (%)
ба	-	72
бб	-	89
бв	-	57
бг	H	96
бд	Me	84
бђ	Et	73
бе	Pr	69
бж	<i>i</i> -Pr	51
бз	алил	68
би	Bu	71
бј	<i>i</i> -Bu	48
бк	металил	66
бл	<i>i</i> -Pe	65
бљ	Bz	58



Слика 26. Структуре синтетисаних арилиденских деривата 2-тиохидаптоина ба-љ.

У протонским спектрима свих добијених арилиденских деривата 2-тиохидаптоина **ба-љ** се могу уочити сигнали карактеристични за тиюхидаптоинску структуру, проширени синглет NH протона у положају 1 изнад 11 ppm и синглет протона CH₂ групе у положају 5 на око 3,8 ppm. Такође, синглет алдиминског протона, који садрже сви деривати, налази се мало изнад 8 ppm. Све ово је илустровано на примеру спектра деривата **бж** (Слика 27). Проширени синглет NH протона у положају 1 тиюхидаптоинског прстена се налази на 11,91 ppm, синглет протона CH₂ групе у положају 5 је на 3,88 ppm, док је синглет алдиминског протона у положају 7 на 8,30 ppm. Хемијско померање и мултиплицитет ароматичних протона зависе од супституције бензеновог прстена. У случају ванилинских деривата 2-тиохидаптоина **бг-љ**, се због 1,3,4-супституције, уочавају синглет и два дублета, који граде АВ квартет, што се може и видети у спектру деривата **бж**, на Слици 27. Синглет протона у положају 9 се налази на 7,34 ppm. Дублети протона у положају 12 и 13 налазе на 7,27 и 7,03 ppm и граде АВ квартет карактеристичан за два изолована блиска протона, који се спрежу само један са другим. Константе спрежања ових дублета имају вредности од 8,2 и 6,0 Hz, што је у очекиваном опсегу за сигнале овог типа. Ванилински деривати у својој структури садрже метокси групу, везану за бензенов прстен, чији се протони у спектрима налазе на око 3,8 ppm, што се може и видети на примеру спектра **бж**, у коме се синглет ових протона, у положају 14, налази на 3,78 ppm. Хемијско померање и мултиплицитет другог *O*-алкил остатка зависе од структуре алкил групе. У случају деривата **бж**, сигнал СН протона угљеника у положају 15, везаног за кисеоник се може уочити као септет на 4,64 ppm ($J = 8,2$ Hz), а дублет протона метил група у положају 16 и 17 се налази на 1,27 ppm ($J = 6,0$ Hz). Подаци добијени из ¹³C NMR спектра су у сагласности са ¹H NMR спектрима.



Слика 27. ¹H NMR спектар деривата 2-тиохидаптоина **бж**.

2.2. Кинетика и механизам реакција настајања алкенилских деривата 2-тиохидантоина из α -аминокиселина

Деривати 2-тиохидантоина се из α -аминокиселина могу добити на више начина, а најчешће у реакцији са алкил- или арил-изотиоцијанатима.²⁷ Алил-изотиоцијанат (АИТС) је главни пикантни састојак рена и слачице и широко коришћен адитив у прехранбеној индустрији. Лако реагује са аминокиселинама у протеинским ланцима, градећи деривате 2-тиохидантоина.³³² 2-Тихидантоини се зато потенијално могу добити приликом процеса припреме и кувања хране, као и при метаболизму једињења унешених кроз исхрану. Ово повлачи питање хемијских и биолошких импликација њиховог присуства и, сходно томе, разјашњавање механизма њиховог настајања добија на значају.

Једно од првих истраживања у области механизма настајања тихидантоина је Едманов рад на секвенцирању пептида и развијање већ поменуте методе за одређивање примарне структуре пептида назване „Едманова деградација“.²³⁸ Ова метода, као што је већ описано, обухвата раскидање једне по једне пептидне везе са *N*-терминуса у реакцији са фенил-изотиоцијанатом, при чему се добијају деривати 2-тиохидантоина. Иако је ова метода добила разне допуне, као и критике^{333,334} и углавном се више не користи, она је ипак од великог значаја, не само за секвенцирање протеина, већ и за хемију хидантоина у целости.

2.2.1. Примена NMR спектроскопије у испитивању кинетике и механизма реакција

Испитивање реакција употребом NMR спектроскопије је тема великог броја истраживања.³³⁵⁻³³⁸ Јединствена способност NMR технике да прати индивидуална језгра атома у различитим хемијским срединама је чини врло моћном методом за кинетичку анализу.³³⁹ Најефикаснији начин за праћење реакције је узастопно снимање ¹H NMR спектра након одређених временских интервала. Праћењем промене интензитета одговарајућих сигнала реактаната и производа могу се добити битне информације (као што је промена концентрације, нпр.), које су неопходне за одређивање кинетичких параметара реакције. Ипак, примена ове методе је ограничена на спорије реакције, чије се брзине поклапају са NMR временском скалом. Појединачна спекрална аквизиција траје од дела секунде до пар секунди, а постизање одговарајућег односа сигнала и шума захтева до неколико десетина пролаза при ниским концентрацијама узорка. Ово значи да разлика између појединачних тачака временске скале реакције износи бар неколико секунди, па навише. Постоји и одређен временски интервал на самом почетку реакције, који се не може пратити, јер извесно време прође пре снимања првог спектра, због мешања реактаната, убацивања узорка у апарат, уједначавања температуре и подешавања магнетног поља. Ово почетно „мртво“ време се мери минутима, мада се може значајно смањити коришћењем „flow“ сонди.³⁴⁰

Ако су реакције довољно споре, NMR даје мноштво корисних информација за карактеризацију реакционих путева и интермедијера. Сигнали релативно малих молекула у ¹H NMR спектрима се обично са лакоћом асигнирају и индивидуални реакциони производи се могу идентификовати и селективно посматрати праћењем одговарајућих резонанци. Ако резолуција ¹H NMR није довољна, могу се употребити дводимензионалне технике, као што су 2D COSY (од енгл. two-dimensional correlation spectroscopy) или TOCSY (од енгл. total correlation spectroscopy), да би се побољшало одвајање резонанци и боље идентификовали производи. Реакције које се могу зауставити представљају посебан случај брзих реакција

које се могу пратити NMR спектроскопијом. Када се реакција заустави, састав и концентрације интермедијера и производа се могу анализирати снимањем спектра, при чему се обезбеђује детаљна карактеризација у сваком заустављеном интервалу реакције.³⁴¹

2.2.2. Примена теоријских метода у испитивању кинетике и механизма реакција

Комбинација NMR спектроскопије и *in silico* метода представља моћан алат за изучавање кинетике и механизма реакција.³⁴² Рачунарска хемија је, поред уобичајених лабораторијских техника, постала једно од основних оруђа за изучавање хемијских процеса. Рачунарске методе играју све већу улогу у истраживањима у оквиру хемије, материјала и природно-математичких наука уопште.³⁴³ У органској хемији су рачунарске методе нарочито значајне за изучавање структура и својстава једињења и боље разумевање реакционих механизма, што је довело до развијања нових реакција и катализатора.³⁴⁴ Данас велики део публикација у области хемије садржи неку врсту рачунарских метода. Рачунарске методе су нарочито погодне за изучавање реакционих механизма због информација које могу да пруже, као што су површине потенцијалне енергије (од енгл. *potential energy surfaces*) разних реакционих путева, као и геометријска и електронска својства реактаната, производа, интермедијера и прелазних стања. Ове информације, у поређењу са експерименталним опсервацијама, као што су кинетика, реакциони интермедијери, изотопни ефекти и стереохемија, дају потпунију слику о изучаваном хемијском проблему.

За широку примену рачунарске хемије одговорни су напреди и побољшања у програмским пакетима, међу којима се издваја Gaussian, кога су развили Попл (Pople) и сарадници,³⁴⁵ као и настанак рачунарских метода заснованих на теорији функционала густине (DFT, од енгл. *Density Functional Theory*), коју је развио Кон (Kohn).³⁴⁶ Поплу и Кону је за своје доприносе рачунарској и квантној хемији додељена Нобелова награда у области хемије 1998. године.^{347,348} Данас рачунарске методе не користе само теоријске истраживачке групе, већ и експериментатори који их користе за поређење са својим експерименталним опсервацијама.

Главни задатак рачунарске хемије је решавање хемијских проблема симулирањем хемијских система, како би се добили прецизни и поуздани подаци на атомском нивоу. Квантно-механичке методе, такође познате и као „*ab initio*“ методе се користе да би се израчунало како интерагују електрони и атомска језгра решавањем временски зависне електронске Шредингерове (Schrödinger) једначине у Борн-Опенхајмеровој (Born–Oppenheimer) апроксимацији.³⁴⁹ Квантно-механичке методе могу да се класификују у две групе, методе засноване на таласној функцији и методе засноване на теорији функционала густине (DFT).

Методе засноване на таласној функцији подразумевају решавање електронске Шредингерове једначине у сврси рачунања експлицитно корелираних таласних функција. Најједноставнија метода овог типа је Хартри-Фокова (Hartree–Fock) метода, у којој су мултиелектронске таласне функције апроксимирани на једну Слејтерову (Slater) детерминанту. Ова апроксимација је заправо и највећа мана Хартри-Фокове методе, јер занемарује корелацију између електрона. Наиме, овом методом се претпоставља да се електрон креће кроз просечно поље које чине сви остали електрони, док је заправо кретање електрона корелисано и кретање једног електрона зависи од тренутне међусобне интеракције са осталим електронима. Овај недостатак доводи до грешке у таласној функцији и енергији, као и предвиђању кинетичких баријера и Лондонових (London) дисперзионих

сила. Упркос овим недостацима, Хартри-Фокова метода се може системски унапредити. Може се унапредити употребом пертурбационе теорије и Молер-Плесетове (Møller–Plesset) методе³⁵⁰ или изражавањем таласне функције као линеарне комбинације Слејтерових детерминанти.³⁵¹ Ипак, и поред унапређења која су увеле наведене пост-Хартри-Фокове методе, њихова примена је ограничена јер су рачунарски врло захтевне.

2.2.2.1. Теорија функционала густине

Методе засноване на теорији функционала густине (DFT) су утемељене на математичким формулацијама које су развили Кон (Kohn) и Шам (Sham) 1965. године.³⁵² Теорема коју су поставили налаже да је енергија основног стања недегенерисаног електронског система дефинисана укупном електронском густином $\rho(r)$ кроз егзактан математички функционал, тј. да се енергија система може изразити као функционал E од $\rho(r)$, тј. $E[\rho(r)]$. Предности ове методе у односу на методе засноване на таласној функцији леже у томе што у теорији функционала густине $\rho(r)$ система од N броја електрона зависи само од три просторне координате, док одговарајућа таласна функција зависи од $3N$ просторних и N спинских варијабила. Према томе, DFT методе су једноставније од Хартри-Фокове методе, а за разлику од ње садрже значајни део недостајуће електронске корелације. Недостатак DFT метода представља то што, иако се постојање универзалног функционала електронске густине, који се односи на енергију система, може математички демонстрирати, тачан облик $E[\rho(r)]$ је за сада још увек непознат. Потрага за функционалима који ће да повежу ове две величине, названи функционалима корелације измене (од енгл. exchange-correlation functional, $E_{xc}[\rho(r)]$) је довела до постојања великог броја DFT метода.³⁵³

Најједноставнији приступ за $E_{xc}[\rho(r)]$ је апроксимација локалне густине (од енгл. Local Density Approximation, LDA), која претпоставља да $E_{xc}[\rho(r)]$ зависи само од експресије вредности функционала $\rho(r)$ у локалној позицији r . LDA је унапређена апроксимацијом генералног градијента (од енгл. Generalized Gradient Approximation, GGA), у којој $E_{xc}[\rho(r)]$ не зависи само од густине $\rho(r)$, већ и од градијента густине, $\nabla\rho(r)$, при чему се урачунава варирање електронске густине у простору, које је присутно у сваком хемијском систему. Мета-GGA функционали су нова класа метода у којима се урачунавају градијенти густине вишег реда. Комбинацијом конвенционалних GGA $E_{xc}[\rho(r)]$ са Хартри-Фок функционалом измене електрона $E_x(\text{HF})$ се добијају хибридни DFT функционали. У овим случајевима се користе емпиријски фактори, тако што се одређени коефицијенти фитују са експерименталним подацима или пост-Хартри-Фок резултатима таласне функције. На крају, хибридне мета-GGA методе примењују мета-GGA концепт у конвенционалним хибридным функционалима, тако да ове методе зависе од електронске густине и њеног градијента, процента измене и кинетичке електронске густине.

Као што је већ напоменуто, развијен је велики број DFT метода. Међутим, најчешће се примењују само неке од њих, пошто обезбеђују адекватан опис електронске структуре и других особина широког скупа молекулских система. Уобичајене GGA методе су PBE,³⁵⁴ OPBE,³⁵⁴⁻³⁵⁶ PW91^{357,358} и BLYP.^{359,360} Конвенционалне хибридне методе су B3LYP,^{360,361} BNLYP,^{360,362} PBE0^{363,364} и wB97X.³⁶⁵ Најчешће употребљиван мета-GGA функционал је M06L,³⁶⁶ а хибридни мета-GGA функционали су M06 и M06-2X.³⁶⁷

2.2.2.2. Базисни скупови

Базисни скупови су линеарне комбинације базисних функција који се користе за конструкцију молекулских орбитала, које затим представљају електронску таласну функцију. Према томе, употреба базисних скупова у прорачунима електронске структуре је неизоставна. Квалитет и прецизност прорачуна зависе од комплетности изабраног базисног скупа. Постоје два главна типа базисних скупова. Орбитале гаусијанског типа (од енгл. Gaussian-type orbitals, GTO) и равни таласи (од енгл. plane waves, PW). GTO су локализоване функције центриране око атома. Оне се најчешће користе за молекулске прорачуне, јер показују типичну радијално-ангуларну декомпозицију и просторну симетрију атомских орбитала. PW су периодичне функције по природи, тј. они нису локализоване функције, већ се униформно проситру у простору. PW се користе за симулацију система чврстог стања. Главна предност GTO у односу на PW је то што број базисних функција зависи искључиво од броја атома у систему, док број PW зависи од величине јединичне ћелије, пошто се простиру у 3D простору. Предност PW у односу на GTO је то што њихов квалитет зависи од једног експлицитног параметра кинетичке енергије и на њих не утичу грешке суперпозиције базисних скупова (од енгл. basis set superposition errors, BSSE), које могу бити критичне при прорачунима адсорпције. BSSE се јављају при коришћењу скраћених GTO базисних скупова, у којима се систем састоји из два фрагмента. Један фрагмент користи базисни скуп другог и обрнуто, при чему долази до прецењивања укупне енергије, што утиче на оптимизоване геометрије. BSSE се исправљају методом противтеже (од енгл. counterpoise method), при чему се врши корекција енергије и геометрија.³⁶⁸

Гаусијански базисни скупови се означавају у формату N-MPG*. N је број примитивних гаусијанских функција за сваку од унутрашњих орбитала. Повлака означава подељени базисни скуп, где су валентне орбитале двоструко зета. M означава број примитивних функција из велике зета функције (за унутрашњу валентну регију) и P означава број примитивних функција које граде малу зета функцију (за спољашњу валентну регију). G означава да је базисни скуп гаусијански. Једна звездица значи да је укључен један сет гаусијанских 3d поларизационих функција за тешке атоме (све осим водоника). Две звездице означавају укључење једног сета гаусијанских 2p функција за тешке атоме и атоме водоника. Тако, на пример, 6-311++G(d,p) базис коришћен у оквиру ове дисертације представља комбинацију шест примитивних функција и свака валентна љуска је подељена на унутрашњи и спољашњи део (двоструко зета) користећи редом три, па један и један примитивни гаусијан. Два плуса означавају дифузионе функције примењене на све тешке и водоникове атоме, а (d,p) је синонимно са две звездице, што значи да су поларизационе функције примењене на све тешке, као и водоникове атоме. Гаусијански базисни скупови су коришћени за неметале, док је за метале, у овом случају платину, коришћен lanl2dz, базисни скуп из групе LANL (Los Alamos National Laboratory) ефективних потенцијала језгра (од енгл. effective core potentials, ECP). Овај тип псеудо-потенцијала је доступан за разне елементе заједно са одговарајућим валентним базисним скупом. Двострука зета функција и целокупна комбинација ECP и валентног базисног скупа се означава као lanl2dz базис.³⁶⁹⁻³⁷¹ LANL2 ECP нису дефинисани за елементе H-Ne. ECP параметри за елементе Na-Kr су изведени из атомских таласних функција добијених из нерелативистичких Хартри-Фок прорачуна, док су релативистички Хартри-Фок прорачуни коришћени за теже елементе Rb-Bi.

2.2.2.3. Солватациони модели

У рачунарској хемији, солватациони модел је рачунарска метода која урачунава симулације и термодинамичке прорачуне примењиве на реакције и процесе који се одвијају у раствору.³⁷² Солватациони модели се деле на експлицитне, имплицитне и хибридне. Експлицитни модели узимају у обзир молекулске детаље сваког молекула растварача у околини. Његове предности су то што даје комплетне детаље молекулске структуре и реалистичну физичку слику система. Мане су му то што је јако захтевно вршити прорачун за тако велики број атома, па и уравнотежење дуго траје. Такође, растварач и растворена супстанца често нису поларизабилни, а и величина система је мала. Имплицитни модели третирају растварач као хомогени континуални медијум. Њихове предности су то што нема експлицитних атома растварача, па се растварач може квантно-механички третирати на највишем нивоу. Мане су му то што се ствара вештачка баријера између растварача и растворене супстанце, као и то што је ово генерално лош модел за прорачун ефеката са кратким дометом. Хибридни модели су, као што име налаже, мешани и они третирају прву и другу солватациону сферу експлицитно, а остатак растварача имплицитно. Сваки од ових модела се даље може поделити на основу употребљеног нивоа теорије, на квантно-механичке и молекулско-механичке. На пример, солватациони модел употребљен унутар ове дисертације за симулацију реакционе смеше је CPCM поларизабилни континуални солватациони модел (од енгл. conductor-like polarizable continuum model). У CPCM, растварач је моделиран као континуални медијум са диелектричном константом, а растворена супстанца је третирана као скуп тачкастих наелектрисања. Тачкаста наелектрисања су окружена виртуалном површином, која одваја растворену супстанцу од растварача. Виртуална површина је поларизабилна, што значи да реагује на присуство електричног поља променом облика и индуковањем поларизације наелектрисања. На овај начин се рачунају ефекти водоничних веза и ван дер Валс-ових интеракција. CPCM је популаран модел јер је рачунарски ефикасан и може се применити на широк опсег метода заснованих на електронској структури, као што су Хартри-Фок-ова и DFT. Употребљен је за изучавање великог броја хемијских система, од малих молекула, до протеина и нуклеинских киселина. Ипак, као и сваки теоријски модел, CPCM има ограничења. На прецизност ове методе утичу фактори као што су избор диелектричне константе, величина и облик виртуалне површине и ниво теорије којим се рачуна електронска структура растворене супстанце. Због тога је битно да се CPCM резултати валидирају експерименталним подацима и другим солватационим моделима.

2.2.2.4. Примена теорије функционала густине у анализи хидантоина

Теоријски DFT приступ је веома заступљен у хемији (тио)хидантоина, полазећи од испитивања структуре,^{373–376} кристалног паковања,^{377,378} таутомеризације,³⁷⁹ хидролизе,³⁸⁰ епимеризације³⁸¹ и симулирања спектра,^{382,383} до комплетних механистичких студија,^{384–387} испитивања координационог понашања са јонима метала,^{388,389} па чак и евалуације антиоксидативне активности.³⁹⁰ Највише коришћени функционали приликом испитивања једињења (тио)хидантоинског типа су хибридни мета-GGA M06, M06-2X и TPSSh и хибридни функционали B3LYP и PBE0. Ови функционали се најчешће користе са гаусијанским базисним скуповима, 6-311G, 6-31G(d,p), 6-31+G(d,p), 6-31++G*, 6-311+G(d,p), 6-31G++(d,p), 6-311G++(d,p) и 6-311+G(2d,2p), а користе се и други базисни скупови као што су rob-TZVP, def2-TZVPP и def2-svpd. Најчешће употребљиван

солватациони модел је поларизабилни континуални CPCM модел, мада се користи и континуални SMD модел (solvation model based on density), као и IEFPCM модел (integral equation formalism polarizable continuum model).

До сада је постојала само једна механистичка студија која се бавила настајањем аминокиселинских деривата 2-тиохидантоина.³⁸⁷ Наиме, ово истраживање описује атропоселективност реакције циклизације, при којој се добијају аксијално хирални деривати 2-тиохидантоина. Испитиване су реакције фенил- и *o*-бромфенил-изотиоцијаната са метил естром L-аланина. Предложен је петостепени механизам, који обухвата адицију, 1,3-премештање протона у двоструко наелектрисаном интермедијеру и апстракцију протона са азота поред фенил групе која потиче од арил-изотиоцијаната триетиламино. Главно питање овог истраживања је било да ли се рацемизација добијеног аксијално хиралног деривата 2-тиохидантоина дешава пре или после циклизације. Нађено је да се рацемизација одвија након циклизације и да је потпомогнута триетиламино, који се већ налази у реакционој смеси у вишку.

Пошто се претходно описани ароматични системи понашају другачије од алилних система заступљених у једињењима која су синетисана у оквиру ове дисертације и пошто ниједно кинетичко истраживање које описује реакције настајања аминокиселинских деривата 2-тиохидантоина није урађено до сада, један од задатака ове дисертације је био механистичко, кинетичко и теоријско испитивање ових реакција у циљу бољег разумевања механизма настајања ових деривата 2-тиохидантоина.

2.2.3. ¹H NMR кинетичко испитивање механизма настајања деривата 2-тиохидантоина у реакцијама метил естара α -аминокиселина и алил-изотиоцијаната

Да би се испитали могући механизми настајања аминокиселинских деривата 2-тиохидантоина, реакције неколико метил естара природних α -аминокиселина (глицин, L-аланин, L-валин, L-леуцин и L-фенилаланин) и АИТС су праћене ¹H NMR спектроскопијом (Схема 70).³⁹¹ Наведене α -аминокиселине су изабране како би се испитао потенцијални утицај различитих аминокиселинских остатака, који током реакције постају C5 супституенти награђеног тиюхидантоина, на механизам и кинетику реакције са АИТС.

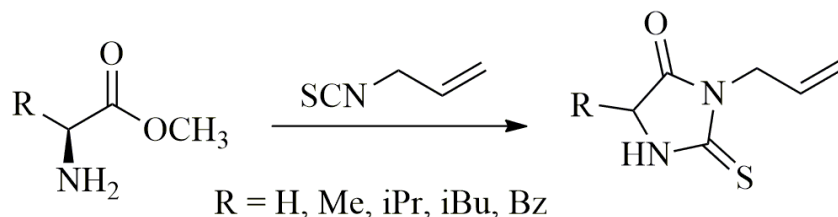


Схема 70. Реакција метил естара α -аминокиселина и АИТС.³⁹¹

На основу спектралних података и квантно-механичких прорачуна, предложен је двостепени механизам са интермедијером АИТС-аминокиселинског естра (Схема 71). Први корак у механизму је реакција адиције метил естра аминокиселине на изотиоцијанатну групу АИТС, при којој се формира интермедијер АИТС-аминокиселинског естра. Други корак механизма је интрамолекуларна циклизација интермедијера, при којој се формира 2-тиохидантоински прстен и ослобађа метанол.³⁹¹

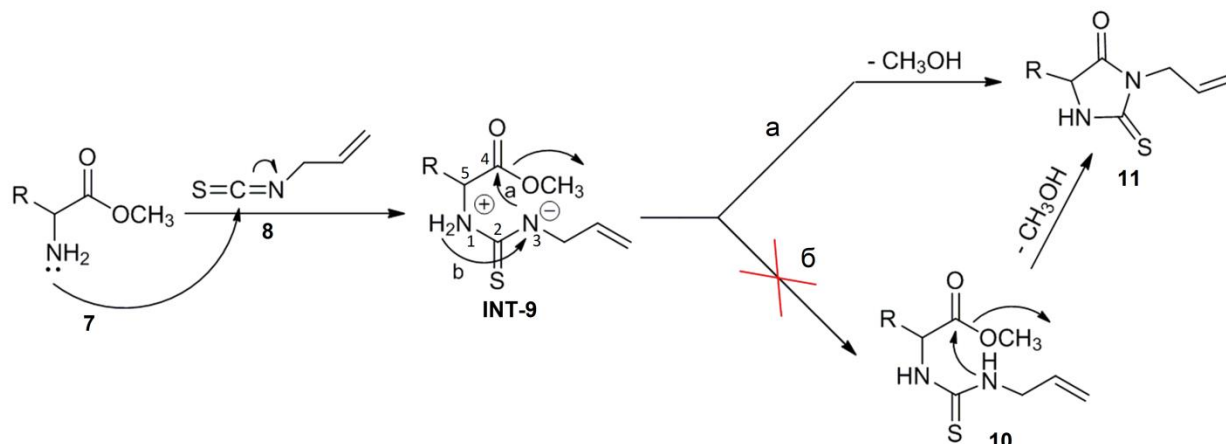
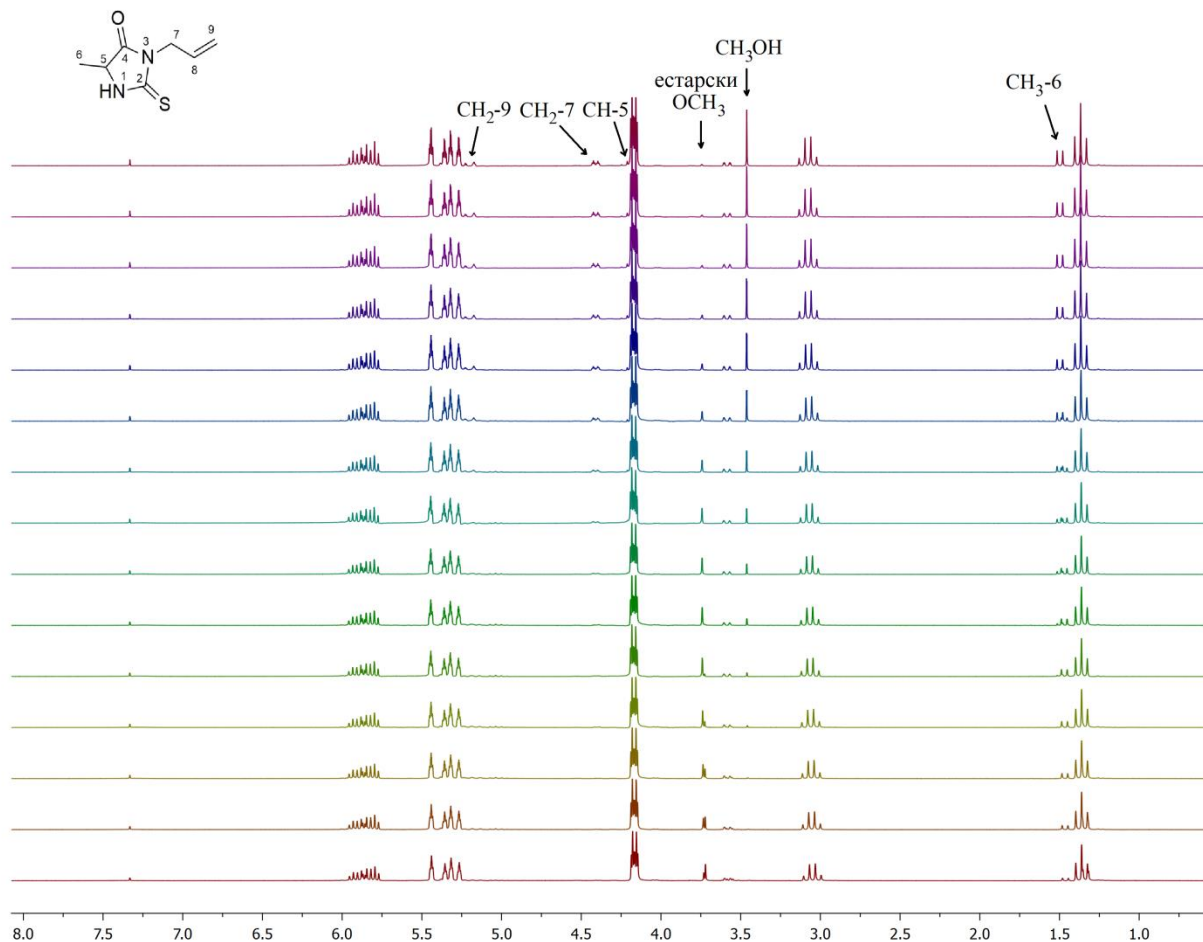


Схема 71. Предложени механизам настајања деривата 2-тиохидантоина.³⁹¹

Истражена су два механистичка пута. Први (а, Схема 71) је директна циклизација двоструко наелектрисаног интермедијера АИТС-аминокиселинског естра (**INT-9**) нападом унутрашњег нуклеофила, азота из АИТС остатка, на угљеник карбонилне групе праћена елиминацијом молекула метанола, одвајањем метокси групе и протона од позитивно наелектрисаног азота. Други истражени пут (б, Схема 71) обухвата 1,3-премештање протона у интермедијеру **INT-9** пре циклизације.³⁹¹

Реакција метил естара α -аминокиселина са АИТС је праћена ¹H NMR спектроскопијом у временски зависном кинетичком експерименту преко ноћи. Настајање 2-тиохидантоинских производа је праћено кроз појаву карактеристичних сигнала протона у спектрима, који се слажу са сигнаlima изолованих једињења.³⁹¹

На примеру реакције метил естара L-аланина и АИТС, која је узета као модел систем (Слика 28), могу се у спектрима уочити сигнали 2-тиохидантоинског производа како се током времена формирају. Мултиплет на 5,19-5,32 ppm и дублет триплета на 4,43 ppm припадају CH₂-9 протонима терминалне двоструке везе и метиленске групе CH₂-7 из N-алил групе. Квартет на 4,21 ppm припада протону CH-5 из тиюхидантоинског прстена, а метил протони CH₃-6 се могу уочити као дублети на 1,19 ppm. Реакција настајања 2-тиохидантоинског производа је праћена помоћу сигнала метил протона одлазеће метокси групе полазног естра у корелацији са сигнаlima метил групе метанола који се формира током циклизације. Синглети ових метил група су изабрани зато што се не преклапају са другим сигнаlima, па самим тим дају најпрецизније резултате. Интеграљењем ових сигнала се добијају промене у концентрацији производа током експеримента, метанола и 2-тиохидантоинског производа, који настају у еквимоларном односу (Слика 29). У спектрима (Слика 28), сигнал метокси групе на 3,72-3,73 ppm полако нестаје, док се интензитет сигнала метил групе метанола на 3,45 ppm повећава током експеримента. Уочено је да се на почетку реакције на 3,72-3,73 ppm налазе два синглета, који варирају у интензитету. Први на 3,72 ppm брзо нестаје, док други на 3,73 ppm настаје и онда се смањује кроз спектре током експеримента. Ова два синглета припадају метокси групама протонаног и депротонаног естра, пошто су сви естри добијени у свом хидрохлоридном облику. Депротоновање је остварено додатком триетиламина и неопходно је ради одвијања саме реакције, што се и може видети, јер реакција почиње брже да се одвија када нестане синглет на 3,72 ppm и естар је потпуно депротонан.³⁹¹

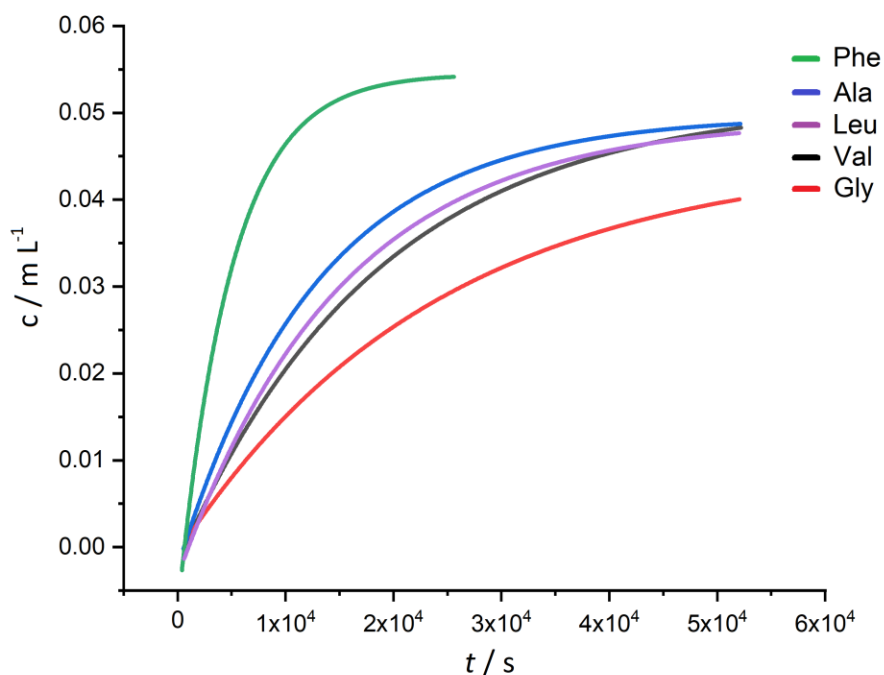


Слика 28. ^1H NMR спектри реакције метил естра *L*-аланина са АИТС у присуству триетиламина у CDCl_3 , приказана одоздо (први снимљени спектар) нагоре (задњи снимљени спектар).³⁹¹

Реакције су изведене у 1:10 молском односу, где је АИТС у десетоструком вишку. Ово је урађено да би се реакционо време поклопило са NMR временском скалом. Сходно томе, реакције су *псеудо*-првог реда и константе су израчунате по једначини:

$$c = c_0 e^{-kt} \quad (1)$$

где је c тренутна концентрација тиохидантоина, c_0 почетна концентрација, k је константа брзине реакције, а t је реакционо време.



Слика 29. Промене концентрација 2-тиохидаптоинских производа током експеримента.³⁹¹

Концентрације потребне за израчунавање константи брзина настајања деривата 2-тиохидаптоина су добијене интегралњем сигнала метокси групе метил естра аминокиселине и метил групе метанола, а израчунате константе брзине за реакције *псеудо*-првог реда су приказане у Табели 4. Највећу константу брзине је имала реакција L-фенилаланина ($2,04 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), затим L-аланина ($7,55 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$), док је реакција са глицином имала најнижу константу брзине од $4,18 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Резултати указују на то да разлике у кинетици реакционих процеса потичу од разлике у структури бочног низа аминокиселина и зависе од разних ефеката, као што су стерни (лакоћа прилаза молекула) и електронски (густина и дистрибуција електрона), што је даље испитивано теоријским прорачунима.³⁹¹

Табела 4. Експериментално одређене константе брзине реакције метил естера аминокиселина са АИТС.³⁹¹

Реактанти	$k_{\text{exp}} / \text{s}^{-1}$
Gly-OMe + АИТС	$4,18 \times 10^{-5}$
Val-OMe + АИТС	$5,44 \times 10^{-5}$
Ala-OMe + АИТС	$7,55 \times 10^{-5}$
Leu-OMe + АИТС	$6,67 \times 10^{-5}$
Phe-OMe + АИТС	$2,04 \times 10^{-4}$

2.2.4. Квантно-механичко испитивање механизма реакција настајања деривата 2-тиохидаптоина из метил естера α -аминокиселина и алил-изотиоцијаната

Теорија функционала густине је примењена у циљу испитивања механизма настајања 2-тиохидаптоина. Механизам реакције метил естера α -аминокиселина и АПТС је испитан је помоћу M06-2X/6-311++G(d,p) нивоа теорије. Први корак предложеног механизма представља нуклеофилни напад метил естра аминокиселине **7** на АПТС **8**, при чему настаје интермедијер **INT9** (Схема 71, Слика 30). Интрамолекуларна циклизација овог интермедијера до производа **11** се може одвијати преко два могућа реакциона пута. Први је нуклеофилни напад азота на карбонилну групу, а други обухвата интермолекуларско 1,3-премештање протона до производа **10** пре циклизације.³⁹¹

Реакција метил естра L-аланина (R = Me) са АПТС је узета као модел и испитана како би се потврдио предложени механизам. Енергетски профил ове реакције је приказан на Сlici 30. Константе брзине реакције су израчунате помоћу једначине 2 и приказане су у Табели 5.

$$k = \frac{k_B}{h} \exp\left(\frac{-\Delta G^{\ddagger 0}}{RT}\right) \quad (2)$$

где је k константа брзине, k_B и h су Болцманова и Планкова константа, $\Delta G^{\ddagger 0}$ је стандардна енергија активације при 1 М концентрацији и R је моларна гасна константа. Гибсова активациона енергија при стандардној концентрацији ($c^0 = 1$ М) се рачуна по једначини 3:

$$\Delta G^{\ddagger 0} = \Delta G^{\ddagger} - RT \ln(c^0 V_m) \quad (3)$$

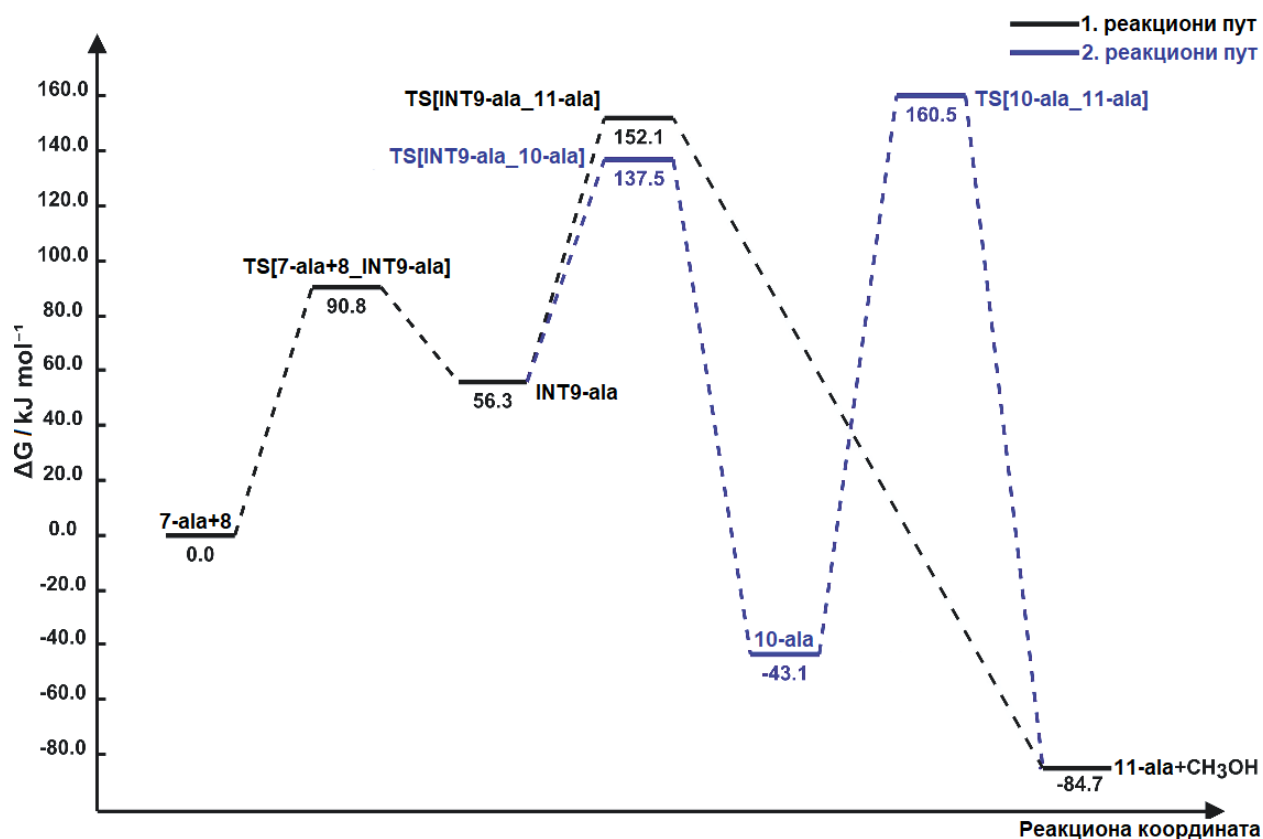
где је ΔG^{\ddagger} активациона енергија стандардног стања ($P_i = 1$ atm), V_m је моларна запремина; $V_m = RT/P^0$ има инверзне јединице концентрације.³⁹²

У првом кораку предложеног механизма, одвија се нуклеофилни напад азота аминокиселине на електрофилни угљеников атом изотиоцијанатне групе, при чему долази до грађења **INT9-ala** (Схема 71). Константа брзине ове реакције је $7,79 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Табела б). Други корак ове реакције се потенцијално може одвијати преко два реакциона пута (Схема 71). Први обухвата нуклеофилни напад азота (N3) на карбонилни угљеник (C4), при чему долази до затварања прстена директно (Слика 30). Преласком протона са амидног азота (N1) на метокси кисеоник долази до грађења метанола и производа **11-ala**. У другом реакционом путу долази до 1,3-премештања протона у интермедијеру **INT9-ala**, при чему се формира производ **10-ala**. Потенцијално, интрамолекуларско, 1,3-премештање протона је приказано на Схеми 72. Очигледно је да је настајање **10-ala** кинетички контролисано, јер се одвија брже у поређењу са настајањем **11-ala**, али је и термодинамички неповољније.³⁹¹

Електронска структура производа **10-ala** је испитана помоћу NBO (од енгл. Natural Bond Orbital) анализе. Да би се испитале доворско-акцепторске интеракције, извршена је анализа Фокове (Fock) матрице другог реда. Енергија стабилизације ($E^{(2)}$) за сваког донора (i) и акцептора (j) везана за делокализацију између i и j је одређена по једначини 4:

$$E^{(2)} = \Delta E_{ij} = q_i \frac{(F_{ij})^2}{(E_j - E_i)} \quad (4)$$

где је q_i попуњеност донорске орбитале, E_i и E_j су дијагонални елементи (орбиталне енергије) и $F_{i,j}$ је елемент ван дијагонале Фокове матрице. Велика вредност $E^{(2)}$ указује на интензивну интеракцију између електрон-донора и електрон-акцептора и већу коњугацију целог система. Могуће интеракције су дате у Табели 5.



Слика 30. Енергетски профил реакције метил естра *L*-аланина и АИТС.³⁹¹

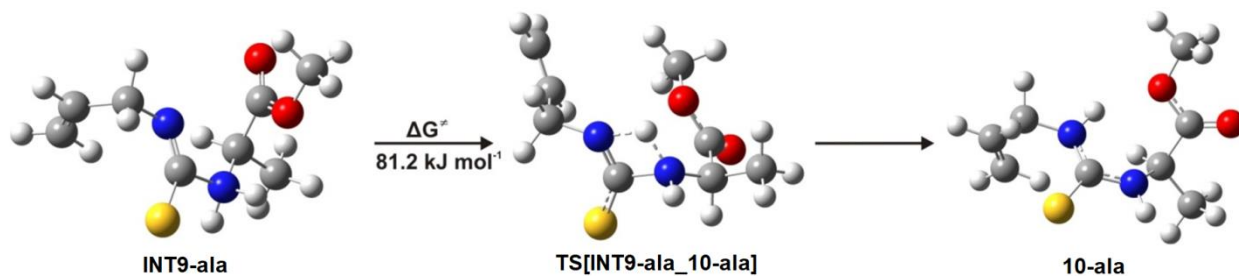


Схема 72. Интрамолекуларско 1,3-премештање протона у интермедијери *INT9-ala*.³⁹¹

Табела 5. Анализа Фокове матрице другог реда за **10-ala**.³⁹¹

Донор (i)	Акцептор (j)	ED(i)	ED(j)	$E^{(2)} / \text{kJ mol}^{-1}$	$E_i - E_j / \text{a.u.}$	$F_{i,j} / \text{a.u.}$
LP2 O4	$\sigma^*(\text{C5-C4})$	1,86	0,08	93,7	0,78	0,12
LP2 O4	$\sigma^*(\text{C4-O4})$	1,86	0,09	157,0	0,80	0,16
LP1 OCH ₃	$\sigma^*(\text{C4-OCH}_3)$	1,96	0,02	37,4	1,36	0,10
LP1 OCH ₃	$\sigma^*(\text{N3-H3})$	1,96	0,03	17,5	1,15	0,062
LP2 OCH ₃	$\pi^*(\text{C4-O4})$	1,80	0,20	245,7	0,47	0,15
LP1 N1	$\sigma^*(\text{C5-C4})$	1,71	0,08	43,1	0,73	0,08
LP1 N1	$\sigma^*(\text{C2-S})$	1,71	0,53	393,0	0,26	0,15
LP2 S	$\sigma^*(\text{N1-C2})$	1,90	0,05	50,5	0,77	0,09
LP2 S	$\sigma^*(\text{C2-N3})$	1,90	0,06	56,5	0,79	0,09
LP1 N3	$\sigma^*(\text{C2-S})$	1,68	0,53	461,5	0,26	0,16

Најбитније интеракционе енергије ($n-\sigma^*$), везане за делокализацију у молекулу, су између електрон-донирајућих LP1 N атомских орбитала и антивезивне акцепторске орбитале $\sigma^*(\text{C-S})$ (LP1 N3 и LP1 N1 $\rightarrow \sigma^*(\text{C2-S})$). Ове интеракције доводе до повећања електронске густине (ED) антивезивне C-S орбитале, што доводи до слабљења везе. Електронска густина на атомима азота N3 и N1 (1,68 до 1,71 е) и $\sigma^*(\text{C-S})$ везе (0,53 е) указује на јаку делокализацију електрона и стабилизацију од $\sim 393\text{--}462 \text{ kJ mol}^{-1}$. Такође, LP2 O слободни електронски парови поседују изражену електрон-донорску способност према антивезивним акцепторским $\pi^*(\text{C-O})$, $\sigma^*(\text{C-O})$ и $\sigma^*(\text{C-C})$ орбиталама.³⁹¹

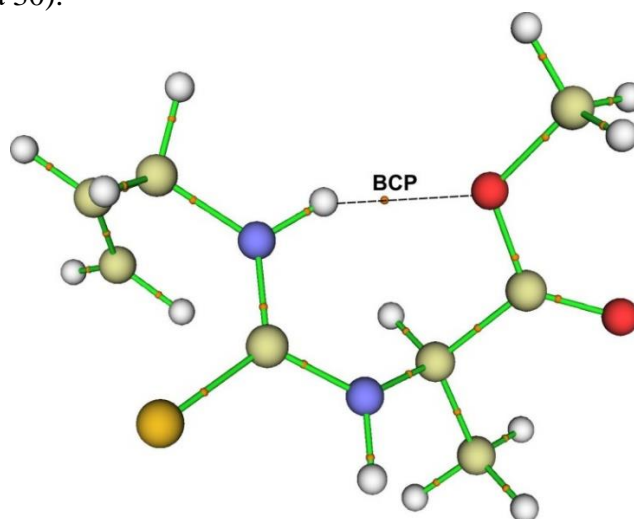
За структуру **10-ala** је карактеристична једна интрамолекулска водонична веза, која додатно стабилизује структуру. Јака водонична веза (2,08 Å) је награђена између N3-H3 и O из метокси групе. NBO анализом је потврђено да је електронска густина донирана од стране *p* орбитале кисеоника метокси групе $\sigma^*(\text{N3-H3})$ вези. Ова водонична веза додатно стабилизује структуру за $17,5 \text{ kJ mol}^{-1}$.

N3-C2 и N1-C2 дужине веза од 1,342 и 1,359 Å су између дужина веза карактеристичних за двоструку N=C и једноструку N-C везу, указујући на парцијалну двоструку природу ових веза, која омогућује делокализацију електрона у **10-ala**. Мало већи допринос *p* орбитале на угљенику C2 у N3-C2 и N1-C2 везама ($0,788(\text{sp}^{1,63})\text{N3} + 0,616(\text{sp}^{2,10})\text{C2}$ и $0,788(\text{sp}^{1,62})\text{N1} + 0,616(\text{sp}^{2,17})\text{C2}$) може да буде главни разлог зашто је ова веза мало дужа од двоструке C=N везе.

QTAIM (од енгл. Quantum Theory of Atoms in Molecules) анализом је приказано да критичне тачке N3-H3---O-CH₃ водоничне везе имају вредности електронске густине и Лапласове функције 0,191 еА и 0,077 а.у. (Слика 31). Ови параметри указују на то да је испитивана водонична веза јака, јер су вредности густине веће од уобичајених за водоничну везу, али ипак испод вредности ковалентних веза, док је вредност Лапласове функције позитивна.³⁹¹

Испитиван је и интрамолекулски нуклеофилни напад азота N3 на карбонилну групу **10-ala**, при којем би се добио циклични производ **11-ala**. Структура, стабилност и циклизација производа **10-ala** су испитивани ради одређивања могућности одвијања овог реакционог пута. Активациона баријера за овај циклизациони корак износи $203,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ и

константа брзине овог процеса је $1,2 \times 10^{-23} \text{ s}^{-1}$, што недвосмислено значи да овај реакциони пут није могућ (Слика 30).



Слика 31. Критичне тачке веза производа **10-ala**.³⁹¹

Реакције осталих испитиваних метил естара α -аминокиселина са АИТС су продискутоване у наставку. Енергетски профили ових реакција су приказани на Слици 32, а израчунате константе брзине и промене Гибсове (Gibbs) слободне енергије, $\Delta_r G$, ових реакција су приказане у Табели 6.

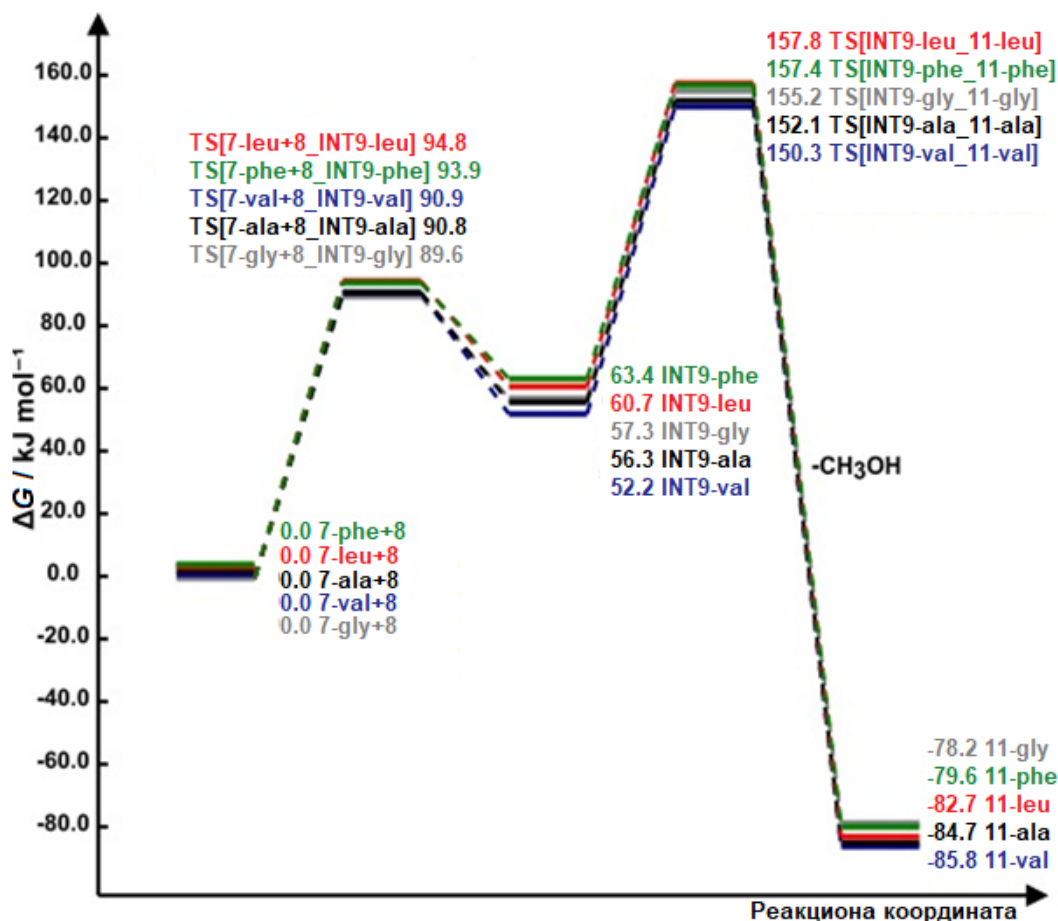
Табела 6. Константе брзине и промене Гибсове слободне енергије реакције настајања производа **11**.³⁹¹

	$k_1 / \text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$\Delta_r G / \text{kJ mol}^{-1}$	k_2 / s^{-1}	$\Delta_r G / \text{kJ mol}^{-1}$
7-gly + 8 → INT9-gly → 11-gly	$1,26 \times 10^{-3}$	57,3	$3,94 \times 10^{-5}$	-135,5
7-val + 8 → INT9-val → 11-val	$7,51 \times 10^{-4}$	52,2	$4,42 \times 10^{-5}$	-138,0
7-ala + 8 → INT9-ala → 11-ala	$7,79 \times 10^{-4}$	56,3	$9,98 \times 10^{-5}$	-140,9
7-leu + 8 → INT9-leu → 11-leu	$1,55 \times 10^{-4}$	60,7	$6,15 \times 10^{-5}$	-143,0
7-phe + 8 → INT9-phe → 11-phe	$2,18 \times 10^{-4}$	63,4	$2,16 \times 10^{-4}$	-143,3

Као што се може видети из Табеле 6, реакција настајања **INT9-gly** има највећу константу k_1 од $1,26 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, док настајање **INT9-leu** има најмању константу брзине. Највише заузете молекулске орбитале (НОМО, од енгл. Highest Occupied Molecular Orbital) и најниже незаузете молекулске орбитале (LUMO, од енгл. Lowest Unoccupied Molecular Orbital) прелазних стања првог корака реакције су приказане на Слици 33.³⁹¹

За све испитиване реакције, НОМО и LUMO се простиру преко свих атома молекула АИТС у прелазним стањима. Са друге стране, LUMO се простира преко свих атома само у молекулу метил естра глицина у прелазном стању, што омогућује бољу делокализацију електрона. Код других естара аминокиселина, LUMO се простира само преко α -угљеника и азота везаног за њега у различитим мерама. Додатно, НВО анализа је показала да α -угљеник глицина има највеће негативно наелектрисање од -0,284 е у прелазном стању. Вредности

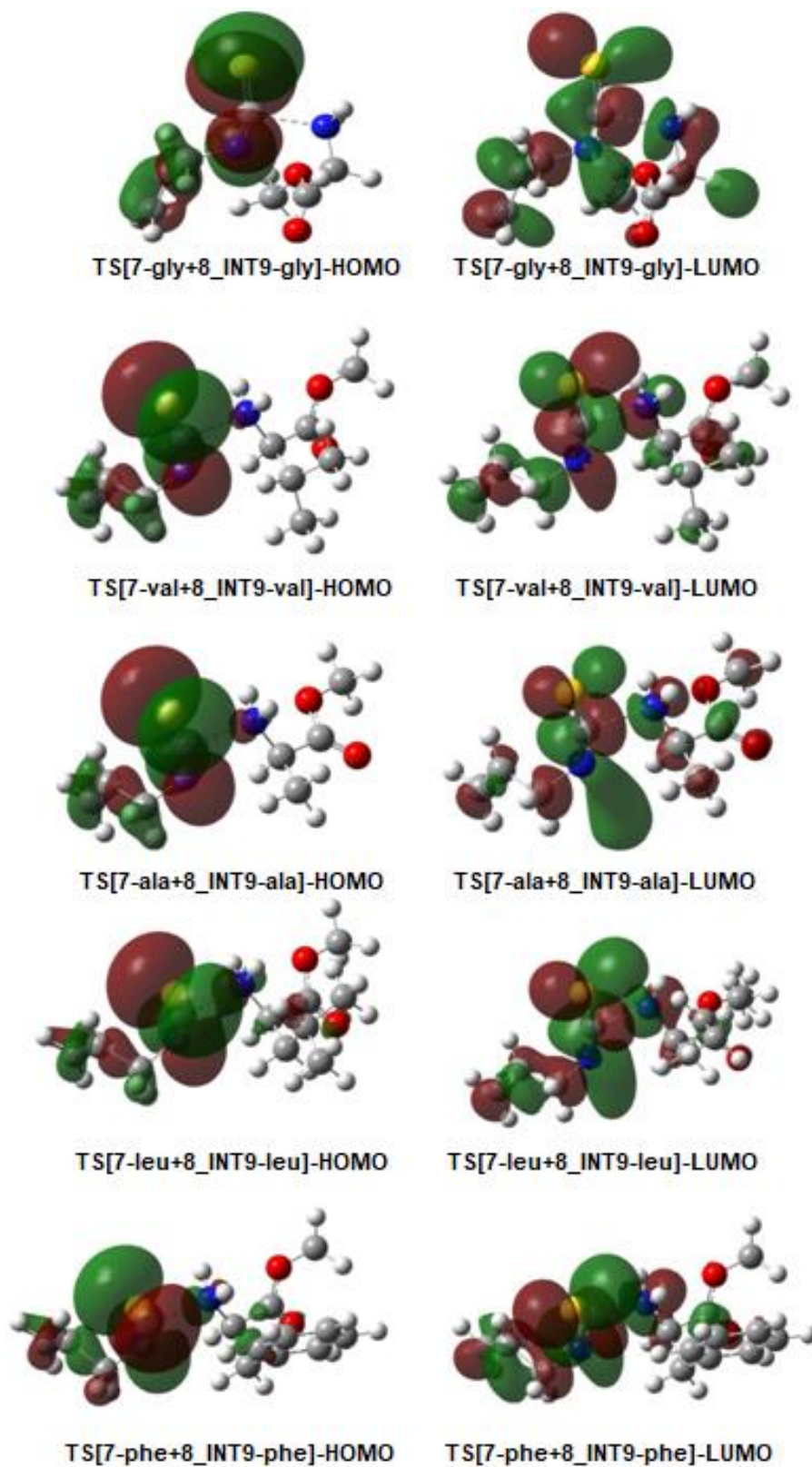
негативне шарже α -угљеника у прелазним стањима естара осталих аминокиселина варира од -0,130 до -0,132 е.



Слика 32. Енергетски профил $7 + 8 \rightarrow \text{INT9} \rightarrow 11$ реакционог пута за све испитиване метил естре α -аминокиселина са АИТС.³⁹¹

Да би се боље разумела дистрибуција електронске густине у прелазним стањима, извршена је АИМ анализа. Параметри критичних тачака веза за настајање C2-N1 везе (густина електрона ($\rho(r)$), Лапласова функција електронске густине ($\nabla^2\rho$), кинетичка ($G(r)$) и потенцијална ($V(r)$) електронска густина) су приказани у Табели 7. Параметри густине електрона $\rho(r)$ показују мало јачу интеракцију везе између C2 и N1 у прелазном стању метил естра глицина у поређењу са другим естрима, што указује на то да је реакција АИТС са метил естром глицина бржа. Позитивне вредности Лапласове функције електронске густине $\nabla^2\rho$ указују на јонску природу C2-N1 везе.

Ипак, АИМ анализа и добијене вредности електронских густина не дају дефинитивно објашњење за вредности константи брзина првог корака реакције. Према томе, једино разумно објашњење је да волуминозност супституента на α -угљенику прави стерне сметње и омета везивање АИТС за амински азот метил естра аминокиселине. Ово је подржано чињеницом да се константе брзине смањују како се волуминозност супституента повећава.³⁹¹



Слика 33. Облици HOMO и LUMO у прелазним стањима првог корака реакције метил естера аминокиселина са AITC.³⁹¹

Табела 7. Параметри критичних тачака C2-N1 везе у прелазним стањима адиционог корака.³⁹¹

Прелазна стања	$\rho(\mathbf{r})$	$\nabla^2\rho$	$V(\mathbf{r})$	$G(\mathbf{r})$
TS[7-gly+8_INT9-gly]	0,056	0,091	-0,040	0,031
TS[7-val+8_INT9-val]	0,055	0,090	-0,039	0,030
TS[7-ala+8_INT9-ala]	0,054	0,090	-0,038	0,031
TS[7-leu+8_INT9-leu]	0,055	0,090	-0,039	0,030
TS[7-phe+8_INT9-phe]	0,055	0,090	-0,039	0,030

Утицај алкил супституената испитиваних метил естара α -аминокиселина на брзине реакција је такав да се брзина реакције смањује при повећавању алкил супституента (Табела 6). Наиме, редослед вредности константи брзине настајања **INT9** k_1 за различите естре аминокиселина указује на то да је први, адициони корак реакције стерно котролисан, пошто је адиција најбржа за **INT9-gly**, а најспорија за **INT9-leu** и **INT9-phe**, који имају најволуминозније супституенте.³⁹¹

Оптимизоване геометрије адиционих производа из првог корака, награђених 2-тиохидаптоина и прелазних стања између њих су приказане на Схема 73, а одговарајуће константе брзине и промене Гибсове слободне енергије су дате у Табели 6. За разлику од првог корака, други корак је егзотерман. Упркос томе, константе брзине овог корака k_2 су још ниже од константи брзине првог корака, указујући на то да је управо циклизација корак који одређује брзину реакције. **INT3-phe** има највећу константу брзине циклизације до **11-phe** од $2,16 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, затим **INT9-ala** са вредности k_2 од $9,98 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, док **INT9-gly** има најнижу константу брзине циклизације од $3,94 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. При циклизацији **INT9** до **11** (Схема 73), нема никаквих стерних сметњи између нуклеофилног азота N3 и електрофилног угљеника C4. Одлазећи метокси кисеоник лако апстрахује водоник са N1 и метанол се ослобађа како се прстен затвара. Циклизација **INT9-phe** до **11-phe** има најнижу активациону баријеру. Промена Гибсове слободне енергије указује на егзоргеност циклизационог процеса, при чему је циклизација **INT9-phe** највише егзоргена, затим **INT9-ala**, док је **INT3-gly** најмање егзоргена. Овај редослед је у складу са распоредом вредности константи брзина циклизације k_2 . Пошто је циклизација корак који одређује брзину реакције, вредности константе циклизације k_2 се добро поклапају са експериментално одређеним константама брзина k_{exp} . Истог су реда, приближних су вредности и прате исти редослед вредности за све естре. Теоријски прорачуни су у складу са експериментално одређеним резултатима и подржавају предложени механизам.³⁹¹

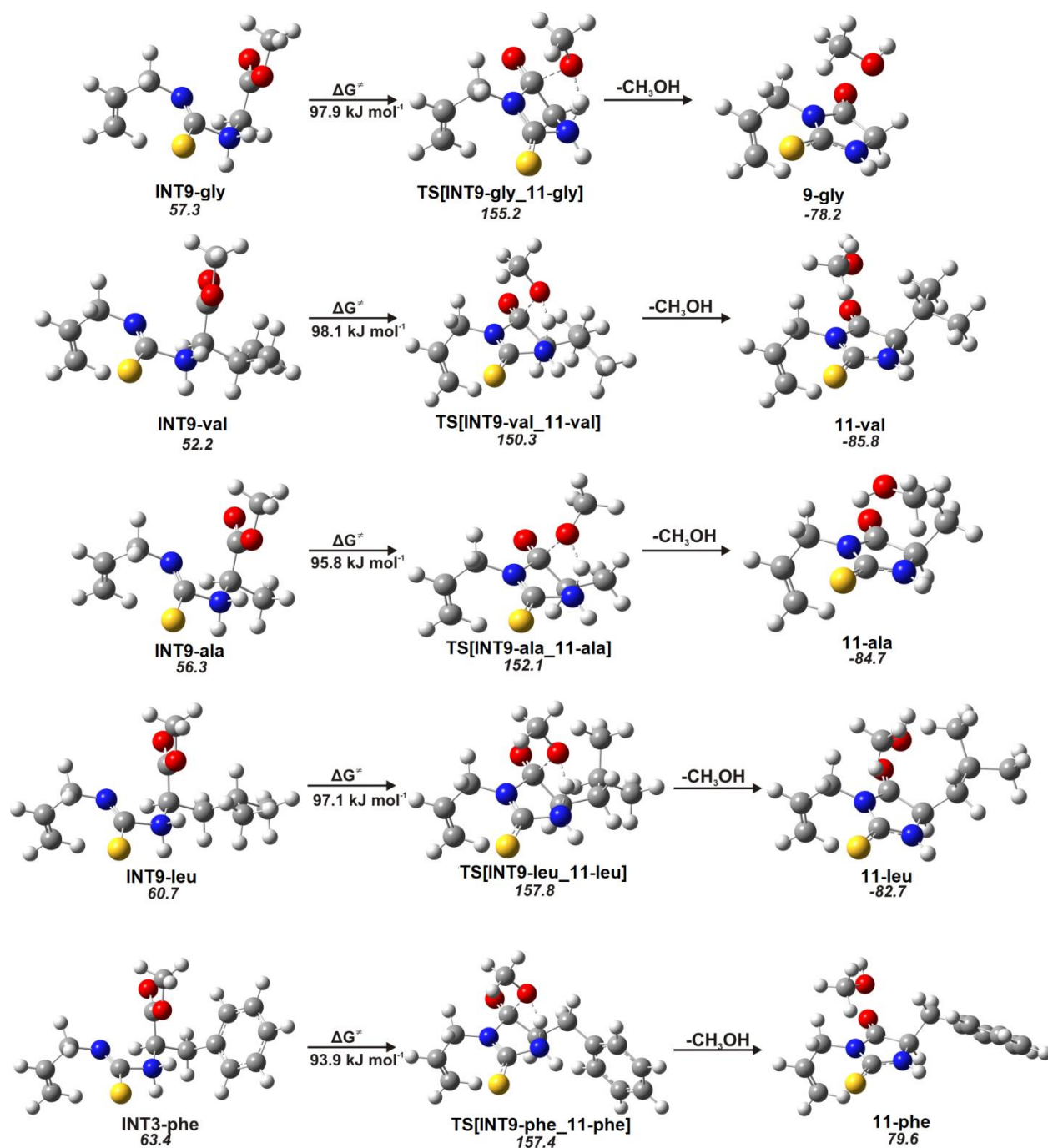


Схема 73. Оптимизоване геометрије интермедијера, прелазних стања и циклизационих производа; релативне енергије су дате у kJ mol^{-1} .³⁹¹

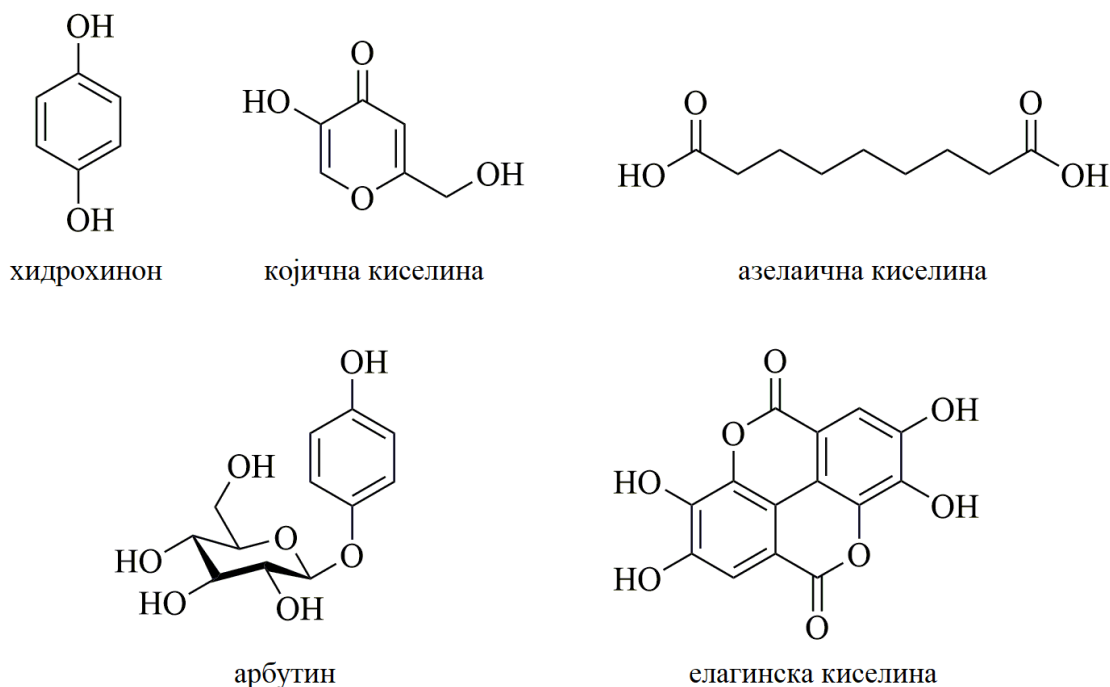
2.3. Антимеланогена активност синтетисаних деривата 2-тиохидаптоина

Меланин је пигмент који, поред тога што даје боју коси, кожи и очима, има виталну улогу у заштити коже од штетног УВ зрачења.³⁹³ Међутим, повећана и абнормална акумулација меланина доводи до разних поремећаја, као што су флеке и пеге, хлоазма, мелазма, старачке и сунчане пеге и меланодерматитис, као и рак коже (меланом).^{394,395} Кожна обољења су видљиве природе и имају знатан утицај на физички изглед пацијента, што може негативно утицати на његово емотивно стање и као последица смањити квалитет живота.^{396,397} Поред овога, повећано стварање меланина игра велику улогу у прогресији меланома и у негативној је корелацији са ефикасношћу хемотерапије и прогнозом преживљавања пацијената са меланомом коже.

Постоји низ топикалних агенаса за третман хиперпигментације коже и сви су засновани на инхибицији ензима тирозиназе, који контролише продукцију меланина. Ови агенси као активну компоненту садрже депигментационе молекуле, као што су хидрохинон, којична киселина, азелаична киселина, арбутин и елагинска киселина (Слика 34.). Хидрохинон је био најчешће преписиван депигментациони агенс и дуго је сматран за златни стандард у лечењу хиперпигментационих поремећаја коже, имајући ефикасност 80-90% у побољшању стања пацијената са поремећајима, као што су мелазма, пеге и пост-инфламаторна хиперпигментација.³⁹⁸ Међутим, нежељена дејства и токсични ефекти узроковани дугорочном употребом хидрохинона, као што су охроноза, едем бубрега, хепатотоксичност, па чак и потенцијално канцерогено дејство, су довели до његовог повлачења из употребе.^{399,400} Светска здравствена организација се у својим смерницама изјаснила против употребе хидрохинона, а у Европи је забрањен у козметичким препаратима. Којична киселина је у широкој употреби, за разлику од хидрохинона, јер не испољава акутна, хронична и репродуктивна токсична дејства,⁴⁰¹ али показује знатно слабију антимеланогену активност.⁴⁰² Арбутин је гликозид хидрохинона и носи са собом сличне ризике,⁴⁰³ док његова повећана растворљивост и транспорт могу довести до додатних нежељених дејстава, као што је токсичност за коштану срж.⁴⁰⁴ Азелаична киселина има слабију активност,⁴⁰⁵ без обзира на то што се сматра безбедном за употребу.⁴⁰⁶ Елагинска киселина има слабу растворљивост, па самим тим и биодоступност.⁴⁰⁷ На основу претходно наведеног се може видети јасан проблем савремених депигментационих молекула. За сад није нађено трајно решење за третман хиперпигментационих поремећаја и болести коже. Неопходно је пронаћи нове, потентне депигментационе агенсе, који постижу смањење производње меланина без испољавања токсичних и других нежељених дејстава.⁴⁰⁸

Великом броју новосинтетисаних органских једињења из различитих класа је испитивана антимеланогена активност, али велика већина није нашла клиничку примену.⁴⁰⁹ Једињења која нису нашла примену су одбачена у претклиничким испитивањима на животињама или раним клиничким испитивањима на људима, јер је њихова депигментациона активност откривена углавном тестирањем инхибиције меланогенезе на моделу тирозиназе печурке.⁴¹⁰ Овај модел није погодан за потрагу за антимеланогеним агенсима јер уопште не може да укаже на потенцијална нежељена дејства испитиваних једињења и ово је разлог због којег су већина једињења одбачена. Додатан недостатак овог модела је што не узима у обзир транспорт, тј. биодоступност молекула.⁴¹¹ Молекула који инхибира тирозиназу *in vitro*, а не може да буде транспортован унутар меланоцита из било ког разлога, не може да испољи антимеланогену активност. На крају, овим моделом не може да се предвиди антимеланогена активност једињења која не инхибирају тирозиназу.

Меланогенеза, процес синтезе меланина, је сплет различитих биохемијских сигналних путева и инхибиција тирозиназе није једини начин на који се може остварити депигментација.⁴¹² Из ових разлога је за проналазак ефикасних и безбедних једињења потребан прави модел за испитивање, који узима у обзир претходно наведено.



Слика 34. Структуре познатих инхибитора тирозиназе, који се користе као депигментациони агенси.

Последњих десетак година, модел зебрице (лат. *Danio rerio*) постао је веома популаран и користан модел систем у претклиничким испитивањима, како у научним истраживањима, тако и у фармацеутској и козметичкој индустрији.⁴¹³ Иако су зебрице филогенетски удаљеније од човека у поређењу са сисарским моделима, важно је истаћи да су молекуларно-генетички путеви развоја различитих класа кичмењака веома конзервирани, тако да у основи онтогенезе риба, водоземаца, рептила, птица и сисара леже врло слични молекуларни механизми. Штавише, упоредна анализа генома човека и зебрице је показала да је 70% хуманих гена присутно у геному зебрице, док 83% гена одговорних за настанак хуманих обољења има своје ортологе код зебрице.⁴¹⁴ Због високог степена молекуларно-генетичке и физиолошке сличности са сисарима, укључујући и човека, зебрица је данас постала веома популаран претклинички анимални модел (биотехнолошка платформа) за испитивање токсичности и утврђивање биолошких активности новосинтетисаних једињења.

Сада се поставља очигледно питање. Зашто користити модел зебрице када су мишеви, који су сисари, еволутивно ближи људима? Зебрице поседују мноштво предности у односу на мишеве. Прва је та да су одрасле јединке зебрице јако мале и живе у великим групама, па заузимају много мање места и лакше и јефтиније их је одржавати од мишева. Затим, одрасле зебрице се јако брзо размножавају (отприлике на сваких десет дана) и производе од 50 до 300 јаја одједном, што је значајно више од мишева који дају до десетак јединки у једном коћењу.⁴¹⁵ Експерименти се због поузданости обично понављају на

великом броју јединки и више пута, што омогућује модел зебрице насупротив сисарским моделима. Међутим, једна од најважнијих предности експерименталног рада са зебрицом јесте што су ембриони зебрица оптички транспарентни, што омогућава да се, применом неагресивног имицинга, као што је светлосна микроскопија, истовремено испита ефикасност тестираног једињења и његов утицај на развој унутрашњих органа.⁴¹⁶ Њихова прозрачност такође омогућава визуализацију флуоресцентно означених ткива у трансгенским ембрионима. Поред тога, експерименти на ембрионима зебрице се обављају у складу са правилима Европске директиве (ЕУ/2010/63) и не подлежу етичкој регулативи јер се спроводе на ембрионима, односно ларвама старим до 120 часова.

Мноштво људских обољења је успешно моделовано на зебрицама.⁴¹⁷ Моделована су обољења костију (као што су остеопороза, остеоартритис и сколиоза),⁴¹⁸ затим срчана (кардиомиопатија, атријална фибрилација)⁴¹⁹ и бубрежна обољења (дијабетесна нефропатија),⁴²⁰ канцер (меланом пре свега),^{421,422} болести крви⁴²³ и нека друга обољења, као што су Дишенова мишићна дистрофија.⁴²⁴ Користи се чак и у испитивању спектра аутистичних поремећаја.⁴²⁵ Поред бројних предности и несумњивог доприноса у биомедицинским истраживањима, постоје ограничења код типова болести која могу да се испитују на овом анималном моделу, као што су болести простате и поремећаји рада млечних жлезда.

Модел зебрице се, између осталог, у скорије време интензивно примењује у истраживању поремећаја пигментације коже.^{426,427} Меланин је категорија пигмената који имају опсег боја од жуто-црвене (феомеланин) до браон и црне (еумеланин) и производе их ензими у процесу који се зове меланогенеза.⁴²⁸ Организми који производе меланин користе ову адаптацију ради спречавања штетног дејства УВ зрачења и оштећења ДНК. Након излагања УВ зрачењу, ћелије коже (кератиноцити) синтетишу и луче меланокордин стимулишући хормон (α -MSH, од енгл. Alpha Melanocyte-Stimulating Hormone). α -MSH затим интерагује са меланокордин рецептором 1 (MC1R, од енгл. Melanocortin Receptor 1) на површини меланоцита, при чему се активира сигнална каскада која упућује меланозоме ка синтези и транспорту меланина унутар меланоцита. Додатни сигнални путеви, као што су ендотелин и c-Kit, су такође одговорни за нормалну функцију меланоцита. Као резултат ових сигнала, повећање количине меланина је одговорно за УВ заштиту и тамњење коже код људи. Ови сигнални путеви су конзервирани код кичмењака, те је модел зебрице врло подесан за испитивање процеса меланогенезе.^{414,429} Неки примери гена који контролишу процес меланогенезе конзервирани у зебрицама су *mitf* (од енгл. microphthalmia-associated transcription factor), допахром таутомераза (DCT), тирозиназа (TYR), TRP-1 (од енгл. Tyrosinase-related Protein 1) и TRP-2 (од енгл. Tyrosinase-related Protein 2). Пошто се меланофоре код зебрица налазе у транспарентној кожи, њихов развој се може ефикасно упоредно пратити.

Циљ овог дела истраживања је био испитивање антимеланогене активности синтетисаних деривата 2-тиохидаптоина *in vivo* на ембрионима зебрица као и евалуација токсичности синтетисаних једињења и одређивања терапеутског потенцијала активних деривата. Такође, молекулски докинг је урађен ради предвиђања места везивања одабраних најактивнијих деривата 2-тиохидаптоина на релеватним биомолекулима у оквиру сигналних путева одговорних за процес меланогенезе.

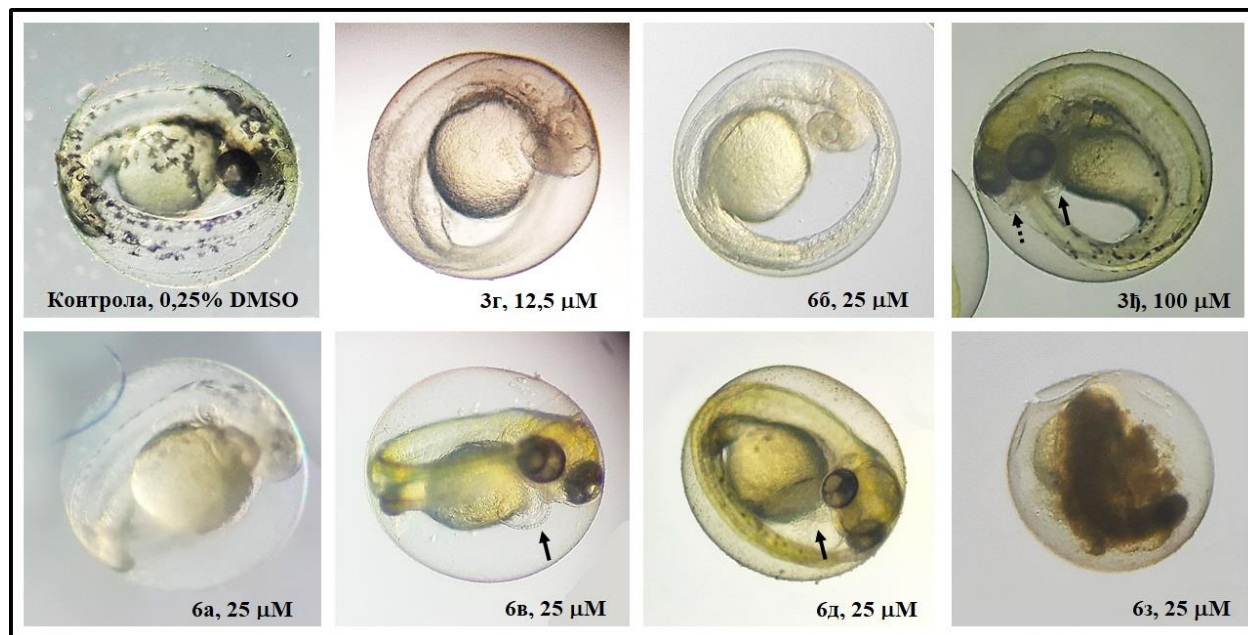
2.3.1. Испитивање антимиеланогене активности синтетисаних деривата 2-тиохидаптоина *in vivo* на моделу ембриона зебрице (*Danio rerio*)

Резултати испитивања антимиеланогеног дејства и токсичности синтетисаних деривата 2-тиохидаптоина су приказани на Слици 35. Од двадесет и седам испитиваних једињења, способност инхибиције меланогенезе утврђена је код четрнаест деривата (51,8%), при чему је потенцијал да потпуно инхибира синтезу меланина *in vivo* показало девет деривата, међу којима се издвојило пет: **3г, 3и, 3к, 6б** и **6д**. Посебно активни су били **3г** и **3и**, који су синтезу меланина инхибирали и у релативно ниској концентрацији од 5 μM , док је потпуна инхибиција меланогенезе била постигнута у концентрацији од 12,5 μM .

А) Инхибиција меланогенезе <i>in vivo</i>									Б) Токсичност <i>in vivo</i>								
	2.5	5	10	13	25	50	100	(μM)	2.5	5	10	13	25	50	100	LC ₅₀ (μM)	
3з	-	-	-	+	+	++	+++		100	100	100	100	100	100	100	>100	
3ж	-	-	-	-	-	+	+		100	100	100	100	100	100	100	>100	
3љ	-	-	-	-	-	-	-		100	100	100	100	100	100	100	>100	
3б	-	-	-	-	-	-	-		100	100	100	100	100	100	100	>100	
3г	-	+	+	+++	+++	+++	+++		100	100	100	100	100	100	100	>100	
3ђ	-	-	-	+	++	+++	+++		100	100	100	100	100	100	100	>100	
3а	-	-	-	-	+	+	+		100	100	100	100	100	100	100	>100	
3е	-	-	-	-	+	+	+		100	100	100	100	100	100	100	>100	
3д	-	+	+	+	+	+	+++		100	100	100	100	100	100	100	>100	
3и	-	+	++	+++	+++	+++	+++		100	100	100	100	100	100	100	>100	
3к	-	-	-	+++	+++	+++	+++		100	100	100	100	100	100	100	>100	
3в	-	-	-	-	-	-	-		100	100	100	100	100	100	100	>100	
3л	-	-	-	-	-	+	+		100	100	100	100	100	100	100	>100	
6а	-	-	-	-	++	++	++		100	100	100	100	100	100	100	>100	
6б	-	-	-	-	+++	+++	+++		100	100	100	100	100	100	100	>100	
6в	-	-	-	-	+++	+++	+++		100	100	100	100	100	100	100	>100	
6д	-	-	-	-	+++	+++	+++		100	100	100	100	100	100	100	>100	
6г	-	-	-	-	-	-	-		100	100	100	100	70	0	0	27.03	
6ж	-	-	-	-	-	-	-		100	100	100	100	75	0	0	27.56	
6л	-	-	-	-	-	-	-		100	100	100	100	60	0	0	25.98	
6к	-	-	-	-	-	-	-		100	100	100	100	42	0	0	23.91	
6и	-	-	-	-	-	-	-		100	100	100	100	56	0	0	25.53	
6ђ	-	-	-	-	-	-	-		100	100	100	100	20	0	0	13.3	
6е	-	-	-	-	-	-	-		100	100	100	100	80	0	0	21.56	
6ј	-	-	-	-	-	-	-		100	100	100	100	0	0	0	17.91	
6љ	-	-	-	-	-	-	-		100	100	100	0	0	0	0	11.18	
6з	-	-	-	-	-	-	-		100	100	100	0	0	0	0	11.18	

Слика 35. Испитивање инхибиције меланогенезе (А) и токсичности (Б) новосинтетисаних тиохидаптоина *in vivo* на моделу ембриона зебрице. А) Ефикасност инхибиције меланогенезе је описана арбитрарно: +++ потпуна инхибиција, ++ умерена инхибиција, + слаба инхибиција, - одсуство инхибиције. Б) Појава знакова кардиотоксичности (црвене ћелије у табели), скелетних малформација (браон ћелије у табели), утицај на преживљавање (сиво-црне ћелије у табели).

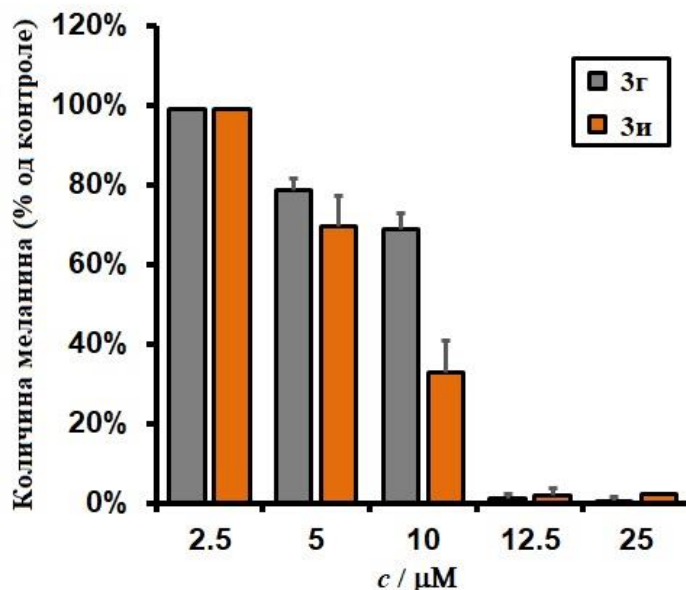
Токсиколошка процена безбедности на моделу ембриона зебрице је показала да ни **3г**, ни **3и**, чијом применном је постигнута потпуна депигментација ембриона током 48-часовног третмана, није индуковало појаву знакова токсичности након третмана у трајању од пет дана. Са друге стране, деривати **3к**, **6в** и **6д** су у антимиеланогеним дозама довели до појаве нежељених дејстава, као што су кардиотоксичност (**6в** и **6д**) и скелетни деформитет (**3к**) (Слика 36).



Слика 36. Изглед ембриона зебрице старих 48 часова третираних различитим дериватима 2-тиохидаптоина.

Изглед ембриона третираних различитим дериватима 2-тиохидаптоина и ефекти примењених третмана су приказани на Слици 36. Деривати **3г** и **6б** су у потпуности блокирали синтезу меланина током 48 h третмана и то без појаве нежељених дејстава. Тиохидаптоини **3ђ**, **6в** и **6д** су поред инхибиције меланогенезе испољили кардиотоксично дејство јер су довели до појаве перикардијалног едема као и тератогено дејство, јер су индуковали малформацију вилице и главеног региона (Слика 36). Тиохидаптоин **6з** је већ током првих 48 часова третмана довео до угинућа свих третираних ембриона зебрице. Дозно-зависан ефекат деривата **3г** и **3и** на инхибицију меланогенезе је приказан на Слици 37.

Као најактивнији деривати са одсуством штетних дејстава при активним концентрацијама показали су се **3г** и **3и**, који су испољили антимиеланогено дејство већ на врло ниској концентрацији од 5 μM , док је потпуна депигментација постигнута при концентрацији од 12,5 μM оба деривата. Оба деривата су довела до појаве скелетних малформација на концентрацијама већим од активних, с тим што је **3г** мање токсичан у односу на **3и**, јер се штетно дејство овог једињења уочава при концентрацији од 50 μM , а **3и** при концентрацији од 25 μM . Оба једињења показују способност инхибиције меланогенезе у ниској концентрацији од 5 μM , као и одсуство негативних ефеката при активним концентрацијама.



Слика 37. Дозно-зависан ефекат 3г и 3и на инхибицију меланогенезе *in vivo* у ембрионима зебрице, праћене на основу количине синтетисаног пигмента меланина.

2.3.2. Молекулски докинг

Молекулски докинг (од енгл. *molecular docking*) је моћна рачунарска метода, која је постала есенцијални аспект *in silico* дизајна лекова.⁴³⁰ Овом техником се на атомском нивоу предвиђају интеракције између малих молекула и биомакромолекула, као што су протеини и ДНК.⁴³¹ Докинг омогућује истраживачима да испитују понашање малих молекула унутар везивних места биомакромолекула и тиме прошире разумевање фундаменталних биохемијских процеса везаних за ове интеракције.⁴³² Докинг је заснован на структури и захтева 3D репрезентацију високе резолуције циљаног биомолекула, која је добијена техникама, као што су рендгенска дифракциона кристалографија, нуклеарна магнетна резонанција, или крио-електронска микроскопија.⁴³³⁻⁴³⁵

Молекулски докинг је пуно примењиван у анализи биолошких и фармаколошких својстава тио(хидантоина). Било да је то испитивање интеракција са ДНК⁴³⁶ (на пример, у циљу испитивања антипролиферативне активности¹⁰²), или испитивање интеракција са одређеним ензимом (на пример, инхибиција пролил хидролазе,⁴³⁷ 5-НТ₇R рецептора,³⁷³ декапренилфосфорил-β-D-рибоза оксидазе,⁴³⁸ хидролазе масних киселина⁴³⁹ серотонин 5-НТ_{2A} рецептора,⁴⁴⁰ или ксантин оксидазе⁴⁴¹), докинг анализа пружа информације везане за елементарне интеракције са биомолекулима унутар биохемијских сигналних путева, преко којих испитивана једињења испољавају активност.

Да би се утврдио механизам инхибиције меланогенезе на молекулском нивоу, односно, да би се детаљније испитала места везивања одабраних најактивнијих деривата 2-тиохидантоина за циљане релевантне биомолекуле у сигналним путевима у процесу синтезе меланина, урађен је молекулски докинг. Како се у меланоцитима коже зебрице синтетише само еумеланин, инхибиторска својства осам активних једињења из алкенилске серије, пет активних (3г, 3д, 3ђ, 3и и 3к) и три једињења са малом активношћу (3б, 3е и 3љ), првобитно су испитивана на три ензима која имају кључну улогу у процесу меланогенезе,

како код зебрице, тако и код човека, а то су тирозиназа, TRP-1 и TRP-2. Биохемијски путеви синтезе меланина код човека су приказани на Слици 74.

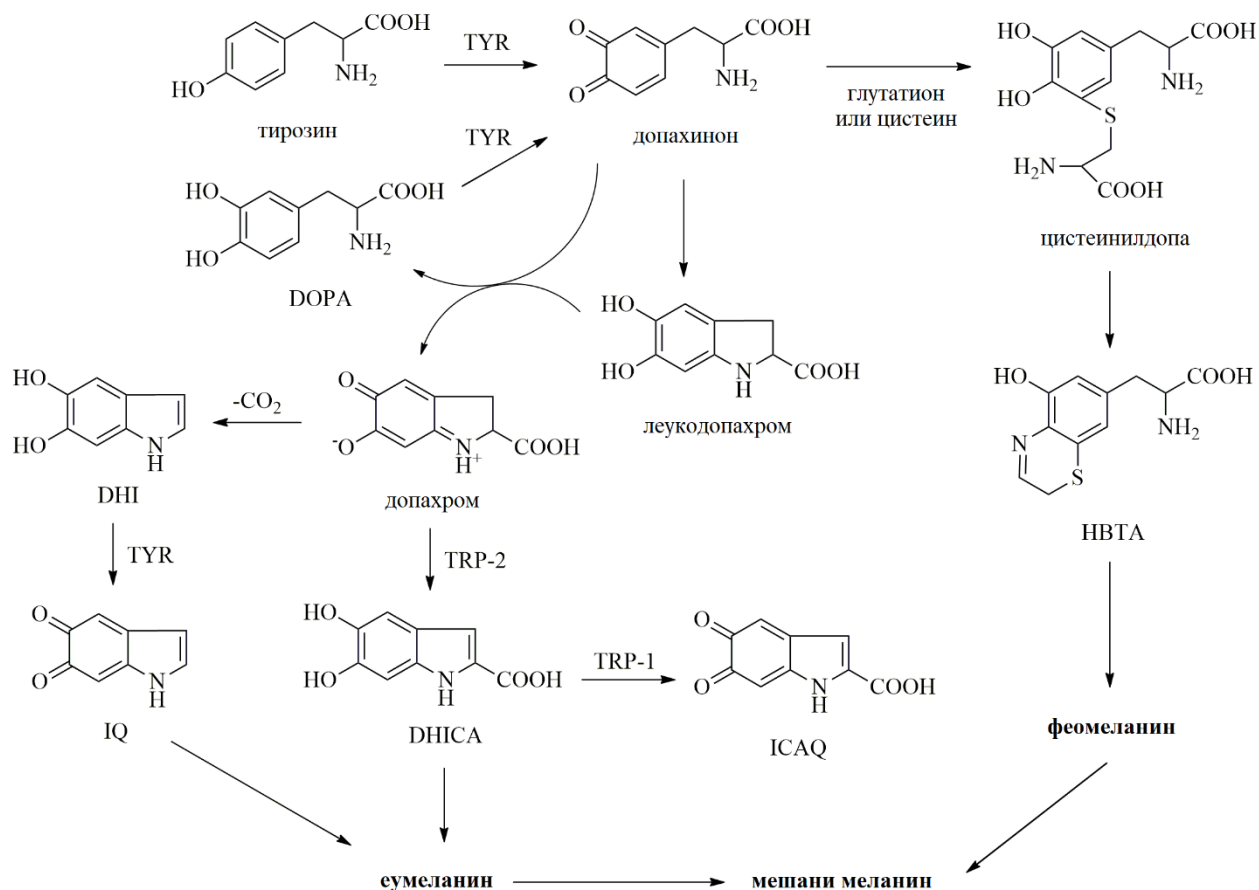


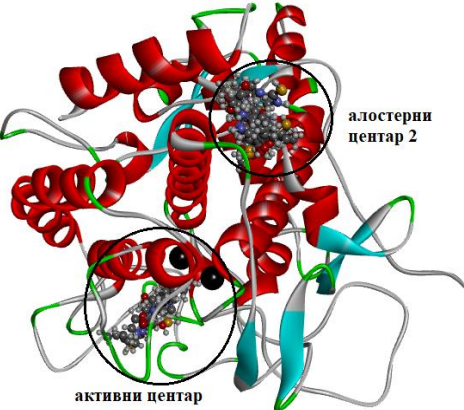
Схема 74. Биохемијски путеви синтезе меланина код човека.

Тирозиназа је ензим одговоран за први корак биосинтезе меланина. Налази се унутар меланозома, органеле меланоцита одговорне за биосинтезу, складиштење и транспорт меланина. Она је оксидаза, са два јона Cu^{2+} у активном центру и катализује оксидацију тирозина и DOPA (3,4-дихидроксифенилаланин) до допахинона. На основу резултата докинга се закључује да се свих осам једињења примарно везује за алостерни центар 2, док се четири једињења везују у активном центру тирозиназе, као другом везивном месту по енергији или конформационој слободи. Само два једињења (3f) и 3e) имају веће енергије везивања за активни центар од DOPA и тирозина, али како су свима прва везивна места алостерна, резултати указују на то да би сва једињења могла да инхибирају тирозиназу некомпетитивним механизмом (Табела 8). Међутим, овакав закључак (да сви деривати инхибирају тирозиназу) не одговара резултатима који су добијени на моделу зебрице, на основу активности које су дефинисане IC_{50} вредностима (само пет активних једињења).

Настали допахинон се спонтано преводи у допахром и DOPA. Допажром се оксидује до DHICA (5,6-дихидроксииндол-2-карбоксилна киселина), у реакцији коју катализује ензим TRP-2, познат још као допахром таутомераза, трансмембрански N-гликопротеин, који се налази у мембрани меланозома. Резултати докинга испитиваних једињења на TRP-2 су показали да се сва једињења везују за активни центар, као прво везивно место (Табела 9).

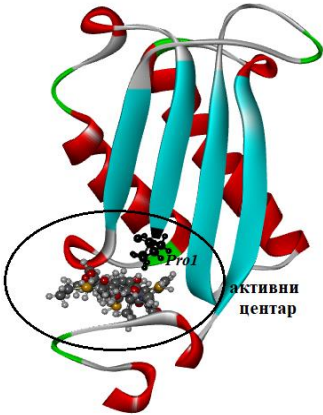
Међутим, опет само два једињења, **3ђ** и **3е**, имају енергије везивања веће за ово место од биолошки активног допахрома (енергија од $-24,7 \text{ kJ mol}^{-1}$). Једино би се за ова два једињења могло очекивати да инхибирају активност TRP-2, и то компетитивним механизмом.

Табела 8. Слободна енергија везивања (ΔG , kJ mol^{-1}), константе везивања (K_i , μM) и места везивања испитиваних једињења за тирозиназу.

Таргет:	Лиганд	Алостерни центар 2 (BS1)	Активни центар (BS2)
 <p>Тирозиназа (PDB код: 2Y9X)</p>	Активна једињења (ΔG; K_i)		
	3г	-24,3; 55,7	-22,2; 129,6
	3ђ	-25,9; 28,4	-25,9; 28,4
	3д	-23,8; 66,0	
	3и	-22,2; 129,6	
	3к	-26,4; 24,0	
	Неактивна једињења (ΔG; K_i)		
	3љ	-23,4; 78,1	
	3б	-21,8; 153,5	-21,8; 153,5
	3е	-28,0; 12,2	-28,0; 12,2
	Биолошки активна једињења (ΔG; K_i)		
	DOPA		-25,1; 39,8
	Тирозин		-24,7; 47,1

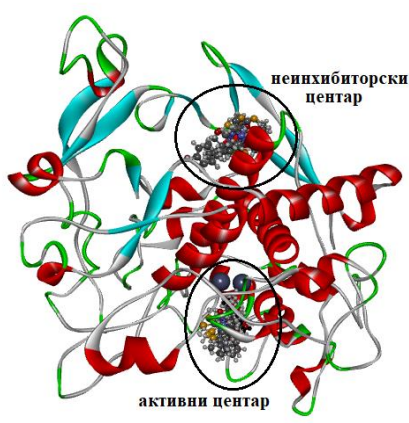
*BS1 је прво, а BS2 је друго везивно место.

Табела 9. Слободна енергија везивања (ΔG , kJ mol^{-1}), константе везивања (K_i , μM) и места везивања испитиваних једињења за TRP-2.

Таргет:	Лиганд	Активни центар (BS1)	
 <p>TRP-2 (PDB код: 3KAN)</p>	Активна једињења (ΔG; K_i)		
	3г	-22,2; 129,6	
	3ђ	-28,5; 10,3	
	3д	-23,4; 78,1	
	3и	-21,3; 181,7	
	3к	-26,8; 20,2	
	Неактивна једињења (ΔG; K_i)		
	3љ	-22,2; 129,6	
	3б	-20,5; 254,7	
	3е	-28,0; 12,2	
Биолошки активна једињења (ΔG; K_i)			
Допахром	-24,7; 47,0		

DHICA се оксидује до ICAQ (индолхинонкарбоксилна киселина) у реакцији која се дешава на TRP-1, који се такође налази у мембрани меланозома. Резултати докинга на овом ензиму показују да сва једињења имају као прво везивно место неинхибиторски центар, док се скоро сви (осим **3ђ** и **3и**) везују за активни центар, у који се везује молекул DHICA (Табела 10). Међутим, енергије везивања за активни центар нису веће од енергије везивања DHICA ($-27,2 \text{ kJ mol}^{-1}$), на основу чега се закључује да једињења не инхибирају TRP-1.

Табела 10. Слободна енергија везивања (ΔG , kJ mol^{-1}), константе везивања (K_i , μM) и места везивања испитиваних једињења за TRP-1.

Таргет:	Лиганд	Неинхибиторски центар (BS1)	Активни центар (BS2)
 <p>TRP-1 (PDB код: 5M8M)</p>	Активна једињења (ΔG; K_i)		
	3г	-24,7; 47,1	-22,6; 109,5
	3ђ	-32,6; 1,9	
	3д	-25,9; 28,4	-22,6; 109,5
	3и	-24,3; 55,7	
	3к		-6,1; 33,6
	Неактивна једињења (ΔG; K_i)		
	3љ	-23,4; 78,1	-20,9; 215,2
	3б	-23,4; 78,1	-20,5; 254,8
	3е	-33,0; 1,6	-26,8; 20,2
Биолошки активна једињења (ΔG; K_i)			
DHICA		-27,2; 17,1	

Резултати докинга на тирозинази, TRP-1 и TRP-2 ензимима, иако указују на могућност инхибирања меланогенезе, не дају, нити објашњавају трендове IC_{50} вредности добијених експериментално. Стога је урађен докинг на *mitf*, који је регулатор експресије гена тирозиназе, TRP-1 и TRP-2. *Mitf* је главни регулатор меланогенезе у меланоцитима, везујући се за М кутију промоторског региона и регулишући експресију гена тирозиназе, TRP-1 и TRP-2.⁴⁴²

Структура *mitf* протеина се састоји из типичног helix-loop-helix (HLH) мотива везаног за два промотора.⁴⁴³ У једном од два *mitf* промотора, хеликс (*a2a*) се завршава после првог препознатљивог хептадног понављања zipper региона, означеног као понављање 0 (аминокиселински остаци 243-258). Трећи десетоструки *a* хеликс (*a2b*), који обухвата остала хептадна понављања I-V (остаци 260-294) се простире након kink региона Arg259-Gln261. Преостали HLH домен (енгл. helix-loop-helix) се састоји из C-терминуса првог хеликса и N-терминуса другог хеликса, које одваја дугачак loop (остаци 231-243). Други *mitf* промотор се састоји из једног дугачког хеликса, *a2*, са скоро петнаест савијања (остаци 243-294). Унутар kink региона недостаје леуцин zipper интеракција, због ког се јавља хол запремине 300 \AA^3 (*mitf* ДНК кутија).

Резултати докинга показују да се сва испитивана једињења везују на два везивна места (Табела 11). Прво у zipper региону, а затим у kink региону. Међутим, ни једно једињење се не везује у просторној шупљини између kink региона оба хеликса (које се сматра као место које може да блокира *mitf*), нити у регион где се везује ДНК, па се закључује да ова једињења не блокирају *mitf*.

Табела 11. Слободна енергија везивања (ΔG , kJ mol^{-1}), константе везивања (K_i , μM) и места везивања испитиваних једињења за *mitf*.

Таргет:	Лиганд	Kink регион (BS1)	Zipper регион (BS2)
<p>mitf (PDB код: 4ATI)</p>	Активна једињења (ΔG; K_i)		
	3г	-18,8; 500,6	-18,0; 701,7
	3ђ	-22,6; 109,5	-23,0; 92,5
	3д	-19,7; 357,1	-19,7; 357,1
	3и	-16,7; 1164,7	-16,3; 1378,9
	3к	-19,7; 357,1	-23,0; 92,5
	Неактивна једињења (ΔG; K_i)		
	3љ	-18,0; 701,7	-18,4; 592,7
	3б	-16,7; 1164,7	-17,6; 830,8
	3е	-22,2; 129,6	-23,0; 92,5
	Биолошки активна једињења (ΔG; K_i)		

Очигледно је да активност пет активних једињења, и неактивност остала три једињења, није могуће објаснити на основу докинг студије на ова четири таргета (*mitf*, тирозиназа, TRP-1 и TRP-2). Стога је потребно укључити и три сигнална пута, која имају везе са *mitf*, а то су сАМР (циклични аденозин-3',5'-монофосфат), Wnt (од енгл. Wingless-related Integration Site) и ERK (од енгл. Extracellular Signal-regulated Kinase) сигнални путеви, чији су схематски прикази дати на Слици 38.

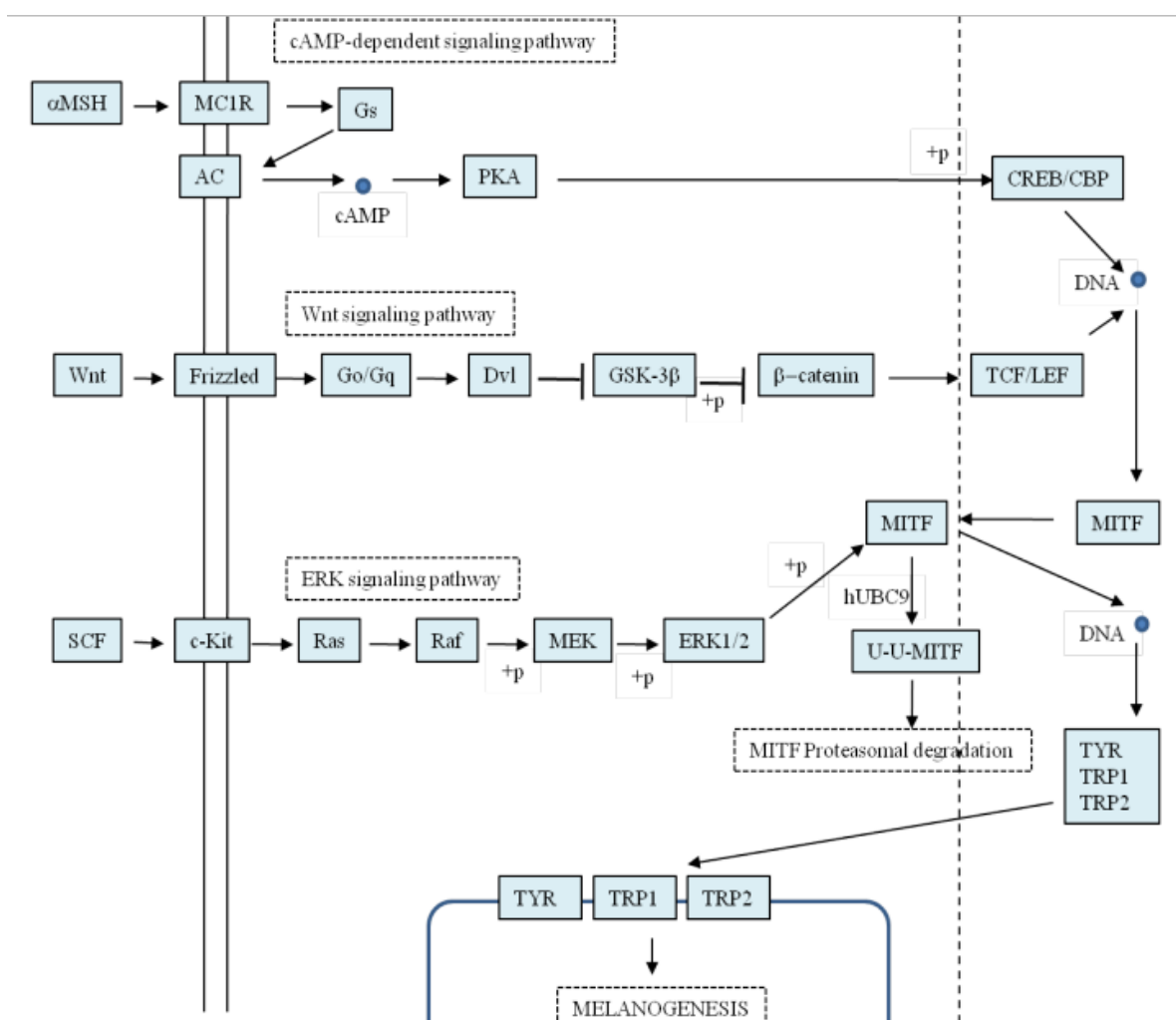
ERK сигнални пут регулише меланогенезу кроз деградацију *mitf* протеина. ERK активација почиње фосфорилацијом *mitf* на серину 73, коју прати *mitf* убиквитинација и протеозомска деградација. Дакле, активација ERK сигналног пута инхибира меланогенезу регулацијом *mitf* активности. Такође, показано је да с-Kit (тирозин-протеин киназа), интрацелуларни периферни мембрански протеин, чија је улога фосфорилација тирозинских остатака специфичних протеина, има важну улогу у ERK путу.

Као таргет за ERK сигнални пут узета је структура с-Kit (PDB код 3G0E). У активном центру с-Kit се везује АТФ (енергија везивања је $-29,3 \text{ kJ mol}^{-1}$). Лек Sunitinib (који се користи против гастроинтестиналних стромалних тумора), за који је такође урађена докинг студија, има већи афинитет везивања за активни центар од АТФ (енергија везивања је $-42,7 \text{ kJ mol}^{-1}$), што објашњава његово дејство. Међутим, иако се сва једињења везују за активно место, њихове енергије везивања су мање од АТФ-ове (Табела 12). Ово упућује на закључак да испитивана једињења не могу да инхибирају с-Kit, и тако спрече *mitf* деградацију. Такође, резултати докинга не могу да објасне ексериментално добијене трендове.

Wnt је први сигнални пут који утиче на експресију *mitf* гена. У овом сигналном путу је кључан интрацелуларни ниво β -катенина. У одсуству Wnt сигнала, β -катенин је фосфорилисан од стране гликоген синтаза киназе-3 β (GSK-3 β), а фосфорилисан β -катенин препознаје комплекс убихитин лигазе, што доводи до деградације β -катенина. Активација Wnt пута негативно регулише GSK-3 β , што доводи до акумулације β -катенина у цитоплазми, транслокације до нуклеуса и грађења комплекса са TCF (од енгл. T-cell Factor)

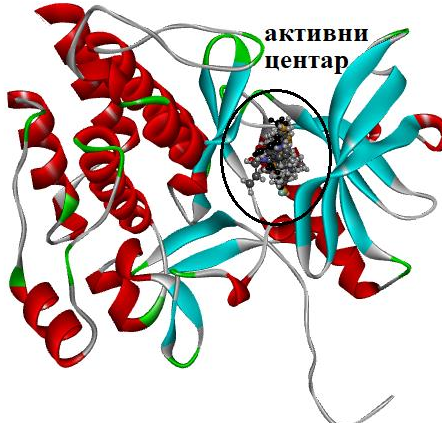
и LEF (од енгл. Lymphocyte Enhancer Factor-1), при чему се позитивно регулише експресија *mitf*. Дакле, активацијом Wnt пута се стимулише меланогенеза регулацијом активности *mitf*.

Познато је да β -катенински остаци His260, Asn261, Lys292, Leu296, Asp299, Tyr306, Gly307, Lys312, Lys335, Lys345, Arg376, Arg386, Asn387, Asn426, Cys429, Lys435, Cys466, His470, Arg474 и Lys508 чине везивни жлеб који интерагује са TCF4, градећи комплекс. Као таргет за овај сигнални пут узет је β -катенин, чија је структура преузета из кристалне структуре са PDB кодом 1DJF, која представља комплекс β -катенина са TCF-4. Докинг је урађен само за β -катенин, а не за цео комплекс. Резултати докинга (Табела 13) су показали да се прво везивно место за сва једињења налазе ван везивног жлеба, за који се везује TCF-4 фактор. Ово упућује на закључак да испитивана једињења не ометају настанак β -катенин/TCF-4 комплекса, а самим тим не блокирају Wnt сигнални пут (што је примећено и на зебрицама).

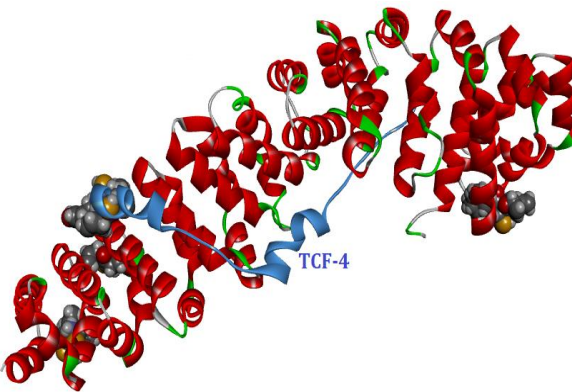


Слика 38. Схематски приказ cAMP, Wnt и ERK сигналних путева укључених у процес меланогенезе код човека.⁴⁴²

Табела 12. Слободна енергија везивања (ΔG , kJ mol^{-1}), константе везивања (K_i , μM) и места везивања испитиваних једињења за *c-Kit*.

Таргет:	Лиганд	Активни центар (BS1)
 <p>c-Kit (PDB код: 3G0E)</p>	Активна једињења (ΔG; K_i)	
	3г	-21,8; 153,5
	3ђ	-28,4; 10,3
	3д	-25,5; 33,6
	3и	-25,5; 109,5
	3к	-23,0; 92,5
	Неактивна једињења (ΔG; K_i)	
	3љ	-20,0; 301,6
	3б	-22,2; 129,6
	3е	-29,3; 7,3
	Биолошки активна једињења (ΔG; K_i)	
	Сунитиниб	-42,7; 0,03
	АТР	-29,3; 7,3

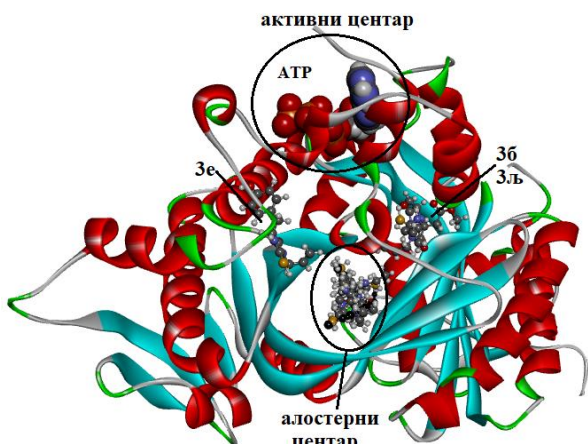
Табела 13. Слободна енергија везивања (ΔG , kJ mol^{-1}), константе везивања (K_i , μM) и места везивања испитиваних једињења за β -катенин.

Таргет:	Лиганд	Место ван везивног жлеба
 <p>β-катенин (PDB код: 1JDH)</p>	Активна једињења (ΔG; K_i)	
	3г	-20,5; 254,7
	3ђ	-23,0; 92,5
	3д	-19,7; 357,1
	3и	-17,6; 830,8
	3к	-18,4; 592,7
	Неактивна једињења (ΔG; K_i)	
	3љ	-18,0; 701,7
	3б	-17,2; 983,7
	3е	-22,6; 109,5
	Биолошки активна једињења (ΔG; K_i)	
	---	-
	--	-

α -MSH је пептид изведен из POMC (проопиомеланокортин) и он регулише меланогенезу cAMP-зависним путем. Када се везује за свој рецептор на мембрани меланоцита, MC1R, овај хормон активира аденилат циклазу (AC), мембрански протеин, чија је улога превођења AMP у cAMP. cAMP, други унутарћелијски сигнал, активира протеин киназу А (PKA), која затим активира експресију гена *mitf* фосфорилацијом CREB (од енгл. cAMP Response Element-binding Protein).

Као таргет узета је кристална структура хумане аденилат циклазе (PDB код 5D0R), која има активну супстанцу бисфенол битионол (BSBT, 2,2'-сулфонилбис(4,6-дихлорфенол) везану у алостерно место. Резултати докинга (Табела 14) су показали да се једињења **3г**, **3ђ**, **3д**, **3и** и **3к** везују у алостерном центру, попут BSBT. Очигледно да инхибирају аденилат циклазу некомпетитивно. Једињења **3љ**, **3б** и **3е** се не везују ни у активном ни у алостерном центру, што упућује на слагање са експерименталним подацима, која су показала малу активност за ова три једињења.

Табела 14. Слободна енергија везивања (ΔG , kJ mol^{-1}), константе везивања (K_i , μM) и места везивања испитиваних једињења за аденилат циклазу.

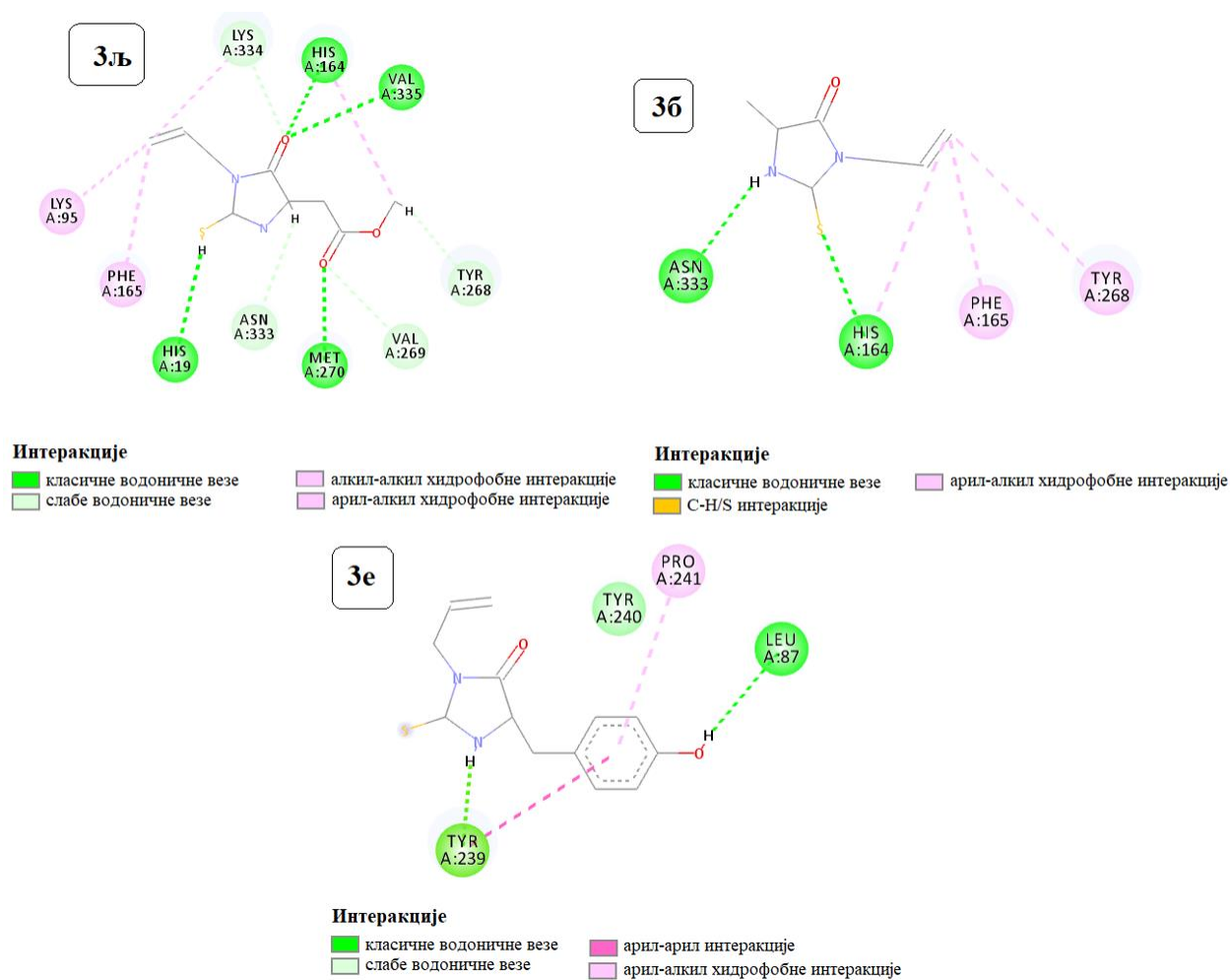
Таргет:	Лиганд	Алостерни центар (BS1)	Други центри (BS1)
 <p>активни центар АТР 3г 3ђ 3д 3и 3к 3љ 3б 3е алостерни центар</p> <p>Аденилат циклаза (PDB code: 5D0R)</p>	Активна једињења (ΔG; K_i)		
	3г	-25,9; 28,4	
	3ђ	-29,3; 7,3	
	3д	-25,1; 39,8	
	3и	-23,8; 66,0	
	3к	-29,3; 7,3	
	Неактивна једињења (ΔG; K_i)		
	3љ		-23,4; 24,0
	3б		-22,2; 129,6
	3е		-30,1; 5,2
Биолошки активна једињења (ΔG; K_i)			
BSBT	-29,3; 7,3		
АТР			Активни центар -31,8; 2,7

Анализом аминокиселинског окружења у најстабилнијем везивном месту за испитивана једињења, која су показала инхибиторску активност на аденилат циклазу (**3г**, **3ђ**, **3д**, **3и** и **3к**), показано је да су хидрофобне алкил-алкил и арил-алкил интеракције најбројније. У овим интеракцијама углавном учествују Phe45, Phe338, Leu102, Ala97 и Ala100 (Слика 40). Класичне водоничне везе су значајно мање заступљене, свега три, односно по једна за три испитивана једињења (**3г**, **3д** и **3к**). Слабе водоничне везе, у које се могу урачунати и С-Н/С интеракције, су нешто бројније (јављају се код свих пет једињења), али још увек су значајно мање бројне од хидрофобних интеракција.

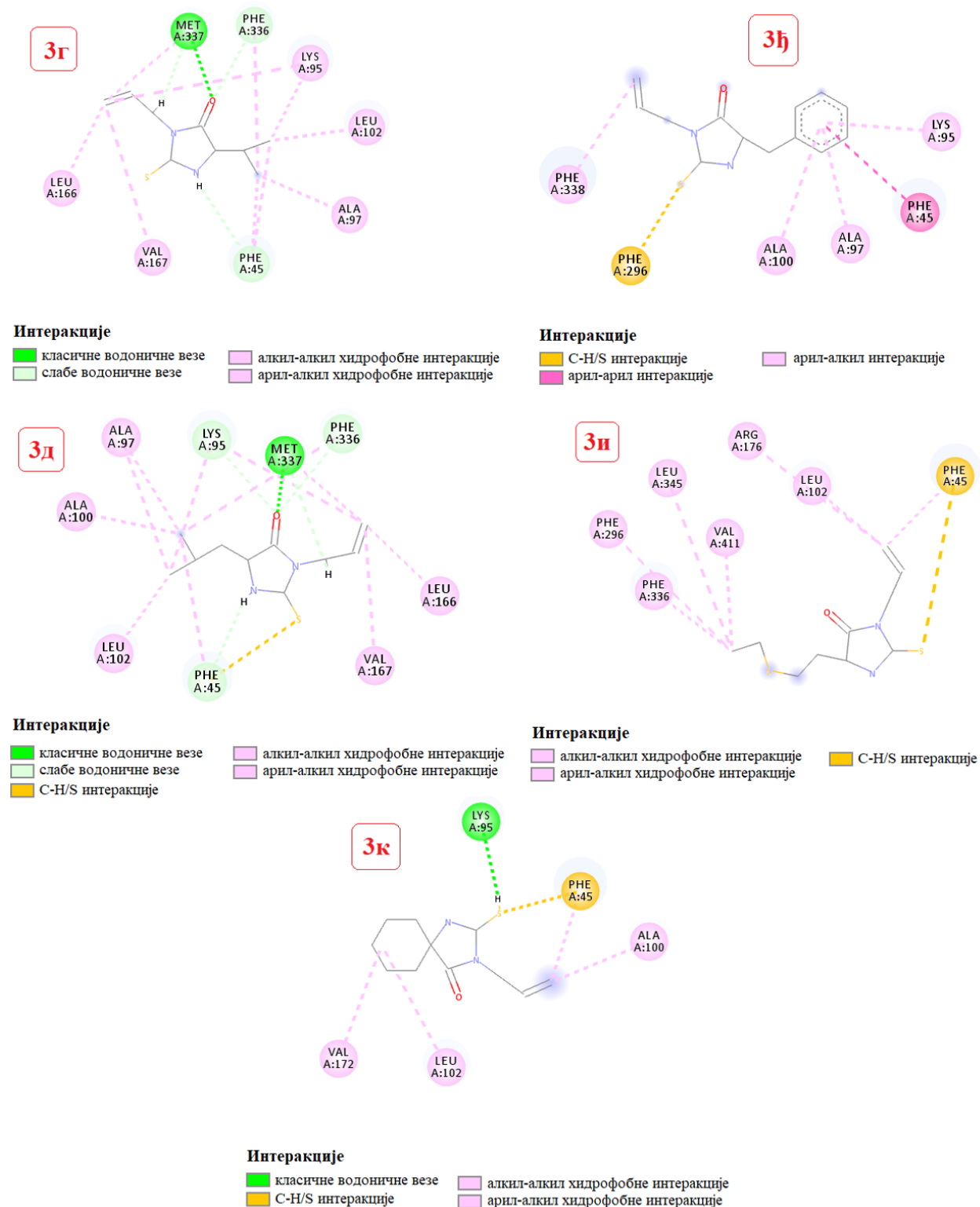
Једињења која нису показала инхибиторску активност на аденилат циклазу (**3љ**, **3б** и **3е**), нису се везала ни за активно место ензима, ни у алостерном месту, него на местима која се не могу повезати са инхибиторским својствима. За њихова везивања су одговорне углавном класичне водоничне везе, које су у овом случају бројније од хидрофобних (Слика 39). Једињење **3љ** гради највећи број водоничних веза (чак четири класичне водоничне везе). Разлог за то је увођење супституента са естарском групом, чиме је повећана акцепторска способност једињења за водонично везивање, разматрано у односу на претходно описана једињења (**3г**, **3ђ**, **3д**, **3и** и **3к**). Једињење **3б** се везује на истом месту као и **3љ**, али гради само две класичне водоничне везе. У оба случаја His164 и Asp333 су укључени у грађење

водоничних веза. За разлику од **3љ**, које има већи акцепторски афинитет, повећан број водоничних веза у случају **3б** је последица смањења хидрофобности. Наиме, у положају 5 се налази метил група, док код испитиваних једињења за које је констатовано да имају велики афинитет према хидрофобним интеракцијама (**3г**, **3ђ**, **3д**, **3и** и **3к**), супституент у положају 5 је волуминознији, а самим тим и хидрофобнији.

Код једињења **3е**, супституент у положају 5 има хидрофобну фенил групу, и за њега везану О-Н групу. Очигледно, увођењем поларне О-Н групе, повећава се донорска способност једињења за водонично везивање. У првом везивном месту, **3е** гради две класичне водоничне везе (са Leu87 и Tyr239), и две додатне хидрофобне интеракције. Разлог различитих места везивања **3љ** и **3б**, с једне стране, од **3е** једињења с друге, и поред тога што сва три једињења граде већи број водоничних веза од описаних активних једињења, налазимо у њиховој улози код водоничног везивања. Наиме, **3љ** и **3б** имају углавном улогу акцептора водоничног везивања у првом везивном месту, док **3е** једињење има улогу донора водоничног везивања.



Слика 39. Аминокиселинско окружење у првом везивном месту испитиваних једињења (**3љ**, **3б** и **3е**), која нису показала инхибиторску активност на аденилат циклазу.



Слика 40. Аминокиселинско окружење у првом везивном месту испитиваних једињења (3г, 3ђ, 3д, 3и и 3к), која су показала инхибиторску активност на аденилат циклазу.

2.4. Арилиденски деривати 2-тиохидаптоина као инхибитори корозије меког челика у киселој средини

Корозија представља један од највећих производних и финансијских потешкоћа већине индустрија на глобалном нивоу. По извештају из 2016. године, трошкови отклањања штете проузроковане корозијом су процењени на око 2,5 билиона америчких долара, што је око 3,4% укупног глобалног бруто домаћег производа.⁴⁴⁴

Меки челик је материјал у широкој употреби у многим индустријама због његових добрих механичких својстава и ниске цене. Упркос његовим атрактивним особинама, слаба отпорност меког челика на киселине значајно ограничава његову употребу.⁴⁴⁵ Агресивни раствори минералних киселина се често употребљавају у индустријским процесима који користе меки челик, највише HCl за закишељавање, хемијско нагризање и индустријско чишћење.

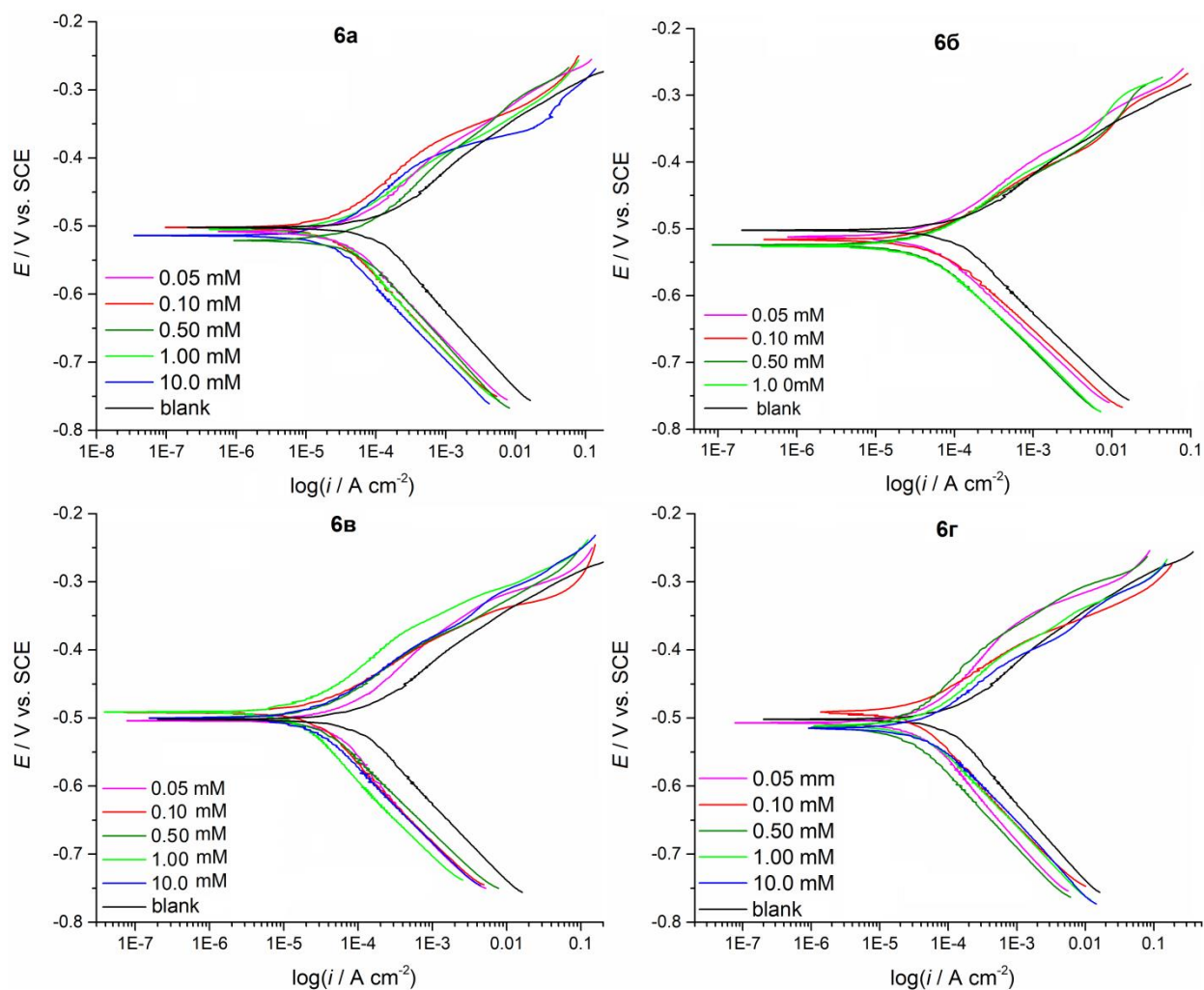
Употреба инхибитора корозије представља најпрактичнији и најпрофитабилнији начин умањења корозије метала у воденим срединама.⁴⁴⁶⁻⁴⁵⁰ Молекули са коњугованим вишеструким везама, ароматичним групама и разним хетероатомима, као што су кисеоник, сумпор и азот, показују добре активности инхибиције корозије, јер се адсорбују на површини метала.⁴⁵¹ Ипак, многа оваква једињења се не могу користити због негативног утицаја на животну средину.⁴⁵² Растуће потребе индустрије захтевају употребу нових и безбедних инхибитора корозије који нису штетни по животну средину.⁴⁵³⁻⁴⁵⁷

Хидантоин, 2-тиохидаптоин и неки њихови деривати су показали антикорозивну активност.⁴⁵⁸⁻⁴⁶¹ Шифове (Schiff) базе, са азометинском групом, такође поседују антикорозивна својства.⁴⁶²⁻⁴⁶⁵ Имајући ово у виду, један од циљева истраживања у оквиру ове дисертације је био испитивање антикорозивних својстава четири деривата **ба-г**, тиохидаптоинских Шифових база, синтетисаних из јефтених, комерцијално доступних супстрата, коришћењем уобичајених гравиметријских, електрохемијских и микроскопских метода, ради добијања економски исплативих и еколошки погодних инхибитора корозије меког челика.⁴⁶⁶

2.4.1. Потенциодинамичка поларизациона мерења

Потенциодинамичка поларизациона мерења у циљу испитивања инхибиторске ефикасности тиохидаптоинских деривата **ба-г**, вршена су у 0,5 М HCl. Потенциодинамичке поларизационе (PP) криве добијене у испитиваном раствору за електроду од меког челика, без и у присуству инхибитора различитих концентрација, су приказане на Слици 41. Као што се може видети из Тафелових (Tafel) правих, тип поларизационих криви је скоро исти за неинхибиране и инхибиране растворе. Анодни и катодни Тафелови нагиби имају само благу промену у њиховим вредностима, што значи да је реакција корозије меког челика кинетички контролисана и адсорбовани инхибитор не утиче на примарни механизам.⁴⁶⁷ Према поларизационим мерењима, присуство инхибитора не изазива никакву значајну промену корозионог потенцијала, E_{corr} , али се Тафелове праве померају ка нижим вредностима густина струје, означавајући да инхибитори смањују анодно растварање меког челика и успоравају редукцију јона водоника. Може се закључити да се степен корозије меког челика у корозивном раствору, 0,5 М HCl, смањује у присуству инхибитора. Уочено смањење у густини струје корозије се може приписати адсорпцији инхибитора на површини меког челика. Заштита површине меког челика од растварања у испитиваном корозивном

раствору се може објаснити адсорпцијом молекула деривата 2-тиохидаптоина (са високом негативном шаржом на хетероатомима) који окупирају активна места на металној површини електроде, а коју углавном чине атоми гвожђа са непопуњеним d орбиталама.^{458,460,468}



Слика 41. Потенциодинамичке поларизационе криве за меки челик у 0,5 М раствору HCl у одсуству и присуству инхибитора 6а-г.⁴⁶⁶

Тафеловом екстраполацијом линеарног дела анодне и катодне поларизационе криве изведене су вредности електрохемијских параметара, корозиони потенцијал (E_{corr}), густина струје корозије (i_{corr}), анодни и катодни Тафелови нагиби (β_a и β_c), дати у Табели 15. Корозиони потенцијал меког челика изложеног дејству 0,5 М раствора HCl је око -504 mV, док се у присуству инхибитора мења од -488 до -526 mV. Одређивање типа инхибитора за било који од испитиваних једињења зависи од забележене разлике у корозионом потенцијалу у неинхибираном и инхибираном раствору.^{460,468,469} Ако је разлика у потенцијалу корозије већа од 85 mV, инхибитор може да се класификује као катодни или анодни, али ако је разлика у потенцијалу корозије мања од 85 mV, инхибитор може да се категорише као мешовит. У овом случају, промена потенцијала корозије је мања од 85 mV, означавајући да ефекат инхибиције може бити и катодни и анодни (мешовитог типа). Ово

указује на то да присуство инхибитора у испитиваном киселом раствору формира или олакшава настајање пасивног филма који инхибира анодну реакцију растварања метала и истовремено контролише механизам катодног издвајања водоника.⁴⁶⁶ На основу експериментално снимљених РР крива, ефикасност инхибиције (η / %) је израчуната по једначини:

$$\eta = \left(\frac{i_{corr}^0 - i_{corr}^i}{i_{corr}^0} \right) \times 100 \quad (5)$$

где су i_{corr}^0 и i_{corr}^i густине струје корозије снимљене без и у присуству инхибитора, респективно, а резултати су приказани у Табели 15.

Табела 15. Електрохемијски параметри изведени из потенциодинамичких поларизационих криви добијених за меки челик у 0,5 М раствору HCl без и са инхибиторима **6a-g** присутним у различитим концентрацијама.⁴⁶⁶

Медијум	C_{inh} / mM	E_{corr} / mV vs. SCE	I_{corr} / $\mu A\ cm^{-2}$	β_a / mV dec ⁻¹	β_c / mV dec ⁻¹	η , %
слепа проба	0,5 М	-504	92,27	81	120	
6a	0,05	-512	37,98	92	110	59
	0,1	-500	22,63	84	112	75
	0,5	-497	26,04	64	113	72
	1,0	-504	25,85	75	117	71
	10,0	-515	20,81	82	105	77
6б	0,05	-515	45,24	92	107	51
	0,1	-514	45,96	74	102	50
	0,5	-521	38,59	74	111	58
	1,0	-526	38,59	84	107	58
6в	0,05	-505	44,6	95	141	51
	0,1	-488	22,8	65	113	75
	0,5	-500	23,1	104	73	74
	1,0	-494	16,83	80	115	82
	10,0	-500	23,5	69	113	74
6г	0,05	-510	45,1	111	128	51
	0,1	-490	34,63	67	114	62
	0,5	-511	22,59	88	68	75
	1,0	-510	40,93	82	105	55
	10,0	-513	46,7	76	102	49

Сви инхибитори су показали значајан потенцијал инхибиције корозије. Ефикасност инхибиције корозије расте са растућом концентрацијом деривата 2-тиохидаптоина до 1,0 mM, означавајући да се способност инхибиције корозије може повезати са структуром инхибитора.⁴⁶⁶

Ипак, додатно повећање концентрације до 10,0 mM, за једињења **6в** и **6г** доводи до смањења ефикасности инхибиције. Скорије су Алхафар (Alhaffar) и сарадници⁴⁷⁰ и Павитра (Pavithra) и сарадници⁴⁷¹ објавили аналогно понашање инхибитора у 1,0 М HCl и 0,5 М

H_2SO_4 . Претпоставили су да, када се достигне оптимална концентрација инхибитора у раствору, на површини метала не преостају активна места за даљу адсорпцију, јер је постигнута максимална покривеност, тако да молекули инхибитора не могу више да се адсорбују на површини. Смањена ефикасност инхибиције приликом додатног повећања концентрације инхибитора је објашњена интеракцијом адсорбованих и неадсорбованих молекула, која изазива десорпцију. За сва испитивана једињења је инхибиција корозије релативно стабилна на концентрацији од 0,5 mM, са стопом инхибиције корозије од $\approx 75\%$. Механизам инхибиције зависи од интеракције између инхибитора и металне површине. Познато је да органски инхибитори корозије имају бар једну поларну функционалну групу са хетероатомима (азот, сумпор, кисеоник и понекад фосфор), која се сматра центром хемисорпционих процеса. Додатно, величина, оријентација, облик и електрична шаржа молекула инхибитора одређују стопу адсорпције и ефикасност инхибиције. Поврх тога, гвожђе поседује велики координациони афинитет према лигандима са хетероатомима. Сви ови фактори могу да објасне разлику у инхибиторском деловању испитиваних деривата 2-тиохидаптоина. Сва једињења имају четири хелатна центра (-NH, C=S, C=N и C=O) и ароматични прстен. Добијени резултати указују на то да сви деривати 2-тиохидаптоина учествују у хемисорпционом процесу кроз адсорпцију на површини меког челика засновану на донорско-акцепторским интеракцијама између π електрона донорских атома инхибитора и празних d орбитала јона гвожђа на површини.^{460,462} Једињење **6в** је показало најбоље перформансе са ефикасношћу инхибиције од 82%. Ова повећана ефикасност инхибиције се може приписати присуству додатног атома кисеоника у хетероароматичном прстену, које доприноси бољој адсорпцији.^{459,466}

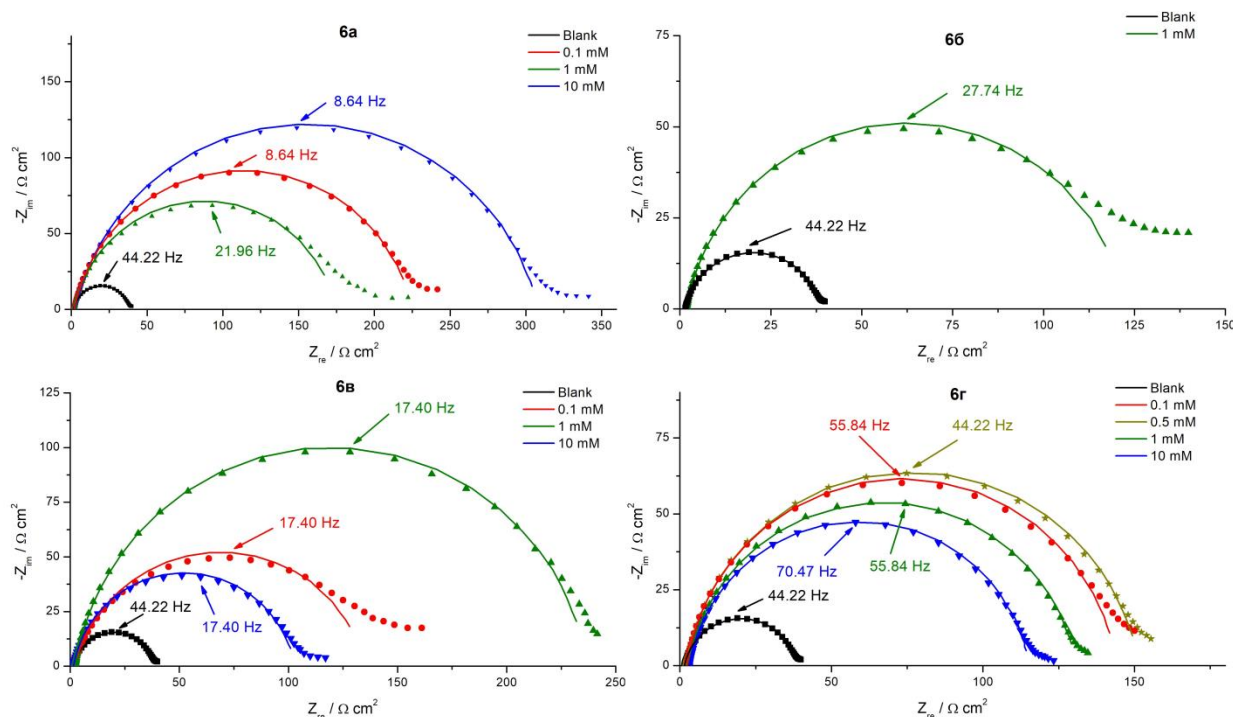
2.4.2. Потенциостатска електрохемијска импедансна спектроскопија

Потенциостатска електрохемијска импедансна спектроскопија (PEIS) је коришћена за процену степена корозије, карактеризацију процеса корозије и испитивања реакционог механизма. Раствори 2-тиохидаптоина у концентрацијама које су након РР мерења показале најбољу активност су коришћени за даљу PEIS евалуацију. На Слици 42 су приказани Никвистови (Nyquist) дијаграми електрода од меког челика у 0,5 М раствору HCl у одсуству и присуству различитих концентрација инхибитора **6а-г**.⁴⁶⁶

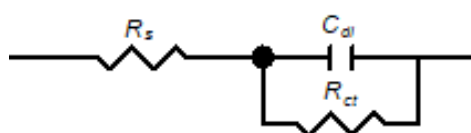
Пошто су потенциодинамичка мерења показала да једињење **6б** има најнижу ефикасност инхибиције корозије од свих тестираних, само концентрација са најбољом перформансом (1,0 mM, $\eta = 58\%$, Табела 14) је коришћена за даљу PEIS евалуацију. Присуство различитих инхибитора изазива повећање у капацитивним петљама, у поређењу са основним раствором. Узимајући у обзир облик импедансног дијаграма, може се рећи да њихова величина зависи од структуре и концентрације инхибитора и да се Никвистови дијаграми састоје од једне благо спуштене капацитивне петље, показујући да пренос наелектрисања контролише реакцију корозије на грубој, нехомогеној површини електроде.⁴⁷² Анализом Никвистових дијаграма је откривено да су капацитивне петље депресирани полукругови, а не идеални полукругови, што је у складу са PEIS теоријом, узимајући у обзир ефекат дисперзије френквенције на грубој и нехомогеној површини електроде, где се молекулски филм инхибитора не понаша као идеални кондензатор двојног слоја. Резултати се могу интерпретирати у смислу еквивалентног кола електроде приказаног на Слици 43. Ово еквивалентно коло је употребљено за моделовање интерфејса између гвожђа и киселине.⁴⁷³ Капацитет двојног слоја је израчунат помоћу једначине:^{474,475}

$$C_{dl} = \left(\frac{1}{2\pi f (-Z''_{max}) R_{ct}} \right) \quad (6)$$

где: $C_{dl} / \text{F cm}^{-2}$ је капацитет двојног слоја, $-Z''_{max}$ је максимална имагинарна компонента импедансе, $R_s / \Omega \text{ cm}^2$ је некомпензован отпор раствора и $R_{ct} / \Omega \text{ cm}^2$ је отпор преноса наелектрисуња.



Слика 42. Никвистови дијаграми електроде од меког челика и инхибитора **6a-г** у различитим концентрацијама у односу на бланко $0,5 \text{ M HCl}$.⁴⁶⁶



Слика 43. Рендлсово еквивалентно коло електроде коришћено за PEIS криве.⁴⁶⁶

Електрохемијски подаци су евалуирани помоћу Рендлсовог (Randles) еквивалентног кола (Слика 43), где је R_s отпор раствора, C_{dl} капацитет двојног слоја и R_{ct} је отпор преноса наелектрисуња.^{475,476}

Предложено еквивалентно коло је у добром складу са резултатима, што је доказано веома малим вредностима хи-квадрата, које су реда величине 10^{-3} за све експериментално добијене податке. Сви параметри електрохемијске импедансе су представљени у Табели 16. Како је густина струје корозије (i_{corr}) инверзно повезана са R_{ct} , ефикасност инхибиције ($\eta / \%$) се може одредити помоћу следеће једначине.^{467,468}

$$\eta = \left(1 - \frac{R_{ct}^0}{R_{ct}} \right) \times 100 \quad (7)$$

где су R_{ct}^0 и R_{ct} отпори преноса наелектрисања неинхибираних и инхибираних раствора.

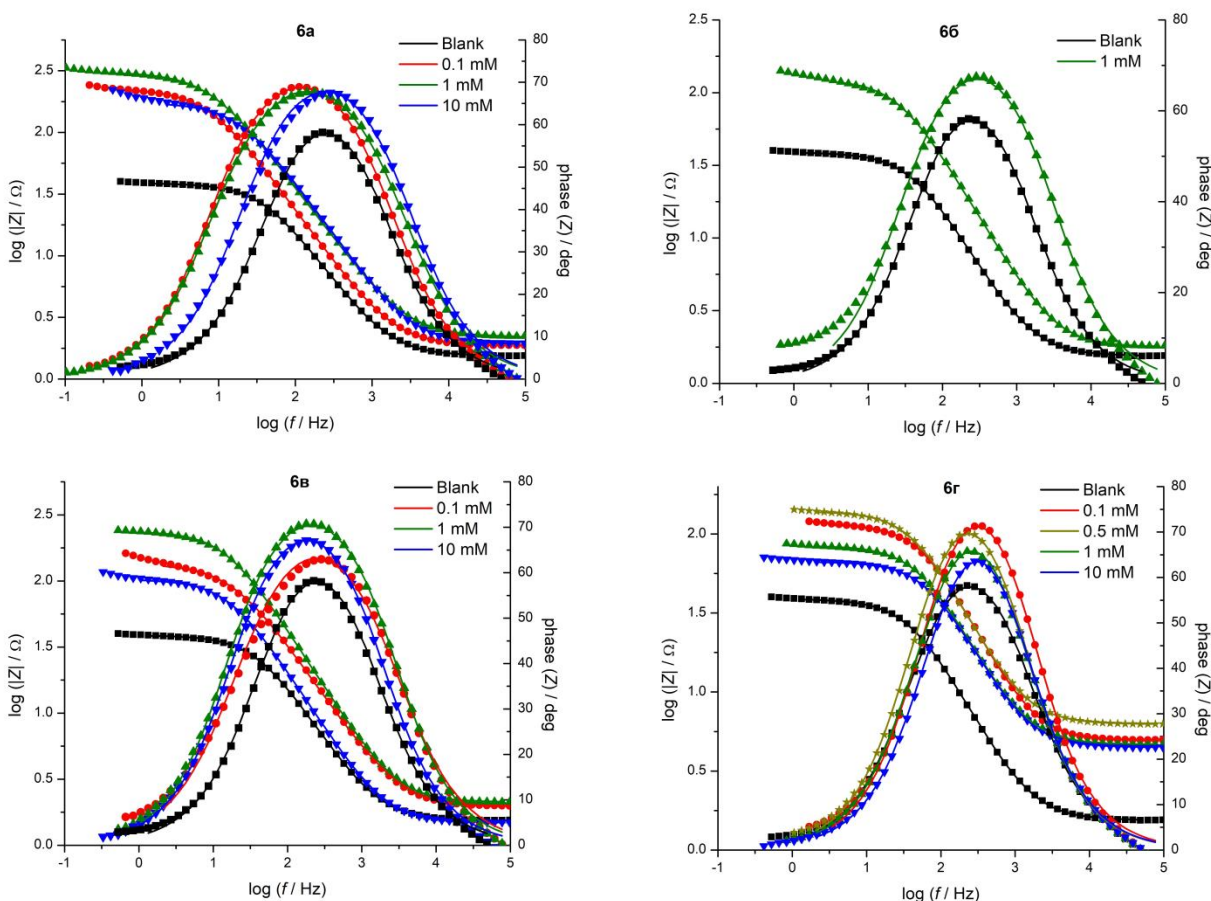
Резултати показују да R_{ct} има растући тренд, док C_{dl} има опадајући тренд на целом опсегу концентрације. Смањење вредности C_{dl} се може описати смањењем локалне диелектричне константе и, вероватније, повећању дебљине двојног електричног слоја. Ово наговештава да молекули испитиваних једињења инхибирају корозију адсорпцијом на метал-раствор интерфејсу.⁴⁷⁷ Концентрација инхибитора игра кључну улогу, али се не може рећи за све инхибиторе да се вредности R_{ct} повећавају са повећањем концентрације. Ова промена R_{ct} јасно показује повећање ефикасности инхибиције и може се приписати блокирању активних места на металној површини кроз процес адсорпције. Вредности капацитивности су смањене због смањења двојног електричног слоја, што је вероватно због замене молекула воде, који имају вишу диелектричну константу, што заузврат подржава идеју о површинској адсорпцији молекула инхибитора.⁴⁷⁶ R_s се односи на отпор раствора и његове вредности се приметно повећавају само у случају једињења **6г**.⁴⁶⁶

Табела 16. Параметри електрохемијске импедансе у одсуству и присуству инхибитора.⁴⁶⁶

Медијум	C_{inh} / mM	$R_s / \Omega \text{ cm}^2$	$R_{ct} / \Omega \text{ cm}^2$	$C_{dl} / \mu\text{F cm}^{-2}$	$\eta, \%$
слепа проба	0,5 М	2,86	82,3	987,2	-
6а	0,05	-	-	-	-
	0,1	2,31	433	38,2	81
	0,5	-	-	-	-
	1,0	2,64	343	49,4	76
	10,0	2,19	748	31,4	89
6б	0,05	-	-	-	-
	0,1	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-
	1,0	3,01	187	118,4	56
	10,0	-	-	-	-
6в	0,05	-	-	-	-
	0,1	2,75	329	47,6	75
	0,5	-	-	-	-
	1,0	2,87	633	34,8	87
	10,0	3,14	211	98,1	61
6г	0,05	-	-	-	-
	0,1	2,56	294	55,8	72
	0,5	3,26	317	51,2	74
	1,0	3,55	257	66,9	68
	10,0	2,98	305	76,5	63

Инхибитори су такође анализирани Бодевим (Bode) дијаграмима (Слика 44). Бодеве дијаграми свих концентрација инхибитора, као и нетретиране електроде од меког челика, показују фазно померање које одговара максимуму полукруга приказаног у Никвистовом дијаграму. Ово је типично понашање за процес приказан Рендлсовим

еквивалентим колом приказаним на Слици 43. Механизам инхибиције корозије је заснован на адсорпцији инхибитора на површини електроде.⁴⁶⁶



Слика 44. Бодеве дијаграми за электроду од меког челика и инхибиторе **6а-г** у различитим концентрацијама у односу на бланко $0,5 \text{ M HCl}$.⁴⁶⁶

2.4.3. Гравиметријска мерења

Метода мерења губитка масе је једна од најјефтинијих, најлакших и најшире прихваћених метода за рачунање степена корозије. Утицај различитих концентрација једињења **6в**, које је показало најбољу активност на основу електрохемијских мерења, на корозију меког челика у агресивном корозивном раствору је испитан методом губитка масе и добијени резултати ефикасности инхибиције и брзине корозије су приказани у Табели 17.⁴⁶⁶ Ефикасност инхибиције једињења **6в** се повећава са повећањем концентрације инхибитора, што се може објаснити бољом покривеношћу површине метала молекулима инхибитора. Из губитка масе, брзина корозије (CR) и ефикасност инхибиције ($\eta / \%$) су израчунати на основу једначина:^{472,478}

$$CR = \frac{w_I - w_F}{St} \tag{8}$$

где су w_I и w_F почетна и крајња маса (mg) меког челика, S / cm^2 је површина узорка меког челика изложена корозивном раствору и t / h је време потапања;

$$\eta = \left(\frac{CR_0 - CR}{CR_0} \right) 100 \quad (9)$$

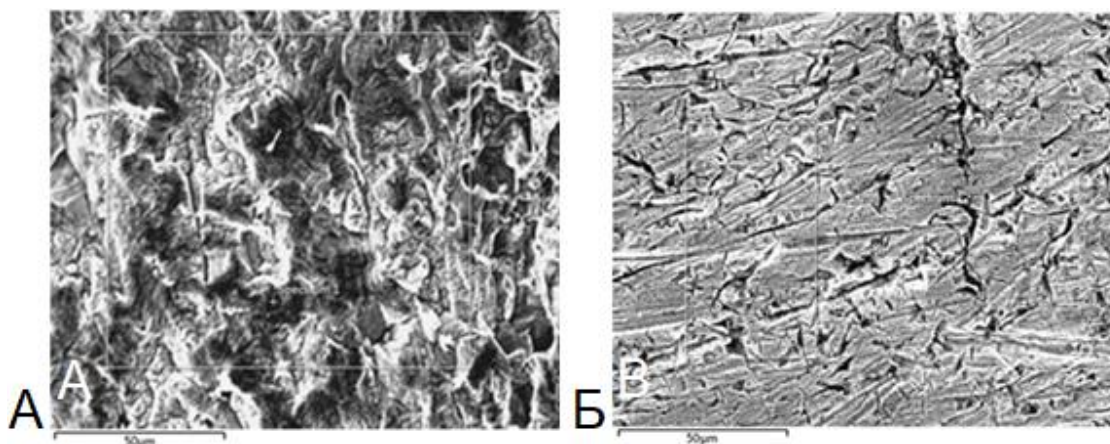
где су CR and CR_0 брзине корозије у присуству и одсуству једињења **бв** респективно.

Табела 17. Параметри корозије узорка меког челика после потапања од 24 h у 0,5 M раствору HCl у одсуству и присуству једињења **бв** при различитим концентрацијама.⁴⁶⁶

Медијум	c_{inh} / mM	$CR / \text{mg cm}^{-2} \text{h}^{-1}$	$\eta / \%$
слепа проба	0,5 M	0,659	-
бв	0,1	0,268	59
	1,0	0,075	89
	10,0	0,066	90

2.4.4. Испитивање морфологије и састава површине меког челика

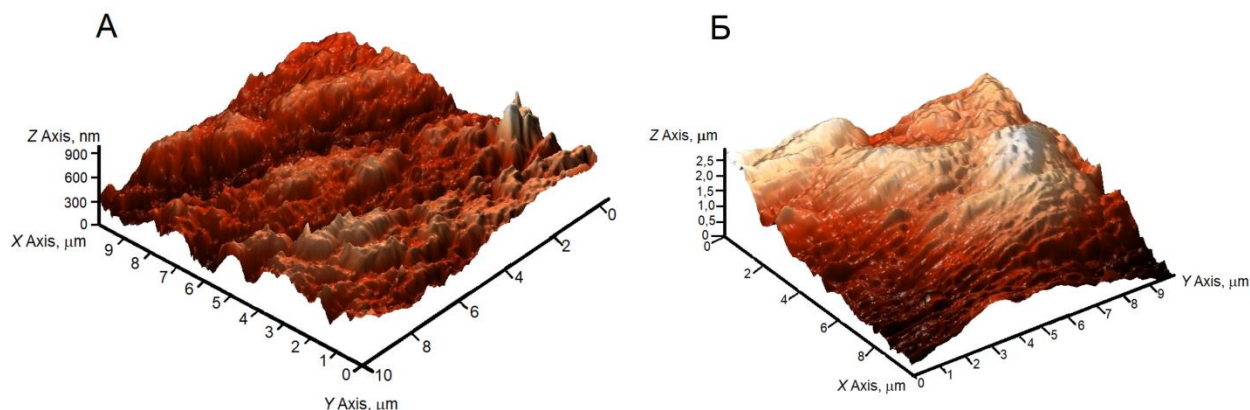
Корозија површине меког челика је окарактерисана после потапања у 0,5 M раствор HCl са и без присуства инхибитора **бв**, користећи SEM/EDS технику. SEM (Scanning Electron Microscopy) је употребљена за испитивање морфологије површине, док је EDS (Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy) коришћена за добијање података о елементарном саставу. На Слици 45 су приказане SEM слике неинхибираног и инхибираног узорка површине меког челика после потапања од 24 h у 0,5 M раствор HCl. Површина узорка меког челика директно изложена киселини без присуства инхибитора је веома оштећена и груба са дубоким корозионим пукотинама и процепима (Слика 45А), док је површина узорка потопљена у раствор киселине са једињењем **бв** концентрације 1 mM уједначенија, глађа и мање кородирана и попуцала (Слика 45Б). SEM површинска анализа се добро слаже са осталим резултатима евалуације корозије и показала је да једињење **бв** има добра својства инхибиције корозије и штити површину меког челика од штетног дејства киселине грађењем заштитног филма на површини метала.^{466,479}



Слика 45. SEM слике узорка меког челика без (А) и са инхибитором **бв** (Б).⁴⁶⁶

EDS анализа оба узорка меког челика (без и са инхибитором **6в**) је урађена ради одређивања елементарног састава. Узорак меког челика без инхибитора је имао високи садржај кисеоника (9,67%). Са друге стране, EDS анализа узорка са инхибитором **6в** је показала велики утицај његовог присуства на корозију узорка, пошто је садржај кисеоника смањен на само 0,12%, очигледно због грађења танког заштитног слоја инхибитора на површини меког челика. Овај заштитни слој је одговоран за инхибицију корозије.⁴⁸⁰

3D микрографи површине меког челика добијени помоћу AFM-a (Atomic Force Microscopy) без и са инхибитором **6в** су приказани на Слици 46. Површина челика после потапања у 0,5 М раствор HCl без инхибитора има просечну храпавост од 337 nm (Слика 46А). Треба нагласити да су параметри храпавости узорка заправо много већи, јер су врхови профила превазилазили мерни опсег и чак поломили иглу током мерења, тако да су делови површине где су висине мање и сама површина униформнија изабрани за анализу. На Слици 46Б се може видети површина меког челика после урањања у раствор са инхибитором **6в**, са просечном храпавошћу од 97,5 nm, означавајући добру адсорпцију на металној површини.⁴⁶⁶



Слика 46. AFM слике меког челика без (А) и са инхибитором **6в** (Б).⁴⁶⁶

2.5. Координациони потенцијал одабраних синтетисаних деривата 2-тиохидантоина

2-Тиюхидантоини поседују велики координациони потенцијал. Упркос малој величини самог молекула, он поседује четири супституциона положаја, што чини деривате 2-тиохидантоина врло атрактивним лигандима. Деривати 2-тиохидантоина поред хетероатома у прстену, као што су азот, кисеоник и сумпор, обично поседују и хетероатоме у бочним низовима, тако да су они врло погодни за координацију јона метала. Многи комплекси хидантоина и тиохидантоина су изучавани до сада.^{193,209,211,214,481} Њихови комплекси поседују одређене биолошке активности, пре свега цитотоксичност према одређеним ћелијама рака, што је врло значајно због потешкоћа у проналажењу нових, потенцијалних антитуморских агенаса.^{210,482,483}

2.5.1. Испитивање реакција цисплатине и аминокиселинских деривата 2-тиохидаптоина са сумпором у бочном низу

Цисплатина или *cis*-диаминодихлоридоплатина(II), $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$, је широко употребљаван лек ефикасан против неких типова рака (плућа, материце, цервикса, дојке, главе и врата, мезотелиоме, неуробластоме итд.).⁴⁸⁴ Негативни споредни ефекти током третмана (повраћање, резистентност, нефротоксичност, ототоксичност, неуротоксичност, кардиотоксичност итд.) ограничавају њену употребу. Ови негативни пропратни ефекти су инспирисали истраживаче у проналаску нових, ефикаснијих антитуморских агенаса са мањим недостацима. Један од новијих приступа у истраживањима овог типа је координација познатих антитуморских лекова са једињењима која су већ показала активност, у нади да ће се на тај начин побољшати цитотоксичност и селективност.

Циљ овог дела истраживања је био проучавање реакција два аминокиселинска деривата са сумпором у бочном низу, 3-алил-5-((метилтио)метил)-2-тиоксоимидазолидин-4-он (**Зж**) и 3-алил-5-((метилтио)етил)-2-тиоксоимидазолидин-4-он (**Зз**), са цисплатином. Реакције су праћене ¹H NMR спектроскопијом у DMSO-*d*₆. Испитивање кинетике и механизма ових реакција може потпомоћи будућем дизајну нових комплекса платине(II) у комбинацији са 2-тиохидаптоинима у циљу побољшања цитотоксичности и смањивању негативних споредних ефеката.

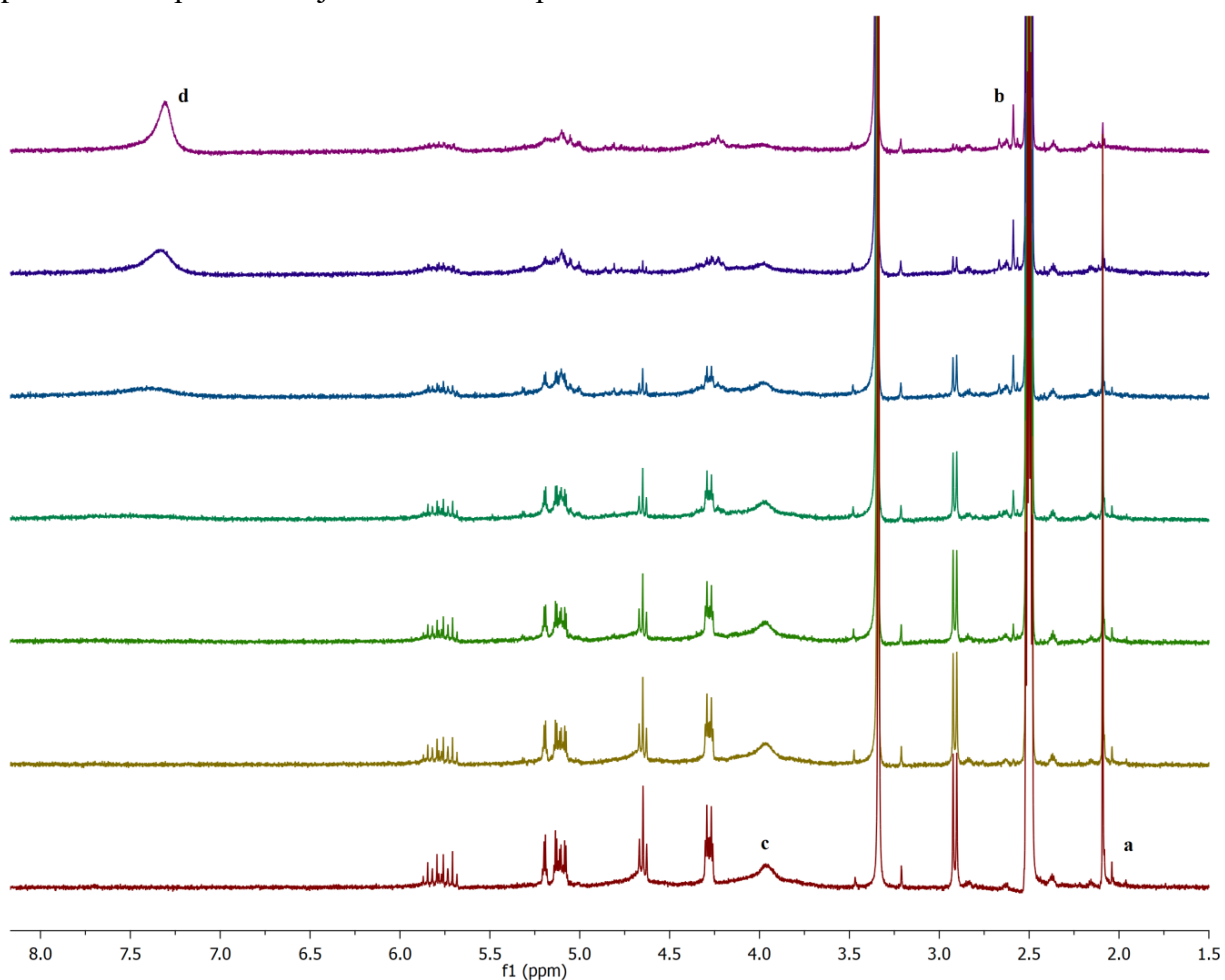
Механизам супституционих реакција између деривата 2-тиохидаптоина и цисплатине је испитан у временски зависном кинетичком експерименту ¹H NMR спектроскопијом на 22 °C у DMSO-*d*₆. Главна разлика између два наведена деривата 2-тиохидаптоина је управо у бочном низу аминокиселина из којих су добијени. Оба деривата имају велики афинитет према цисплатини, пошто садрже сумпор у структури и понашају се као меке базе према Pt(II).

2.5.1.1. ¹H NMR студија реакција деривата 2-тиохидаптоина Зж и Зз са цисплатином

Реакције тиохидаптоина **Зж**, **Зз** и цисплатине су испитиване у кинетичким ¹H NMR експериментима преко ноћи, а затим праћене снимањем спектра до завршетка реакције. При реакцији **Зж** са цисплатином, уочена су два пара синглета који се мењају током експеримента (Слика 47). Први пар синглета на 2,09 ppm (**a**) и 2,59 ppm (**b**) потиче од -S-CH₃ протона слободног и координованог 3-алил-5-((метилтио)метил)-2-тиоксоимидазолидин-4-она (**Зж**). Други пар синглета на 3,95 ppm (**c**) и 7,50 ppm (**d**) одговара -NH₃ сигналу цисплатине и слободног амонијака. Познато је да цисплатина има велики афинитет према диметилсулфоксиду (DMSO) и лако реагује са њим, градећи моносупституисани $[PtCl(NH_3)_2(dmsO)]^+$ и дисупституисани $[Pt(NH_3)_2(dmsO)_2]^{2+}$ комплекс.⁴⁸⁵ Координација са првим молекулом DMSO се одвија преко сумпора и одвија се толико брзо да се при концентрацији цисплатине од 1 mg mL⁻¹ (пет пута мањој од оне коришћене у овом истраживању) реакција завршава у потпуности после сат времена.⁴⁸⁵ Моносупституисани $[PtCl(NH_3)_2(dmsO)]^+$ даље лако реагује са другим молекулом DMSO, градећи $[Pt(NH_3)_2(dmsO)_2]^{2+}$. Узимајући ово у обзир, закључује се да проширени синглет на 3,95 ppm (**c**) потиче од -NH₃ лиганата моносупституисаног $[PtCl(NH_3)_2(dmsO-d_6)]^+$, а не цисплатине и та реакција је довољно брза да се може сматрати да је сва цисплатина преведена у моносупституисани DMSO-*d*₆ дериват пре него што је реакција са **Зж** и **Зз** почела.

Присуство првог пара синглета (**a**) и (**b**) у спектрима указује на то да се координација Pt(II) одвија преко сумпора из бочног низа. Током експеримента интензитет синглета на 2,09

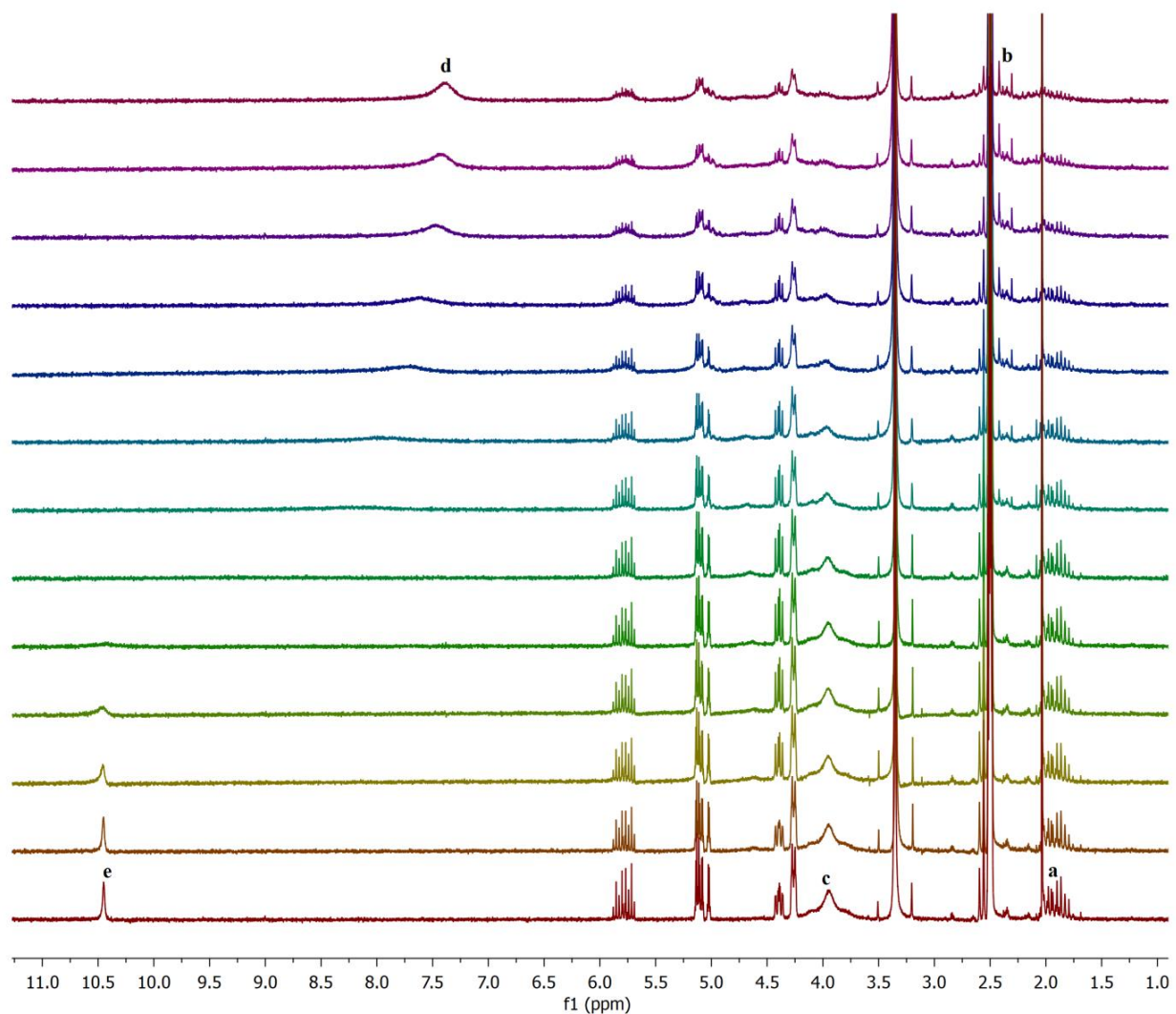
ppm слободног **3ж** се смањује, а интензитет синглета координованог **3ж** на 2,59 ppm се повећава. Интензитет проширеног синглета $-\text{NH}_3$ лиганда моносупституисаног $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ на 3,95 ppm се смањује током експеримента, док се после пар сати појављује нови проширени синглет на 7,50 ppm који потиче од слободног амонијака. Ослобађање амонијака указује на координацију $\text{DMSO}-d_6$ у каснијим корацима реакције. У последњем спектру постављеног експеримента су од сигнала нових врста били доминантни синглет координованог **3ж** на 2,59 ppm и проширени синглет слободног амонијака на 7,50 ppm и после три дана није било даљих промена.



Слика 47. ^1H NMR спектри реакције тиохидантоина **3ж** и цисплатине (**a** је сигнал $S\text{-Me}$ групе слободног **3ж**, **b** је сигнал $S\text{-Me}$ групе координованог **3ж**, **c** је сигнал NH_3 група $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO})]^+$ и **d** је сигнал слободног NH_3).

У спектрима реакције тиохидантоина **3з** са цисплатином (Слика 48), слично као са **3ж** се уочавају два пара синглета: (**a**) синглет $-\text{S}-\text{CH}_3$ групе слободног тиохидантоина **3з** на 2,03 ppm и (**b**) синглет $-\text{S}-\text{CH}_3$ групе координованог тиохидантоина **3з** на 2,30 ppm; (**c**) широки синглет $-\text{NH}_3$ лиганда моносупституисаног $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ на 3,95 ppm и (**d**) проширени синглет слободног амонијака на 7,50 ppm. Интензитет синглета слободног тиохидантоина на 2,03 ppm опада, док интензитет синглета координованог тиохидантоина **3з** на 2,30 ppm расте. Такође, интензитет проширеног синглета моносупституисаног

$[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dms}\text{-}d_6)]^+$ на 3,95 ppm опада, док се у спектрима појављује нови проширени синглет слободног амонијака на 7,50 ppm. У последњем спектру кинетичког експеримента су од сигнала нових врста били доминантни синглет координованог **3з** на 2,30 ppm и проширени синглет слободног амонијака на 7,50 ppm и после недељу дана није било даљих промена. За разлику од реакције са **3ж**, у реакцији цисплатине са **3з** се може уочити и проширени синглет NH групе слободног **3з** на 10,49 ppm (**e**), чији интензитет слаби током експеримента и после нешто мање од два сата нестаје потпуно. Нестајање овог сигнала указује на депротоновање NH групе тиохидантоина и његово координовање за јон платине преко тог азота. Недостатак овог сигнала у реакцији цисплатине са **3ж** се може објаснити очигледном разликом у брзини реакција, јер је реакција са **3ж** значајно бржа, а самим тим и депротоновање.

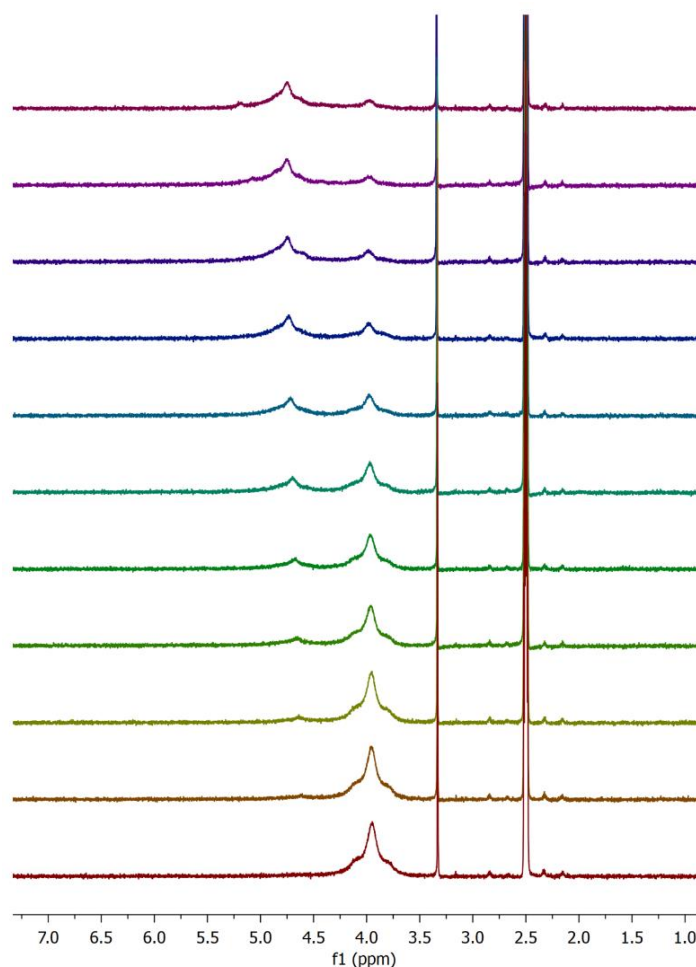


Слика 48. ^1H NMR спектри реакције тиохидантоина **3з** и цисплатине (**a** је сигнал S-Ме групе слободног **3з**, **b** је сигнал S-Ме групе координованог **3з**, **c** је сигнал NH_3 групе $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dms}\text{-}d_6)]^+$, **d** је сигнал слободног NH_3 и **e** је сигнал NH групе слободног **3з**).

Додатно, недостатак овог сигнала у спектрима реакције са **3ж** може указати на вишестепеност реакције цисплатине са **3з**, што је подржано чињеницом да се синглет $-S-CH_3$ групе координаног тиохидантоина **3з** не може уочити пре нестанка проширеног синглета NH групе слободног **3з**. Очигледно је да се у овом случају координација за сумпор из бочног низа не одвија пре депротонавања NH групе и координације за азот.

Као што је већ раније напоменуто, познато је да цисплатина реагује са DMSO,⁴⁸⁵ што поставља питање конкурентности DMSO као лиганда и испитиваних тиохидантоина, као и његов утицај на ток и кинетику њихових реакција са цисплатином. Диметилсулфоксид је широко коришћен органски растварач, нарочито у истраживањима рака и биолошкој хемији, због своје ниске токсичности, способности растварања великог броја једињења и могућности мешања са водом.⁴⁸⁶ DMSO има велики афинитет према Pt(II) као мека база. Показано је да цисплатина подлеже солволизацији и реагује са DMSO у његовом чистом облику, као и у његовој смеси са водом.⁴⁸⁷ Испитивани тиохидантоини и цисплатина се заједно могу растворити само у DMSO, па је било неопходно извести реакције у овом растварачу.

Да би се описао утицај DMSO на реакције цисплатине са тиохидантоинима **3ж** и **3з**, извршен је контролни кинетички експеримент, где је праћена реакција цисплатине и DMSO- d_6 без њиховог присуства (Слика 49).



Слика 49. 1H NMR спектри реакције цисплатине са DMSO- d_6 .

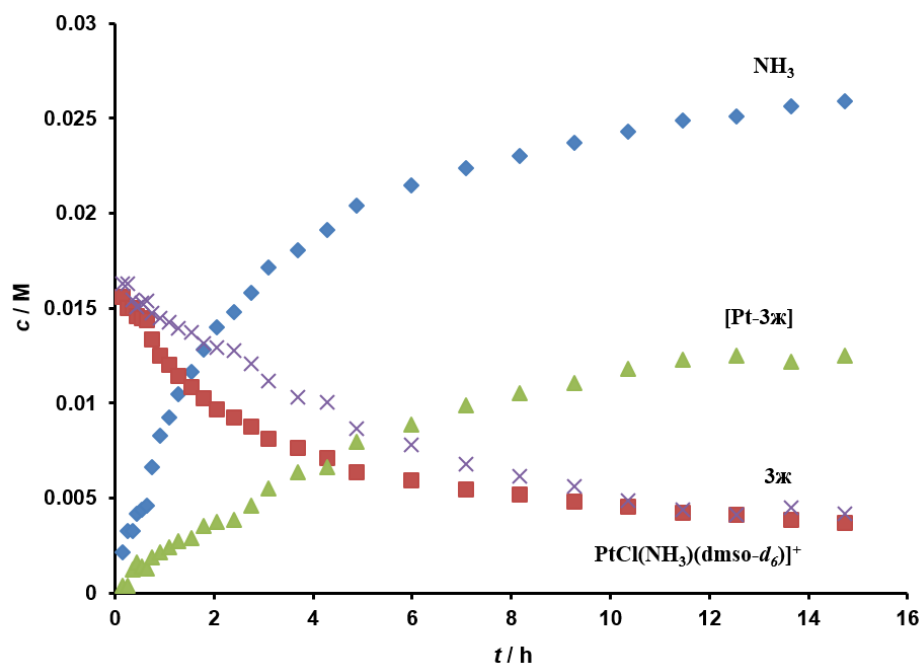
Током експеримента се може приметити промена два сигнала. Интензитет проширеног синглета $-\text{NH}_3$ лиганата моносупституисаног $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ на 3,95 ppm опада током експеримента, док интензитет проширеног синглета $-\text{NH}_3$ лиганата дисупституисаног $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO})_2]^{2+}$ на око 4,8 ppm расте.

Пошто се у спектрима реакција цисплатине са **Зж** и **Зз** не уочава као доминантан сигнал Pt-DMSO- d_6 адукта на око 4,8 ppm при крају реакције, може се сматрати да Pt-DMSO- d_6 адукт није један од коначних производа, као и сама чињеница да се у реакцијама цисплатине са **Зж** и **Зз** ослобађа амонијак (што се не дешава у одсуству тиохидантоина). Ова споредна реакција цисплатине и DMSO- d_6 , додуше, свакако чини систем комплекснијим и ствара конкуренцију између њених DMSO- d_6 адукта при реакцији са **Зж** и **Зз**. У спектрима реакције цисплатине са **Зж** се не уочава проширени синглет DMSO- d_6 адукта на 4,7-4,8 ppm, док се у реакцији са **Зз** може уочити његово настајање са врло slabим интензитетом, али и он нестаје како реакција иде својим током. Очигледна разлика у брзини реакција цисплатине са **Зж** и **Зз** може описати ову разлику у појави сигнала DMSO- d_6 адукта. Такође, разлика у појави сигнала DMSO- d_6 адукта додатно указује на могућност да **Зж** и **Зз** различито реагују, где би реакција са **Зз** обухватала додатан корак у односу на реакцију са **Зж**, као што је претходно претпостављено.

2.5.1.2. Одређивање механизма реакција деривата тиохидантоина **Зж** и **Зз** са цисплатином на основу концентрације реактаната и потенцијалних производа

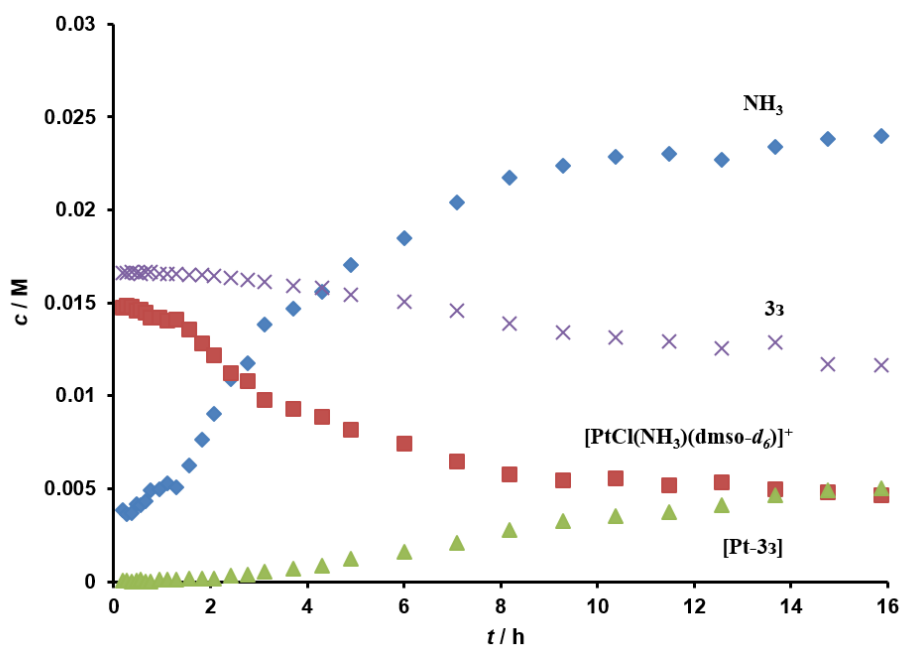
Резултати анализе ^1H NMR спектра указују на реакцију $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ са дериватима тиохидантоина **Зж** и **Зз**, али не дају јасан увид у сам механизам ових реакција. С тим циљем, анализирани су промене количине $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$, тиохидантоина **Зж** и **Зз**, насталих **Зж** и **Зз** платинских комплекса (означени као $[\text{Pt}-\text{Зж}]$ и $[\text{Pt}-\text{Зз}]$), и слободног амонијака (NH_3) током времена. Графици промена концентрација наведених компоненти са временом су дати на Сликама 50 и 51. Промене количине слободног и координованог **Зж** су изведене из промене интензитета сигнала на 2,09 ppm и 2,59 ppm, а количине $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ и слободног амонијака су изведене из сигнала на 3,95 и 7,50 ppm.

Почетне концентрације $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ и **Зж** су исте (око 0,015 М), јер су ове две компоненте помешане у молском односу 1:1. Након 15 h реакције (Слика 50), њихове концентрације су такође исте (око 0,004 М), указујући да су количине изреагованог **Зж** и $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ исте, односно да настаје моноклеарни комплекс платине са бидентатно везаним **Зж**. Узимајући у обзир промене концентрација реактаната и насталог комплекса (означен на графику као $[\text{Pt}-\text{Зж}]$ комплекс), закључујемо да $[\text{Pt}-\text{Зж}]$ комплекс настаје у молском односу 1:1 у односу на $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ или **Зж**. На основу ^1H NMR анализе, познато је да овај комплекс има **Зж**, који се везује за платину преко S атома цистеинског остатка. Количина ослобођеног амонијака је дупло већа (односно промена концентрације) од количине насталог $[\text{Pt}-\text{Зж}]$ комплекса. На основу овога се може закључити да везивање **Зж** потпуно истискује амонијак из $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$. Поред тога, треба узети у обзир да DMSO- d_6 може да реагује са $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$, што додатно компликује слику о механизму реакције.



Слика 50. Промена количина реактанта и потенцијалних производа реакције 3ж са цисплатином у $\text{DMSO-}d_6$ као растварачу.

Механизам реакције 3з са $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dms0-}d_6)]^+$ је сложенији када се посматрају промене концентрација реактанта и производа реакције (Слика 51). Промене концентрација реактанта се смањују током времена, али не у истој количини.

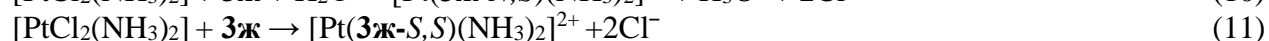
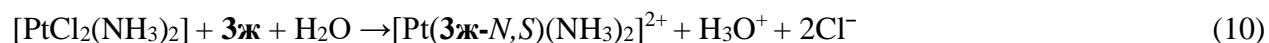


Слика 51. Промена количина реактанта и потенцијалних производа реакције 3з са цисплатином у $\text{DMSO-}d_6$ као растварачу.

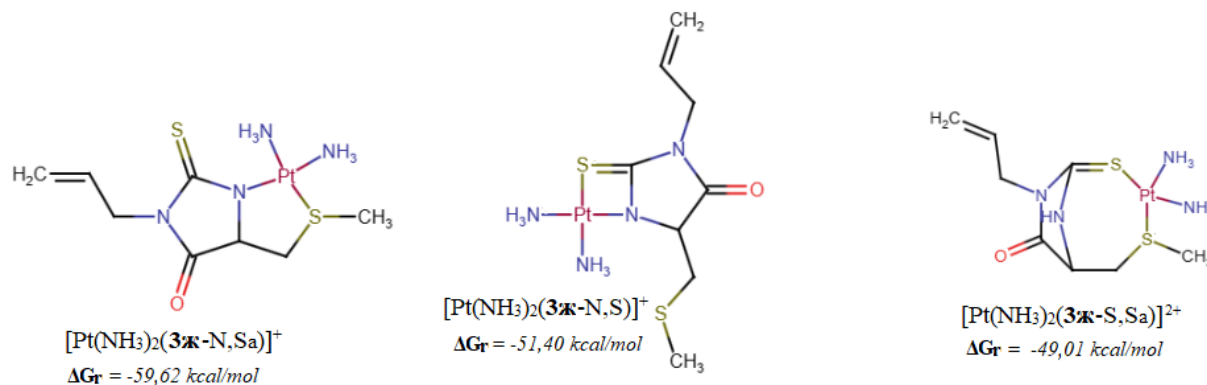
Наиме, концентрација **3ж** се смањи током реакције за 0,005 М, док $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsod}_6)]^+$ за 0,010 М. Ово указује да долази до настанка динуклеарног комплекса платине у реакцији са **3ж**, на шта указује и промена концентрације насталог $[\text{Pt}-\mathbf{3ж}]$ комплекса, која износи око 0,005 М. Концентрација ослобођеног амонијака износи око 0,0250 М, и ако се узму у обзир промене концентрација реактаната, може се закључити да током реакције долази до отпуштања пет молекула амонијака, насталих супституцијом пет амминских лиганда, по једном молекулу $[\text{Pt}-\mathbf{3ж}]$ комплекса.

2.5.1.3. Рачунање промене Гибсове слободне енергије реакције цисплатине са тиохидантоином **3ж**

Да би се утврдило који је начин координовања тиохидантоина **3ж** за платину кинетички фаворизован, урађени су квантно-механички прорачуни за процену промене Гибсове слободне енергије реакције 10 и 11. У реакцији цисплатине са тиохидантоином **3ж** могу настати три комплекса као производи, који се разликују у начину координовања тиохидантоина за Pt(II) јон (Слика 52). Реакциона једначина 10 се користи за реакцију приликом које долази до координације тиохидантоина **3ж** преко азотовог атома прстена. У овом случају се молекул воде користи као акцептор протона са азотовог атома. Када се координација врши преко атома сумпора, користи се једначина 11.



Прорачуни показују да је најспонтанија реакција (најнегативнија вредност $\Delta_r G$) у којој се **3ж** бидентатно координује за Pt(II) јон преко тиохидантоинског N атома и цистеинског S_a атома (настаје $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\mathbf{3ж}-N,S_a)]^+$ комплекс, Слика 52). Нешто мање спонтано је координовање за Pt(II) јон преко тиохидантоинског N атома и тиокарбонилног S атома (настаје $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\mathbf{3ж}-N,S)]^+$ комплекс, Слика 52). Најмање спонтано (најмање негативна вредност $\Delta_r G$) је координовање преко наведена два S атома (настаје $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\mathbf{3ж}-S,S_a)]^{2+}$ комплекс, Слика 52).



Слика 52. Структуре могућих комплекса платине насталих у реакцији тиохидантоина **3ж** са цисплатином, у DMSO као растварачу.

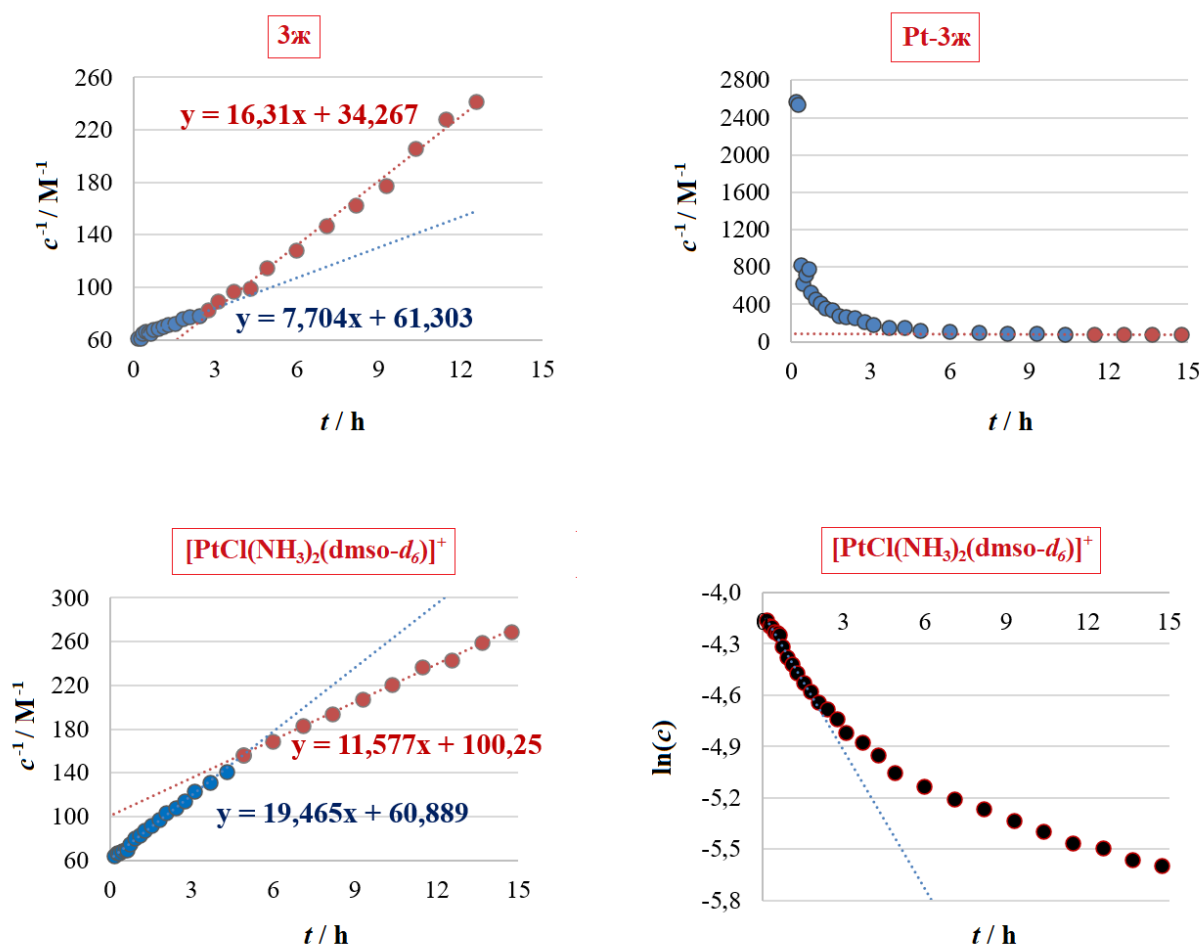
2.5.1.4. Одређивање механизма реакције тиохидантоина **Зж** и **Зз** са цисплатином на основу реда реакције

Графици промене концентрације у зависности од времена (Слике 50 и 51) дају увиде о могућим производима реакције испитиваних тиохидантоина са цисплатином, али не и детаље о самим механизмима реакција. Да би се дошло до ових података, анализирани су графици зависности реципрочне вредности концентрације ($1/c$) од времена, који се користе као модели за реакције другог реда. Заправо, реакције тиохидантоина са цисплатином би требало да одговарају реакцијама другог реда.

На основу графика за промену концентрације тиохидантоина **Зж**, јасно је да ово није реакција другог реда, као што се очекује, него се јављају два линеарна правца (Слика 53), односно, реакција тиохидантоина **Зж** се може описати у две фазе. Ово указује на чињеницу да су у питању сложене реакције. На почетку, реакција **Зж** и $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ има правац, којем одговара следећа једначина праве: $y = 7,704x + 61,303$. На 2,5 h долази до преломне тачке реакције, након чега реакција **Зж** убрзава, на шта указује и коефицијент k у једначини праве ($y = 16,31x + 34,267$), којом је дефинисан правац друге фазе реакције ($k_2 = 16,31$), који је значајно већи од коефицијента k за прву фазу реакције ($k_1 = 7,704$). Ово говори да је дошло до промена у реакционом систему, односно до стварања хемијске врсте, чија је концентрација значајна тек после 2,5 h. Једна од могућности је да је настао дисупституисани платински комплекс у реакцији $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ са $\text{DMSO}-d_6$, као растварачем, који замењује хлоридо лиганд, $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)_2]^+$. Друга могућност је реакција **Зж** са комплексом насталим у његовој реакцији са цисплатином. На основу ^1H NMR спектра се закључује да се од почетка реакције примећује депротоновање тиохидантоинског прстена, као и промене у положајима S-CH₃ протона, услед координовања сумпора за платина(II) јон. Очигледно је да долази до бидентатног координовања тиохидантоина **Зж**, и да овај лиганд измеђује два хлоридо лиганда, те новонастали комплекс има следећу формулу: $[\text{Pt}(\text{Зж})(\text{NH}_3)_2]^+$. Како се тачна структура комплекса насталог реакцијом тиохидантоина **Зж** и $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ за сада не зна, овај комплекс је симболички означен као $[\text{Pt}-\text{Зж}]$. Праћењем његовог графика (Слика 53, горе десно), уочава се нагли пад у области до 2,5 h, затим се график асимптотски приближава x-оси. Међутим, од 11 h график је линеаран и паралелан са x-осом, указујући да нема промена у количини насталог $[\text{Pt}-\text{Зж}]$ комплекса, али и на могућност промене структуре $[\text{Pt}-\text{Зж}]$ услед реакције са растварачем, односно са $\text{DMSO}-d_6$.

Ако се посматра график за $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ (Слика 53, доле лево), примећују се такође две фазе, као и у случају тиохидантоина **Зж**. Прва фаза, која је бржа и траје око 5 h, одговара правцу који се може описати једначином праве $y = 19,465x + 60,889$. Ако би $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ реаговао само са **Зж**, коефицијент правца (k_1) би требао да износи 7,704, јер су $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ и **Зж** помешани у молском односу 1:1. Међутим, коефицијент правца за прву фазу реакције $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ је значајно већи, и износи $k_1 = 19,465$. Ово указује на паралелну реакцију $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$, која је бржа од реакције са **Зж**. Претпоставља се да у овој фази $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ реагује са растварачем, при чему настаје $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)_2]^+$. Да би се ово потврдило, анализиран је график зависности логаритма промене концентрације ($\ln(c)$) од времена за $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ (Слика 53, доле десно), који се користи за препознавање реакција првог реда. На графику се може јасно уочити да постоји линеарана промена до 5 h, након чега долази до одступања тачака од линеарности. Све ово указује на чињеницу да се у првој фази примарно дешава реакција, која има особине реакција првог и другог реда. То значи да

се у првој фази примарно дешава реакција *псеудо*-првог реда, односно реакција са растварачем. Сада је јаснија промена на графику за тиохидантоин **Зж**. Наиме, **Зж** брже реагује са $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)_2]^+$, него са $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$. То је разлог зашто је друга фаза на $(1/c)$ графику за $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ спорија. Наиме, паралелно се дешавају две конкурентне реакције, које троше **Зж**, а потрошња $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ је мања него у првој фази, јер **Зж** има већи афинитет за реакцију са $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)_2]^+$. Преферентна реакција даје $[\text{Pt}(\text{Зж})(\text{dmsO}-d_6)_2]^+$ комплекс као производ. Међутим, ако се узме у обзир $(1/c)$ график за $[\text{Pt}-\text{Зж}]$ комплекс, односно претпоставка да после 11 h долази до реакције насталог комплекса са $\text{DMSO}-d_6$, јасно је да ће нови $\text{DMSO}-d_6$ лиганд изменити аммински лиганд. То значи да ће се у укупној реакцији **Зж** са $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ ослободити два молекула амонијака, и да ће настати $[\text{Pt}(\text{Зж})(\text{dmsO}-d_6)_2]^+$. Како је претходно већ констатовано да у реакцији **Зж** и цисплатине настаје duplo већа количина амонијака од $[\text{Pt}-\text{Зж}]$ комплекса (Слика 54), може се слободно закључити да је $[\text{Pt}(\text{Зж})(\text{dmsO}-d_6)_2]^+$ комплекс крајњи производ реакције.

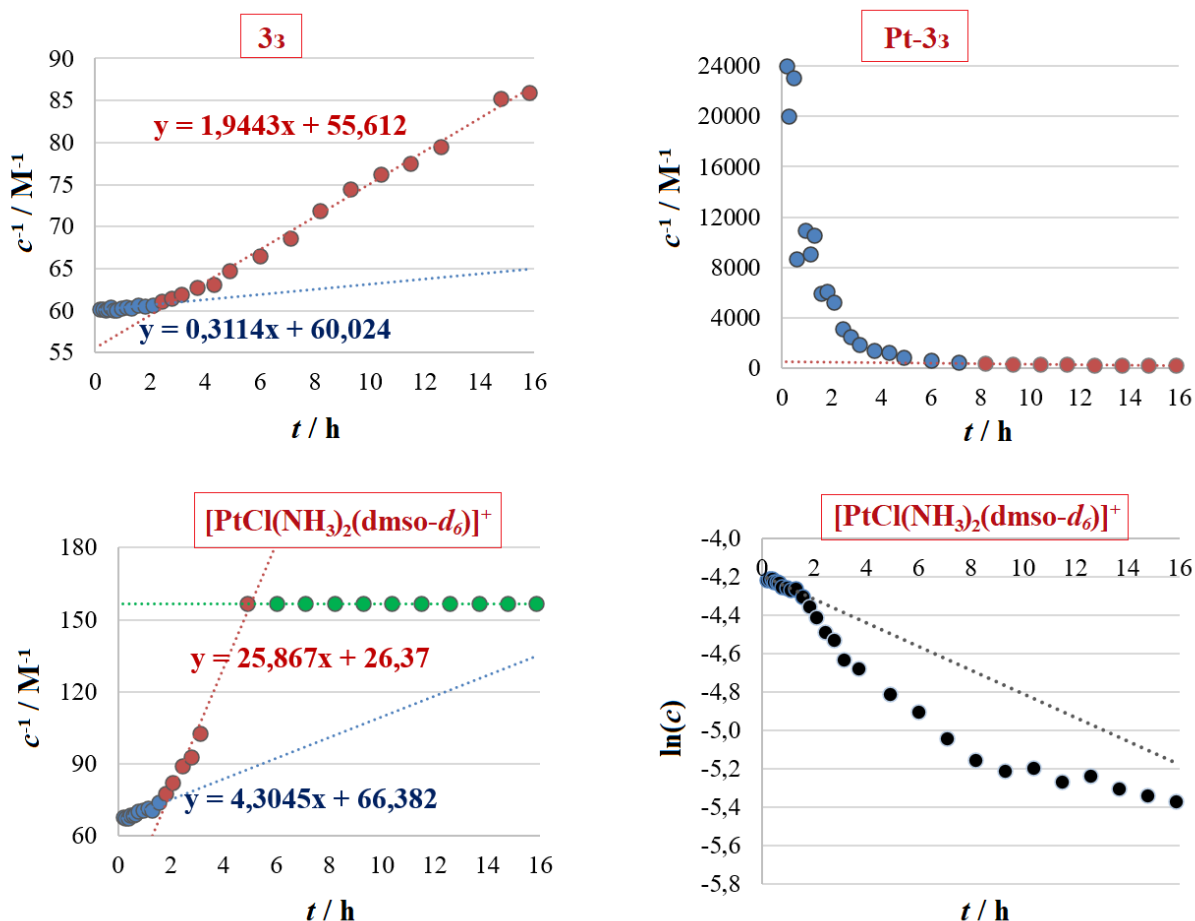


Слика 53. Графици првог и другог реда реакције тиохидантоина **Зж** са цисплатином у $\text{DMSO}-d_6$ као растварачу.

Механизам реакције тиохидантоина **Зж** са цисплатином у $\text{DMSO}-d_6$ као растварачу је значајно сложенији, у поређењу са механизмом за тиохидантоин **Зж**. Графици за процену

реда реакције су приказани на Слици 54. Промена реципрочне вредности концентрације **Зз** има две фазе у којима промена има линеаран карактер. У прва два сата реакције се промена може описати са једначином праве $y = 0,3114x + 60,024$. Коefицијент правца за ову фазу доста је нижи ($k_1 = 0,3114$) него код прве фазе за **Зж** ($k_1 = 7,704$), на основу чега се може закључити да **Зж** реагује значајно брже са $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ комплексом (око 25 пута). Како се у првим $^1\text{H NMR}$ спектрима (прва два сата) не јавља сигнал од координоване S-CH₃ групе, него сигнал који упућује на депротоновање N атома тиохидантоинског прстена, може се претпоставити да се **Зз** координује преко N и S атома тиохидантоинског прстена за Pt из $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ комплекса, замењујући један хлоридо и један аммински лиганд. То је разлог зашто **Зз** реагује спорије од **Зж**. За разлику од прве фазе **Зж**, код тиохидантоина **Зз** у координовању не учествује S атом метионинског супституента. Метионински супституент је дужи за једну метиленску групу од цистеинског супституента тиохидантоина **Зж**, што му повећава број ротабилних веза, а самим тим и даје већу конформациону слободу. Бидентатно координовање преко S атома супституента и N атома тиохидантоинског прстена је неповољније ентропијски за **Зз**, јер је координовањем метионинског S атома већи губитак степена слободе овог супституента него при координовању цистеинског S атома. Поред тога, настанак петочланог хелатног прстена приликом бидентатног координовања **Зж** преко метионинског S атома и N атома тиохидантоинског прстена је кинетички повољније од настанка шесточланог прстена координовањем **Зз** преко N атома тиохидантоинског прстена и S атома бочног низа. У другој фази, код које се промена $1/c$ параметра може описати једначином праве $y = 1,9443x + 55,612$ и почиње од 2,4 h, брзина реакције **Зз** се повећава око 6 пута ($k_2 = 1,944$). Очигледно је да **Зз** значајно брже реагује са комплексом платине који садржи два координована DMSO-*d*₆ лиганда, $([\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)_2]^{2+})$, и највероватније настаје у првој фази реакције. Повећана реактивност се може објаснити већим афинитетом платине за везивање нуклеофила. Наиме, координовањем другог молекула DMSO-*d*₆, истискује се хлоридо лиганд, што за последицу има повећање наелектрисања комплекса (прелаз из +1 у +2), односно повећање парцијално позитивног наелектрисања платине. У овом случају долази до координовања **Зз** преко метионинског S атома, што се може потврдити појавом сигнала од координоване S-CH₃ групе у $^1\text{H NMR}$ спектру (Слика 48), који се јавља после 2,1 h од почетка реакције. Након везивања метионинског S атома за $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)_2]^{2+}$ комплекс, уз отпуштање једног молекула амонијака, настали $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(\text{dmsO}-d_6)_2(\text{Зз}-\text{S}_a)]^{2+}$ комплекс реагује са другим $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)_2]^{2+}$, при чему долази до бидентатног везивања **Зз** преко S и N атома тиохидантоинског прстена, што је праћено отпуштањем два молекула амонијака и настанком бинуклеарног комплекса. У овом комплексу (означеном као $[\text{Pt}-\text{Зз}]$), тиохидантоин **Зз** има улогу мостног лиганда. Промена $1/c$ параметра за настали $[\text{Pt}-\text{Зз}]$ комплекс има облик асимптоте до неких 8 h, након чега следи интервал линеарне промене (Слика 38). У линеарном делу, права је паралелна са x-осом, указујући на реакцију *псеудо*-првог реда, односно реакцију насталог бинуклеарног комплекса са DMSO-*d*₆. Координовање новог молекула DMSO се дешава на платинском центру за који је координован метионински S атом, уз супституцију амминског лиганда и настанак бинуклеарног $[\{\text{Pt}(\text{dmsO}-d_6)_2\}(\text{Зз})\{\text{Pt}(\text{dmsO}-d_6)_3\}]$ комплекса. Када се анализира график другог реда за $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ комплекс (Слика 54), примећујемо три фазе његовог реакционог тока. Прва фаза се може описати једначином праве $y = 4,3045x + 66,382$, која јасно указује да овај комплекс има значајно већи коefицијент правца ($k_1 = 4,3045$) од коefицијента правца за прву фазу реакције тиохидантоина **Зз** ($k_1 = 0,3114$). Како су помешани у молском односу 1:1, требало би и овде очекивати да ће им коefицијенти бити слични. Међутим, четрнаест пута већи k_1 коefицијент за $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ комплекс,

указује на реакцију са другом врстом, што је у овом случају DMSO- d_6 . То се може потврдити и графиком зависности логаритма концентрације од времена за $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ комплекс, који има линеарну промену у интервалу који одговара првој фази, што указује на реакцију *псеудо*-првог реда, односно реакцију $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ са DMSO- d_6 .



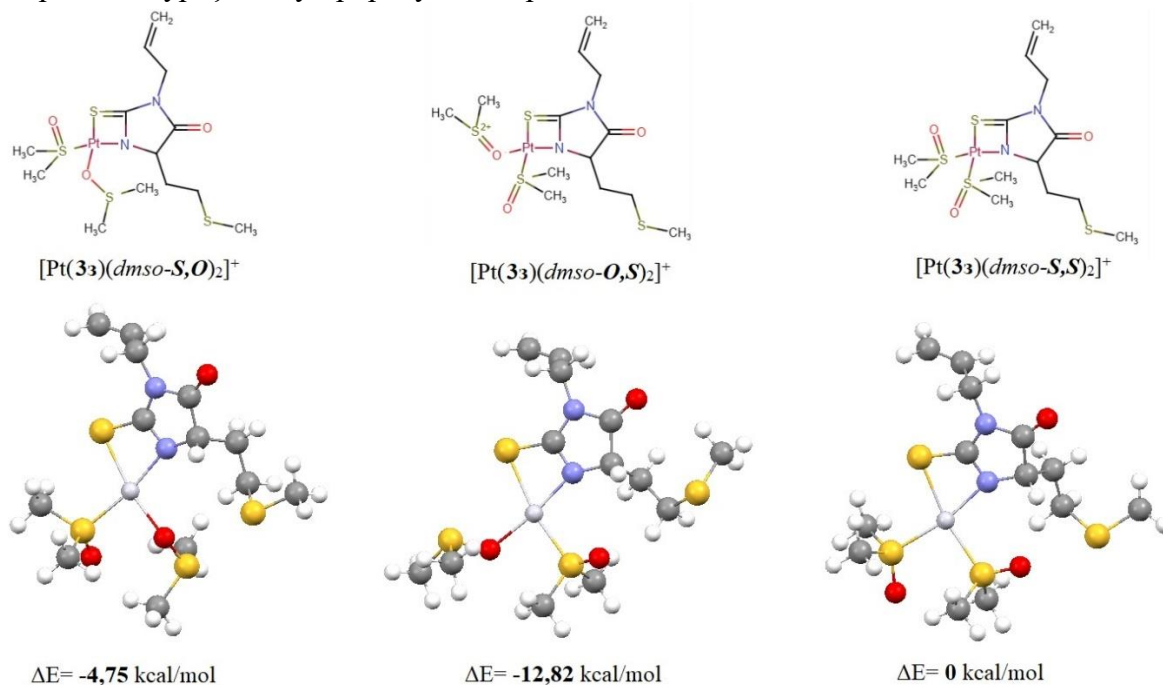
Слика 54. Графици првог и другог реда реакције тиохидантоина **3z** са цисплатином, у DMSO- d_6 као растварачу.

У процесу настанка бинуклеарног комплекса ослобађа се 4 од укупних 5 молекула амонијака (посматрано од почетне реакције два DMSO- d_6 са цисплатином, а затим и реакције ових комплекса са тиохидантоином **3z**). Извор петог молекула амонијака можемо тражити у првој фази реакције **3z**. Наиме, рекли смо да **3z** шест пута брже реагује у другој фази, када он реагује са $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)_2]^{2+}$ него са $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ комплексом. Сходно томе, количина насталог комплекса у реакцији **3z** са $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)]^+$ комплексом је око 6 пута мања. Међутим, настали комплекс ($[\text{Pt}(\mathbf{3z}-\text{N},\text{S})(\text{NH}_3)(\text{dmsO}-d_6)]^+$) такође може да реагује са $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dmsO}-d_6)_2]^{2+}$, градећи бинуклеарни $[\{\text{Pt}(\text{NH}_3)(\text{dmsO}-d_6)\}(\mathbf{3z})\{\text{Pt}(\text{NH}_3)(\text{dmsO}-d_6)_2\}]$ комплекс са **3z** као мостним лигандом. Претпоставља се да ће и овај комплекс даље реаговати са растварачем, у поменутом периоду од 8 h, па ће настати $[\{\text{Pt}(\text{dmsO}-d_6)_2\}(\mathbf{3z})\{\text{Pt}(\text{dmsO}-d_6)_3\}]$ комплекс. И у овом случају долази до ослобађања четири молекула амонијака, што би значило да ће настати укупно осам молекула амонијака. Како се укупно ослободи пет молекула амонијака, јасно је да је количина насталог $[\{\text{Pt}(\text{dmsO}-$

$d_6)_2\}(\mathbf{3z})\{\text{Pt}(\text{dms}\text{-}d_6)_3\}$ комплекса по другој реакцији четири пута мања. Иако је у другој реакцији прва фаза шест пута спорија, очигледно је да његова друга фаза (реакција са $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dms}\text{-}d_6)_2]^{2+}$) бржа од друге фазе прве реакције, која започиње реакцијом $\mathbf{3z}$ са једним $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dms}\text{-}d_6)_2]^{2+}$, а затим са још једним $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dms}\text{-}d_6)_2]^{2+}$ (друга фаза).

2.5.1.5. Рачунање енергије стабилности за координовање DMSO у комплексу насталом у реакцији цисплатине са тиохидантоином $\mathbf{3z}$

Да би се утврдило који начин координовања два DMSO лиганда је термодинамички фаворизован, у комплексу насталом у реакцији тиохидантоина $\mathbf{3z}$ са цисплатином, у DMSO као растварачу, урађени су квантно-механички прорачуни за процену енергије стабилизације, ΔE , за три могућа мононуклеарна комплекса платине, код којих је тиохидантоин $\mathbf{3z}$ координован хелатно, преко азотовог атома прстена и тиокарбонилног атома сумпора (Слика 55). Хипотетички, мононуклеарни комплекс са једним DMSO лигандом и хелатно координованим тиохидантоином, настаје у првој фази реакције. Да би се утврдило који је начин координовања другог DMSO лиганда термодинамички фаворизован, урађени су прорачуни на три модел система.



Слика 55. Структуре могућих комплекса насталих у реакцији тиохидантоина $\mathbf{3z}$ са цисплатином, у DMSO као растварачу.

Прорачунима је показано да су код најнестабилнијег изомера ($\Delta E = 0$), поред N,S -координованог тиохидантоина $\mathbf{3z}$, оба DMSO лиганда координована преко S атома ($[\text{Pt}(\mathbf{3z}\text{-}N,S)(\text{dms}\text{-}S)_2]^{2+}$ изомер). Нешто стабилнији ($\Delta E = -19,87 \text{ kJ mol}^{-1}$) је изомер код којег је DMSO лиганд, у *trans* положају у односу на N атом тиохидантоина $\mathbf{3z}$, координован преко S атома ($[\text{Pt}(\mathbf{3z}\text{-}N,S)(\text{dms}\text{-}O)(\text{dms}\text{-}S)]^{2+}$ изомер), док је други координован преко O атома. Енергетски најстабилнији је изомер ($\Delta E = -53,64 \text{ kJ mol}^{-1}$) код којег је DMSO у *trans* положају у односу на N атом тиохидантоина $\mathbf{3z}$ координован преко O атома ($[\text{Pt}(\mathbf{3z}\text{-}$

N,S -(dms o - S)(dms o - O)]²⁺ изомер), док је други координован преко S атома. Очигледно је да координовање оба DMSO лиганда преко атома сумпора доводи до стерног нагомилавања у првој координационој сфери и стога је овај изомер најмање стабилан. Изомер код кога су оба DMSO лиганда координована преко атома кисеоника није узет у обзир, јер не постоји могућност за његов настанак.

Како је у претходном поглављу закључено да после координовања тиохидантоина **Зж** преко S и N атома прстена следи реакција насталог комплекса са растварачем (DMSO), који супституише NH_3 лиганд, приказани модел системи су јако корисни за предвиђање крајње структуре динуклеарног комплекса.

2.5.1.6. Координовање DMSO за платину, квантно-механички, кинетички и кристалографски аспекти

У претходним поглављима је показано да у механизму реакције тиохидантоина **Зж** и **Зз** са цисплатином постоји фаза која је *псеудо*-првог реда, у којој платински комплекс интерагује са DMSO- d_6 као растварачем. Да бисмо утврдили који начин координовања DMSO за цисплатину је кинетички фаворизован, моделован је систем који одговара овој реакцији, са циљем да се процени његова Гибсова слободна енергија (ΔrG).

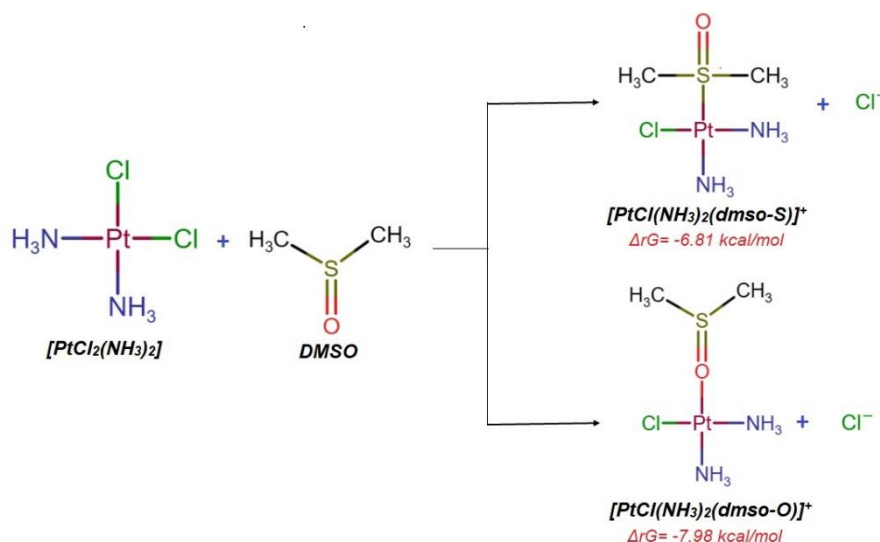
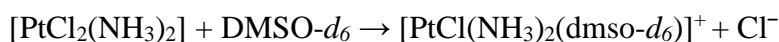


Схема 75. Схематски приказ комплекса платине насталих у реакцији DMSO са цисплатином, у DMSO као растварачу.

Прорачуни су урађени користећи `wb97xf` методу, 6-31g** базисни скуп за неметале и `lanl2dz` за Pt. Прорачуни показују да је спонтанија реакција ($\Delta rG = -33,39$ kJ mol⁻¹) у којој се DMSO монодентатно координује за Pt преко O атома ($[PtCl(NH_3)_2(dms\text{-}d_6\text{-}O)]^+$ комплекс, Схема 75). Кинетички, нешто мање повољно ($\Delta rG = -28,49$ kJ mol⁻¹) је координовање за Pt преко S атома ($[PtCl(NH_3)_2(dms\text{-}d_6\text{-}S)]^+$ комплекс, Схема 75).

Претрагом Кембричке базе структурних података (скраћено CSD, од енгл. The Cambridge Structural Database),⁴⁸⁸ екстраховане су све кристалне структуре које имају DMSO

координован за платина(II) јон. Резултати претраге не иду у прилог резултатима квантно-механичке студије, јер је пронађена 561 структура код којих је DMSO координован за платину преко S атома, а само 7 структура са DMSO координованим преко O атома за платина(II) јон. Објашњење неслагања ових резултата може да се нађе у кинетичкој студији у којој је реакција $[\text{PtCl}_4]^{2-}$ комплекса са DMSO праћена помоћу ^1H NMR.⁴⁸⁹ Настали $[\text{PtCl}_3(\text{dmsO-S})]^-$ комплекс у првој фази ове реакције, реагује са другим молекулом DMSO. У реакцији настаје комплекс са два координована DMSO лиганда ($\text{trans-}[\text{PtCl}_2(\text{dmsO})_2]$), који су у *trans* положају због јаког *trans* ефекта S атома из првог везаног DMSO лиганда (Схема 76). Комплекс се временом изомеризује, односно трансформише у термодинамички стабилнији *cis* производ ($\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{dmsO})_2]$). На основу промена сигнала у ^1H NMR спектрима реакције, закључено је да се код *trans* изомера други DMSO молекул координује преко O атома (кинетики фаворизован производ, $\text{trans-}[\text{PtCl}_2(\text{dmsO-O})(\text{dmsO-S})]$), док се временом овај комплекс изомеризује у термодинамички стабилнији *cis* комплекс ($\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{dmsO-S})_2]$ комплекс), у којем су оба DMSO лиганда координована преко S атома за платину (Схема 76).

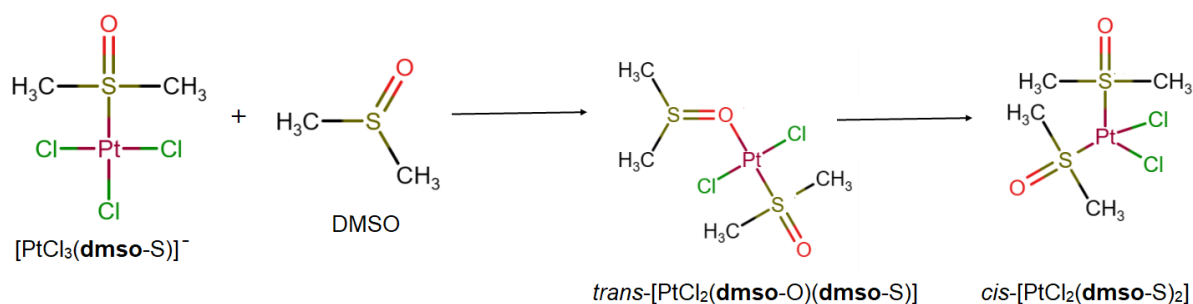


Схема 76. Схематски приказ настанка и изомеризације комплекса платине насталих у реакцији DMSO са цисплатином, у D_2O као растварачу.⁴⁸⁹

Анализом кристалних структура комплекса платине са DMSO добијене су корисне информације, не само о начинима координовања DMSO, него и реакцијама ових комплекса са врстама које такође могу да се координују. Пребројавањем структура закључено је да постоје три групе структура, које су најзаступљеније у кристалним структурама. Такође је закључено да је код већине као полазно једињење у синтези коришћен $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{dmsO-S})_2]$ комплекс. Најзаступљеније су структуре код којих је $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{dmsO-S})_2]$ комплекс реаговао са врстом која се бидентатно координује за платину, градећи хелатни $[\text{PtCl}(\text{dmsO-S})(\text{L}^{\wedge}\text{L})]$ комплекс (Схема 77). Други по заступљености су $\text{trans-}[\text{PtCl}_2(\text{dmsO-S})\text{L}]$ комплекси, настали у реакцији $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{dmsO-S})_2]$ комплекса са врстама које се монодентатно координују за платину. Нешто мање бројне су структуре $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{dmsO-S})\text{L}]$ комплекса, такође насталих у реакцији $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{dmsO-S})_2]$ комплекса са врстама које се монодентатно координују.

Иако је у реакцијама нуклеофилне супституције хлоридни јон боља одлазећа група од DMSO, анализом реакција $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{dmsO-S})_2]$ комплекса је закључено да то није одлучујући фактор у реакцијама овог комплекса. Могуће објашњење може се наћи у самом механизму реакција супституције квадратно-планарних комплекса платине.

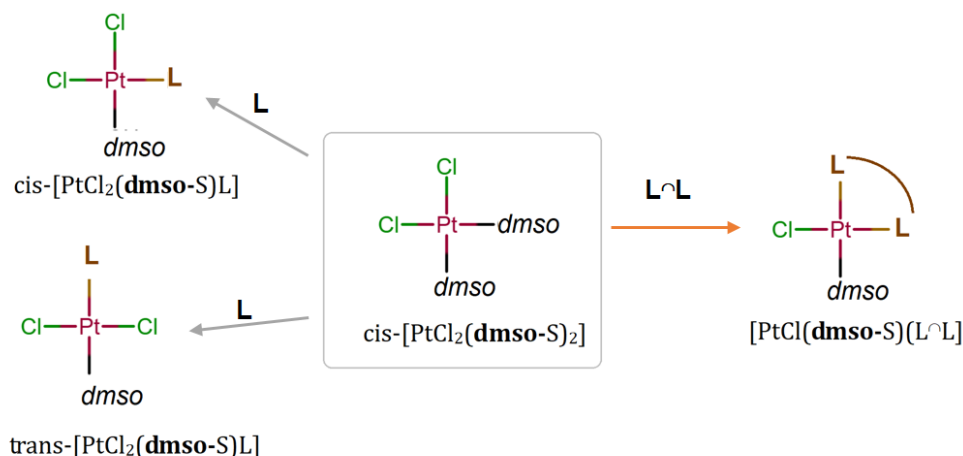


Схема 77. Реакциона схема настанка три најбројније врсте комплекса платине са DMSO лигандом у кристалним структурама, екстрахованих из CSD.

Познато је да механизам супституције иде преко прелазног стања у коме комплекс има квадратно-пирамидалну геометрију, са долазећим лигандима у апикалном положају (Схема 78). Интерконверзијом настаје интермедијер са тригонално-бипиримидалном геометријом, који преко другог прелазног стања, који као и прво прелазно стање има квадратно-пирамидалну геометрију, прелази у крајњи производ са квадратно-планарном геометријом. Очигледно да кинетика трансформације интермедијера у друго прелазно стање, или пак његова стабилност, су фазе које одлучују који ће лиганд бити замењен. И у једном и другом случају, интрамолекуларске интеракције имају одлучујућу улогу, а не јачине појединачних координационих веза.

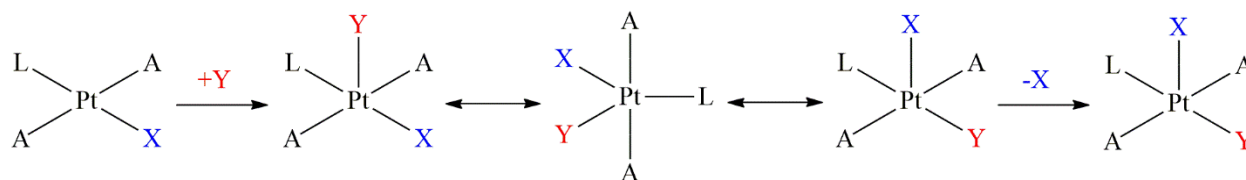


Схема 78. Механизам супституције квадратно-планарних комплекса платине.

Показано је да реакцијом $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{dms0-S})_2]$ са нуклеофилом или врстом која има способност монодентатног везивања, долази до истискивања DMSO лиганда, а не хлорида, и настанка комплекса који има два хлорида лиганда у *trans* положају (комплекси **7a** и **13a**, Схема 79).⁴⁹⁰ Настали комплекси подлежу даљој изомеризацији, при чему настају *cis*-изомери (комплекси **76** и **136**, Схема 79). Интересантно је то да *cis*-комплекс настаје директно у реакцији $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{dms0-S})_2]$ са хетероцикличним једињењима. Додатком нуклеофила у вишку настаје комплекс код којег су два нуклеофила координована за платина(II) јон, с тим што је први заменио DMSO, а други хлорида лиганд (комплекс **12**, Схема 79). Сличан редослед замене се дешава када $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{dms0-S})_2]$ реагује са врстом која има способност бидентатног везивања за платину. Настаје комплекс, који поред хелатног прстена, поседује један хлорида и један DMSO лиганд (комплекс **4**, Схема 79). Загревање овог комплекса у вакууму доводи до јонизационе изомерије. Наиме, хлоридни јон из

спољашње сфере комплекса замењује DMSO лиганд, па настаје комплекс са два хлоридо лиганда у *cis* положају (комплекс **5**, Схема 79).

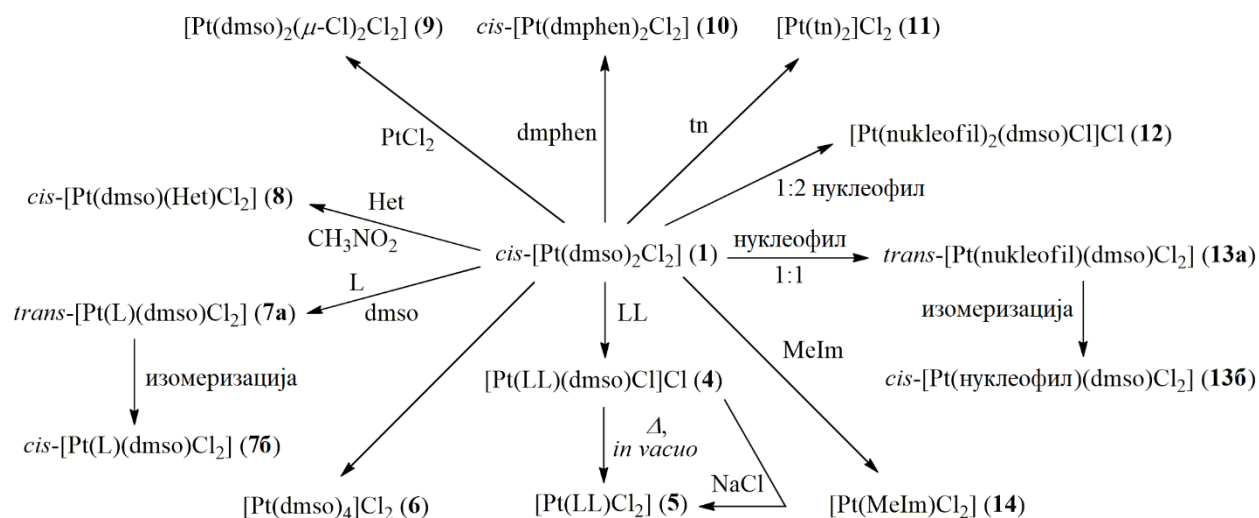


Схема 79. Схема реакције $cis-[PtCl_2(dmsO)_2]$ комплекса.

Реакција $cis-[PtCl_2(dmsO)_2]$ са дериватом 2-фенилиндола је пример реакције у којој настаје најпре *trans* изомер, који се временом преводи у *cis* изомер (Схема 80). Наиме, након два сата рефлуковања у метанолу као растварачу, 2-фенилиндолни лиганд замењује DMSO лиганд, везујући се за платину преко N атома индолног прстена, при чему настаје комплекс платине са два хлоридо лиганда у *trans* положају. Кристална структура добијеног комплекса је решена и архивирана у CSD под рефкодом UGANOH.⁴⁹¹ Када се рефлуковање продужи на 14 h, долази до изомеризације комплекса, тј. ствара се смеша *cis* и *trans* изомера. *Cis* изомер је изгледа главна компонента, јер је из овог раствора кристалисао овај комплекс, а његова решена кристална структура је архивирана у CSD под рефкодом UGANUN. Биолошка истраживања су показала да су оба изомера показала већу цитотоксичну активност према MCF-7 туморским ћелијама дојке од цисплатине, с тим што је *cis* изомер значајно активнији.

На основу овог примера, може се претпоставити да је настанак *trans* изомера кинетички контролисан, док је *cis* изомер термодинамички фаворизован, јер је стабилнији. Међутим, мала измена у структури нуклеофила може довести до настанка различитих изомера, чак и када се реакција изводи под истим условима. Наиме, из CSD су екстраховане три кристалне структуре комплекса платине (Слика 56), насталих у реакцији $cis-[PtCl_2(dmsO)_2]$ комплекса са три деривата алкалоида триптантрина.⁴⁹² У сва три случаја је координовање деривата триптантрина (try) водило истискивању једног DMSO лиганда. Под истим реакционим условима, комплекс са координованим јодо дериватом триптантрина (кристална структура са рефкодом OGAWUR) има *cis* геометрију, док комплекси са бромо дериватом (кристална структура са рефкодом OGAWOL) и несупституисани дериват у положају **8** (кристална структура са рефкодом OGAXAY) имају *trans* оријентацију хлоридо лиганда.

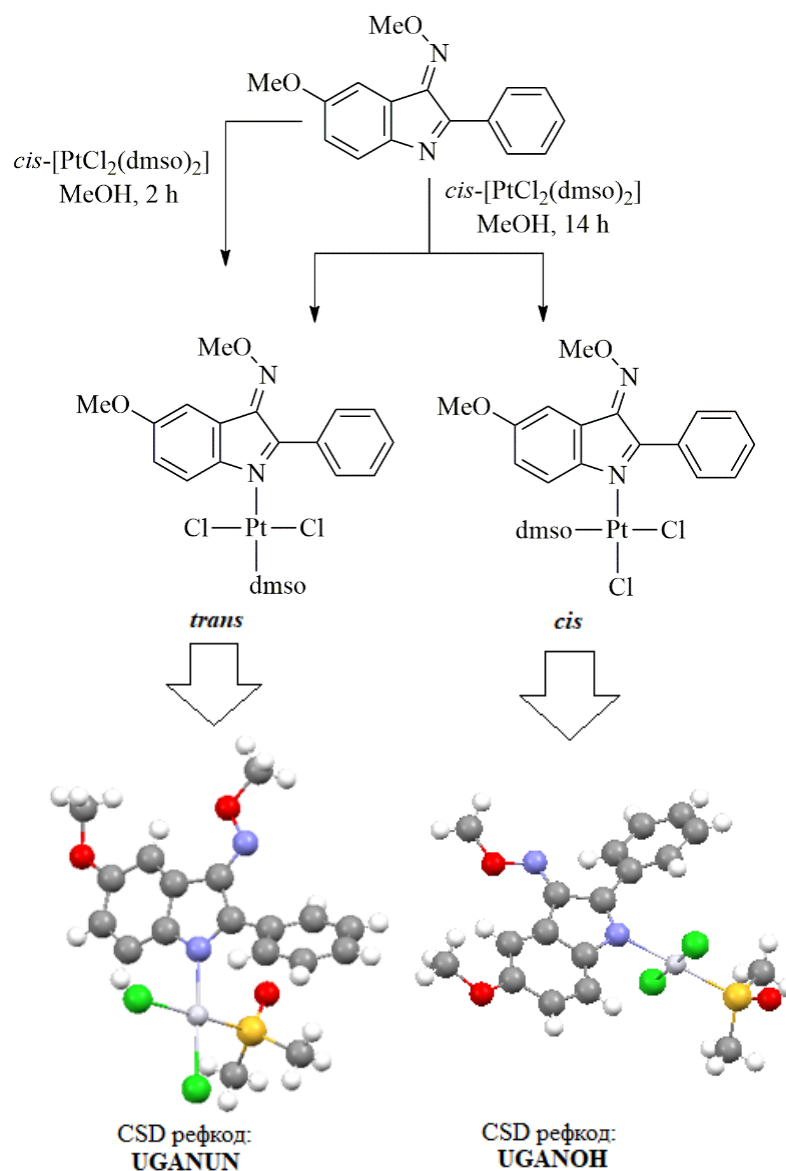
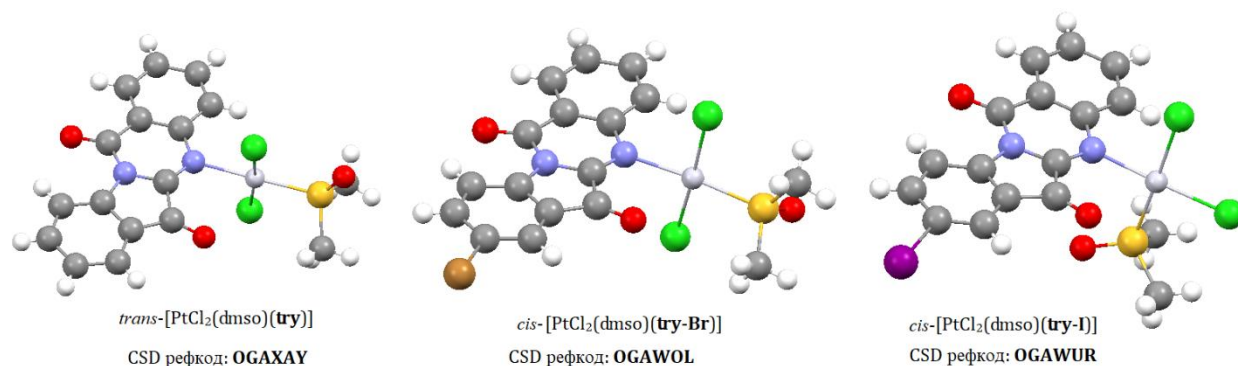


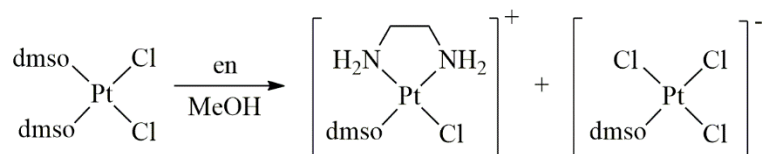
Схема 80. Приказ реакције $\text{cis-[PtCl}_2(\text{dmsO})_2]$ комплекса са дериватом 2-фенилиндола и кристалних структура производа насталих у овој реакцији.

Претпоставља се да ове разлике потичу од разлика у структурама интермедијерних тригонално-бипирамидалних комплекса. Сва три комплекса су показала ниску токсичност ка нормалним (нетуморским) HL-7702 ћелијама. *In vitro* студија је показала да халогеновање триптантрина у положају 8 води ка повећању њихових инхибиторских способности ка ензиму теломераза, као и повећању митохондријалне дисфункције. Међутим, комплекс са бромо дериватизованим триптантрином показује највећу активност, указујући да *trans* геометрија и халогеновање у положају 8 имају највећи утицај на наведене биолошке активности.



Слика 56. Приказ кристалних структура производа насталих у реакцији *cis*-[PtCl₂(dmsO-S)₂] комплекса са дериватима алкалоида триптантрина.

Као потврда да се из *cis*-[PtCl₂(dmsO-S)₂] комплекса може прво истиснути један DMSO лиганд, па затим хлоридо лиганд, је кристална структура комплекса насталог у реакцији са етилендиамином (en).⁴⁹⁰ Реакција се одвија у поларном растварачу (метаноу) и настаје [PtCl(dmsO-S)(en)]⁺ комплекс, што је потврђено кристалном структуром са рефкодом NINQAC. Међутим, поред овог комплекса, у јединичној ћелији се налази и [PtCl₃(dmsO-S)]⁻ комплекс (Схема 81), очигледно настао у реакцији ослобођеног хлоридо лиганда са неизреагованим *cis*-[PtCl₂(dmsO-S)₂] комплексом. Претпоставља се да протични растварачи фаворизују настанак наелектрисаних комплекса, јер на тај начин електростатички појачавају водоничне везе које се јављају између растварача и наелектрисаних комплекса јона метала.



CSD рефкод: NINQAC

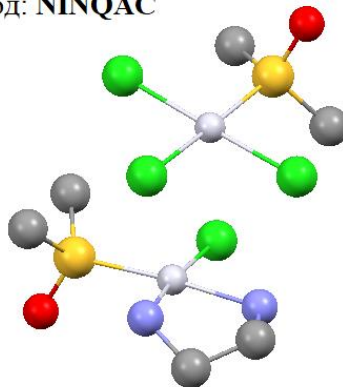


Схема 81. Приказ реакције *cis*-[PtCl₂(dmsO-S)₂] комплекса са етилендиамином (en) и кристална структура са комплексима платине насталих у овој реакцији.

Када се користе непротични растварачи, супституција може да има нешто другачији исход. Наиме, у реакцији *cis*-[PtCl₂(dmsO-S)₂] са 2,2'-бипиримидином, која се дешава у ацетонитрилу, настаје комплекс са хелатним 2,2'-бипиримидинским лигандом, који није

наелектрисан (Схема 82).⁴⁹³ Када би 2,2'-бипиримидински лиганд заменио један DMSO и један хлоридо лиганд приликом његовог координовања за платину, настао би позитивно наелектрисани комплекс, који би услед тога имао боље донорске способности за водонично везивање од неутралног комплекса. Међутим, како ацетонитрил нема класичних донорских ни акцепторских група, очигледно је да настанак неутралног комплекса са два хлоридо лиганда, уз истискивање оба DMSO лиганда, није вођен појачавањем водоничног везивања. Ако се узме у обзир структура насталог неутралног комплекса, јасно је да он има већи афинитет за стекинг интеракције него за водонично везивање, како због ароматичних прстенова, настанка хелатног лиганда, који повећава афинитет ка стекинг интеракцијама, тако и због његовог неутралног наелектрисуња. Наиме, ако би настали комплекс био позитивно наелектрисан, значајно би се смањила јачина стекинг интеракција између ова два комплекса, услед јаким одбојних интеракција између њих.

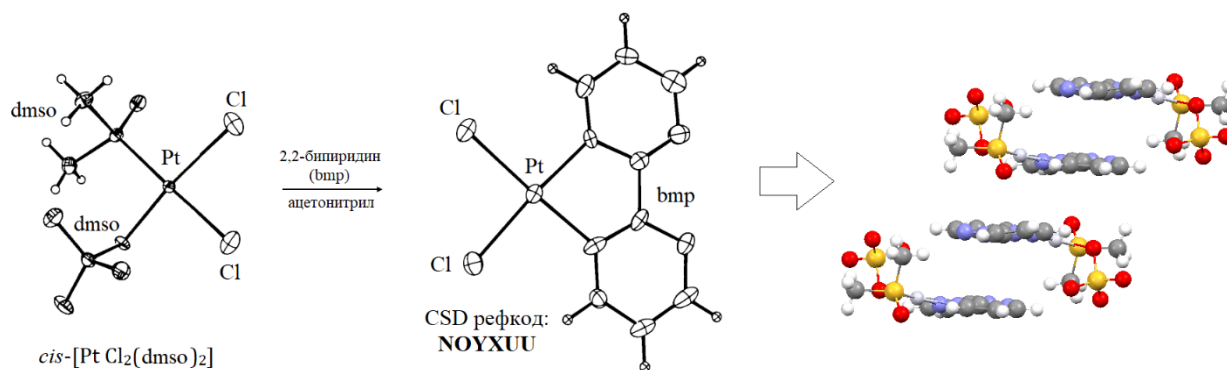


Схема 82. Приказ реакције $cis-[PtCl_2(dmsO)_2]$ комплекса са 2,2'-бипиримидином у апротичном растварачу (ацетонитрилу) и стекинг низа унутар кристалне структуре добијеног производа.

Из наведених примера, јасно је да растварач има веома важну улогу у одређивању механизма супституције. Његов утицај се може уочити и анализом паковања унутар кристалне структуре комплекса насталог у реакцији $cis-[PtCl_2(dmsO)_2]$ са 3,6,9,16,19,22-хексаазатрицикло[22.2.2.^{11,14}]-триаконта-11,13,24,26(1),27,29-хексаеном (L), при чему настаје бинуклеарни комплекс (Схема 83).⁴⁹⁴ Лиганд L је хексадентатни, са по три N атома координована по јону платине, и са *p*-ксиленским фрагментом као мостним лигандом. Растварач је поларан протичан (метанол), што указује на тежњу за стварањем наелектрисаних комплекса, чиме би се обезбедило електростатичко јачање водоничних веза између растварача и комплекса. Како лиганд L везује три азотова атома по јону платине, требало би очекивати истискивање два DMSO и једног хлоридо лиганда, што и јесте случај. Настали бинуклеарни комплекс је наелектрисан +2, а као контра јон у кристалној структури се јавља $cis-[PtCl_3(dmsO-S)]^-$ комплекс. Он настаје у реакцији неизреагованог $cis-[PtCl_2(dmsO-S)_2]$ са ослобођеним хлоридо лигандом. У кристалној структури, негативно наелектрисани $[PtCl_3(dmsO-S)]^-$ комплекс је смештен између позитивно наелектрисаних бинуклеарних комплекса, држећи се јаким електростатичким интеракцијама, а истовремено смањујући одбијање између два позитивна бинуклеарна комплекса. Илустрације ради, на Схеми 83 је приказано паковање дуж *c*-осе, са којег се такође види да се бинуклеарни комплекси понашају као мостови између два $[PtCl_3(dmsO-S)]^-$ комплекса, који их држе на краћим растојањима у кристалним структурама смањивањем одбојне силе између две негативно

наелектрисане врсте. Може се размотрити и друга могућност супституције лиганда приликом настанка бинуклеарног комплекса, која представља истискивање једног DMSO и два хлоридо лиганда. У овом случају би настао бинуклеарни комплекс са по једним DMSO лигандом по јону платине и укупним наелектрисањем од +4. Ослобођена два хлоридна јона могу да реагују са cis -[PtCl₂(dmsO-S)₂], градећи два [PtCl₃(dmsO-S)]⁻ комплексна анјона, са укупним наелектрисањем од -2. На овај начин се не би компензовало позитивно наелектрисање бинуклеарног комплекса, а како су у почетној реакционој смеси све врсте неутралне (cis -[PtCl₂(dmsO-S)₂], лиганд L и растварач), очигледно је да је овакав реакциони ток немогућ.

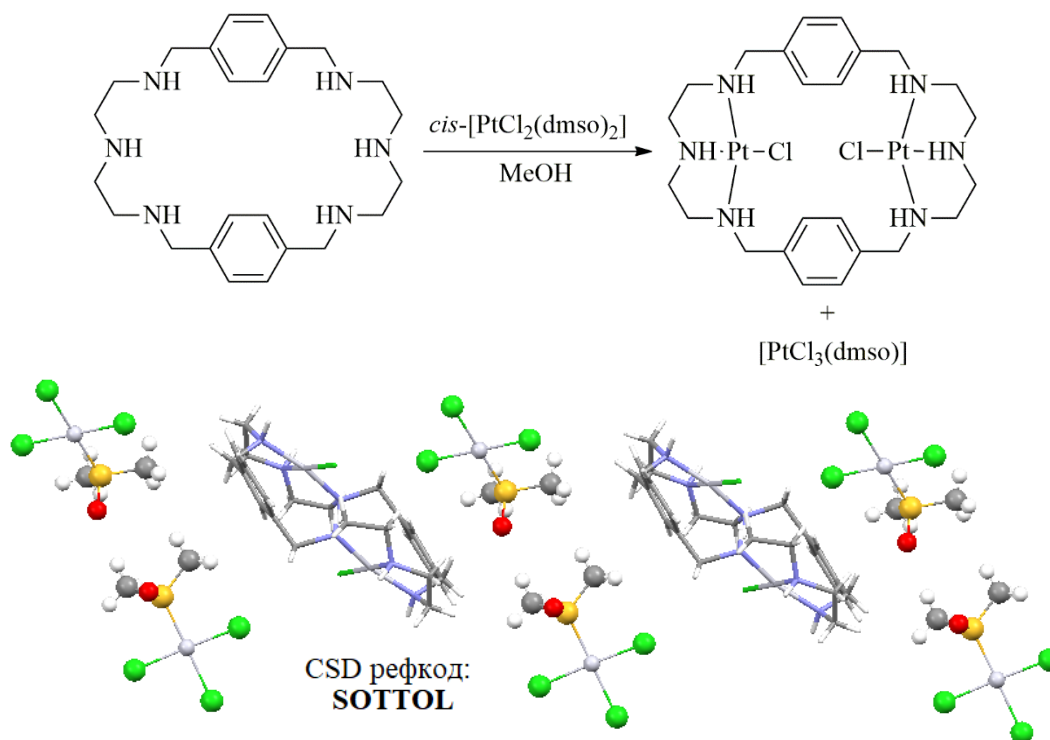


Схема 83. Приказ реакције cis -[PtCl₂(dmsO-S)₂] комплекса са цикличним хексаеном и паковања дуж c -осе унутар кристалне структуре насталог бинуклеарног комплекса.

Из CSD је екстраховано 7 кристалних структура са O-координованим DMSO, а анализа овог сета структура је показала да се у две структуре DMSO налази у $trans$ положају у односу на S-координовани DMSO (Схема 84, рефкод AVOBEU), у две структуре је у $trans$ положају јон платине (Схема 85, рефкод BINJEN), док се у три структуре у $trans$ положају налази органометални ароматични C атом (Схема 86, рефкод UKONUE). Само у две структуре DMSO реагује као растварач, док је у преосталих пет реактант или је лиганд у почетном платинском комплексу. У четири комплекса, координовање DMSO је праћено изомеризацијом координованог DMSO, у две структуре се не јавља изомеризација, док је у једној структури, која представља координациони полимер, DMSO бидентатни мостни лиганд. Како је услов приликом претраге CSD био координација DMSO преко O атома за Pt, добијене су три структуре у којима је платина наелектрисана +4, са октаедарском геометријом комплекса.

Кристална структура са рефкодом FLYUU представља комплекс платине са четири координована DMSO (cis -[Pt(dmsO-O)₂(dmsO-S)₂]²⁺), настао растварањем платина(II)-хидроксида и CF₃SO₃H у DMSO.⁴⁹⁵ Претпоставља се да растварањем платина(II)-хидроксида у DMSO настаје најпре квадратно-планарни комплекс са два DMSO лиганда. Због присутних ОН група, комплекс има базни карактер и реагује са CF₃SO₃H. Реакција неутрализације је праћена са координовањем два нова молекула DMSO, али овога пута преко О атома. Како је реакција неутрализације брза, настали аква лиганди се одмах замењују са два молекула DMSO, чиме је спречена изомеризација *O*-координованог до *S*-координованог DMSO лиганда. CF₃SO₃⁻ јон има улогу контра јона насталом cis -[Pt(dmsO-O)₂(dmsO-S)₂]²⁺ комплексу.

DMSO због великог афинитета према платини може да доведе до раскидања или трансформације комплекса, услед његовог растварања у DMSO. Примера ради, бинуклеарни комплекс са два PPh₃ лиганда и четири хлоридо лиганда (Схема 84) се раствара у DMSO, али при томе долази до распадања бинуклеарног комплекса и настанка два мононуклеарна комплекса.⁴⁹⁶

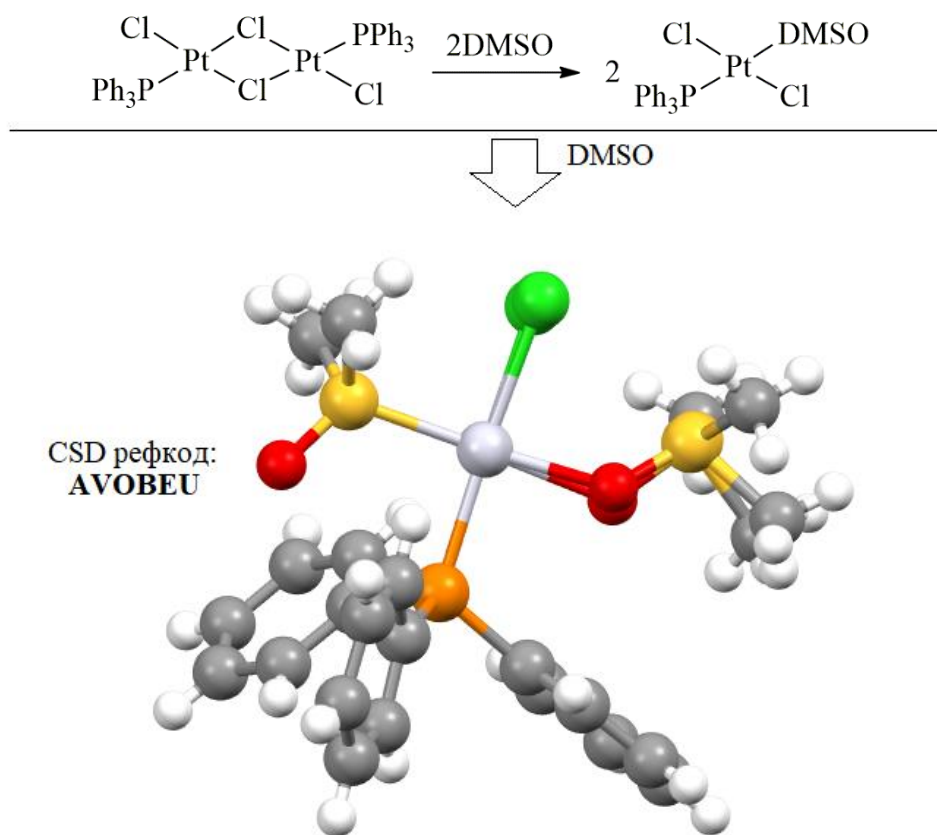


Схема 84. Приказ реакције распадања бинуклеарног комплекса под утицајем нуклеофила и кристалне структуре насталог мононуклеарног комплекса у реакцији која се одвијала у DMSO као растварачу.

Настали мононуклеарни комплекс садржи PPh₃ лиганд, један DMSO лиганд и два хлоридо лиганда у *trans* положају. Након везивања DMSO у *trans* положају у односу на PPh₃ лиганд, долази до изомеризације комплекса, тј. преласка DMSO из *trans* у *cis* положај у

односу на PPh_3 лиганд, при чему се мења и начин координовања DMSO . Везивна изомеризација је потврђена ^{31}P NMR спектрима. Претпоставља се да се DMSO најпре координује преко O атома (кинетички фаворизовано), да би се након изомеризације DMSO координовао преко S атома (термодинамички фаворизовано). Како се реакција одвија у DMSO , услед јаког *trans* ефекта S -координованог DMSO долази до супституције једног хлоридо лиганда са новим DMSO лигандом. У овом случају је DMSO координован преко O атома. Након 48 h настао је кристал са горе описаном структуром платинског комплекса, архивиран у CSD под рефкодом AVOBEU (Схема 84).

Да је координовање DMSO преко O атома кинетички фаворизовано, као и да се изомеризација не дешава када не постоје услови за то, показује и бинуклеарни $[\text{Pt}_2(\text{SO}_4)_4(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекс, код којег долази до измене два аква лиганда са DMSO лигандима, координованих за јоне платине преко O атома (Схема 85).⁴⁹⁷ У овом случају DMSO није коришћен као растварач, него је додат као реактант. Структура новонасталог комплекса је потврђена у кристалном стању, која је архивирана у CSD под рефкодом BINJEN. У овом случају не долази до распада бинуклеарног комплекса, јер се гради метал-метал веза, која је додатно ојачана са четири мостна SO_4 лиганда. Како су сви лиганди у *cis* положају у односу на мостни DMSO , они немају могућност замене места са DMSO , стога не долази до интерконверзије и везивне изомеризације, односно до везивања DMSO лиганда за платину преко S атома.

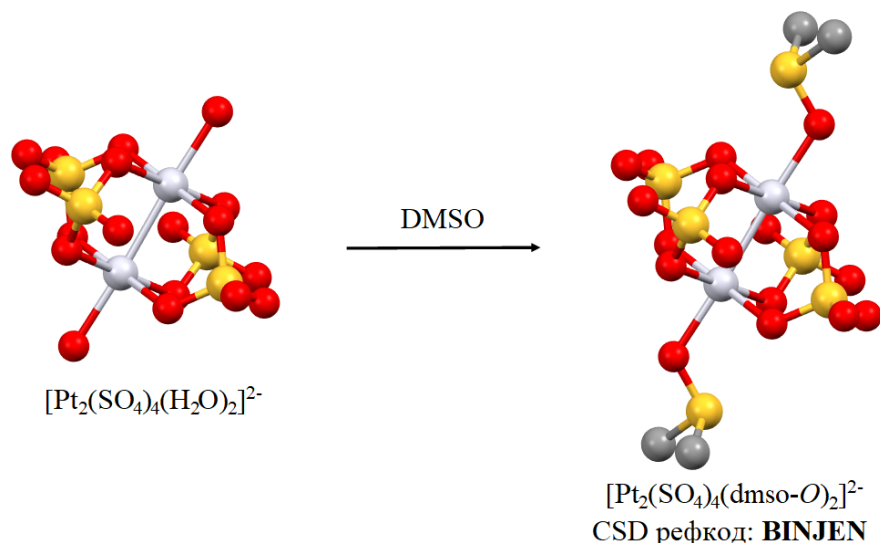
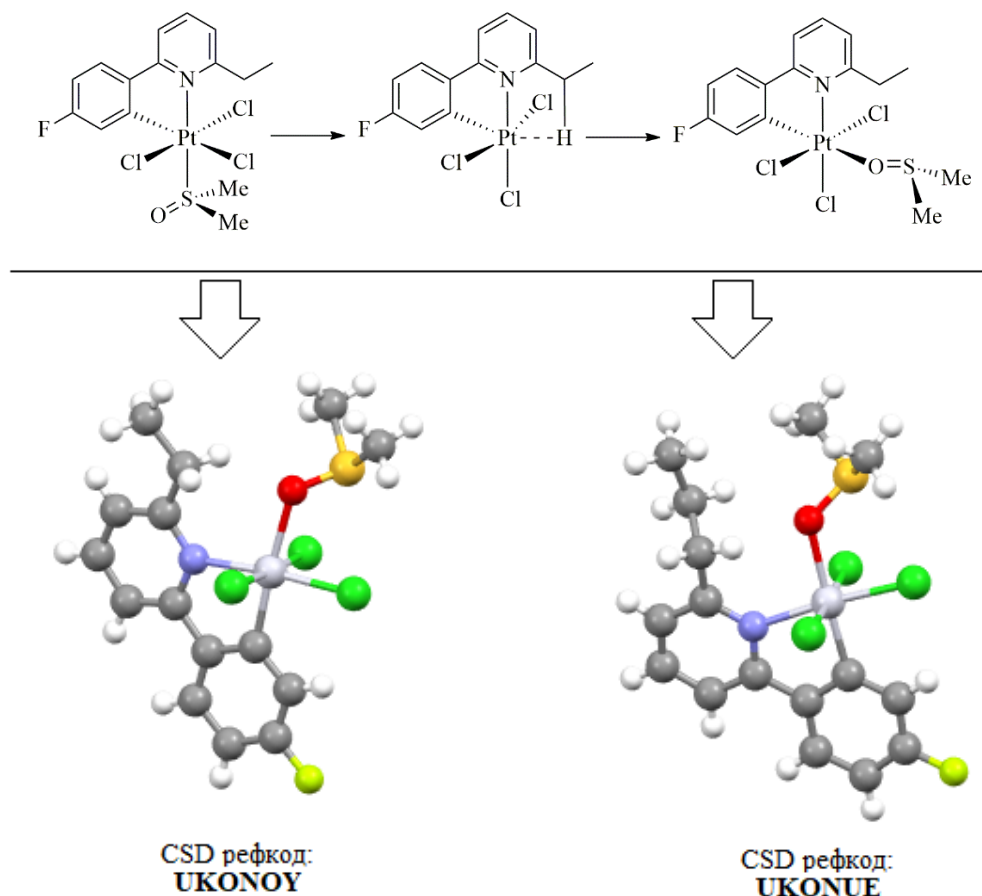


Схема 85. Приказ реакције бинуклеарног комплекса са DMSO и кристалне структуре насталог DMSO комплекса.

Иако следећа два комплекса имају октаедарску геометрију, код које јон платине има наелектрисање +4, закључци добијени њиховом анализом су јако корисни и могу бити применљиви на квадратно-планарне комплексе. Наиме, оксидацијом органометалног комплекса Pt(II) , са DMSO везаним преко S атома, настаје октаедарски комплекс са Pt(IV) на месту централног јона. Оно што је интересантно у овом случају је интерконверзија DMSO лиганда из аксијалног у екваторијални положај, која је праћена везивном изомеризацијом. DMSO лиганд у првој фази дисосује, при чему настаје квадратно-пирамидални интермедијерни комплекс Pt(IV) . У следећој фази, DMSO се везује преко O атома за

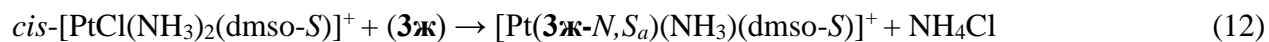
платину, али овог пута у *trans* положај у односу на органометални S атом (Схема 86).⁴⁹⁸ Структура овог комплекса је такође решена и архивирана у CSD под рефкодом UKONUE и UKONOU. На основу ове две структуре може се претпоставити да је у октаедарским комплексима координовање DMSO преко O атома термодинамички фаворизовано, али исто тако указује на могућност појаве и у квадратно-планарном окружењу, јер је везивање DMSO преко S атома стерно неповољније у унутрашњој координационој сфери од везивања преко O атома.



Слика 86. Приказ реакције бинуклеарног комплекса са DMSO и кристалне структуре насталог DMSO комплекса.

2.5.1.7. Структура комплекса платине са тиохидантоинима 3ж и 3з

На основу претходних разматрања може се извући закључак о структурама комплекса платине са тиохидантоинима 3ж и 3з. У првој фази реакције, 3ж не реагује са цисплатином, него са DMSO дериватом, $cis-[PtCl(NH_3)_2(dmsO-S)]^+$ комплексом. Ова фаза траје 2,5 h, а реакција се може написати у облику једначине 12.

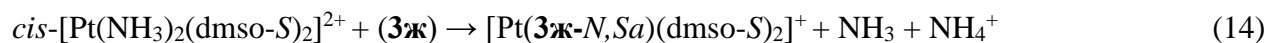


У насталом комплексу, 3ж је бидентатни лиганд, који се координује преко N атома прстена и S атома алифатичног супституента (Sa), градећи петочлани хелатни прстен. Како је првих

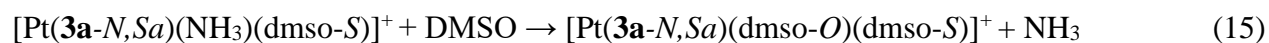
пет сати реакција *псеудо*-првог реда, јасно је да је главна реакција у овом интервалу реакција која тече паралелно са реакцијом описаном у једначини 10. То је у ствари реакција $cis-[PtCl(NH_3)_2(dmsO-S)]^+$ комплекса са растварачем (DMSO), која се може написати у облику једначине 13.



Када се посматра реактивност **3ж**, уочава се преломна тачка на 2,5 h, након чега се повећава брзина његове реакције. Очигледно је да је после 2,5 h настало довољно $cis-[Pt(NH_3)_2(dmsO-S)_2]^{2+}$ комплекса, и да **3ж** има већи афинитет према овом DMSO комплексу. Нова реакција се може приказати једначином 14.



На графику реда реакције за $[Pt-3ж]$ комплекс (Слика 53) јавља се равна линија од 11 h, која указује да не постоји промена у количини насталог $[Pt-3ж]$ комплекса. Међутим, како се количина насталог NH_3 још увек повећава, јасно је да постоји реакција у којој се ослобађа амонијак, али која не укључује нити **3ж**, а ни $cis-[Pt(NH_3)_2(dmsO-S)_2]^{2+}$ комплекс. Како амонијак постоји као лиганд у $[Pt(3ж-N, Sa)(NH_3)(dmsO-S)]^+$ комплексу, насталом у првој фази реакције, очигледно је да овај комплекс реагује са растварачем. Реакција се може приказати једначином 15, у којој настаје комплекс са два координована DMSO лиганда. Везивање другог DMSO иде преко O атома, јер не постоји могућност интерконверзије, којом би настао везивни изомер комплекса са S-координованим DMSO лигандом.

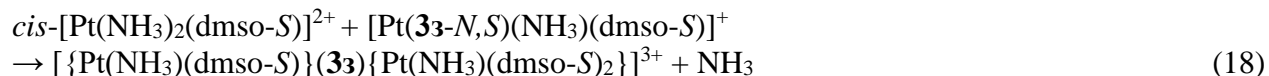
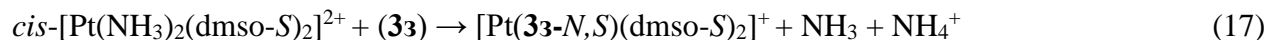


Закључује се да у реакцији **3ж** са цисплатином, у DMSO као растварачу, настају два мононуклеарна комплекса, са хелатно везаним **3ж** и два DMSO лиганда. Главни производ је $[Pt(3ж-N, Sa)(dmsO-S)_2]^+$ комплекс, са оба DMSO лиганда координована за јон платине преко сумпора, док је $[Pt(3а-N, Sa)(dmsO-O)(dmsO-S)]^+$ комплекс споредни производ, у којем је један DMSO лиганд координован за јон платине преко кисеоника (Слика 57). Главни производ је кинетички фаворизован, док је споредни производ термодинамички стабилнији.

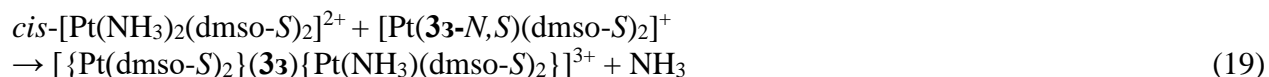
Код тиохидантоина **3з** прва фаза реакције траје нешто краће, око 2,1 h, у којој **3з** реагује са $cis-[PtCl(NH_3)_2(dmsO-S)]^+$ комплексом. Ова реакција се може написати у облику једначине 16, а у насталом комплексу, **3з** гради четворочлани хелатни прстен, координујући се преко N и S атома тиохидантоинског прстена.



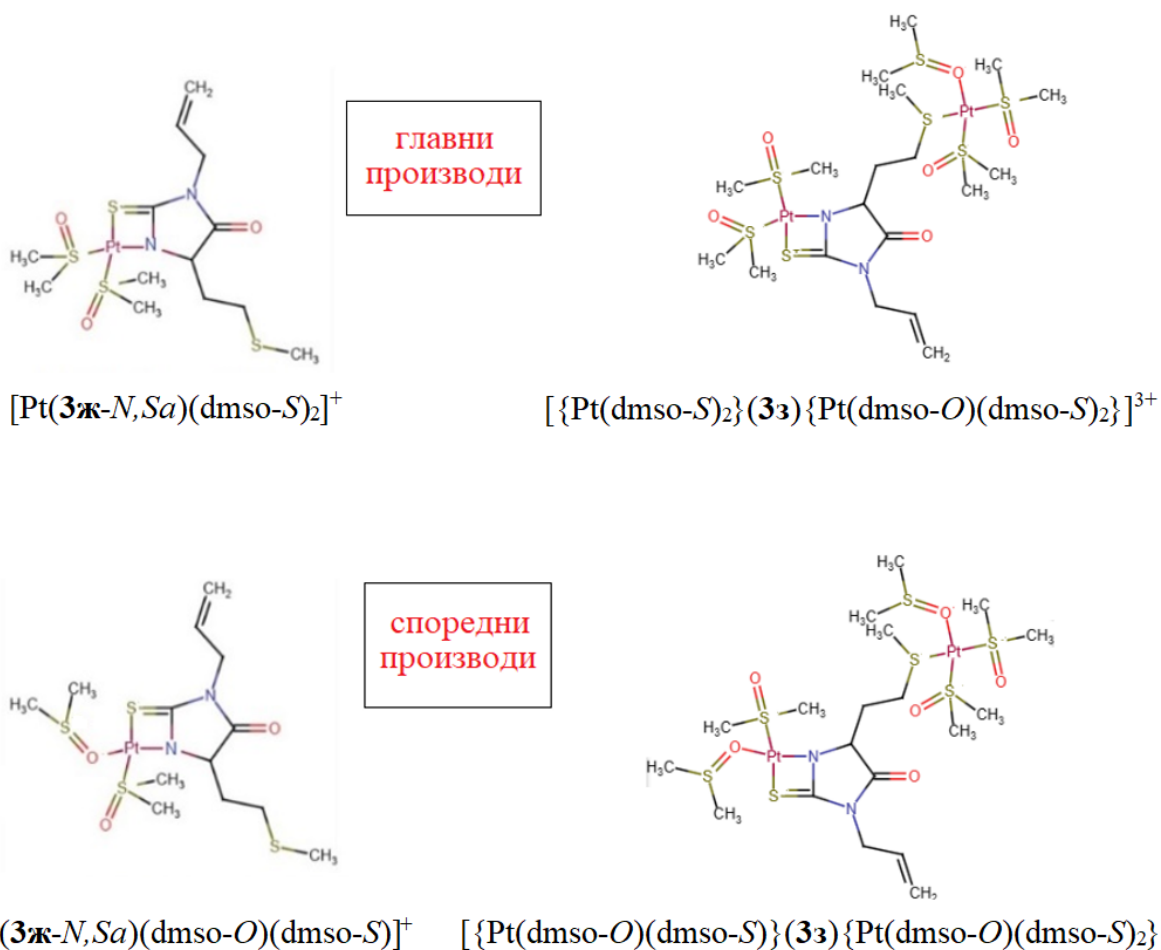
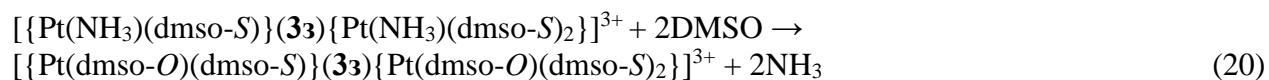
У другој фази је реакција бржа и праћена координовањем S атома метионинског супституента, што је потврђено помоћу 1H NMR спектара. Разлог за убрзавање реакције је појава $cis-[Pt(NH_3)_2(dmsO-S)_2]^{2+}$ комплекса, који може да реагује са **3з** (реакција 17), али и са новонасталим $[Pt(3з-N, S)(NH_3)(dmsO-S)]^+$ комплексом (реакција 18).



Настали мононуклеарни производ у реакцији 17 такође може да реагује са *cis*-[Pt(NH₃)₂(dms_o-S)₂]²⁺ комплексом, при чему настаје бинуклеарни комплекс (реакција 19), који се разликује од бинуклеарног комплекса насталог у реакцији 18.



На графику за процену реда реакције насталог [Pt-**3z**] комплекса се уочава права линија од 8 h, која указује на реакцију са растварачем. У прилог томе иде и права линија која се јавља од 5 h на графику за процену реда реакције за *cis*-[PtCl(NH₃)₂(dms_o-S)]⁺ комплекс, указујући да ова врста више не учествује у реакцији. Реакцији са растварачем подлежу оба бинуклеарна комплекса, а њихове реакције су приказане у једначинама 20 и 21.



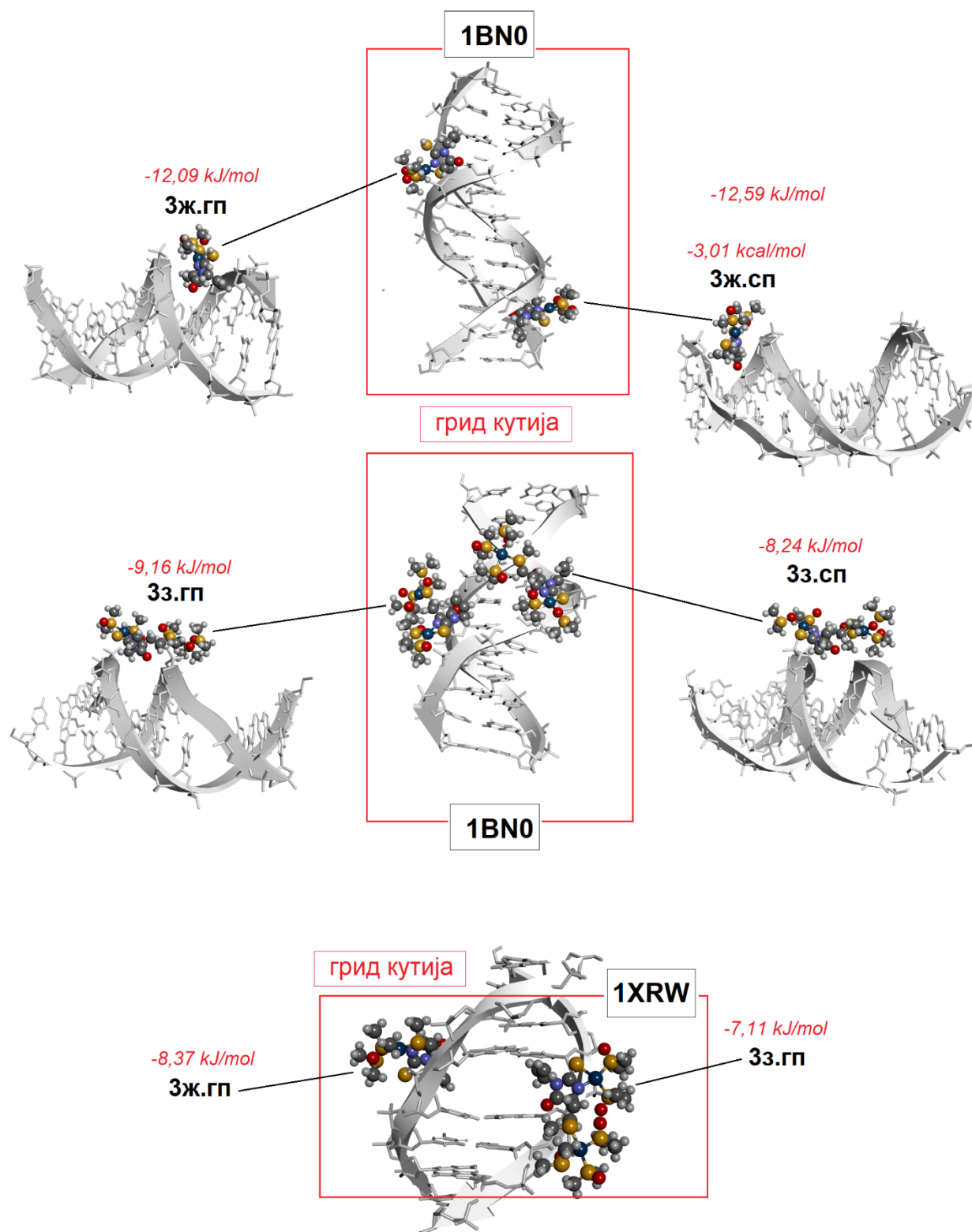
Слика 57. Структуре главних и споредних производа у реакцији **3ж** и **3z** са цисплатином у DMSO као растварачу.

Супституцијом амонијака, DMSO лиганд се координује у овој фази преко O атома, због немогућности везивне изомерије. Главни производ је бинуклеарни комплекс, са формулом $[\{Pt(dmsO-S)_2\}(3z)\{Pt(dmsO-O)(dmsO-S)_2\}]^{3+}$ и укупно пет координована DMSO лиганда, од којих је један координован преко O атома. Споредни производ је бинуклеарни комплекс са формулом $[\{Pt(dmsO-O)(dmsO-S)\}(3z)\{Pt(dmsO-O)(dmsO-S)_2\}]^{3+}$, у којем су два од пет DMSO лиганда координована за јон платине преко O атома. Сваки јон платине има по један DMSO лиганд координован преко O атома. Структуре ових комплекса су приказане на Слици 57.

2.5.1.8. Резултати молекулског докинга

Да би се одредили начини везивања главних производа (.гп) и споредних производа (.сп), добијених у реакцији тиохидантоина **Зж** и **Зз** са цисплатином, у DMSO као растварачу, за ДНК, а самим тим и предвидели њихову антитуморску активност, урађена је докинг студија са два структурно различита ДНК ланца. Код првог циљаног ДНК, са структуром преузетом из PDB са 1BNA кодом, структура не поседује интелекциону шупљину, него се састоји из три региона. Први и последњи регион представља регионе са по четири G=C пара, а између њих је регион са четири A=T пара. Интеракције између одговарајућих производа и ДНК ланца су приказане на Слици 54. Резултати молекулског докинга показали су да се оба **Зж** комплекса везују у мали жлеб ДНК (или енгл. *minor groove binding*), с тим што споредни производ (**Зж.сп**) има нешто вишу енергију везивања ($-12,59 \text{ kJ mol}^{-1}$) од главног производа (**Зж.гп**, енергија везивања: $-12,09 \text{ kJ mol}^{-1}$). Међутим, оба бинуклеарна комплекса се не везују у жлеб, него за фосфатну кичму ДНК, премошћавајући мали жлеб. Овај начин је познат у литератури као *minor groove spanning*, и сматра се да је последица јаким електростатичким интеракција између позитивно наелектрисаних комплекса и негативно наелектрисане фосфатне кичме ДНК.⁴⁹⁹ Разлике у везивањима мононуклеарних (**Зж**) комплекса од бинуклеарних (**Зз**) комплекса заиста се могу сагледати са аспекта велике разлике у наелектрисуњима комплекса. Наиме, бинуклеарни комплекси имају значајно веће позитивно наелектрисуње (+3) од мононуклеарних комплекса (+1), које је одговорно за њихов већи афинитет за везивање за фосфатну кичму, која је носилац негативног наелектрисуња ДНК. Иако су мононуклеарни комплекси наелектрисани, они имају нешто већи афинитет за везивање у малом жлебу. Због своје величине, мононуклеарни комплекси не би могли да се везују истовремено за фосфатну кичму два ланца, него само за један. То му значајно смањује контактну (интеракциону) површ, у поређењу са везивањем у малом жлебу (Слика 58). Како енергија везивања зависи и од величине контактне површи интерагујућих врста, јасно је да се укључивањем већег броја фрагмената мононуклеарног комплекса у интеракције са ДНК, услед везивања унутар малог жлеба, повећава његова енергија везивања. Мононуклеарни комплекси се везују у областима богатим G=C паровима, са којима граде водоничне везе које су додатно ојачане електростатичким интеракцијама.

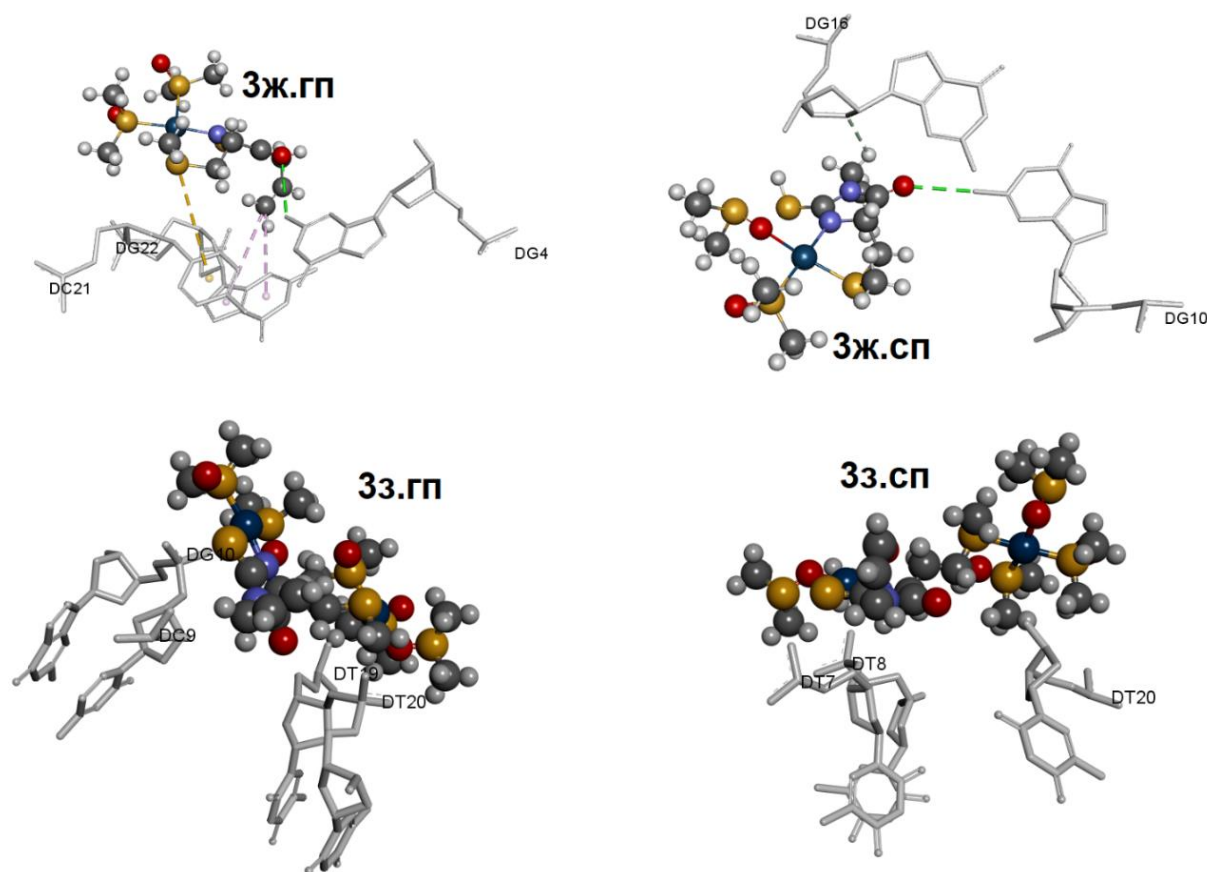
Поред наведена два нековалентна начина везивања за ДНК (везивање унутар малог или великог жлеба и везивање за фосфатну кичму), постоји и трећи начин који се назива интеркалација. Постоји и ковалентно везивање, и оно се углавном односи на координовање азотних база за јон метала. На ковалентном везивању се заснива антитуморско дејство цисплатине. Интеркалација је карактеристична за једињења која услед одговарајуће величине и хемијске природе имају могућност да се уметну између базних парова ДНК, јачајући тако стекинг архитектуру ДНК.



Слика 58. Места везивања главних (.гп) и споредних производа (.сп) у реакцији 3ж и 3з са цисплатином у DMSO као растварачу, на ДНК структурама без (1BN0) и са интеркалационом шупљином (1XRW).

Ова једињења имају углавном планарну, ароматичну или полицикличну структуру, која им омогућава лако продирање између базних парова. Да бисмо утврдили да ли испитивани производи имају афинитет ка интеркалацији, урађена је докинг студија на структуру ДНК, која садржи интеркалациону шупљину (структура са 1XRW кодом, Слика 58). За разлику од докинга на структуру ДНК без интеркалационе шупљине (структура са 1BNA кодом), код које грид кутија укључује целу ДНК структуру, у овом случају грид кутија је знатно мања. Смањењем кутије смањује се могућност производа да се везују на начине за које смо већ показали да имају афинитет. Грид кутија за ДНК, која садржи интеркалациону шупљину (структура са 1XRW кодом) укључује, осим шупљине, и два пара база изнад и испод шупљине. Резултати докинга показују да ни моноклеарни ни бинуклеарни производи немају афинитет ка интеркалацији.

У упоредној студији, која се заснива на масеној спектрометрији (МС), приказани су резултати везивања цисплатине и његовог DMSO деривата за ДНК и једноланчану ДНК.⁴⁸⁵ Адукт настао ковалентним везивањем цисплатине за ДНК је идентификован, али не и адукт ДНК са DMSO дериватом. Међутим, ковалентни адукт DMSO деривата са једноланчаном ДНК је идентификован помоћу МС. Очигледно, везивно место DMSO деривата за ДНК није имало гуанински прстен, са којим би могао да гради координациону везу, што је у случају једноланчане ДНК било могуће. Анализом везивног места **3ж.гп** и **3ж.сп**, показало се да оба производа имају гуанински нуклеозид (DG) у везивном месту (Слика 59), што упућује на могућност ковалентног везивања оба моноклеарна **3ж** комплекса за ДНК.



Слика 59. Приказ окружења моноклеарних **3ж** комплекса у везивном месту унутар малог жлеба и **3з** комплекса са фосфатном кичмом ДНК.

Ово није случај са бинуклеарним комплексима, који се везују за фосфатну кичму, те стога немају прилаз нуклеинским базама, а самим тим ни могућност њиховог координовања за јон платине. Стога, требало би очекивати да бинуклеарни **3z** комплекси имају мању антитуморску активност од цисплатине.

2.5.2. Испитивање реакција арилиденског деривата 2-тиохидантоина **6a** са солима паладијума(II)

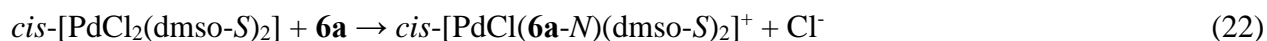
Да би се испитали кинетика и механизам координације 3-арилиденских-2-тиохидантоина са паладијумом(II), извршен је кинетички, временски завијан експеримент, у коме је праћена реакција 3-((фенилметил)амино)-2-тиоксо-4-имидазолидинона **6a** са PdCl₂, *cis*-[PdCl₂(dmsO-S)₂] и K₂[PdCl₄] у DMSO-*d*₆ као растварачу. DMSO-*d*₆ је коришћен зато што је погодан за растварање деривата и 2-тиохидантоина и металних соли. Координација **6a** и паладијум(II) јона је праћена кроз промену карактеристичних сигнала у спектрима.⁵⁰⁰

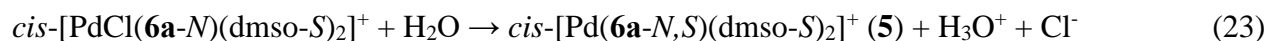
2.5.2.1. Реакција арилиденског деривата 2-тиохидантоина **6a** са *cis*-[PdCl₂(dmsO-S)₂]

¹H NMR спектри реакције 3-((фенилметил)амино)-2-тиоксо-4-имидазолидинона **6a** са *cis*-[PdCl₂(dmsO-S)₂] су приказани на Слици 60. Сигнали координованог **6a** се могу уочити већ у првом спектру. Као што се може видети на Слици 60, сви сигнали су померени ка нижем пољу. Синглет CH₂ групе 2-тиохидантоинског прстена (a) је померен од 3,90 до 4,15 ppm, мултиплети протона бензеновог прстена (b) су померени од 7,25-7,95 ppm до 9,57-8,94 ppm, а синглет СН протона двоструке везе (c) је померен од 8,41 до 9,37 ppm. Сигнали координованог **6a** (a, b и c) се могу уочити од првог спектра и њихови интензитети се не мењају током експеримента. Ово указује на брзу иницијалну координацију, која је чак и превише брза за NMR временску скалу.⁵⁰⁰

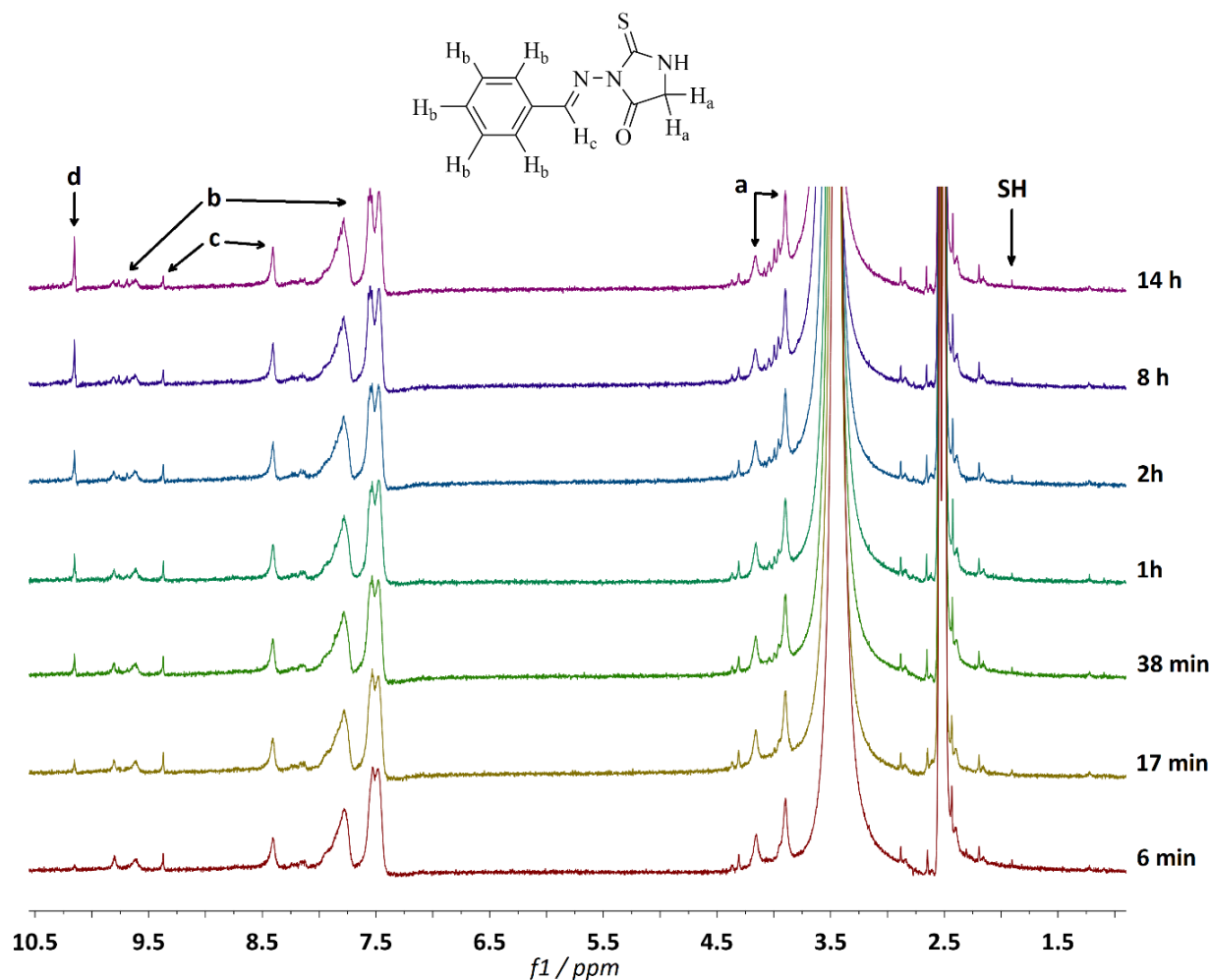
Још једна ствар која указује на координацију је одсуство широког синглета NH протона 2-тиохидантоинског прстена. Познато је да се 2-тиохидантоини налазе у два равнотежна таутомерна облика (Схема 87).⁵⁰¹ Претпоставља се да је тиенолни таутомерни облик одговоран за координацију и да је ова „кето-енолна“ равнотежа померена ка тиенолном облику приликом реакције.²¹² SH протони тиенолног таутомера се могу видети у спектрима као синглет на 1,85 ppm (Слика 60). Додатно, може се уочити нов синглет на 10,15 ppm (d), чији интензитет расте током експеримента. Он потиче од хлороводоничне киселине која настаје депротоновањем 2-тиохидантоинског прстена и супституцијом хлоридних анјона у *cis*-[PdCl₂(dmsO-S)₂].⁵⁰⁰

Претпоставља се да се реакција у целости одвија у два корака. У првом кораку (једначина 22), иницијална координација се одвија преко азота у бочном низу. Ово је бржи корак, што је подржано присуством сигнала комплекса у првом спектру експеримента. Други, спорији корак реакције је депротоновање 2-тиохидантоинског прстена и координовање преко сумпора (једначина 23). Резултујући комплекс је петочлани хелат у коме је паладијум(II) јон координован преко сумпора из тиюхидантоинског прстена и азота двоструке везе бочног низа.⁵⁰⁰





Иако спектрални подаци јасно приказују реакцију између деривата 2-тиохидаптоина **6a** и $cis-[PdCl_2(dmsO-S)_2]$, они нису довољни да би се разоткрио хемизам реакције ван начина координације. Концентрације насталог комплекса су израчунате интеграљењем одговарајућег протонског сигнала на 10,15 ppm (Слика 61). Како хлороводонична киселина настаје еквимоларно са комплексом према једначини 23, концентрације одређене интеграљењем тог сигнала се могу сматрати концентрацијама комплекса. Синглет на 10,15 ppm је интеграљен у односу на синглет некоординованог **6a** на 8,40 ppm. Релативне промене интензитета синглета на 10,15 ppm су директно пропорционалне променама концентрације комплекса и концентрације су израчунате из релативних вредности интеграла.⁵⁰⁰



Слика 60. 1H NMR спектри реакције 3-((фенилметилен)амино)-2-тиоксо-4-имидазолидинона **6a** са $cis-[PdCl_2(dmsO-S)_2]$ у $DMSO-d_6$.⁵⁰⁰

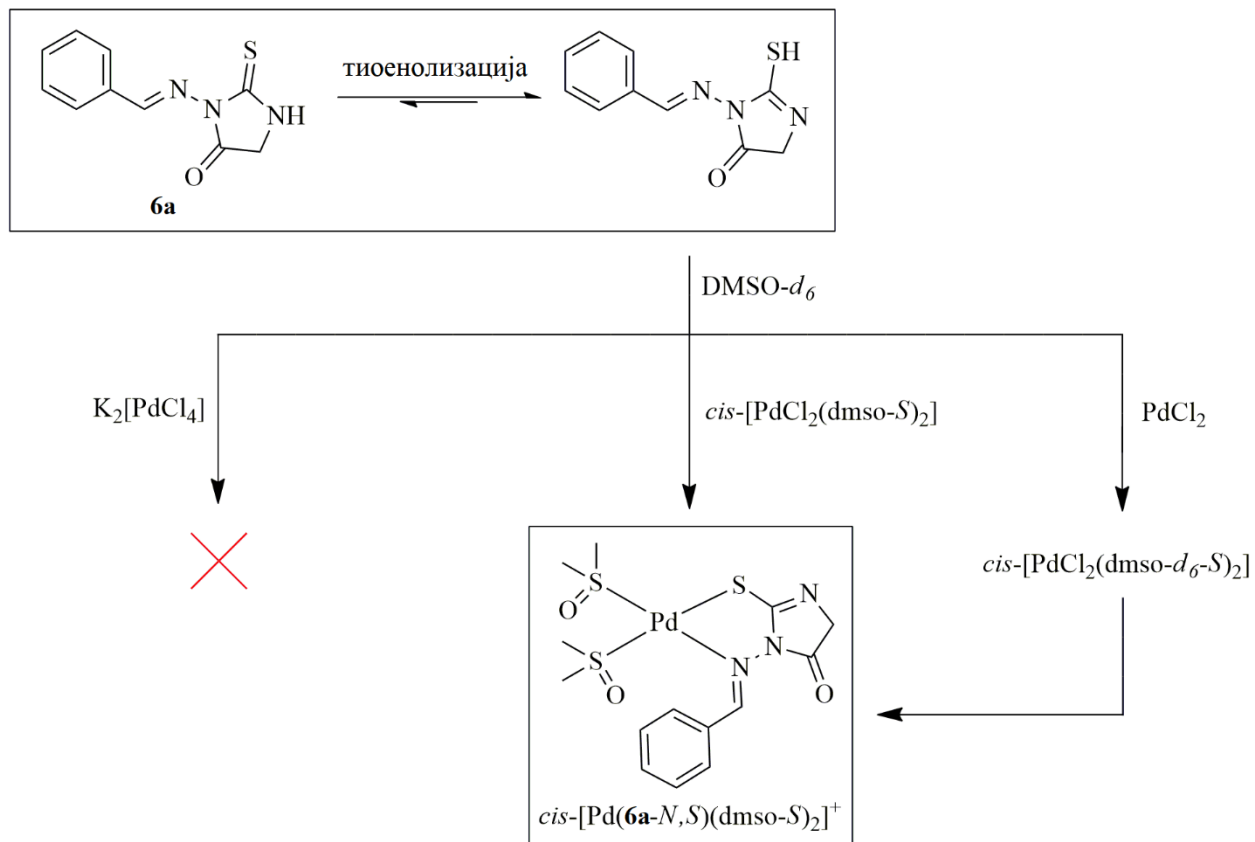
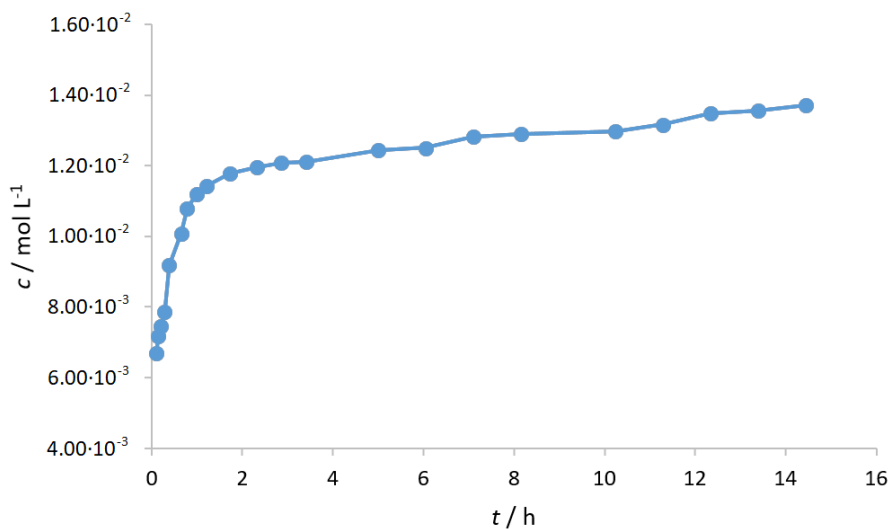


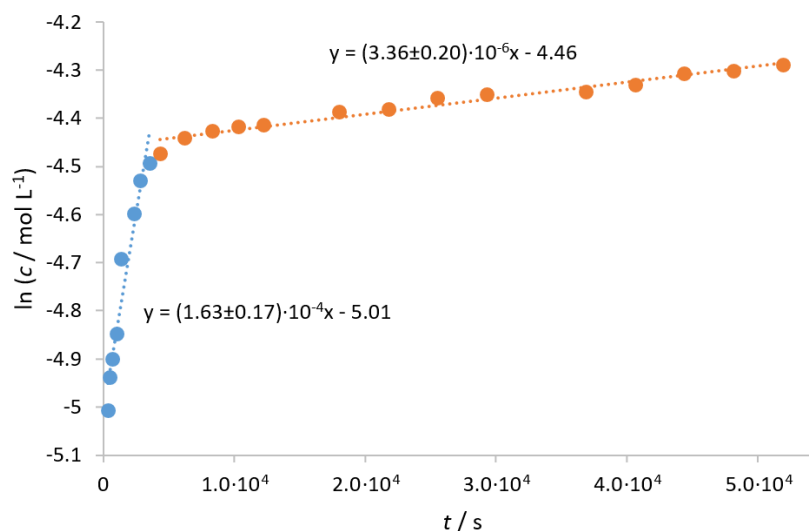
Схема 87. Реакције 3-((фенилметилен)амино)-2-тиоксо-4-имидазолидинона **6a** са PdCl_2 , $\text{cis-}[\text{PdCl}_2(\text{dmsO-S})_2]$ и $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$. Није уочена реакција са $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$ током експеримента.⁵⁰⁰



Слика 61. Промене концентрације производа, $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{6a-N,S})(\text{dmsO-S})_2]^+$, током супституционе реакције $\text{cis-}[\text{PdCl}_2(\text{dmsO-S})_2]$ са **6a** у $\text{DMSO-}d_6$.⁵⁰⁰

На графику се може уочити да се током експеримента, после отприлике сат времена, реакција настајања комплекса успорава драстично. Ако узмемо у обзир стехиометрију система, на крају експеримента се може видети да више од половине почетне количине **6a** не учествује ни у каквој реакцији, што значи да је реакциони систем ипак мало комплекснији и да $cis-[PdCl_2(dmsO-S)_2]$ заправо учествује у више конкурентних реакција.

Како би се добила детаљнија слика о механизму реакције, конструисан је и анализиран график зависности логаритма промене концентрације производа од времена експеримента (Слика 62). На графику се јасно види да ово није типична реакција првог реда, него се виде два линеарна нагиба. Ово је у складу са закључком да се одвија више процеса, а не само реакција **6a** са $cis-[PdCl_2(dmsO-S)_2]$. Током првих сат времена, реакција се може описати једначином $y = (1,63 \pm 0,17) \cdot 10^{-4}x - 5,01$. После отприлике сат времена, кинетика система се мења и може се уочити нови правац са једначином $y = (3,36 \pm 0,20) \cdot 10^{-6}x - 4,46$. Прва фаза ове реакције је значајно бржа, са коефицијентом нагиба $k_1 = 1,63 \cdot 10^{-4} s^{-1}$, док друга фаза има коефицијент нагиба $k_2 = 3,36 \cdot 10^{-6} s^{-1}$. Разлог за промену брзине реакције је промена у реакционом систему. Настаје нова хемијска врста, чија концентрација постаје знатна након сат времена од почетка експеримента.⁵⁰⁰

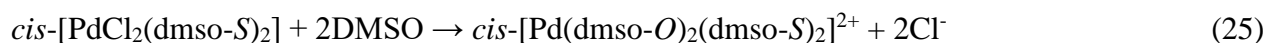
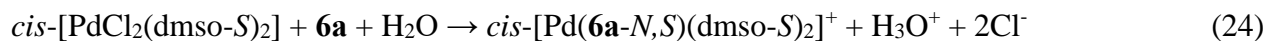


Слика 62. График првог реда супституционе реакције деривата 2-тиохидантоина **6a** са $cis-[PdCl_2(dmsO-S)_2]$ у $DMSO-d_6$.⁵⁰⁰

Комплекс $cis-[PdCl_2(dmsO-S)_2]$ највероватније реагује паралелно и са растварачем, пошто је познато да $cis-[PdCl_2(dmsO-S)_2]$ може реаговати са DMSO, при чему се добија $cis-[Pd(dmsO-O)_2(dmsO-S)_2]^{2+}$.^{502,503} $cis-[PdCl_2(dmsO-S)_2]$ има два молекула DMSO везана у cis конфигурацији преко атома сумпора. DMSO молекули везани преко сумпора испољавају веома јак *trans* ефекат на суседне хлоридо лиганде, који ослабљује њихове везе са паладијумом. Имајући ово у виду, $cis-[PdCl_2(dmsO-S)_2]$, поред реакције са дериватом 2-тиохидантоина **6a**, реагује и са DMSO, градећи тетракис(диметилсулфоксид)паладијум(II), $cis-[Pd(dmsO-O)_2(dmsO-S)_2]^{2+}$, у коме су друга два молекула DMSO везана преко кисеоника. Постоји мало одступање од идеалне квадратно-планарне структуре код $cis-[Pd(dmsO-O)_2(dmsO-S)_2]^{2+}$, највеће код угла између два молекула DMSO везана преко сумпора, због

стерних одбијања између метил група једног молекула DMSO и сулфокси групе другог. Ове стерне сметње онемогућавају везивање осталих молекула преко сумпора, што је и разлог зашто су друга два молекула DMSO везана преко кисеоника.^{500,502}

Током експеримента, *cis*-[PdCl₂(dmsO-S)₂] учествује у две паралелне реакције. Прва је са дериватом 2-тиохидантоина **6a** (једначина 24), а друга је са растварачем, DMSO (једначина 25).



Реакција настајања комплекса је бржа у току прве фазе, првих сат времена експеримента ($k_1 = 1,63 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), док се не успостави динамичка равнотежа и не настане знатна количина *cis*-[Pd(dmsO-O)₂(dmsO-S)₂]²⁺, при чему она (једначина 24) успорава у другој фази ($k_2 = 3,36 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$), зато што се у реакционом систему налази значајно мања количина реактанта, *cis*-[PdCl₂(dmsO-S)₂].⁵⁰⁰

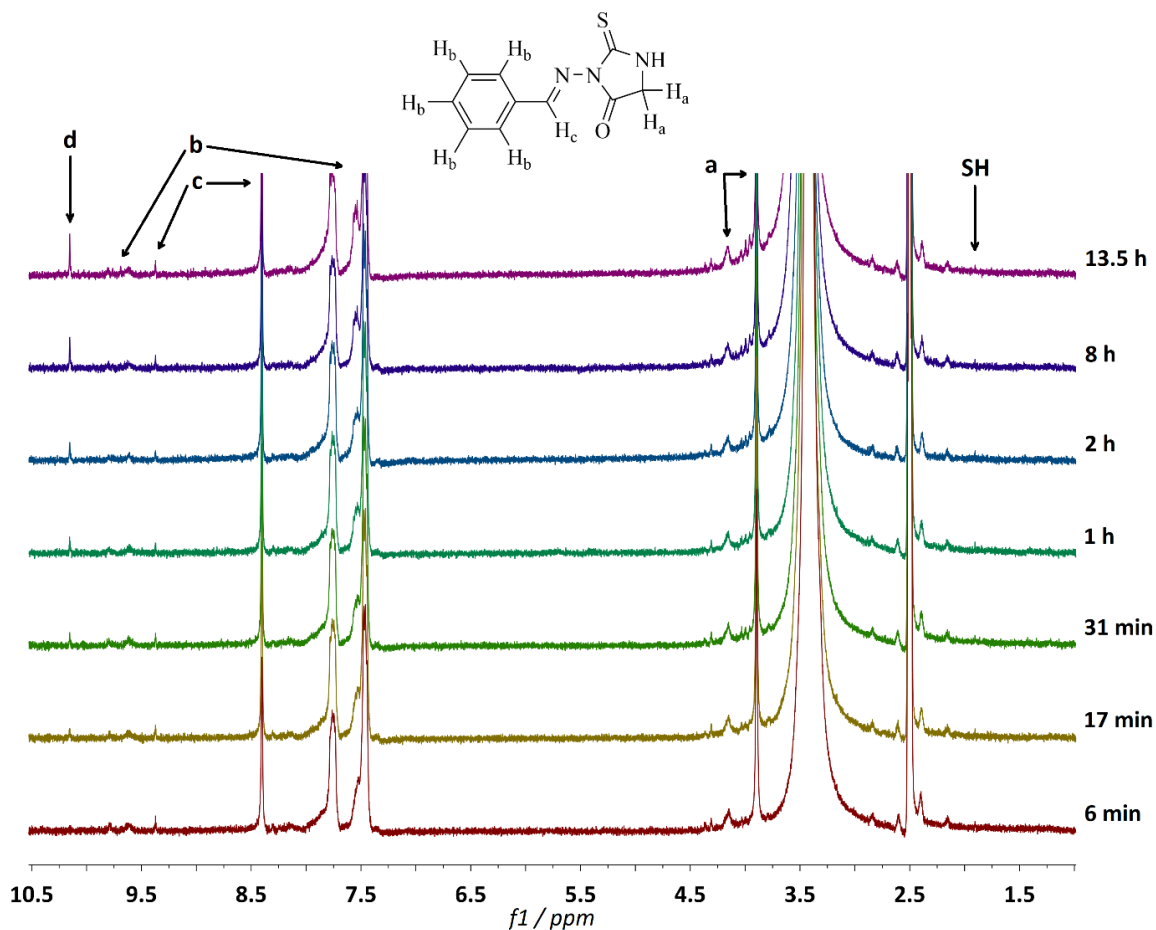
2.5.2.2. Реакција арилиденског деривата 2-тиохидантоина **6a** са PdCl₂

Координација 3-((фенилметил)амино)-2-тиоксо-4-имидазолидинона **6a** у реакцији са PdCl₂ се одвија на исти начин као са *cis*-[PdCl₂(dmsO-S)₂]. У спектрима се могу уочити сви исти сигнали на идентичних хемијским померањима (Слика 63), парови сигнала координованог и некоординованог **6a**, међу којима су синглети протона CH₂ групе 2-тиохидантоинског прстена (а), мултиплети протона бензеновог прстена (b) и синглети NH протона двоструке везе. Синглет SH протона тиоенолног таутомера се налази та 1,85 ppm, широки синглет NH протона 2-тиохидантоинског прстена недостаје, а синглет који потиче од HCl се налази на 10.15 ppm и његов интензитет расте током експеримента.⁵⁰⁰

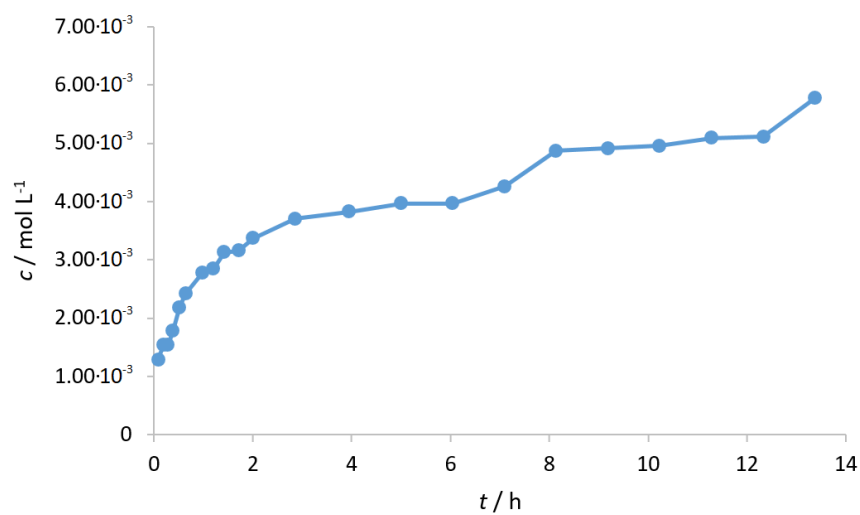
Након рачунања концентрација насталог *cis*-[Pd(**6a-N,S**)(dmsO-S)₂]⁺ комплекса коришћењем спектралних података, уочена је јасна разлика у брзинама реакција и да је реакција са PdCl₂ спорија него са *cis*-[PdCl₂(dmsO-S)₂]. Промене концентрација насталог комплекса током експеримента су приказане на Слици 64. Разлике у кинетици ова два система су помало збуњујуће, пошто се из спектралних података види да у оба случаја настаје исти производ и да се у суштини одвија иста реакција.⁵⁰⁰

Да би се дошло до одговора, конструисан је и анализиран график зависности логаритма концентрације производа реакције од времена експеримента (Слика 65). Као и у реакцији са *cis*-[PdCl₂(dmsO-S)₂], у овом случају постоје две фазе, са два линеарна нагиба, који се секу после мало више од сат времена. Прва фаза се може описати једначином $y = (1,80 \pm 0,22) \cdot 10^{-4}x - 6,59$, док се друга фаза може описати једначином $y = (1,25 \pm 0,09) \cdot 10^{-5}x - 5,77$. Прва фаза, у којој настаје већина комплекса, има коефицијент нагиба $k_1 = 1,80 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, који је приближан коефицијенту нагиба прве фазе реакције са *cis*-[PdCl₂(dmsO-S)₂] ($k_1 = 1,63 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). Познато је да PdCl₂ има велики афинитет према DMSO и лако реагује са њим, дајући *cis*-[PdCl₂(dmsO-S)₂] као производ, према једначини 26.^{500,504}



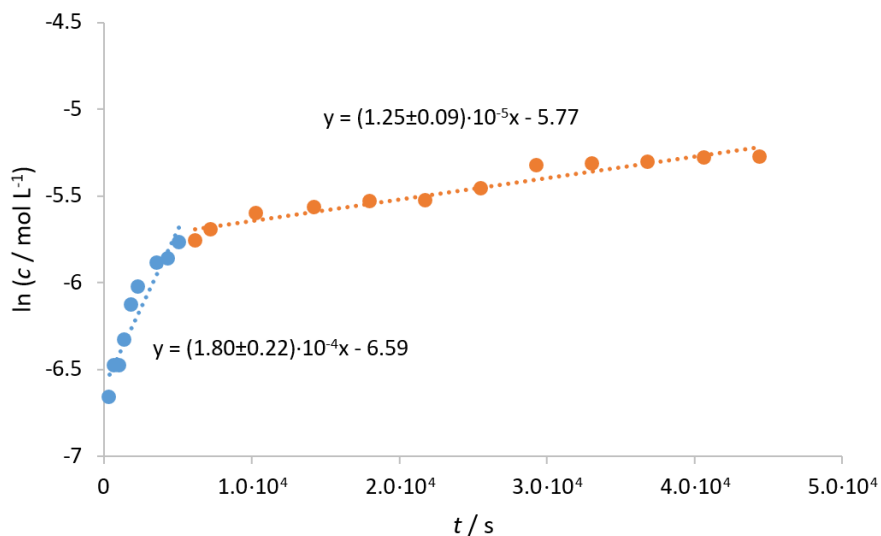


Слика 63. ^1H NMR спектри реакције 3-((фенилметил)амино)-2-тиоксо-4-имидазолидинона **6a** са PdCl_2 у $\text{DMSO-}d_6$.⁵⁰⁰



Слика 64. Промене концентрације производа, $\text{cis-}[\text{Pd}(\mathbf{6a-N,S})(\text{dmsO-S})_2]^+$, током реакције PdCl_2 са **6a** у $\text{DMSO-}d_6$.⁵⁰⁰

Може се закључити да се у оба случаја у суштини одвија иста реакција (једначина 24), што подржавају врло блиске вредности константи k_1 . Реакција је спорија са PdCl_2 зато што сама се не реагује са дериватом 2-тиохидаптоина **6a**. Реакција се одвија тек када настане довољна количина $\text{cis-}[\text{PdCl}_2(\text{dmsO-S})_2]$, тако да се мања брзина реакције са PdCl_2 може објаснити тиме што је концентрација реактанта, $\text{cis-}[\text{PdCl}_2(\text{dmsO-S})_2]$, нижа.⁵⁰⁰



Слика 65. График првог реда реакције деривата 2-тиохидаптоина **6a** са PdCl_2 у DMSO-d_6 .⁵⁰⁰

2.5.2.3. Реакција арилиденског деривата 2-тиохидаптоина **6a** са $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$

У случају треће испитиване соли паладијума(II), $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$, није било реакције са 3-((фенилметилена)амино)-2-тиоксо-4-имидазолидиноном **6a** током експеримента.⁵⁰⁰ У ^1H NMR спектрима нису примећени никакви сигнали било какве врсте 2-тиохидаптоинског комплекса. Четири хлоридо лиганда у $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$ су кинетички еквивалентна и врло је могуће да су сва четири супституисана са DMSO, пошто је познато да тетрахлоридоплатинат(II), као и тетрахлоридопаладат(II) могу реаговати са DMSO на овај начин.⁵⁰⁵ Ова реакција би спречила координацију са дериватом 2-тиохидаптоина **6a**.

2.5.3. Реакција арилиденског деривата 2-тиохидаптоина **6b** са полимерним $\text{trans-}[\text{CuCl}_2(\text{dmsO})_2]_n$ комплексом: неочекивана изомеризација до бинуклеарног $\text{cis-}[\{\text{CuCl}(\text{dmsO})_2\}_2(\mu_2\text{-Cl})_2]$

Комплекси метала са диметилсулфоксидом и осталим сулфоксидима имају разне примене и познати су због својих каталитичких својства и биолошких активности, а користе се и као прекурсорни у синтези неких других координационих једињења.⁵⁰⁶⁻⁵⁰⁸ DMSO молекули, лиганди, у комплексима бабра(II) са општом формулом $[\text{CuX}_2(\text{dmsO})_2]$ (DMSO лиганди су у *trans* положају), као и у комплексима са четири DMSO лиганда, $[\text{Cu}(\text{dmsO})_4](\text{ClO}_4)_2$, су координовани за јон бабра углавном преко атома кисеоника.⁵⁰⁹⁻⁵¹¹ Ипак, постоје и комплекси бабра(II) где је DMSO координован преко атома сумпора, градећи поприлично дуге Cu-S везе.^{512,513} Полимерни $\text{trans-}[\text{CuCl}_2(\text{dmsO})_2]_n$ комплекс је синтетисан и структурно окарактерисан,^{504,509} док *cis* изомер $[\text{CuCl}_2(\text{dmsO})_2]$ није био

окарактерисан јако дуго. Скорије, објављено је настајање бинуклеарног бакар(II) комплекса, $cis\text{-}[\{\text{CuCl}(\text{dmsO})_2\}_2(\mu_2\text{-Cl})_2]$, као последица декомпозиције стајањем тетрануклеарног $[\text{Cu}_4\text{Cl}_8(\text{dmsO})_8(\text{hmta})]$ комплекса (hmta је хексаметилентетрамин).⁵¹⁴

Имајући у виду координациони потенцијал деривата 2-тиохидаптоина, као и значај DMSO комплекса, циљ је био синтеза одговарајућег бакар DMSO 2-тиохидаптоинског комплекса. Ипак, у реакцији 3-[(2-хидроксибензилиден)амино]-2-тиоксоимидазолидин-4-она **66** са $trans\text{-}[\text{CuCl}_2(\text{dmsO})_2]_n$ комплексом, није дошло до настајања одговарајућег бакар(II) тиохидаптоинског комплекса, већ до изомеризације $trans\text{-}[\text{CuCl}_2(\text{dmsO})_2]_n$ до бинуклеарног $cis\text{-}[\{\text{CuCl}(\text{dmsO})_2\}_2(\mu_2\text{-Cl})_2]$.⁵¹⁵

2.5.3.1. Добијање $cis\text{-}[\{\text{CuCl}(\text{dmsO})_2\}_2(\mu_2\text{-Cl})_2]$ комплекса

Полимерни $trans\text{-}[\text{CuCl}_2(\text{dmsO})_2]_n$ је направљен по протоколу у коме се бакар(II)-хлорид раствори у етанолском раствору DMSO.⁵⁰⁴ Евкимоларне количине $trans\text{-}[\text{CuCl}_2(\text{dmsO})_2]_n$ и **66** су мешане у метанолу. Ипак, није дошло до координације, али је настао бинуклеарни $cis\text{-}[\{\text{CuCl}(\text{dmsO})_2\}_2(\mu_2\text{-Cl})_2]$ као коначан стабилан производ (Схема 88). Полазни **66** је скоро потпуно повраћен након реакције.⁵¹⁵

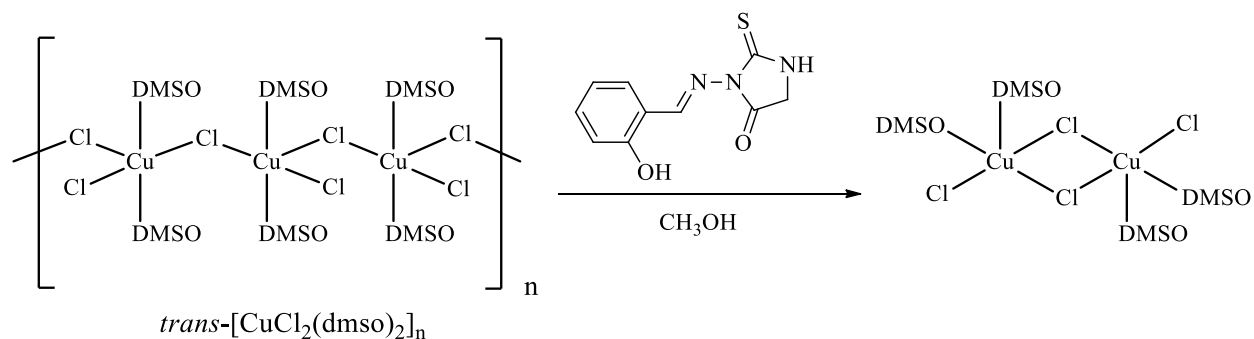
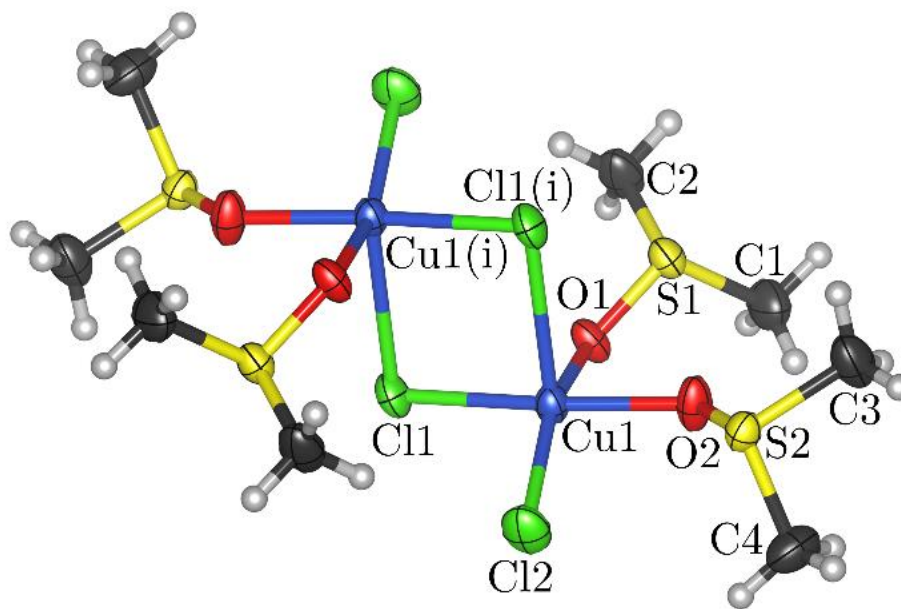


Схема 88. Добијање $cis\text{-}[\{\text{CuCl}(\text{dmsO})_2\}_2(\mu_2\text{-Cl})_2]$ из $trans\text{-}[\text{CuCl}_2(\text{dmsO})_2]_n$.⁵¹⁵

2.5.3.2. Дескрипција кристалне структуре $cis\text{-}[\{\text{CuCl}(\text{dmsO})_2\}_2(\mu_2\text{-Cl})_2]$ комплекса

Молекулска структура $cis\text{-}[\{\text{CuCl}(\text{dmsO})_2\}_2(\mu_2\text{-Cl})_2]$ комплекса је приказана на Слици 66. Структурни параметри комплекса су у одличном слагању (стандардна девијација атомских позиција за све атоме је 0,0283 Å) са већ публикованим параметрима (Табела 18).⁵¹⁴ У циљу ригорознијег поређења, хемијске координате молекулских структура (изостављајући водонине везе), изражене као независне дистанце, d_i , и одговарајуће стандардне несигурности, $\sigma(d_i)$, су израчунате за обе структуре. Иако се у структури комплекса налазе 24 атома који нису водоници ($N = 24$), постоји само 33 независних дужина између њих (формула за рачунање броја независних дужина је $(3N - 6)/2$). Разлике $\Delta\rho_i$ између парова независних дистанци у две структуре, $d(1)_i$ и $d(2)_i$, су испитане у дијаграму вероватноће (Слика 67).⁵¹⁶ Вредности $\delta m_i = \Delta\rho_i / \sigma(\Delta\rho_i)$ су израчунате по једначини 27 за све независне дистанце, учртане у односу на очекиване вредности (α_i) полунормалне расподеле. Одговарајући график је затим анализиран линеарном регресијом:⁵¹⁵

$$\delta m_i = |d(1)_i - d(2)_i| / [\sigma^2(d(1)_i) - \sigma^2(d(2)_i)]^{1/2} \quad (27)$$



Слика 66. Структура $cis\text{-}[\{\text{CuCl}(\text{dmsO})_2\}_2(\mu_2\text{-Cl})_2]$ комплекса.⁵¹⁵

Табела 18. Структурни параметри $cis\text{-}[\{\text{CuCl}(\text{dmsO})_2\}_2(\mu_2\text{-Cl})_2]$ комплекса.⁵¹⁵

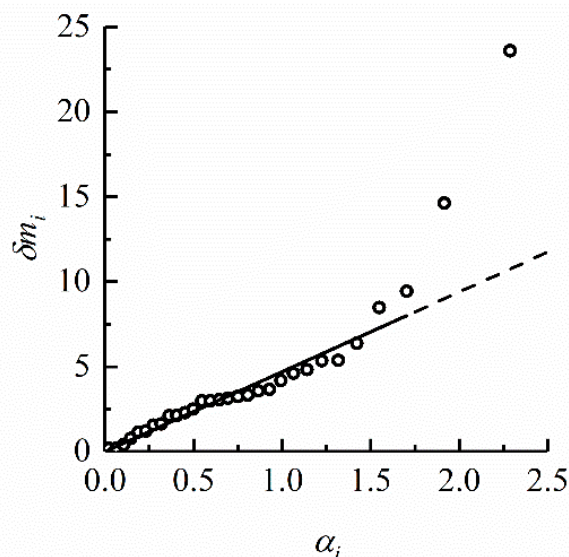
Веза	Дужина, Å	Везе	Угао, °
Cu1–O1	2.0082(16)	O1–Cu1–O2	83.57(7)
Cu1–O2	1.9662(18)	O1–Cu1–Cl1	88.70(5)
Cu1–Cl1	2.2631(7)	O2–Cu1–Cl2	92.71(5)
Cu1–Cl2	2.2484(7)	Cl1–Cu1–Cl2	94.40(3)
Cu1–Cl1(i)	2.7164(8)	O1–Cu1–Cl1(i)	91.62(6)
S1–O1	1.5322(17)	O2–Cu1–Cl1(i)	91.71(7)
S2–O2	1.5300(18)	Cl1–Cu1–Cl1(i)	88.44(2)
S1–C1	1.769(3)	Cl2–Cu1–Cl1(i)	112.26(3)
S1–C2	1.767(3)	O1–Cu1–Cl2	155.96(6)
S2–C3	1.777(3)	O2–Cu1–Cl1	172.26(5)
S2–C4	1.765(3)	Cu1–Cl1–Cu1(i)	91.56(2)

Код симетрије (i) $-x + 1, -y + 1, -z + 1$.

Резултати показују да су, поред два аутлајера, експерименталне девијације нормално распоређене, указујући да нема значајних геометријских разлика између две структуре. Исечак ($-0.01(17)$) и нагиб криве ($4.7(2)$) линеарне регресије, рачунати после одстрањивања два аутлајера, указују на одсуство систематских грешака и подцењивање стандардних несигурности експерименталних међуатомских дистанци за фактор од 4,7. Мора се узети у обзир да су две структуре одређене на значајно различитим температурама (295 K за нашу структуру и 150 K за већ објављену структуру⁵¹⁴), што утиче на величину стандардних несигурности.⁵¹⁵

Кристална структура $cis\text{-}[\{\text{CuCl}(\text{dmsO})_2\}_2(\mu_2\text{-Cl})_2]$ се састоји из центросиметричних динуклеарних молекула, где су $\text{Cu}\cdots\text{Cu}$ дистанце $3,5827(7)\text{ Å}$. $\text{Cu}(\text{II})$ јони су пентакоординовани, са два молекула DMSO и три хлоридна анјона. Бакар-лиганд дужине

веза имају велики опсег од 1,9662(18) до 2,7164(8) Å, због различите природе лигандних атома и специфичности полиедарске координације. Координациона средина Cu(II) јона је деформисана и може да се опише као квадратно пирамидална, тако да основна раван садржи O1, O2, Cl1, Cl2, а у апикалном положају се налази Cl1i (код симетрије (i) $-x + 1, -y + 1, -z + 1$). Три хлоридо лиганда су везана за Cu(II) јон на различитим раздаљинама. Као што је очекивано, најкраћа веза је са немостним хлоридом из базне равни (Cu1-Cl2 = 2,2484(7) Å), затим је веза са мостним хлоридом из базне равни (Cu1-Cl1 = 2,2631(7) Å), а најдужа је са апикалним хлоридо лигандом (Cl1-Cu1 = 2,7164(8) Å).⁵¹⁵

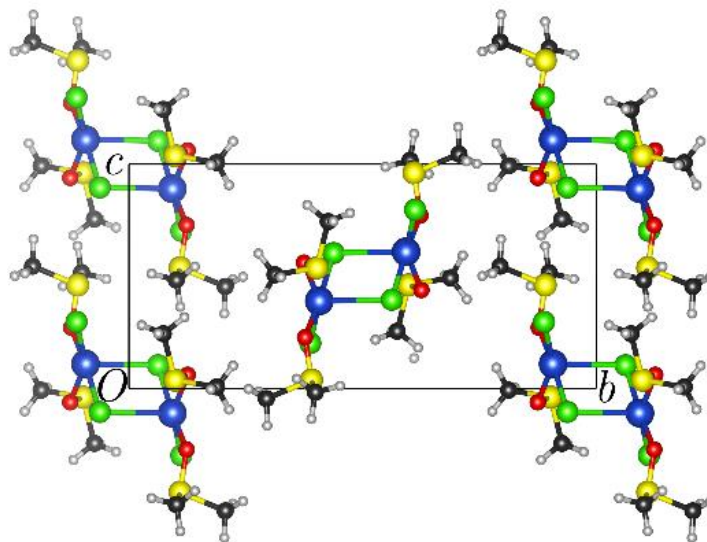


Слика 67. Дијаграм полунормалне расподеле експерименталних девијација између две структурне детерминације $cis\text{-}[\{\text{CuCl}(\text{dmsO})_2\}_2(\mu_2\text{-Cl})_2]$ комплекса. Једначина линеарне регресије је $\Delta t_i = 4.7(2)\alpha_i - 0.01(17)$. Пирсонов коефицијент корелације $R = 0.976$.

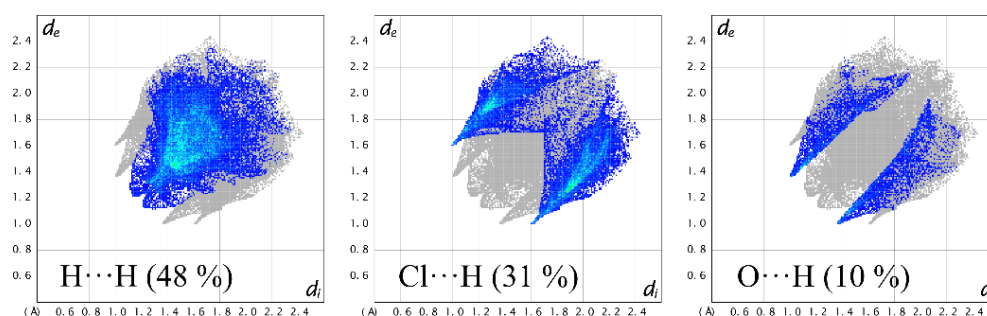
Степен координационе деформације полиедра је одређен на основу више критеријума. Најједноставнији, Адисонов (Addison) индекс тригоналности,⁵¹⁷ који има вредност 0 за квадратну пирамиду са једнаким *trans*-базалним угловима (SPY-5) и 1 за савршену тригоналну бипирамиду (ТВРУ-5), има вредност 0,27 за $cis\text{-}[\{\text{CuCl}(\text{dmsO})_2\}_2(\mu_2\text{-Cl})_2]$. Сложенија анализа Холмсовом (Holmes) методом⁵¹⁸ је показала мало другачије углове дисторзије, пошто проценат на Беријевој (Berry) псеудоротационој координати $C4v \rightarrow C2v \rightarrow D3h$ износи 39,7 (изабрана референтна SPY-5 има *trans*-базални угао од 150°). На крају, када су деформације анализирани континуалним мерењима облика, према којима је координациони полиедар ближи SPY-5 (CShM = 2,175 ако су *trans*-базални углови референтног облика 150°, а CShM = 3,005 ако су *trans*-базални углови референтног облика 174°) него ТВРУ-5 (CShM = 3,496). Ове CShM вредности указују на значајна одступања од референтних облика и рачунање Беријевих псеудоротационих координати није поуздано, јер су одступања испитаног полиедра на минималном дисторзионом путу од SPY-5 до ТВРУ-5 превише велика. Да би се изоставио утицај разлике у дужинама бакар-лиганд веза и да би резултати били упоредиви са Холмсовом методом, прорачуни континуалних мерења облика су били извршени и са уједначеним дужинама координационих веза. Овај резултат је показао да је полиедар на 41,3% минималног дисторзионог пута између SPY-5 (са *trans*-

базалним углом од 174°) и ТВРУ-5, што је у добром слагању са вредностима добијеним Холмсовом методом.⁵¹⁵

Молекулко паковање у кристалној структури *cis*-[CuCl(dmsO)₂]₂(μ₂-Cl)₂ комплекса је приказано на Слици 68. Хиршфелдова анализа површине комплекса је показала доминантне интермолекулске контакте, Н···Н су најприсутнији (48%), затим Cl···Н (31%) и О···Н (10%), што је приказано у „fingerprint“ дијаграмима на Слици 69.⁵¹⁵



Слика 68. Кристално паковање *cis*-[CuCl(dmsO)₂]₂(μ₂-Cl)₂ кристала посматрано дуж кристалографске *a* осе.⁵¹⁵



Слика 69. „Fingerprint“ дијаграми *cis*-[CuCl(dmsO)₂]₂(μ₂-Cl)₂ комплекса.⁵¹⁵

Прорачуни односа обогаћења су показали да су Cl···Н и О···Н интермолекулски контакти обогаћени ($E_{\text{ClH}} = 1,33$; $E_{\text{OH}} = 1,37$), S···Н и Н···Н су благо осиромашени ($E_{\text{SH}} = 0,84$; $E_{\text{HH}} = 0,91$), док су Cl···S, Cl···Cl, Cl···О и О···О значајно или потпуно избегнути ($E_{\text{ClS}} = 0,52$; $E_{\text{ClCl}} = 0$; $E_{\text{ClO}} = 0$; $E_{\text{OO}} = 0$) у кристалној структури *cis*-[CuCl(dmsO)₂]₂(μ₂-Cl)₂. Cl···Н и О···Н интермолекулски контакти обухватају водоникове атоме С3 и С4 метил група, као и вршње Cl1(i) и О1 атоме. Резултати Хиршфелдове анализе, укључујући појединачне елементарне контакте, као и односе обогаћења контаката, су приказани у Табели 19.⁵¹⁵

Табела 19. Резултати Хиришфелдове анализе интрамолекулских контаката *cis*-[CuCl(dms_o)₂]₂(μ₂-Cl)₂ комплекса.⁵¹⁵

Атом	Елементарни контакти, %					
	Cu	Cl	S	O	C	H
Cu	0	0	0	0	0	1,4
Cl	0	0	0,4	0	0	18,0
S	0	0,4	1,5	0	0	3,5
O	0	0	0	0	0	5,3
C	0	0	0	0	0	0
H	1,3	12,5	2,5	4,8	0	48,4
Односи обогаћења контаката						
	Cu	Cl	S	O	C	H
Cu	-	-	-	-	-	-
Cl	-	0,00	-	-	-	-
S	-	0,52	-	-	-	-
O	-	0,00	-	0,00	-	-
C	-	-	-	-	-	-
H	-	1,33	0,84	1,37	-	0,91

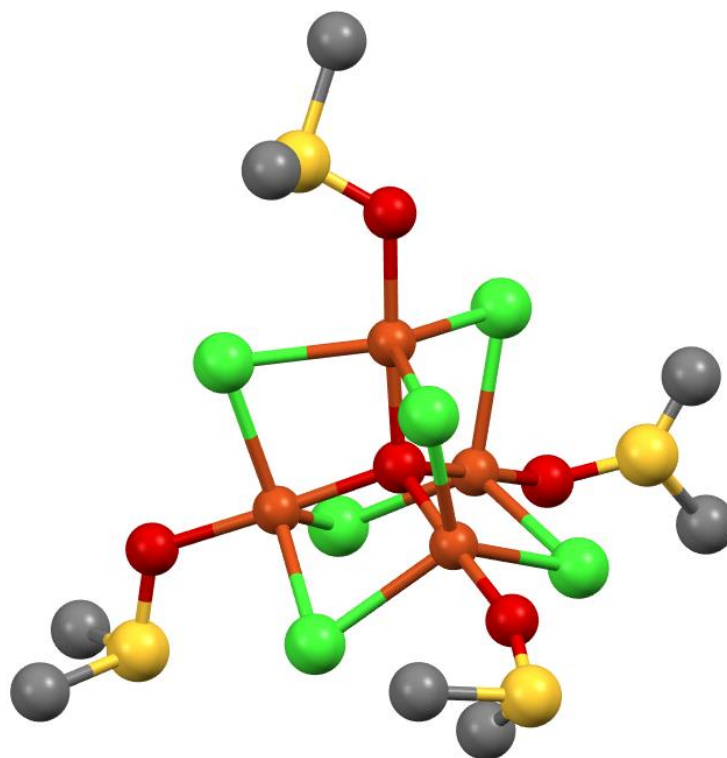
2.5.3.3. Изомеризација и стабилност *cis*-[CuCl(dms_o)₂]₂(μ₂-Cl)₂ комплекса

До сада је објављена само једна процедура за добијање *cis*-[CuCl(dms_o)₂]₂(μ₂-Cl)₂, заснована на разлагању тетрануклеарног [Cu₄Cl₈(dms_o)₈(hmta)] комплекса. Треба нагласити да је *cis* конфигурација молекула DMSO у *cis*-[CuCl(dms_o)₂]₂(μ₂-Cl)₂ комплексу пренешена директно из [Cu₄Cl₈(dms_o)₈(hmta)], док је *trans*-[CuCl₂(dms_o)₂]_n изомер увек био коначан стабилни производ. Кристали основног комплекса, остављени у матичном раствору (после око недељу дана) су се полако распадали, а комплекс *cis*-[CuCl(dms_o)₂]₂(μ₂-Cl)₂ је добијен као последица тог процеса. Нађено је да се кристали *cis*-[CuCl(dms_o)₂]₂(μ₂-Cl)₂ полако трансформишу (после 1-2 недеље), при чему се добија само *trans*-[CuCl₂(dms_o)₂]_n.⁵¹⁴

Изомеризација *trans*-[CuCl₂(dms_o)₂]_n до *cis* облика се претпоставља да се догодила услед утицаја деривата 2-тиохидаптоина **66**.⁵¹⁵ Да би се ово потврдило, урађен је једноставан контролни експеримент. Реакција је извршена под истим реакционим условима, само без деривата 2-тиохидаптоина **66**. У одсуству **66** се не добија *cis* изомер комплекса, али, што је интересантније, добија се инверзан координациони комплекс са кисеоником у координационом центру, чија је структура потврђена рендгенском структурном анализом (Слика 70). Четири атома бабра су тетрадарски координована за централни кисеоник, док је за атоме бабра тригонално бипирамидално координовано шест мостних хлорида и четири молекула DMSO. Инверзна координација је релативно нов концепт. Идеја да се у центру координационе сфере налази нешто друго осим јона метала се до скоро сматрала радикалном. До сада је познат поприличан број једињења овог типа, углавном са халкогеном, халкогеном или пниктогеном у координационом центру (најчешће је то кисеоник).⁵¹⁹

Пошто се у овом случају није добио *cis* изомер комплекса, може се закључити да 3-[(2-хидроксибензилиден)амино]-2-тиоксоимидазолидин-4-он **66** има кључну улогу у изомеризацији. На основу досадашњих резултата, може се претпоставити да се гради нестабилни интермедијерни комплекс са **66**, у коме су DMSO лиганди, због своје величине

и стерних сметњи које прави **6b** у *cis* положају један у односу на други. По раскидању везе са **6b**, DMSO лиганди задржавају *cis* конфигурацију током грађења динуклеарног комплекса.



Слика 70. Инверзан координациони комплекс $[Cu_4Cl_6(dmsO)_4O]$ са кисеоником у координационом центру, добијен из $trans-[CuCl_2(dmsO)_2]_n$, без присуства **6b**.

2.5.3.4. Одређивање антимикуробне активности $cis-[\{CuCl(dmsO)_2\}_2(\mu_2-Cl)_2]$

Резултати антимикуробног есеја су показали да ниједан од тестираних комплекса није показао антибактеријску активност према ESKAPE патогенима и тестираним *Candida* врстама, осим умерене активности према *Candida krusei*. Комплекс $cis-[\{CuCl(dmsO)_2\}_2(\mu_2-Cl)_2]$ има бољу антифунгалну активност од $trans-[CuCl_2(dmsO)_2]_n$ за *C. krusei* ATCC 62528 са МИС (од енгл. minimum inhibitory concentration) вредностима од 125 и 250 μ M респективно. Иако је *Candida albicans* најчешћи фунгални изолат добијен из крви пацијената са инвазивном фунгалном инфекцијом, епидемиолошке студије извршене у задњих двадесет година су показале повишен тренд инфекција других *Candida* врста, као што су *C. glabrata* и *C. krusei*.⁵²⁰ Штавише, *C. krusei* је идентификована као главни узрок кандидемije у неким хематолошким малигнитетима, нарочито код пацијената са неутропенијом изазваном хемотерапијом.⁵²⁰ Сагледани заједно, ови резултати указују на то да се тестирана једињења могу разматрати као кандидати за даљу дериватизацију, у циљу побољшања антифунгалне активности.⁵¹⁵

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. Опште напомене

Све хемикалије и реагенси су комерцијално доступни (Sigma-Aldrich или Acros), високе чистоће и коришћени су без даљег пречишћавања. Растварачи су пречишћавани дестилацијом пре употребе и сушени стандарним поступцима.

Естри аминокиселина су добијени добро познатом методом у којој се користи HCl растворен у метанолау.⁵²¹ *O*-Алкил деривати ванилина су добијени по претходно објављеном протоколу.^{522,523}

IR спектри су снимљени на Perkin-Elmer FT-IR спектрометру, модел Spectrum One у облику KBr пилула, пошто су сви узорци чврсти. NMR спектри су снимљени на Varian Gemini 2000 NMR спектрометру на 200 MHz у CDCl₃ или DMSO-*d*₆ као растварачу. Тетраметилсилан ($\delta = 0,0$ ppm), је коришћен као интерни стандард и хемијска померања су заокружена на најближи 0,01 ppm. Елементарна анализа је урађена на Vario ELIII CHNSO анализатору у Лабораторији за микроанализу, Хемијског Факултета, Универзитета у Београду. Дифракциони подаци су прикупљени на Oxford Diffraction Gemini S дифрактометру у ω -scan режиму, опремљеним са MoK α X-гау извором зрачења у изолованој туби и Sapphire CCD детектором. Прикупљање и редукација података су изведени помоћу CrysAlisPRO.⁵²⁴ „Multi-scan“ методом су проверене тачности адсорпционих ефеката.⁵²⁵ Кристалне структуре су решене помоћу SHELXT,⁵²⁶ а утачњене помоћу SHELXL.⁵²⁷ Сви атоми осим атома водоника су утачњавани анизотропски. ShelXle софтвер је коришћен за процедуре утачњавања.⁵²⁸ Platon⁵²⁹ и Mercury⁵³⁰ су коришћени за валидацију модела кристалне структуре.

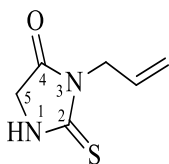
3.2. Опште синтетичке процедуре

3.2.1. Синтеза метил естара аминокиселина (2а-љ)

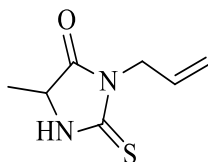
У балону са округлим дном 5 mL метанола је охлађено у леденом купатилу на 0 °C. Ацетил-хлорид (2 mL) је полако укапаван и смеша је мешана 20 минута на 0 °C. Аминокиселина (**1**) (5 mmol) је додата у једној порцији и смеша је остављена да се меша преко ноћи на собној температури. Растварач је уклоњен под вакуумом и чврст хидрохлорид метил естра аминокиселине (**2**) је коришћен без даљег пречишћавања. Успешност естерификације је потврђена ¹H NMR спектроскопијом.

3.2.2. Синтеза алкенилских аминокиселинских деривата 2-тиохидаптоина (3а-љ)

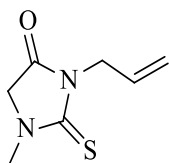
Смеша 5 mmol хидрохлорида метил естра аминокиселине (**2**), 5 mmol триетиламина и 5 mL CH₂Cl₂ или CHCl₃ је мешана 20 минута на собној температури до растварања естра. Алил-изотиоцијанат (5 mmol) је укапаван полако и реакциона смеша је загревана под рефлуксом 7 сати. Реакциона смеша је потом охлађена до собне температуре и растварач упарен под вакуумом. Чврсти остатак је растворен у CH₂Cl₂, испран водом и сушен преко анхидрованога Na₂SO₄. Растварач је још једном уклоњен под вакуумом и сиров чврсти производ је прекристалисан из смеше CH₂Cl₂ и хексана.



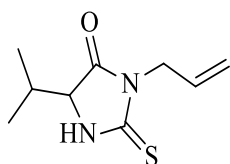
3-Алил-2-тиоксоимидазолидин-4-он (**3а**). Браонкасто жути штапићасти кристали. Принос: 0,471 g (60%). IR (KBr) ν_{max} : 3225, 2923, 1751, 1650, 1526, 1430, 1343, 1259, 1173, 929, 697 cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7,78 (bs, 1H, NH), 5,86 (ddt, $J = 5,8, 10,2, 17,2$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,99–5,35 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,37 (dt, $J = 1,2$ и 6,0 Hz, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,17 (d, $J = 1,4$ Hz, 2H, CH_2-NH) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 184,64, 171,05, 130,46, 118,68, 48,49, 43,32 ppm.



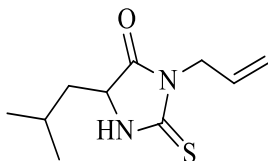
3-Алил-5-метил-2-тиоксоимидазолидин-4-он (**3б**). Жућкасти игличасти кристали. Принос: 0,435 g (51%). IR (KBr) ν_{max} : 3170, 3012, 2920, 1743, 1647, 1538, 1429, 1346, 1263, 1171, 927, 636 cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7,22 (bs, 1H, NH), 5,87 (ddt, $J = 5,6, 10,2, 17,2$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,19–5,32 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,43 (dt, $J = 1,2$ и 6,0 Hz, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,21 (q, $J = 6,8$ Hz, 1H, $\text{CH}-\text{NH}$), 1,49 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 183,48, 174,12, 130,55, 118,46, 54,91, 43,28, 16,99 ppm.



3-Алил-1-метил-2-тиоксоимидазолидин-4-он (**3в**). Бели ситни кристали. Принос: 0,827 g (97%). IR (KBr) ν_{max} : 3470, 3082, 2918, 1739, 1520, 1392, 1350, 1251, 1193, 956, 922, 606 cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 5,86 (ddt, $J = 5,8, 10,2, 17,0$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,16–5,34 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,43 (d, $J = 5,8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,05 (s, 2H, $\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$), 3,34 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 182,80, 169,79, 130,72, 118,39, 53,80, 44,11, 34,03 ppm.

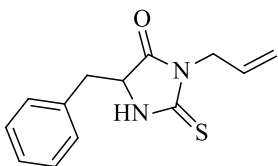


3-Алил-5-изопропил-2-тиоксоимидазолидин-4-он (**3г**). Жућкасти игличасти кристали. Принос: 0,807 g (81%). IR (KBr) ν_{max} : 3292, 3093, 2963, 1725, 1648, 1512, 1428, 1355, 1254, 1171, 929, 664 cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7,61 (bs, 1H, NH), 5,85 (ddt, $J = 5,8, 10,2, 17,0$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,18–5,32 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,42 (d, $J = 5,6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,00 (dd, $J = 1,4$ и 2,0 Hz, 1H, $\text{CH}-\text{NH}$), 2,19–2,38 (m, 1H, $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 1,08 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H, CH_3), 0,94 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H, CH_3), ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 183,94, 173,09, 130,56, 118,52, 64,60, 43,09, 30,87, 18,82, 16,34 ppm.

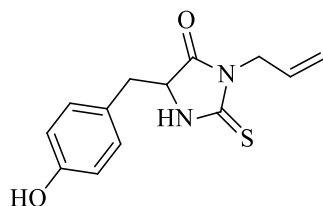


3-Алил-5-изобутил-2-тиоксоимидазолидин-4-он (**3д**). Бели ситни игличасти кристали. Принос: 1,022 g (96%). IR (KBr) ν_{max} : 3181, 3006, 2956, 1754, 1650, 1534, 1433, 1346, 1253, 1175, 926, 656 cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7,78 (bs, 1H, NH), 5,86 (ddt, $J = 5,8, 10,0, 17,0$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,19–5,30 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,42 (dd, $J = 1,2$ и 5,6 Hz, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,14 (dd, $J = 2,6$ и 9,6 Hz, 1H, $\text{CH}-\text{NH}$), 1,52–1,90 (m, 3H, $\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 0,98 (d, $J = 6,0$ Hz, 6H, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ

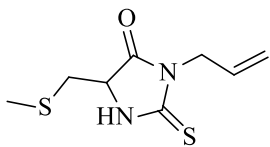
183,47, 174,01, 130,53, 118,44, 57,94, 43,21, 40,40, 25,26, 23,04, 21,55 ppm.



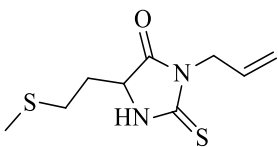
3-Алил-5-бензил-2-тиоксоимидазолидин-4-он (**3h**). Ситни бели игличасти кристали. Принос: 0,995 g (81%). IR (KBr) ν_{max} : 3205, 3033, 2920, 1749, 1647, 1524, 1428, 1344, 1250, 1175, 931, 732, 651 cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7,18–7,40 (m, 6H, Ar-H, NH), 5,72 (ddt, $J = 5,8, 10,4, 17,0$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,01–5,19 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,36 (dd, $J = 1,6$ и 5,6 Hz, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,31 (d, $J = 3,8$ Hz, 1H, $\text{CH}-\text{NH}$), 3,33 (dd, $J = 3,6$ и 14,0 Hz, 1H, $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2$), 2,89 (dd, $J = 9,0$ и 14,0 Hz, 1H, $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2$), ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 183,43, 172,63, 134,59, 130,36, 129,06, 127,67, 118,34, 60,42, 43,21, 37,61 ppm.



3-Алил-5-(4-хидроскибензил)-2-тиоксоимидазолидин-4-он (**3e**). Ситни жути кристали. Принос: 0,671 g (51%). IR (KBr) ν_{max} : 3258, 3013, 2925, 1726, 1650, 1528, 1437, 1263, 1171, 960, 653 cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7,07 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H, Ar-H, NH), 6,78 (d, $J = 6,4$ Hz, 2H, Ar-H), 5,73 (ddt, $J = 5,6, 10,2, 17,0$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,00–5,19 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,0 (bs, 1H, OH), 4,34 (dt, $J = 4,0$ и 5,4 Hz, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,28 (ddd, $J = 0,8, 3,8$ и 8,6 Hz, 1H, $\text{CH}-\text{NH}$), 3,23 (dd, $J = 3,6$ и 14,0 Hz, 1H, $\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2$), 2,84 (dd, $J = 8,6$ и 14,0 Hz, 1H, $\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2$) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 183,48, 172,75, 155,13, 130,40, 126,54, 118,34, 115,93, 60,59, 43,21, 36,73 ppm.

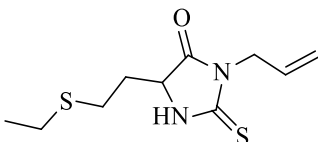


3-Алил-5-((метилтио)метил)-2-тиоксоимидазолидин-4-он (**3z**). Светло наранџасти игличасти кристали. Принос: 0,926 g (86%). IR (KBr) ν_{max} : 3182, 3087, 2915, 1743, 1648, 1526, 1427, 1343, 1254, 1175, 921, 639 cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7,41 (bs, 1H, NH), 5,75–5,98 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,19–5,34 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,44 (d, $J = 5,4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,29 (dd, $J = 3,4$ и 8,2 Hz, 1H, $\text{CH}-\text{NH}$), 3,11 (dd, $J = 3,6$ и 14,0 Hz, 1H, $\text{S}-\text{CH}_2$), 2,73 (dd, $J = 9,4$ и 14,0 Hz, 1H, $\text{S}-\text{CH}_2$), 2,19 (s, 3H, CH_3-S) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 183,70, 172,14, 130,42, 118,59, 58,50, 43,42, 35,84, 16,21 ppm.

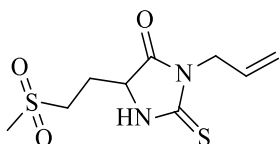


3-Алил-5-((метилтио)етил)-2-тиоксоимидазолидин-4-он (**3z**). Светло наранџасти игличасти кристали. Принос: 0,938 g (82%). IR (KBr) ν_{max} : 3169, 3002, 2921, 1741, 1646, 1531, 1432, 1346, 1255, 1165, 923, 650 cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7,81 (bs, 1H, NH), 5,86 (ddt, $J = 5,8, 10,2, 17,2$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,18–5,32 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,43 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,28 (ddd, $J = 1,2, 4,2$ и 7,4 Hz, 1H, $\text{CH}-\text{NH}$), 2,68 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, $\text{S}-\text{CH}_2$), 2,12 (s, 3H, CH_3-S), 2,18–2,34 (m, 1H, $\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 2,01 (septet, $J = 6,8$ Hz, 1H, $\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), ppm. ^{13}C NMR (50 MHz,

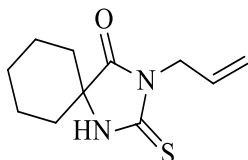
CDCl₃) δ 183,54, 173,42, 130,50, 118,58, 58,52, 43,34, 30,42, 30,30, 15,30 ppm.



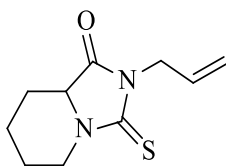
3-Алил-5-((етилтио)етил)-2-тиоксоимидазолидин-4-он (**3и**). Жућкасти игличасти кристали. Принос: 1,122 g (92%). IR (KBr) ν_{max} : 3310, 3085, 2924, 1724, 1648, 1510, 1432, 1354, 1254, 1191, 930, 625 cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 8,22 (bs, 1H, NH), 5,86 (ddt, J = 5,8, 10,0, 17,0 Hz, 1H, CH=CH₂), 5,19–5,30 (m, 2H, CH=CH₂), 4,42 (d, J = 5,6 Hz, 2H, CH₂-CH=CH₂), 4,32 (dd, J = 4,8 и 8,2 Hz, 1H, CH-NH), 2,71 (t, J = 6,8 Hz, 2H, S-CH₂-CH₂), 2,60 (q, J = 7,2 Hz, 2H, CH₃-CH₂-S), 2,19–2,36 (m, 1H, S-CH₂-CH₂), 2,00 (septet, J = 6,4 Hz, 1H, S-CH₂-CH₂), 1,27 (t, J = 7,2 Hz, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 183,41, 173,51, 130,47, 118,48, 58,48, 43,25, 38,82, 27,66, 25,77, 14,57 ppm.



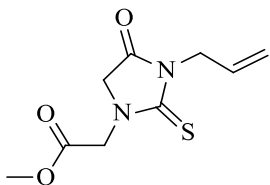
3-Алил-5-(2-(метилсулфонил)етил)-2-тиоксоимидазолидин-4-он (**3ј**). Бели ситни кристали. Принос: 0,494 g (37%). IR (KBr) ν_{max} : 3494, 3132, 3079, 2984, 2897, 1792, 1444, 1355, 1265, 1149, 1117, 1054, 1023, 843, 782, 727 cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7,53 (bs, 1H, NH), 5,86 (ddt, J = 5,8, 10,2, 17,2 Hz, 1H, CH=CH₂), 5,20–5,33 (m, 2H, CH=CH₂), 4,43 (d, J = 5,8 Hz, 2H, CH₂-CH=CH₂), 4,34 (t, J = 6,4 Hz, 1H, CH-NH), 3,25 (dt, J = 3,4 и 7,0 Hz, 2H, SO₂-CH₂), 3,01 (s, 1H, CH₃-S), 2,23–2,59 (m, 2H, SO₂-CH₂-CH₂) ppm. ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 183,54, 172,63, 130,36, 118,93, 57,27, 50,39, 43,45, 41,39, 24,44 ppm.



3-Алил-2-тиоксо-1,3-дiazаспиро[4,5]декан-4-он (**3к**). Браонкасто наранџасти четворострани плочасти кристали. Принос: 1,007 g (90%). IR (KBr) ν_{max} : 3271, 3180, 2939, 1745, 1716, 1651, 1508, 1427, 1215, 1099, 930, 642 cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 8,71 (bs, 1H, NH), 5,86 (ddt, J = 5,4, 10,0, 17,4 Hz, 1H, CH=CH₂), 5,15–5,26 (m, 2H, CH=CH₂), 4,42 (dt, J = 1,6 и 4,0 Hz, 2H, CH₂-CH=CH₂), 1,12–1,98 (m, 10H, (CH₂)₅) ppm. ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 181,96, 176,33, 130,71, 117,90, 64,28, 42,94, 32,98, 24,38, 21,66 ppm.



2-Алил-3-тиоксохексахидроимидазо[1,5-а]пиридин-1(5H)-он (**3л**). Светло жута течност. Принос: 0,908 g (86%). IR (KBr) ν_{max} : 2946, 2927, 2858, 1745, 1495, 1446, 1356, 1246, 1204, 1124, 932, 770, 654 cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 5,86 (ddt, J = 5,6, 10,2, 17,2 Hz, 1H, CH=CH₂), 5,14–5,27 (m, 2H, CH=CH₂), 4,75–4,87 (m, 1H, N-CH-C=O), 4,43 (d, J = 5,6 Hz, 2H, CH₂-CH=CH₂), 3,91 (dd, J = 4,4 и 8,0 Hz, 1H, CH₂-CH₂-N), 3,05 (dt, J = 3,2 и 12,8 Hz, 1H, CH₂-CH₂-N), 1,19–2,34 (m, 6H, CH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-N) ppm. ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 179,07, 172,80, 130,79, 117,68, 59,73, 43,54, 43,22, 27,79, 24,78, 22,57 ppm.



Метил-2-(3-алил-4-оксо-2-тиоксоимидазолидин-1-ил)-ацетат (**3j**). Ситни жути кристали. Принос: 0,613 g (54%). IR (KBr) ν_{max} : 3271, 3079, 2955, 1751, 1646, 1493, 1352, 1233, 1164, 940, 645 cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 5,87 (ddt, $J = 5,6, 10,4, 17,0$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,17–5,33 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,62 (s, 2H, N-(C=O)- CH_2 -N), 4,46 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H, CH_2 - $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,18 (s, 2H, CH_2 -COO), 3,80 (s, 3H, CH_3 -O) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 184,13, 169,84, 167,87, 130,48, 118,50, 52,60, 52,40, 47,40, 44,39 ppm.

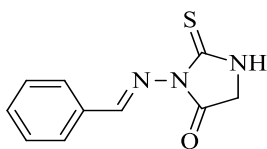
3.2.3. Синтеза *O*-алкил деривата ванилина (**4j**-љ)

Ванилин **4g** и *O*-метил ванилин **4d** су комерцијално доступна једињења. *O*-Етил ванилин **4h** је добијен по процедури у којој се користи диетил-сулфат.⁵²² Ванилин (10 mmol) растворен у 100 mL кључале воде се загрева на парном купатилу. Порција од 4 mL 20% раствора NaOH се загрева до 100 °C и додаје одједном у врућу смешу ванилина и воде. Загревање се наставља и 13,5 mmol диетил-сулфата се додаје полако у порцијама. Након додавања диетил-сулфата, које траје око 1,5 h, реакциона смеша се загрева још 45 минута и додатна количина од 2,2 mmol диетил-сулфата се додаје истом брзином као претходна количина. Након додавања ове количине етил-сулфата, смеша треба да покаже киселу реакцију. У реакциону смешу се потом додаје NaOH до благо базне реакције и додавање диетил-сулфата и NaOH се понавља још два пута, док се не дода укупна количина од 22,5 mmol диетил-сулфата. Реакционој смеси се затим додаје 2 mL раствора NaOH и загрева се још 20 минута. Реакциона смеша се брзо охлади на собну температуру уз континуално мешање и производ се екстрахује диетил-етром (3×10 mL). Комбиновани етарски екстракти се суше преко анхидрованог MgSO_4 и етар се упарава, при чему заостаје жуто уље које стајањем очврсне.

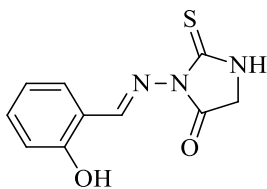
O-Алкил деривати ванилина **4j**-љ су синтетисани по познатом протоколу у којем се користе алкил-халодениди са калијум-карбонатом у ацетону.⁵²³ Смеша ванилина (10 mmol), одговарајућег алкил-халогенида (25 mmol) и анхидрованог K_2CO_3 (32,6 mmol) у 40 mL ацетона је загревана под рефлуксом 3 h. Смеша је охлађена до собне температуре и затим изливена у хладну воду. Производи су екстраховани етил-ацетатом (3×10 mL). Комбиновани екстракт је испран водом и сушен преко анхидрованог Na_2SO_4 . Растварач је уклоњен вакуум дестилацијом и производ одвојен од остатка стубном хроматографијом користећи смешу хексан/етил-ацетат (од 3:1 до 6:1) као елуент. Структура и чистоћа свих производа је потврђена IR и NMR спектроскопијом.

3.2.4. Синтеза арилиденских деривата 2-тиохидантоина (**6a**-љ)

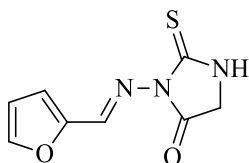
Смеша алдехида **4** (10 mmol) и тиосемикарбазида (1 mmol) у 50 mL метанола је загревана под рефлуксом 3 сата, а затим охлађена, дајући тиосемикарбазоне **5**. У ту реакциону смешу је додат етил-хлорацетат (10 mmol) и анхидровани натријум-ацетат (30 mmol) и смеша је загревана под рефлуксом још 6 сати. Смеша је затим охлађена и изливена у хладну воду. Добијен талог је процеђен, испран врућом водом, осушен и прекристалисан из врућег метанола.



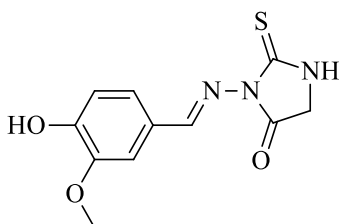
3-(Бензилиденамино)-2-тиоксоимидазолидин-4-он (**6a**). Бели аморфни прах. Принос: 1,579 g (82%). IR (KBr) ν_{max} : 3419, 3055, 3032, 2967m, 2768, 1711, 1645, 1591, 1490, 1445, 1409w, 1345, 1327, 1310, 1249, 1225, 1213, 1074, 1039, 969, 877, 854, 835, 788, 756, 734, 713, 695, 629 cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ 11,99 (bs, 1H, NH), 8,40 (s, 1H, $\underline{\text{CH}}=\text{N}$), 7,75 (m, 2H, Ar-H), 7,45 (m, 3H, Ar-H), 3,89 (s, 2H, $\underline{\text{CH}}_2\text{-NH}$) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6) δ 174,33, 165,51, 156,31, 134,31, 130,76, 128,96, 127,76, 33,26 ppm.



3-((2-Хидроксибензилиден)амино)-2-тиоксоимидазолидин-4-он (**6b**). Бели пахуљасти аморфни прах. Принос: 2,102 g (%). IR (KBr) ν_{max} : 441, 3318, 3031, 2958, 2776, 1718, 1640, 1623, 1568, 1492, 1469, 1334, 1317, 1266, 1254, 1204, 1149, 890, 838, 757, 735, 710, 637 cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ 12,09 (bs, 1H, NH), 10,88 (s, 1H, OH), 8,64 (s, 1H, $\underline{\text{CH}}=\text{N}$), 7,58 (dd, $J = 8,0$ и $1,9$ Hz, 1H, Ar-H), 7,32 (dt, $J = 7,8$ и $1,8$ Hz, 1H, Ar-H), 6,95 (m, 2H, Ar-H), 3,97 (s, 2H, $\underline{\text{CH}}_2\text{-NH}$) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6) δ 173,77, 164,44, 158,01, 157,76, 132,17, 130,62, 119,54, 118,50, 116,38, 33,46 ppm.

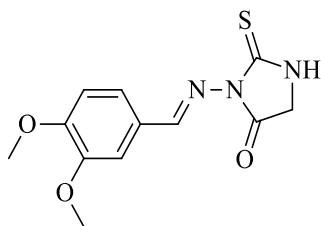


3-((Фуран-2-илметилен)амино)-2-тиоксоимидазолидин-4-он (**6v**). Беличаст аморфни прах. Принос: 1,186 g (57%). IR (KBr) ν_{max} : 3434, 3153, 3114, 3023, 2949, 2752, 1713, 1642, 1594, 1476, 1436, 1390, 1360, 1320, 1249, 1206, 1154, 1074, 1044, 1018, 964, 939, 895, 884, 852, 824, 787, 771, 732, 677, 599, 514 cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ 8,21 (s, 1H, $\underline{\text{CH}}=\text{N}$), 7,85 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, Ar-H), 6,95 (d, $J = 3,4$ Hz, 1H, Ar-H), 6,64 (dd, $J = 3,6$ и $1,8$ Hz, 1H, Ar-H), 3,87 (s, 2H, $\underline{\text{CH}}_2\text{-NH}$). ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6) δ 174,32, 165,00, 149,48, 146,00, 145,77, 115,88, 112,59, 33,40 ppm.

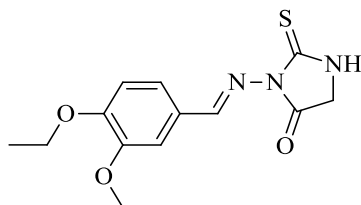


3-((4-Хидрокси-3-метоскибензилиден)амино)-2-тиоксоимидазолидин-4-он (**6g**). Беличаст пахуљасти аморфни прах. Принос: 2,540 g (96%). IR (KBr) ν_{max} : 3393, 2938, 2774, 1696, 1640, 1613, 1513, 1472, 1435, 1398, 1326, 1271, 1248, 1210, 1167, 1123, 1042, 803, 768, 737, 655, 519 cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ 11,83 (bs, 1H, NH), 9,63 (s, 1H, OH), 8,26 (s, 1H, $\underline{\text{CH}}=\text{N}$), 7,32 (s, 1H, Ar-H), 7,19 (d, $J = 8,2$, 1H, Ar-H), 6,84 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, Ar-H), 3,87 (s, 2H, $\underline{\text{CH}}_2\text{-NH}$), 3,80 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6) δ 174,13, 163,50, 156,22,

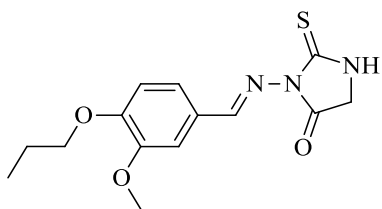
149,50, 147,91, 125,75, 122,18, 115,69, 110,66, 55,70, 33,08 ppm.



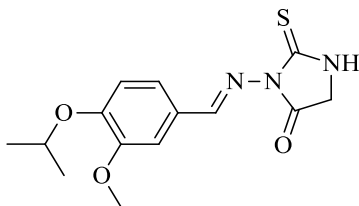
3-((3,4-Диметоксibenзилиден)амино)-2-тиоксоимидазолидин-4-он (**6д**). Бели пахуљаст аморфни прах. Принос: 2,358 g (84%). IR (KBr) ν_{max} : 3394, 3288, 3036, 2981, 2950, 2824, 2780, 1705, 1648, 1513, 1463, 1437, 1341, 1326, 1267, 1164, 1142, 1031, 850, 762, 622 cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ 11,92 (bs, 1H, NH), 8,31 (s, 1H, CH=N), 7,35 (s, 1H, Ar-H), 7,30 (d, $J = 11,6$ Hz, 1H, Ar-H), 7,04 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, Ar-H), 3,88 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3,80 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 3,79 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6) δ 177,59, 174,12, 155,98, 151,19, 148,95, 127,02, 122,05, 111,70, 109,62, 55,74, 55,54, 33,08 ppm.



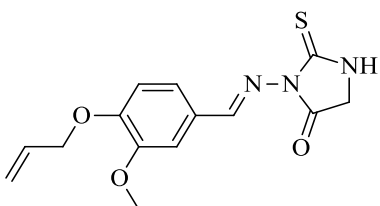
3-((4-Етокси-3-метоксибензилиден)амино)-2-тиоксоимидазолидин-4-он (**6ђ**). Бели пахуљаст аморфни прах. Принос: 2,145 g (73%). IR (KBr) ν_{max} : 3435, 3043, 2973, 2771, 1705, 1644, 1512, 1322, 1269, 1140, 1039, 967, 861, 834, 770, 737, 620 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ 11,91 (bs, 1H, NH), 8,30 (s, 1H, CH=N), 7,34 (s, 1H, Ar-H), 7,28 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, Ar-H), 7,02 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, Ar-H), 4,06 (q, $J = 6,8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 3,88 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3,79 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 1,34 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6) δ 174,00, 164,14, 155,96, 150,41, 149,01, 126,89, 121,98, 112,57, 109,81, 63,19, 55,49, 33,05, 14,78 ppm.



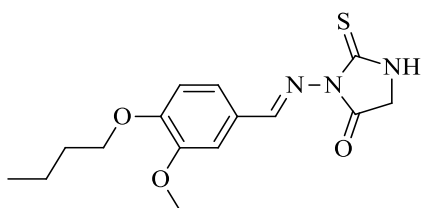
3-((3-Метокси-4-пропоксибензилиден)амино)-2-тиоксоимидазолидин-4-он (**6е**). Жуљкаст аморфни прах. Принос: 2,121 g (69%). IR (KBr) ν_{max} : 3432, 3042, 2969, 2766, 1722, 1640, 1512, 1320, 1270, 1137, 1029, 974, 863, 799, 773, 736, 622 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ 11,92 (bs, 1H, NH), 8,31 (s, 1H, CH=N), 7,35 (s, 1H, Ar-H), 7,28 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, Ar-H), 7,02 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, Ar-H), 3,96 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 3,88 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3,80 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 1,74 (q, $J = 6,8$ Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$), 0,98 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6) δ 174,10, 163,99, 156,02, 150,62, 149,10, 126,92, 122,04, 112,68, 109,94, 69,92, 55,61, 33,06, 22,19, 10,57 ppm.



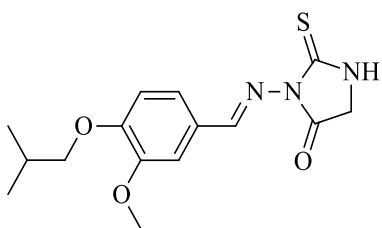
3-((4-Изопропокси-3-метоксибензилиден)амино)-2-тиоксоимидазолидин-4-он (**6ж**). Беличаст аморфни прах. Принос: 1,569 g (51%). IR (KBr) ν_{max} : 3449, 2976, 2761, 1722, 1643, 1508, 1319, 1268, 1251, 1138, 1031, 952, 860, 737 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ 11,91 (bs, 1H, NH), 8,30 (s, 1H, CH=N), 7,34 (s, 1H, Ar-H), 7,27 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,03 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, Ar-H), 4,64 (sept, $J = 6,0$ Hz, 1H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 3,88 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3,78 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 1,27 (d, $J = 6,0$ Hz, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6) δ 174,10, 164,00, 155,97, 149,85, 149,28, 127,02, 121,82, 114,62, 110,40, 70,42, 55,56, 33,08, 21,99 ppm.



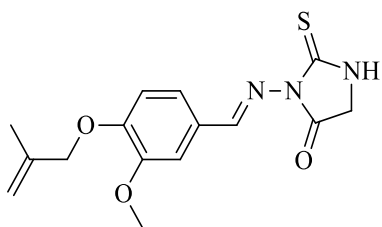
3-((4-Алилокси)-3-метоксибензилиден)амино)-2-тиоксоимидазолидин-4-он (**6з**). Жут аморфни прах. Принос: 2,069 g (68%). IR (KBr) ν_{max} : 3436, 3080, 2954, 2775, 1708, 1511, 1421, 1322, 1270, 1250, 1139, 1018, 924, 773, 621 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ 11,93 (bs, 1H, NH), 8,31 (s, 1H, CH=N), 7,36 (s, 1H, Ar-H), 7,28 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, Ar-H), 7,04 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, Ar-H), 5,95-6,16 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,21-5,49 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,61 (d, $J = 5,2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 3,88 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3,80 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6) δ 174,02, 164,05, 155,86, 149,99, 149,19, 133,49, 127,26, 121,79, 117,80, 113,26, 110,12, 69,03, 55,62 ppm.



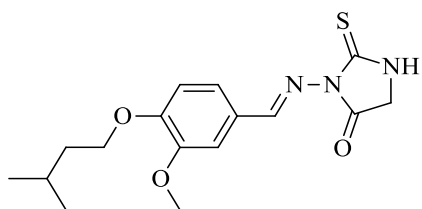
3-((4-Бутокси-3-метоксибензилиден)амино)-2-тиоксоимидазолидин-4-он (**6и**). Наранцаст аморфни прах. Принос: 2,287 g (71%). IR (KBr) ν_{max} : 3443, 3035, 2955, 2938, 2869, 2760, 1716, 1638, 1599, 1511, 1468, 1420, 1319, 1252, 1138, 1030, 1004, 868, 768, 735 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ 11,91 (bs, 1H, NH), 8,30 (s, 1H, CH=N), 7,35 (s, 1H, Ar-H), 7,28 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, Ar-H), 7,03 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, Ar-H), 4,00 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 3,88 (s, 1H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3,80 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 1,71 (quint, $J = 7,1$ Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 1,43 (sext, $J = 7,4$ Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 0,93 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6) δ 174,03, 164,09, 155,91, 150,65, 149,14, 126,93, 121,98, 112,82, 110,14, 68,07, 55,65, 33,02, 30,83, 18,82, 13,76 ppm.



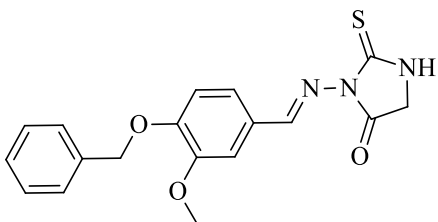
3-((4-Изобутоксн-3-метокснбензлден)амно)-2-тнсоимдазолндин-4-он (**6j**). Жућкаст аморфнн прах. Прнос: 1,527 g (48%). IR (KBr) ν_{max} : 3435, 2959, 2780, 1722, 1513, 1321, 1270, 1138, 1026, 865, 801, 770, 621 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ 11,91 (bs, 1H, NH), 8,30 (s, 1H, CH=N), 7,35 (s, 1H, Ar-H), 7,28 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, Ar-H), 7,02 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, Ar-H), 3,88 (s, 1H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3,80 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 3,78 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 2,04 (nonet, $J = 6,7$ Hz, 1H, $(\text{CH}_3)_2\text{-CH-CH}_2$), 0,98 (d, $J = 6,8$ Hz, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6) δ 175,85, 164,04, 155,98, 149,16, 137,24, 126,94, 122,03, 112,87, 110,22, 74,64, 55,74, 33,04, 27,85, 19,18, 12,58 ppm.



3-((3-Метоксн-4-((2-метлаллн)оксн)бензлден)амно)-2-тнсоимдазолндин-4-он (**6k**). Наранцаст аморфнн прах. Прнос: 2,112 g (66%). IR (KBr) ν_{max} : 3435, 3076, 2943, 2767, 1720, 1628, 1511, 1319, 1266, 1139, 1034, 1011, 895, 805, 769, 736, 621 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ 11,92 (bs, 1H, NH), 8,31 (s, 1H, CH=N), 7,37 (s, 1H, Ar-H), 7,27 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,02 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, Ar-H), 4,90-5,12 (m, 2H, $\text{CH}_2=\text{C}$), 4,51 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 3,88 (s, 1H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3,81 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 1,77 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}=\text{CH}_2$) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6) δ 174,12, 162,58, 155,95, 150,12, 149,23, 140,73, 127,26, 121,05, 113,32, 112,61, 110,14, 71,67, 55,72, 33,09, 19,37 ppm.



3-((4-(Изопентллоксн)-3-метокснбензлден)амно)-2-тнсоимдазолндин-4-он (**6l**). Жућкаст аморфнн прах. Прнос: 2,190 g (65%). IR (KBr) ν_{max} : 3430, 3043, 2959, 2871, 2773, 1718, 1640, 1513, 1321, 1268, 1247, 1138, 1015, 972, 892, 770, 623 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ 11,89 (bs, 1H, NH), 8,30 (s, 1H, CH=N), 7,34 (s, 1H, Ar-H), 7,28 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, Ar-H), 7,05 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, Ar-H), 4,03 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 3,88 (s, 1H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3,78 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 1,87-1,70 (m, 1H, $(\text{CH}_3)_2\text{-CH-CH}_2$), 1,63 (q, $J = 6,8$ Hz, 2H, $(\text{CH}_3)_2\text{-CH-CH}_2\text{-CH}_2$), 0,93 (d, $J = 6,6$ Hz, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6) δ 173,98, 164,00, 155,89, 150,62, 149,15, 126,94, 121,97, 112,85, 110,12, 66,85, 55,65, 37,52, 33,0, 24,67, 22,50 ppm.



3-((4-(Бензилокси)-3-метоксибензилиден)амино)-2-тиоксоимидазолидин-4-он (**66**). Беличаст пахуљаст аморфни прах. Принос: 2,059 g (58%). IR (KBr) ν_{max} : 3424, 3031, 2959, 2770, 1712, 1636, 1510, 1321, 1266, 1136, 1007, 920, 866, 770, 745, 700, 625 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ 11,92 (bs, 1H, NH), 8,31 (s, 1H, CH=N), 7,10-7,50 (m, 8H, Ar-H), 5,14 (s, 2H, C₆H₅-CH₂-O), 3,88 (s, 1H, CH₂-NH), 3,81 (s, 3H, CH₃-O) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6) δ 174,46, 164,16, 156,08, 150,17, 149,29, 136,80, 128,47, 127,97, 127,89, 127,37, 121,84, 113,39, 110,05, 70,05, 55,64, 33,05 ppm.

3.2.5. Синтеза *cis*-[CuCl(dmsO)₂]₂(μ_2 -Cl)₂

Тиохидантоин **66** (0,76 mmol) је растворен у 10 ml метанола под рефлуксом. У тај раствор се полако укапава *trans*-[CuCl₂(dmsO)₂]_n (0,76 mmol) растворен у 10 ml метанола. Смеша је загревана под рефлуксом преко ноћи. По завршетку реакције је смеша охлађена ледом и талог филтриран под вакуумом. Беличасти талог је испран врућом водом. Филтрат је упарен и преостали чврсти остатак је растворен у меши ацетонитрила и хлороформа (3:5). Два дана касније из меше се одвоје белики, обли зелени кристали *cis*-[CuCl(dmsO)₂]₂(μ_2 -Cl)₂. Елементарна анализа за C₈H₂₄O₄S₄Cu₂Cl₄: Израчунато C, 16,53, H, 4,16, S, 22,06 %; Нађено C, 16,70, H, 4,35, S, 21,93 %.

3.3. ^1H NMR експерименти

3.3.1. ^1H NMR кинетичка мерења реакције метил естара аминокиселина са алил-изотиоцијанатом

^1H NMR кинетичка мерења реакције метил естара аминокиселина (0,032 mmol, 1 екв.) са алил-изотиоцијанатом (0,320 mmol, 10 екв.) у присуству триетиламина (0,096 mmol, 3 екв.) у 0,6 mL хлороформа-*d* су извршена у стандардној 5 mm NMR кивети на собној температури преко ноћи. Укупно 29 спектра је снимљено при сваком експерименту и време снимања сваког спектра је било 172 s (аквизиционо време, $at = 4$ s; време релаксације, $dI = 1$ s, број тразијената, $nt = 32$). Првих шест спектра је снимљено без чекања између снимања спектра, затим су следећа три снимљена са чекањем од по 5 минута, затим следећа три по 10 минута, па следећа три по 15 минута, наредна три по 30 минута и коначно, задњих једанаест спектра је снимљено са чекањем од по сат времена.

3.3.2. ^1H NMR кинетичка мерења реакције цисплатине и тиохидантоина **3ж** и **3з**

^1H NMR кинетичка мерења реакције између цисплатине и тиохидантоина **3ж** и **3з** су изведена на свеже припремљеном узорку реактаната у DMSO- d_6 на собној температури. 300 μL 10 mM раствора цисплатине и 300 μL 10 mM раствора тиохидантоина су помешани у NMR кивети. Након мешања, ^1H NMR спектри узорака су снимани узастопно сваких 5 минута, затим сваких 10, сваких 15, сваких 30 и на крају сваких сат времена преко ноћи. Након завршетка експеримента, реакција је праћена још неколико дана до завршетка.

3.3.3. ^1H NMR кинетичка мерења реакције тиохидантоина ба и соли паладијума(II)

^1H NMR кинетичка мерења реакције између тиохидантоина ба и соли паладијума(II) су изведена по процедури описаној у поглављу 3.3.2.

3.4. Рачунарске методе

3.4.1. Квантно-механички прорачуни

Оптимизације геометрије и рачунања фреквенција за све структуре приликом испитивања механизма настајања алкенилских 2-тиохидантоина су изведени коришћењем теорије функционала густине (DFT), M06-2X/6-311++G(d,p) нивоа теорије. Примењен функционал је ефикасан у рачунању термохемијских, кинетичких и спектроскопских параметара и практичан је алат за испитивање и проверу механизма органских реакција.³⁶⁷ Како би се урачунао и утицај растварача, реакције су моделоване у хлороформу ($\epsilon = 4.7113$) употребом CPCM поларизабилног континуалног солватационог модела,⁵³¹ који је укључен у Gaussian 09 софтверски пакет.³⁴⁵ Геометрије су оптимизоване у потпуности без наметнутих рестрикција. Структуре енергетских минимума нису садржале имагинарне фреквенције, док су прелазна стања карактерисана са по једном имагинарном фреквенцијом.

Употребом интринзичне реакционе координате (IRC), методе за одређивање производа и реактаната реакције, полазећи од структуре прелазног стања, је проверено да ли имагинарна фреквенција одговара очекиваном померању по реакционој координати у случају прелазних стања. Прорачунима је показано да свако прелазно стање повезује два одговарајућа енергетска минимума: пре-реакциони комплекс и комплекс производа. NBO (Natural Bond Orbital) анализа је урађена да би се проценила стабилност награђених производа.^{532,533} Теорија прелазног стања даје најједноставније теоријске приступе за процену константи брзина (k) и захтева само структурне и енергетске параметре и вибрационе фреквенције за реактанте и прелазна стања.⁵³⁴ Главна предност теорије прелазног стања је то што не захтева пуно информација везаних за реактанте и прелазна стања, што је чини врло практичном за испитивање великог броја хемијских реакција. Упркос њене релативне једноставности, ова теорија се показала као довољно добра за репродуковање експериментално одређених константи брзина.⁵³⁵ У овом испитивању механизма реакција између алил-изотиоцијаната и метил естара аминокиселина је употребљена конвенционална теорија прелазног стања, имплементирана у Eyringru програмском пакету,⁵³⁶ заснована на термодинамичким својствима реактаната и прелазних стања.

3.4.2. Молекулски докинг

Структуре испитиваних комплекса платине (једињења Pt-3ж1, Pt-3ж2, Pt-3з1, и Pt-3з2), као и структуре осам хидантоинских деривата, пет активних из алкенилске серије (3г, 3д, 3ђ, 3и и 3к) и три једињења са малом активношћу (3б, 3е и 3љ), су оптимизоване помоћу wb97xd методе, користећи 6-31g** базисни скуп за неметале и LANL2DZ базисни скуп за Pt. Функционал wB97XD је изабран за оптимизацију јер укључује емпиријску дисперзију, док 6-31g** базисни скуп је изабран јер се показало да су оптимизације са овим базисним скупом показале добро слагање оптимизованих дужина и углова веза са експерименталним

подацима, добијених из рендгенске анализе.⁵³⁷ 6-31g** базисни скуп се често користи за неметале и некоординоване лиганде, јер је прикладнији за лакше елементе, у поређењу са тежим LANL2DZ базисним скупом, коришћеним за метале и комплексе метала. Мерц-Колманова (Merz–Kollman) атомска наелектрисања су израчуната за све атоме на горе наведеном нивоу, у складу са шемом која је дефинисана RESP процедуром.⁵³⁸

Као циљани биомолекули за везивање комплекса Pt коришћене су структуре ДНК, док су као циљани биомолекули за везивање деривата тиохидантоина коришћени ензими. Молекулски докинг је рађен на целом биомолекулу, а не на појединим деловима биомолекула, као што је активно место. Студија укључује цео биомолекул јер експерименталним техникама није потврђено да се инхибиција заснива на везивању за активно место, нити било које друго везивно место (алостерно место) које за последицу има инхибицију испитиваних ензима. Из истог разлога, докинг студија је урађена на цео молекул ДНК, а не на поједине његове делове. Као извор структура биомолекула коришћена је Протеинска банка података (PDB, од енгл. Protein Data Bank).⁵³⁹ PDB је база података тродимензионалних структура великих биомолекула, као што су протеини и нуклеинске киселине. Структурни подаци у овој бази су добијени рендгенском кристалографијом, NMR спектроскопијом и криоелектронском микроскопијом. Структура ДНК, екстрахована из PDB, која представља двоструку хеликоидну структуру са два региона богата G≡C паровима), и регионом богатим A=T паровима азотних база, смештеним између G≡C региона, (*d(CpGpCpGpApApTpTpCpGpCpG)*) додекамер (структура са PDB кодом: 1BNA).⁵⁴⁰ Испитивани комплекси су такође доковани на структуру ДНК са интеркалационом шупљином (структура са PDB кодом: 1XRW),⁵⁴¹ из које је претходно уклоњен везани лиганд.

Испитивана су и инхибиторска својства деривата тиохидантоина, применом молекулског докинга, на седам протеина, који се сматрају јако битним за поједине фазе меланогенезе, а то су Тирозиназа (структура са PDB кодом: 2Y9X),⁵⁴² хумани TRP-1 ензим (од енгл. Tyrosinase Related Protein 1, структура са PDB кодом: 5M8M),⁵⁴³ TRP-2 ензим (структура са PDB кодом: 3KAN),⁵⁴⁴ MITF (од енгл. Melanocyte Inducing Transcription Factor, структура са PDB кодом: 4ATI),⁵⁴⁵ c-Kit рецептор (структура са PDB кодом: 3G0E),⁵⁴⁶ β-катенин (структура са PDB кодом: 1JDH),⁵⁴⁷ и хумана Аденилат циклaza (структура са PDB кодом: 5D0R).⁵⁴⁸

AutoDock Vina⁵⁴⁹ програм је коришћен за рачунање слободних енергија везивања испитиваних хидантоина за ензиме, док је AutoDock 4.2 програм коришћен за рачунање слободне енергије везивања испитиваних комплекса платине за ДНК. Константе инхибиције су израчунате из слободних енергија везивања испитиваних хидантоина за ензиме према једначини 28:

$$K_i = e^{\frac{\Delta G}{RT}} \quad (28)$$

где су K_i константа инхибиције, ΔG слободна енергија везивања, R универзална гасна константа и T температура.

AutoDock 4.2 програм⁵⁵⁰ је коришћен за припрему структура испитиваних ДНК и протеина, док је AutoDockTools програм⁵⁵⁰ коришћен за генерисање фајлова са grid and docking параметрима. Атомски параметри су учитани из AutoDock програма, осим за Pt, где је коришћен АД4 параметарски фајл (AD4.1_bound.dat). За потребе докинга, коришћена је кутија (grid box) у коју је могуће сместити цео циљани биомолекул. Ламаркијански

(Lamarckian) генетички алгоритам је коришћен за претрагу и рачунање лиганд-рецептор везивних афинитета и одређивање 50 најбољих везивних адуката (са најнижом енергијом конформације) по прорачуну. Discovery Studio програм је коришћен да би се визуализовали и анализирали резултати молекулског докинга.⁵⁵¹

3.5. Биолошке методе

3.5.1. Одређивање антимицробне активности

Антимицробна активност тестираних једињења је испитивана на панелу хуманих патогених бактерија (ESKAPE панел: *Enterococcus faecium* ATCC 6037, *Staphylococcus aureus* ATCC43300, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA2146, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 и *Enterobacter cloacae* ATCC 13047) и гљива рода *Candida* (*Candida albicans* SC5314, *Candida glabrata* ATCC 2001, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 и *Candida krusei* ATCC 62528), а које су набављене из NCTC (National Collection of Type Cultures) и ATCC (American Type Culture Collection) колекције микроорганизама.

Минимална инхибиторна концентрација (МИС) сваког једињења на тестираним бактеријама и гљивама је одређена у складу са микродилуционим тестом CLSI стандардом (Clinical and Laboratory Standards Institute).^{552,553}

Бактерије и гљиве су култивисане у Luria-Bertani бујону (Biolife Italiana s.r.l., Милано, Италија), односно у RPMI 1640 медијуму са 2% глукозе разређене у одговарајућем медијуму, дајући инокулуме са коначном концентрацијом од 5×10^5 и 10^5 CFU mL⁻¹. Шток раствор тестираних једињења је направљен у DMSO и примењен у дозама од 1 до 250 μ M. Након инкубације 24 h на 37 °C, МИС вредности су одређене мерењем апсорбанце на 600 nm (OD600), користећи Tecan Infinite 200 Pro читач микротитарских плоча. Негативна контрола (само медијум) и позитивна контрола (само микроорганизми у течном бујону) на истој плочи су коришћени као референце за одређивање инхибиције раста бактерија. Једињења која су инхибирала раст испитиваних микроорганизама више од 90% у односу на раст у нетретираним узорку (контроли) су класификовани као активни агенси.

3.5.2. Евалуација токсичности *in vivo* на моделу ембриона зебрице (*Danio rerio*)

3.5.2.1. Материјал и методе

У испитивању токсичности библиотеке синтетисаних тиохидаптоина коришћени су ембриони дивљег АВ соја зебрица (*Danio rerio*, wild type). Експерименти су рађени на ембрионима односно ларвама зебрице старим до 120 часова након оплођења (*eng. hours post fertilization* – hpf), а све у складу са правилима Европске директиве (EU2010/86) и Правилника за рад са експерименталним животињама Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду.

Општи услови гајења. Адултне рибице гајене су у узгајалишту зебрица Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, под строго контролисаним условима (светлосни режим 14 h дан / 10 h ноћ, и температура од 28 ± 1 °C). Рибице су храњене 3 пута дневно различитом врстом хране – протеинска SDS300, лисната (TetraMinFlakes) и живом (*Artemia salina*).

Мрест зебрица. Дан непосредно пред мрест, адултне зебрице су одвојене у специјализоване мрестилице, у односу мужјака и женки 3:2. Мрест је индукован следећег дана паљењем светла у раним јутарњим сатима. Сакупљена јаја су испрана ЕЗ водом за узгој ембриона, како би се уклониле све потенцијалне нечистоће и детритус који би утицали на даљи развој ембриона. Након тога, вршена је селекција оплођених од неоплођених јаја под светлосним микроскопом (Motic SMZ140 Series, Кина). Оплођена јаја (ембриони) су гајена у ЕЗ води у петријевим шољама и инкубирана у инкубатору (Sanyo MCO-20AIC, Јапан) на температури од $27,5 \pm 0,5$ °C до почетка третмана и током третмана.

Медијум за гајење ембриона - ЕЗ вода:

5 mM NaCl (ACROS Organics™, САД)
0,17 mM KCl (Merck, Немачка)
0,33 mM CaCl₂ · 2H₂O (Merck, Немачка)
0,33 mM MgSO₄ · 7H₂O (ACROS Organics™, САД)

3.5.2.2. Испитивање акутне токсичности на ембрионима зебрице – *Fish Embryo Acute Toxicity Assay* (FET тест)

Испитивање токсичности на ембрионима зебрице, као претклиничком анималном моделу, вршено је по протоколу који је успостављен у Лабораторији за молекуларну генетику и екологију микроорганизама, а који се заснива на примени OECD протокола (2013)⁵⁵⁴ и процедура описаних у литератури.⁵⁵⁵ Испитивање токсичности је рађено на ембрионима старим 6 hpf у трајању од 114 h, односно до 120 hpf, а у складу са правилима Европске директиве (EU2010/86) и Правилника за рад са експерименталним животињама Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду.

Експерименти су вршени у микротитарским плочама са 24 бунарића (Sarstedt). Припрема ембриона пре почетка експеримента подразумевала је постављање по 10 ембриона у сваки бунарић микротитарске плоче, потом уклањање вишка воде из сваког бунарића и додавање по 1 mL ЕЗ воде, чиме је обезбеђено да сви ембриони буду изложени истим почетним експерименталним условима. Штокови испитиваних супстанци су направљени у DMSO. Токсичност синтетисаних молекула је испитивана у шест различитих доза: 0,5, 1, 2, 5, 10 и 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. За тестирање је коришћено 30 ембриона по дози, односно 3 бунарића са по 10 ембриона по бунарићу. Експерименти су поновљени два пута.

Ембриони гајени у самој ЕЗ води у присуству 0,25% DMSO (максимална дозвољена концентрација) су коришћени као негативна контрола. Преживљавање, развој и појава тератогених малформација код третираних ембриона праћени су на свака 24 h, у периоду до петог дана развоја ембриона (120 hpf), а уинули ембриони су уклањани свакодневно у циљу отклањања могућег негативног утицаја на развој живих ембриона. При евалуацији токсичности праћено је 17 токсиколошких параметара који су приказани у Табели 20, као и ефекат на пигментацију (меланогенезу) третираних ембриона.⁵⁵⁵

Табела 20. Листа леталних и тератогених ефеката који су праћени на ембрионима зебрице током 120 h часова након оплођења (hpf).

Категорија	Развојни процес	Време (hpf)				
		24	48	72	96	120
Летални ефекат	Коагулација јајета (ембриона) ¹	•	•	•	•	•
	Одсуство формирања сомита	•	•	•	•	•
	Одвојеност репа	•	•	•	•	•
	Одсуство срчаних контракција	•	•	•	•	•
Тератогени ефекат	Малформација главе	•	•	•	•	•
	Малформација очију ²	•	•	•	•	•
	Малформација отолита/сакула ³	•	•	•	•	•
	Малформација нотохорде	•	•	•	•	•
	Сколиоза	•	•	•	•	•
	Малформација репа ⁴		•	•	•	•
	Едем перикардијалне дупље	•	•	•	•	•
	Промена фреквенције рада срца		•	•	•	•
	Промена у циркулацији крви		•	•	•	•
	Едем жуманцетне кесе	•	•	•	•	•
	Деформација жуманцетне кесе	•	•	•	•	•
	Обојеност (некроза) јетре			•	•	•
	Промене у величини/дужини тела ⁵			•	•	•

¹ Застој у развоју ембриона (органогенези);

² Промене у величини и облику ока;

³ Одсуство отолита или присуство више од два отолита у сакулусу; редукција или увећање отолита и/или сакулуса;

⁴ Промене у облику и положају репа;

⁵ Застој у развоју ембриона и повећању његове величине (праћено пре излегања ембриона, 24 hpf и 48 hpf), односно дужине тела (праћено одмах по излегању и 72 hpf).

3.5.3. Испитивање инхибиције меланогенезе *in vivo* на моделу зебрице

Способност инхибиције меланогенезе новосинтетисаних једињења прелиминарно је испитана на моделу ембриона зебрице према процедури описаној у литератури.⁴⁰⁸ Ембриони АВ соја зебрице су на ступњу старости од 6 часова након оплодне третирања са 7 различитих доза испитиваних једињења у периоду од 48 h. Након третмана, пигментација коже ембриона је анализирана помоћу светлосне микроскопије, као и морфологија самих меланоцита. Експеримент је урађен у плочама са 24 бунарића (10 ембриона по бунарићу), при чему је коришћено 20 ембриона по концентрацији. Третирања ембриона су гајени у инкубатору на температури од 28 °C. Након прелиминарног тестирања, одабрана су три најактивнија једињења и одређен је ефекат на меланогенезу у дозама које су се у тесту акутне токсичности показале безбедним. Степен антимеланогене активности је одређен мерењем количине синтетисаног меланина. У циљу добијања довољне количине пигмента меланина за квантитативну евалуацију инхибиторног дејства, коришћено је 50 ембриона по концентрацији. Након третмана од 48 h, ембриони су подвргнути циклусу сонификације од 30 s и хлађења на леду 30 s (три узастопна циклуса), како би се ослободио пигмент меланин

из меланоцита коже ембриона. Добијени лизат је центрифугиран 5 min на $12000 \times g$, супернатант је одбачен, а меланин у талогу растворен инкубацијом талога у 1 mL KOH на 95°C током 30 минута. Након центрифугирања ($12000 \times g$, 5 min), супернатант је сакупљен, а количина меланина у њему одређена мерењем апсорбанце на таласној дужини од 490 nm.⁵⁵⁶ Количина меланина у третманима је одређена у односу на количину пигмента у контролној (нетретираној) групи ембриона.

3.6. Методе за испитивање антикорозивне активности

3.6.1. Електрохемијска мерења

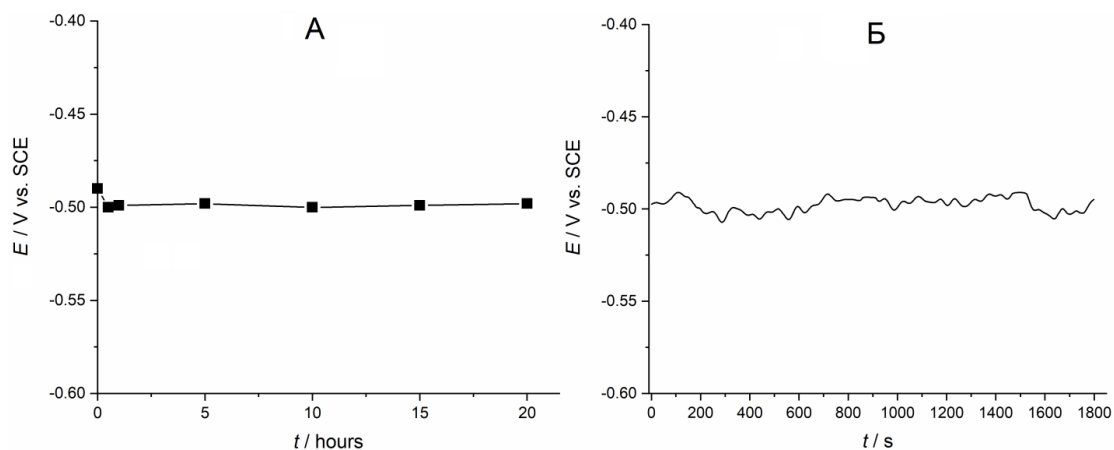
Корозивни електролит коришћен за електрохемијске експерименте је 0,5 M HCl, направљен разблаживањем 37% HCl Milli-Q водом. Четири деривата 2-тиохидаптоина **ба-г**, коришћена у пет различитих концентрација (0,05; 0,1; 0,5; 1,0 и 10 mM), су тестирана као инхибитори корозије меког челика. Свежи раствори су припремљени растварањем једињења **ба-г** у 0,5 M HCl пре сваког експеримента.

Електрохемијска мерења су извршена у троелектродној Ругех стакленој ћелији. Засићена каломелова електрода са Лугиновом (Luggin) капиларом постављеном близу радне електроде (да би се компензовао омски пад) је употребљена као референтна електрода. Сви забележени потенцијали су изражени у односу на референтну электроду. Платинска плоча је коришћена као контра електрода. Меки челик, хемијског састава Fe са C (макс. 0.1%), P (0.045%), S (0.045%), N (0.009%) је коришћен као радна електрода (RE). Цилиндри меког челика су убачени у епокси смолу, остављајући површину од $1,3 \text{ cm}^2$ изложену корозивном раствору. Пре сваког експеримента, радна електрода је механички полирана силицијум-карбидним папиром (600-1200), затим опрана Milli-Q водом у ултразвучном купатилу 5 минута, па детаљно испрана апсолутним етанолом и дејонизованом водом и осушена. Сви експерименти су извршени на собној температури без мешања.

Пре свих електрохемијских мерења, радна електрода је потопљена у спремљени електролит 30 минута, док се није постигао релативно стабилан потенцијал отвореног кола (OCP, Open Circuit Potential). Типичан дијаграм OCP у односу на време је приказан на Слици 71, где се може приметити да се после 30 минута од урањања RE могу уочити само незнатне промене E_{OCP} , што значи да се стабилно стање постиже после 30 минута.

Потенциостат/галваностат EG&G PAR 2631A са Power Suite софтвером је коришћен за потенциодинамичка поларизациона (PP) мерења. PP криве су добијене варирањем између $-0,250 \text{ V}$ и $0,250 \text{ V}$ у односу на OCP са брзином скенирања од 1 mV s^{-1} .

Потенциостатска електрохемијска импедансна спектроскопска (PEIS) мерења су извршена на потенциостату/галваностату BioLogic SAS SP-240 опремљеним софтвером за корозију и физичку електрохемију. PEIS испитивања су извршена у опсегу фреквенција 10^{-2} - 10^6 Hz користећи синусоидну амплитуду потенцијала од 10 mV за мерења око отвореног еквивалентног кола (у опсегу од $-0,430$ до $-0,476 \text{ V}$) за све узорке. Рендлсово коло је примењено за анализу PEIS података употребом Zview® софтвера.



Слика 71. Криве потенцијала отвореног кола за корозију меког челика у 0,5 М раствору HCl после урањања од 20 сати (А) и 30 минута (Б).

3.6.2. Гравиметријска мерања

Тест губитка масе је урађен у чаши од 200 mL са 100 mL корозивног раствора у одсуству и присуству различитих концентрација инхибитора. Пре тестирања су цилиндри меког челика исполирани, детаљно испрани апсолутним етанолом и дејонизованом водом, сушени и измерени. Затим су узорци убачени у корозивни раствор на 24 h. Сви експерименти су поновљени три пута ради поузданости резултата. Израчунат је просечан губитак масе у одсуству и присуству инхибитора.

3.6.3. Микроскопске методе

Карактеризација морфологије површине узорака меког челика је изведена коришћењем SEM (Scanning Electron Microscope) инструмента (JOEL JSM-IT300LV на 20 keV) после урањања од 24 h у 0,5 М раствор HCl у одсуству и присуству инхибитора. Хемијски састав узорака је одређен помоћу дисперзивне X-рау спектроскопије (EDS). EDS спектри су снимљени на X-рау спектрометру прикљученом на SEM помоћу Aztec софтвера. Површинске карактеристике узорака меког челика су испитане помоћу микрокопије атомских сила, на AFM NT-MDT Solver Pro инструменту у контактном режиму.

4. ЗАКЉУЧАК

Синтетисане су две серије нових деривата 2-тиохидантоина: алкенилских деривата 2-тиохидантоина полазећи од α -аминокиселина и арилиденских деривата 2-тиохидантоина полазећи од ароматичних алдехида. Сва једињења су добијена у добрим до одличним приносима, а њихова структура и чистоћа су потврђене IR и NMR спектроскопијом. Добијена једињења су подвргнута механистичким испитивањима реакција настајања и комплексирања са јонима прелазних метала, као и биолошким и електрохемијским испитивањима са аспекта њихове могуће примене.

У циљу испитивања кинетике и механизма настајања аминокиселинских деривата 2-тиохидантоина, реакције неколико изабраних метил естара α -аминокиселина и алил-изотиоцијаната су праћене ^1H NMR спектроскопијом. Одређене су константе брзина и предложен је двостепени механизам, у коме је циклизација кључни корак који одређује брзину реакције. Први корак је адиција метил естра аминокиселине на алил-изотиоцијанат, при чему се добија двоструко наелектрисани интермедијерни јон са развдојеном шаржом, а други корак је циклизација интермедијера до деривата 2-тиохидантоина. DFT прорачуни подржавају предложени двостепени механизам. Константа брзине првог корака механизма је највећа за глицин, па аланин и валин, док је први корак био најспорији за фенилаланин и леуцин. Константе брзине се смањују са повећањем волуминозности алкил супституента у бочном низу аминокиселина, што указује на стерну контролу првог корака механизма. Константа брзине другог корака је највећа за фенилаланин, затим аланин, леуцин и валин, док глицин има најнижу вредност константе брзине циклизације. Појава да метил естар фенилаланина има највећу константу брзине циклизације је у сагласности са чињеницом да његова циклизација има најнижу активациону баријеру. Такође је овај процес и најегзотермнији, док је следећи у низу циклизација аланина, а циклизација глицина је најмање егзотермна. Овај тренд опадања је у складу са трендом опадања вредности константи циклизације. Теоријски израчунате константе су у добром слагању са експериментално одређеним константама.

Да би се одредила *in vivo* антимиеланогена активност синтетисаних деривата 2-тиохидантоина, ембриони зебрица су третирани са седам различитих концентрација испитиваних једињења. Од свих тестираних једињења, четрнаест је показало депигментациону активност, од којих су три изазвала потпуну депигментацију ембриона на концентрацији од 12,5 μM , а два најактивнија деривата **3g** и **3i** су показали активност и на врло ниској концентрацији од 5 μM . На ембрионима зебрица је такође испитивана акутна токсичност свих ових једињења. Тиохидантоини из арилиденске серије су испољили токсичне ефекте, као што је кардиотоксичност и већина је довела до леталног исхода. Тиохидантоини из алкенилске серије нису доводили до леталног исхода и већином су нетоксични при максималној испитаној концентрацији од 100 μM . Од свих једињења из те серије, четири су испољавала штетно дејство, један је кардиотоксичан а три су доводила до скелетних малформација при високим концентрацијама (међу њима су и **3g** и **3i**). Два најактивнија деривата, **3g** и **3i**, ипак нису испољавала штетно дејство при нижим концентрацијама при којима показују потпуну депигментациону активност и представљају добре кандидате за потенцијалне инхибиторе меланогенезе. Даља истраживања су потребна да би се утврдио њихов терапеутски потенцијал и могућност примене у третману хиперпигментационих поремећаја коже. Молекулски докинг је урађен за релевантне таргете биосинтетичког пута меланогенезе (тирозиназа, TRP-1, TRP-2, *mitf*, c-Kit, β -катенин и аденилат циклаза). Резултати докинга су показали да активни деривати инхибирају аденилат

циклазу некомпетитивно, везујући се за алостерни центар, док се неактивни деривати не везују ни за алостерни, ни за активни центар.

Антикорозивна активност четири арилиденска деривата 2-тиохидаптоина је испитана за меки челик у 0,5 М НСI. Ефикасност инхибиције корозије сва четири тииохидаптоина се повећава са концентрацијом, при чему се максимум достиже на 1,0 mM. Поларизационе криве показују да се деривати 2-тиохидаптоина понашају као инхибитори мешовитог типа. Дериват са хетероароматичном фурил групом **6в** се показао као најефикаснији инхибитор корозије, са стопама инхибиције у опсегу од 82-90%, у зависности од примењене методе. Промене у импедансним параметрима указују на адсорпцију инхибитора на површини метала и формирање заштитног слоја. SEM и AFM методама је потврђено присуство заштитног слоја инхибитора на површини меког челика. Резултати овог истраживања показују да испитани деривати 2-тиохидаптоина пружају добру заштиту меког челика од корозије у киселој средини.

Реакције комплексирања аминокиселинских деривата 2-тиохидаптоина са сумпором у бочном низу, **3ж** и **3з** са цисплатином су праћене ^1H NMR спектроскопијом у DMSO- d_6 . Анализом података из NMR спектра, уз помоћ теорије функционала густине одређени су начин координације, механизам, као и ред реакције испитиваних тииохидаптоина са цисплатином. У оба случаја је цисплатина учествовала у споредној реакцији са растварачем, градећи моно- и диспустигуисане DMSO комплексе који су реаговали са испитиваним дериватима 2-тиохидаптоина. Дериват 2-тиохидаптоина **3ж** гради мононуклеарни петочлани хелатни комплекс, где је платина везана за **3ж** преко азота из хидантоинског прстена и сумпора из бочног низа. Остала два координациона места на платини заузимају молекули DMSO везани или оба преко сумпора или један преко сумпора, а други преко кисеоника. Дериват 2-тиохидаптоина **3з** гради бинуклеарни комплекс, где је један јон платине везан за азот и тиокарбонилни сумпор из тииохидаптоинског прстена (остала два места окупира DMSO), а други јон платине је везан за сумпор из бочног низа (остала три места окупира DMSO). У овом случају, дериват 2-тиохидаптоина **3з** има улогу мостног лиганда. Урађена је и молекулска докинг анализа ових комплекса са ДНК. Комплекс [Pt-**3ж**] може да се веже у мали жлеб ДНК, а комплекс [Pt-**3з**] се због свог позитивног наелектрисања (+3) везује за фосфатну кичму, што онемогућава његову антитуморску активност.

Реакције арилиденског деривата 2-тиохидаптоина, 3-((фенилметилена)амино)-2-тиоксо-4-имидазолидинон **6а**, са PdCl₂, *cis*-[PdCl₂(dmsO-S)₂] и K₂[PdCl₄] су праћене ^1H NMR спектроскопијом у DMSO- d_6 као растварачу. У случају PdCl₂ и *cis*-[PdCl₂(dmsO-S)₂], награђен је *cis*-[Pd(**6а**-N,S)(dmsO-S)₂]⁺ комплекс, у коме је паладијум(II) координован преко азота у бочном низу и сумпора из 2-тиохидаптоинског прстена. Механизам координације се састоји из два корака. Први корак је монодентатно везивање **6а** преко азота у бочном низу. Овај корак је превише брз за NMR временску скалу, али је потврђен одговарајућим сигнаlima у спектрима. Други, спорији корак, који одређује брзину реакције је депротонавање 2-тиохидаптоинског прстена, хелатизација интермедијерног комплекса, *cis*-[PdCl(**6а**-N)(dmsO-S)₂]⁺, и везивање **6а** за сумпор, при чему се добија коначни комплекс, *cis*-[Pd(**6а**-N,S)(dmsO-S)₂]²⁺. Већина коначног комплекса настаје током првих сат времена експеримента. Истовремено, поред реакције настајања комплекса, одвија се реакција са растварачем, при чему настаје *cis*-[Pd(dmsO-O)₂(dmsO-S)₂]²⁺. Ова споредна реакција после

одређеног времена зауставља реакцију грађења $cis-[Pd(\mathbf{6a-N,S})(dms\text{-}S)_2]^{2+}$ комплекса. $K_2[PdCl_4]$ није реаговао са **6a** у току експеримента.

У реакцији арилиденског деривата 2-тиохидаптоина **6b** са полимерним $trans-[CuCl_2(dms\text{-}O)_2]_n$, уместо одговарајућег бакар-тиохидаптоинског комплекса, добијен је бинуклеарни $cis-[\{CuCl(dms\text{-}O)_2\}(\mu\text{-}Cl)]_2$. Структура комплекса је у потпуности окарактерисана рендгенском структурном анализом. Није уочена декомпозиција насталог комплекса, што значи да је он крајњи стабилни производ. Претпоставља се улога тиохидаптоина **6b** у изомеризацији, јер се она не дешава у његовом одсуству. Добијени комплекс показује умерену антимикуробну активност на гљиву *Candida krusei*.

5. ЛИТЕРАТУРА

1. L. Konnert, F. Lamaty, J. Martinez, E. Colacino, *Chem. Rev.* **117** (2017) 13757–13809.
2. N. Trisovic, G. Uscumlic, S. Petrovic, *Hem. Ind.* **63** (2009) 17–31.
3. C. A. Lopez, G. G. Trigo, *Adv. Heterocycl. Chem. Vol.* **38** (1985) 177–228.
4. E. Ware, *Chem. Rev.* **46** (1950) 403–470.
5. M. Meusel, M. Gütschow, *Org. Prep. Proced. Int.* **36** (2004) 391–443.
6. S. H. Cho, S. H. Kim, D. Shin, *Eur. J. Med. Chem.* **164** (2019) 517–545.
7. D. W. Hook, S. J. Porter, C. Herzog, *Front. Res. Metrics Anal.* **3** (2018).
8. M. Su, D. Xia, P. Teng, A. Nimmagadda, C. Zhang, T. Odom, A. Cao, Y. Hu, J. Cai, *J. Med. Chem.* **60** (2017) 8456–8465.
9. Basappa, C. S. Ananda Kumar, S. Nanjunda Swamy, K. Sugahara, K. S. Rangappa, *Bioorg. Med. Chem.* **17** (2009) 4928–4934.
10. K. Virijevic, P. Stanic, J. Muskinja, J. Katanic-Stankovic, N. Sreckovic, M. Zivanovic, B. Smit, *J. Serb. Chem. Soc.* **87** (2022) 1349–1358.
11. S. M. Sondhi, J. Singh, A. Kumar, H. Jamal, P. P. Gupta, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 1010–1015.
12. H. Byrtus, J. Obniska, A. Czopek, K. Kamiński, *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **344** (2011) 231–241.
13. D. Kim, L. Wang, C. G. Caldwell, P. Chen, P. E. Finke, B. Oates, M. MacCoss, S. G. Mills, L. Malkowitz, S. L. Gould, J. A. DeMartino, M. S. Springer, D. Hazuda, M. Miller, J. Kessler, R. Danzeisen, G. Carver, A. Carella, K. Holmes, J. Lineberger, W. A. Schleif, E. A. Emini, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11** (2001) 3103–3106.
14. K. Gallop, *Emerg. Med. Australas.* **22** (2010) 108–118.
15. W. Kassouf, S. Tanguay, A. G. Aprikian, *J. Urol.* **169** (2003) 1742–1744.
16. Z. T. Al-Salama, *Drugs* **78** (2018) 699–705.
17. T. Krause, M. U. Gerbershagen, M. Fiege, R. Weißhorn, F. Wappler, *Anaesthesia* **59** (2004) 364–373.
18. A. Huttner, E. M. Verhaegh, S. Harbarth, A. E. Muller, U. Theuretzbacher, J. W. Mouton, *J. Antimicrob. Chemoth.* **70** (2015) 2456–2464.
19. Cosmetic Ingredient Review Panel; Final Report on the Safety Assessment of DMDM Hydantoin, in *J. Am. Coll. Toxicol.* **7** (1988) 245–277.
20. C. Blystone, C. Lambright, J. Furr, V. Wilson, L. Gray Jr, *Toxicol. Lett.* **174** (2007) 74–81.
21. P. P. Gawas, B. Ramakrishna, N. Veeraiah, V. Nutalapati, *J. Mater. Chem. C* **9** (2021) 16341–16377.
22. A. Baeyer, V. Drewsen, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **15** (1882) 2856–2864.
23. A. Baeyer, *Ann. Chem. Pharm.* **117** (1861) 178–180.
24. A. Baeyer, *Ann. Chem Pharm.* **119** (1861) 126–128.
25. A. Baeyer, *Ann. Chem Pharm.* **130** (1864) 129–175.
26. A. Strecker, *Ann. Chem Pharm.* **155** (1870) 177–185.
27. M. A. Metwally, E. Abdel-Latif, *J. Sulfur Chem.* **33** (2012) 229–257.
28. C. Liebermann, A. Lange, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **12** (1879) 1588–1595.
29. J. Volhard, *Liebigs Ann. Chem Pharm.* **166** (1873) 383–384.
30. E. Mulder, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **8** (1875) 1261–1267.
31. A. Lange, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **12** (1879) 595–599.
32. B. Freytag, *J. Prakt. Chem.* **20** (1879) 380–382.
33. R. Andreasch, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **12** (1879) 1385–1390.
34. R. Andreasch, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **13** (1880) 1423–1427.

35. A. N. Roy, P. C. Guha, *J. Indian Chem. Soc.* **22** (1945) 82–84.
36. M. Wagner, D. Sonntag, R. Grimm, A. Pich, C. Eckerskorn, B. Sohling, J. R. Andreesen, *Eur. J. Biochem.* **260** (1999) 38–49.
37. T. Wirth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **54** (2015) 10074–10076.
38. A. Tabassum, R. G. Bristow, V. Venkateswaran, *Cancer Treat. Rev.* **36** (2010) 230–234.
39. C. Sanmartin, D. Plano, M. Font, J. A. Palop, *Curr. Cancer Drug Tar.* **11** (2011) 496–523.
40. M. Koketsu, A. Takahashi, H. Ishihara, *J. Heterocycl. Chem.* **44** (2007) 79–81.
41. D. Garud, M. Koketsu, H. Ishihara, *Molecules* **12** (2007) 504–535.
42. O. A. Attanasi, P. Filippone, F. R. Perrulli, S. Santeusano, *Eur. J. Org. Chem.* **14** (2002) 2323–2330.
43. J. R. Scott, J. B. Cohen, *J. Chem. Soc. Trans.* **119** (1921) 664–672.
44. E. O. von Lippman, *Ber. Dtsch. Chem. Gese.* **29** (1896) 2645–2654.
45. J. Collip, R. Sandin, *Trans. R. Soc. Canada* **22** (1928) 185–186.
46. E. Baumann, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **7** (1874) 237–239.
47. H. Blendermann, *Z. Physiol. Chem.* **6** (1882) 234–262.
48. H. D. Dakin, *J. Biol. Chem.* **8** (1910) 25–33.
49. F. Lippich, *Z. Physiol. Chem.* **90** (1914) 442–488.
50. T. B. Johnson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2** (1916) 69–73.
51. M. Wada, *Proc. Imp. Acad.* **9** (1933) 43–46.
52. P. Chemla, *Tetrahedron Lett.* **34** (1993) 7391–7394.
53. M. Nakajima, K. Itoi, Y. Takamatsu, T. Kinoshita, T. Okazaki, K. Kawakubo, M. Shindo, T. Honma, M. Tohjigamori, T. Haneishi, *J. Antibiot. (Tokyo)*. **44** (1991) 293–300.
54. D. Bialonska, J. Zjawiony, *Mar. Drugs* **7** (2009) 166–183.
55. C. V. Kavitha, M. Nambiar, C. S. Ananda Kumar, B. Choudhary, K. Muniyappa, K. S. Rangappa, S. C. Raghavan, *Biochem. Pharmacol.* **77** (2009) 348–363.
56. S. Suzen, E. Buyukbingol, *Farm.* **55** (2000) 246–248.
57. C. Carmi, A. Cavazzoni, V. Zuliani, A. Lodola, F. Bordi, P. V. Plazzi, R. R. Alfieri, P. G. Petronini, M. Mor, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16** (2006) 4021–4025.
58. M. E. Jung, S. Ouk, D. Yoo, C. L. Sawyers, C. Chen, C. Tran, J. Wongvipat, *J. Med. Chem.* **53** (2010) 2779–2796.
59. S. Malancona, S. Altamura, G. Filocamo, O. Kinzel, J. I. M. Hernando, M. Rowley, R. Scarpelli, C. Steinkühler, P. Jones, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21** (2011) 4422–4428.
60. A. S. H. da Silva Guerra, D. J. do Nascimento Malta, L. P. Morais Laranjeira, M. B. Souza Maia, N. Cavalcanti Colaço, M. do Carmo Alves de Lima, S. L. Galdino, I. da Rocha Pitta, T. Gonçalves-Silva, *Int. Immunopharmacol.* **11** (2011) 1816–1822.
61. D. Sergeant, Q. Wang, N. A. Sasaki, J. Ouazzani, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18** (2008) 4332–4335.
62. J. Handzlik, E. Szymańska, J. Chevalier, E. Otrębska, K. Kieć-Kononowicz, J.-M. Pagès, S. Alibert, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 5807–5816.
63. F. Fujisaki, K. Shoji, M. Shimodouzo, N. Kashige, F. Miake, K. Sumoto, *Chem. Pharm. Bull.* **58** (2010) 1123–1126.
64. L. A. Shaala, D. T. A. Youssef, *Mar. Drugs* **19** (2021) 691.
65. P. A. Procopiou, V. J. Barrett, N. J. Bevan, P. R. Butchers, R. Conroy, A. Emmons, A. J. Ford, S. Jeulin, B. E. Looker, G. E. Lunniss, V. S. Morrison, P. J. Mutch, R. Perciaccante, M. Ruston, C. E. Smith, G. Somers, *Bioorg. Med. Chem.* **19** (2011) 4192–4201.
66. J. Handzlik, E. Szymańska, K. Nędza, M. Kubacka, A. Siwek, S. Mogilski, J. Handzlik, B. Filipek, K. Kieć-Kononowicz, *Bioorg. Med. Chem.* **19** (2011) 1349–1360.

-
67. J. Handzlik, D. Maciąg, M. Kubacka, S. Mogilski, B. Filipek, K. Stadnicka, K. Kieć-Kononowicz, *Bioorg. Med. Chem.* **16** (2008) 5982–5998.
 68. N. Teno, K. Gohda, K. Wanaka, Y. Tsuda, T. Sueda, Y. Yamashita, T. Otsubo, *Bioorg. Med. Chem.* **22** (2014) 2339–2352.
 69. F. LoVecchio, Hydantoin Anticonvulsants: Phenytoin and Fosphenytoin, in *Crit. Care Toxicol.*, Springer International Publishing, Cham (2017) 1043–1052.
 70. J. L. Romine, D. R. St. Laurent, J. E. Leet, S. W. Martin, M. H. Serrano-Wu, F. Yang, M. Gao, D. R. O’Boyle, J. A. Lemm, J.-H. Sun, P. T. Nower, X. (Stella) Huang, M. S. Deshpande, N. A. Meanwell, L. B. Snyder, *ACS Med. Chem. Lett.* **2** (2011) 224–229.
 71. E. Wernecke, *DMW - Dtsch. Med. Wochensch.* **42** (1916) 1193–1194.
 72. F. Roeder, Über die Anwendung von Schlafmitteln in der Kinderheilkunde, mit besonderer Berücksichtigung des Nirvanols, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1918.
 73. W. Freund, *DMW - Dtsch. Med. Wochensch.* **45** (1919) 1388–1389.
 74. H. H. Merritt, T. Putnam, *J. Am. Med. Assoc.* **111** (1938) 1068.
 75. T. J. Putnam, H. H. Merritt, *Science* **85** (1937) 525–526.
 76. O. P. Kimball, *J. Am. Med. Assoc.* **112** (1939) 1244.
 77. American Medical Association Committee on Pharmacy and Chemistry, *J. Am. Med. Assoc.* **113** (1939) 1734.
 78. M. Rosenbaum, *J. Am. Med. Assoc.* **119** (1942) 582.
 79. M. E. Drake, C. M. Gruber, V. G. Haury, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **71** (1941) 268–272.
 80. H. H. Houston, *Am. J. Med. Sci.* **200** (1940) 541–544.
 81. M. J. Schuh, K. Mustain, S. Crosby, *Inov. Pharm.* **13** (2022) 14.
 82. G. A. Emerson, *Exp. Biol. Med.* **54** (1943) 252–254.
 83. A. Lumière, F. Perrin, *Bull. Soc. Chim.* **36** (1924) 1022–1026.
 84. A. Novelli, Z. M. Lugones, P. Velasco, *An. Asoc. Quím. Argentina* **30** (1942) 225–231.
 85. H. B. Lewis, *J. Biol. Chem.* **13** (1912) 347–356.
 86. J. Chong, W. Oh, B. Liaw, *Onco. Targets. Ther.* **11** (2018) 2141–2147.
 87. J. A. Gibbons, T. Ouatas, W. Krauwinkel, Y. Ohtsu, J.-S. van der Walt, V. Beddo, M. de Vries, J. Mordenti, *Clin. Pharmacokinet.* **54** (2015) 1043–1055.
 88. I. D. Davis, A. J. Martin, M. R. Stockler, S. Begbie, K. N. Chi, S. Chowdhury, X. Coskinas, M. Frydenberg, W. E. Hague, L. G. Horvath, A. M. Joshua, N. J. Lawrence, G. Marx, J. McCaffrey, R. McDermott, M. McJannett, S. A. North, F. Parnis, W. Parulekar, D. W. Pook, M. N. Reaume, S. K. Sandhu, A. Tan, T. H. Tan, A. Thomson, E. Tu, F. Vera-Badillo, S. G. Williams, S. Yip, A. Y. Zhang, R. R. Zielinski, C. J. Sweeney, *N. Engl. J. Med.* **381** (2019) 121–131.
 89. G. E. Benoist, R. J. Hendriks, P. F. A. Mulders, W. R. Gerritsen, D. M. Somford, J. A. Schalken, I. M. van Oort, D. M. Burger, N. P. van Erp, *Clin. Pharmacokinet.* **55** (2016) 1369–1380.
 90. A. J. Armstrong, *J. Natl. Compr. Cancer Netw.* **13** (2015) 690–693.
 91. A. J. Armstrong, R. Z. Szmulewitz, D. P. Petrylak, J. Holzbeierlein, A. Villers, A. Azad, A. Alcaraz, B. Alekseev, T. Iguchi, N. D. Shore, B. Rosbrook, J. Sugg, B. Baron, L. Chen, A. Stenzl, *J. Clin. Oncol.* **37** (2019) 2974–2986.
 92. D. Potin, M. Launay, F. Monatlik, P. Malabre, M. Fabreguettes, A. Fouquet, M. Maillet, E. Nicolai, L. Dorgeret, F. Chevallier, D. Besse, M. Dufort, F. Caussade, S. Z. Ahmad, D. K. Stetsko, S. Skala, P. M. Davis, P. Balimane, K. Patel, Z. Yang, P. Marathe, J. Postelneck, R. M. Townsend, V. Goldfarb, S. Sheriff, H. Einspahr, K. Kish, M. F. Malley, J. D. DiMarco, J. Z. Gougoutas, P. Kadiyala, D. L. Cheney, R. W. Tejwani, D. K. Murphy, K.
-

- W. McIntyre, X. Yang, S. Chao, L. Leith, Z. Xiao, A. Mathur, B.-C. Chen, D.-R. Wu, S. C. Traeger, M. McKinnon, J. C. Barrish, J. A. Robl, E. J. Iwanowicz, S. J. Suchard, T. G. M. Dhar, *J. Med. Chem.* **49** (2006) 6946–6949.
93. S. H. Watterson, Z. Xiao, D. S. Dodd, D. R. Tortolani, W. Vaccaro, D. Potin, M. Launay, D. K. Stetsko, S. Skala, P. M. Davis, D. Lee, X. Yang, K. W. McIntyre, P. Balimane, K. Patel, Z. Yang, P. Marathe, P. Kadiyala, A. J. Tebben, S. Sheriff, C. Y. Chang, T. Ziemba, H. Zhang, B.-C. Chen, A. J. DelMonte, N. Aranibar, M. McKinnon, J. C. Barrish, S. J. Suchard, T. G. Murali Dhar, *J. Med. Chem.* **53** (2010) 3814–3830.
94. F. Nique, S. Hebbe, N. Triballeau, C. Peixoto, J.-M. Lefrançois, H. Jary, L. Alvey, M. Manioc, C. Housseman, H. Klaassen, K. Van Beeck, D. Guédin, F. Namour, D. Minet, E. Van der Aar, J. Feyen, S. Fletcher, R. Blanqué, C. Robin-Jagerschmidt, P. Deprez, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 8236–8247.
95. S. Singh, S. Gauthier, F. Labrie, *Curr. Med. Chem.* **7** (2000) 211–247.
96. U. Münster, C. Nakamura, A. Haberland, K. Jores, W. Mehnert, S. Rummel, M. Schaller, H. C. Korting, C. C. Zouboulis, U. Blume-Peytavi, M. Schäfer-Korting, *Pharmazie* **60** (2005) 8–12.
97. T. Battmann, C. Branche, F. Bouchoux, E. Cerede, D. Philibert, F. Goubet, G. Teutsch, M. Gaillard-Kelly, *J. Steroid Biochem.* **64** (1998) 103–111.
98. G. Teutsch, F. Goubet, T. Battmann, A. Bonfils, F. Bouchoux, E. Cerede, D. Gofflo, M. Gaillard-Kelly, D. Philibert, *J. Steroid Biochem.* **48** (1994) 111–119.
99. N. A. Sims, P. Clément-Lacroix, D. Minet, C. Fraslon-Vanhulle, M. Gaillard-Kelly, M. Resche-Rigon, R. Baron, *J. Clin. Invest.* **111** (2003) 1319–1327.
100. M. Azizmohammadi, M. Khoobi, A. Ramazani, S. Emami, A. Zarrin, O. Firuzi, R. Miri, A. Shafiee, *Eur. J. Med. Chem.* **59** (2013) 15–22.
101. K. Tot, A. Lazić, B. Božić, A. Mandić, T. Djaković Sekulić, *Biomed. Chromatogr.* (2019) e4539.
102. A. Zagórska, A. Czopek, A. Jaromin, M. Mielczarek-Putka, M. Struga, D. Stary, M. Bajda, *Materials (Basel)*. **14** (2021) 4156.
103. L. Sacconnay, L. Ryckewaert, G. M. Randazzo, C. Petit, C. D. S. Passos, J. Jachno, V. Michailovienė, A. Zubrienė, D. Matulis, P.-A. Carrupt, C. A. Simões-Pires, A. Nurisso, *Eur. J. Pharm. Sci.* **85** (2016) 59–67.
104. G. Wang, Y. Wang, L. Wang, L. Han, X. Hou, H. Fu, H. Fang, *Bioorg. Med. Chem.* **23** (2015) 7359–7365.
105. F. Nique, S. Hebbe, C. Peixoto, D. Annot, J.-M. Lefrançois, E. Duval, L. Michoux, N. Triballeau, J.-M. Lemoullec, P. Mollat, M. Thauvin, T. Prangé, D. Minet, P. Clément-Lacroix, C. Robin-Jagerschmidt, D. Fleury, D. Guédin, P. Deprez, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 8225–8235.
106. Y. S. Bae, S. Choi, J. J. Park, J. H. Joo, M. Cui, H. Cho, W. J. Lee, S. H. Lee, *Bioorg. Med. Chem.* **24** (2016) 4144–4151.
107. N. Shankaraiah, S. Nekkanti, K. J. Chudasama, K. R. Senwar, P. Sharma, M. K. Jeengar, V. G. M. Naidu, V. Srinivasulu, G. Srinivasulu, A. Kamal, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24** (2014) 5413–5417.
108. P. Vachal, S. Miao, J. M. Pierce, D. Guiadeen, V. J. Colandrea, M. J. Wyvratt, S. P. Salowe, L. M. Sonatore, J. A. Milligan, R. Hajdu, A. Gollapudi, C. A. Keohane, R. B. Lingham, S. M. Mandala, J. A. DeMartino, X. Tong, M. Wolff, D. Steinhuebel, G. R. Kieczkowski, F. J. Fleitz, K. Chapman, J. Athanasopoulos, G. Adam, C. D. Akyuz, D. K. Jena, J. W. Lusen, J. Meng, B. D. Stein, L. Xia, E. C. Sherer, J. J. Hale, *J. Med. Chem.* **55**

- (2012) 2945–2959.
109. E. Źesławska, A. Kincses, G. Spengler, W. Nitek, K. Wyrzuc, K. Kieć-Kononowicz, J. Handzlik, *Bioorg. Med. Chem.* **24** (2016) 2815–2822.
110. F. Wu, H. Jiang, B. Zheng, M. Kogiso, Y. Yao, C. Zhou, X.-N. Li, Y. Song, *J. Med. Chem.* **58** (2015) 6899–6908.
111. P. Majumdar, C. Bathula, S. M. Basu, S. K. Das, R. Agarwal, S. Hati, A. Singh, S. Sen, B. B. Das, *Eur. J. Med. Chem.* **102** (2015) 540–551.
112. L. Tong, S. H. Kim, K. Rosner, W. Yu, B. B. Shankar, L. Chen, D. Li, C. Dai, V. Girijavallabhan, J. Popovici-Muller, L. Yang, G. Zhou, A. Kosinski, M. A. Siddiqui, N.-Y. Shih, Z. Guo, P. Orth, S. Chen, D. Lundell, X. Niu, S. Umland, J. A. Kozlowski, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27** (2017) 3037–3042.
113. A. Sarswat, E. Wasilewski, S. K. Chakka, A. M. Bello, A. V. Caprariello, C. M. Muthuramu, P. K. Stys, S. E. Dunn, L. P. Kotra, *Bioorg. Med. Chem.* **25** (2017) 2643–2656.
114. C. De Savi, D. Waterson, A. Pape, S. Lamont, E. Hadley, M. Mills, K. M. Page, J. Bowyer, R. A. Maciewicz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23** (2013) 4705–4712.
115. N. Teno, Y. Iguchi, Y. Yamashita, N. Mori, M. Une, T. Nishimaki-Mogami, K. Gohda, *Bioorg. Med. Chem.* **25** (2017) 1787–1794.
116. T. Matsuda, A. Okuda, Y. Watanabe, T. Miura, H. Ozawa, A. Tosaka, K. Yamazaki, Y. Yamaguchi, S. Kurobuchi, M. Koura, K. Shibuya, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25** (2015) 1274–1278.
117. C. Guo, M. Hu, R. J. DeOrazio, A. Usyatinsky, K. Fitzpatrick, Z. Zhang, J.-H. Maeng, D. B. Kitchen, S. Tom, M. Luche, Y. Khmelnsky, A. J. Mhyre, P. R. Guzzo, S. Liu, *Bioorg. Med. Chem.* **22** (2014) 3414–3422.
118. M.-Y. Wang, Y.-Y. Jin, H.-Y. Wei, L.-S. Zhang, S.-X. Sun, X.-B. Chen, W.-L. Dong, W.-R. Xu, X.-C. Cheng, R.-L. Wang, *Eur. J. Med. Chem.* **103** (2015) 91–104.
119. M. K. Langer, A. Rahman, H. Dey, T. Anderssen, H.-M. Blencke, T. Haug, K. Stensvåg, M. B. Strøm, A. Bayer, *Eur. J. Med. Chem.* **249** (2023) 115147.
120. A. M. Caramiello, M. C. Bellucci, E. Ottaviano, S. Ancona, E. Borghi, A. Volonterio, *Org. Biomol. Chem.* **21** (2023) 7702–7706.
121. K. Haj Mohammad Ebrahim Tehrani, M. Hashemi, M. Hassan, F. Kobarfard, S. Mohebbi, *Chinese Chem. Lett.* **27** (2016) 221–225.
122. D. Erşen, M. Ülger, S. Mangelinckx, M. Gemili, E. Şahin, Y. Nural, *Med. Chem. Res.* **26** (2017) 2152–2160.
123. J. Handzlik, E. Szymańska, S. Alibert, J. Chevalier, E. Otrębska, E. Pękala, J.-M. Pagès, K. Kieć-Kononowicz, *Bioorg. Med. Chem.* **21** (2013) 135–145.
124. Y. Zheng, J. Zhou, D. A. Sayre, H. O. Sintim, *Chem. Commun.* **50** (2014) 11234–11237.
125. Y. Zheng, J. Zhou, S. M. Cooper, C. Opoku-Temeng, A. M. De Brito, H. O. Sintim, *Tetrahedron* **72** (2016) 3554–3558.
126. M. J. Meyers, E. J. Anderson, S. A. McNitt, T. M. Krenning, M. Singh, J. Xu, W. Zeng, L. Qin, W. Xu, S. Zhao, L. Qin, C. S. Eickhoff, J. Oliva, M. A. Campbell, S. D. Arnett, M. J. Prinsen, D. W. Griggs, P. G. Ruminski, D. E. Goldberg, K. Ding, X. Liu, Z. Tu, M. D. Tortorella, F. M. Sverdrup, X. Chen, *Bioorg. Med. Chem.* **23** (2015) 5144–5150.
127. A. Buchynskyy, J. R. Gillespie, Z. M. Herbst, R. M. Ranade, F. S. Buckner, M. H. Gelb, *ACS Med. Chem. Lett.* **8** (2017) 886–891.
128. M. Abdoli, V. De Luca, C. Capasso, C. T. Supuran, R. Žalubovskis, *Int. J. Mol. Sci.* **23** (2022) 14115.

-
129. C. E. Theodore, G. Sivaiah, S. B. B. Prasad, K. Y. Kumar, M. S. Raghu, F. Alharethy, M. K. Prashanth, B.-H. Jeon, *Chem. Phys. Impact* **7** (2023) 100319.
 130. B. Lapan, *Am. J. Obstet. Gynecol.* **78** (1959) 1320–1323.
 131. N. K. B. Kimbell, *Int. J. Obstet. Gynaecol.* **73** (1966) 319–319.
 132. D. F. Morris, D. L. Sugrue, *Sex. Transm. Infect.* **51** (1975) 123–124.
 133. E. Epstein, *Obstet. Gynecol.* **27** (1966) 369–370.
 134. Y. A. Ivanenkov, M. S. Veselov, I. G. Rezekin, D. A. Skvortsov, Y. B. Sandulenko, M. V. Polyakova, D. S. Bezrukov, S. V. Vasilevsky, M. E. Kukushkin, A. A. Moiseeva, A. V. Finko, V. E. Koteliansky, N. L. Klyachko, L. A. Filatova, E. K. Beloglazkina, N. V. Zyk, A. G. Majouga, *Bioorg. Med. Chem.* **24** (2016) 802–811.
 135. R. Alhasan, G. M. Martins, P. P. de Castro, R. S. Z. Saleem, A. Zaiter, I. Fries-Raeth, A. Kleinclauss, C. Perrin-Sarrado, P. Chaimbault, E. N. da Silva Júnior, C. Gaucher, C. Jacob, *Bioorg. Med. Chem.* **94** (2023) 117479.
 136. S. L. Ruskin, M. Pfalz, *J. Am. Chem. Soc.* **60** (1938) 1471–1472.
 137. J. Zhu, A. Wumanjiang, Y. Wang, L. Zhang, P. Li, *Yingyong Huagong* **39** (2010) 702–703.
 138. R. L. McKee, H. R. Henze, *J. Am. Chem. Soc.* **66** (1944) 2020–2023.
 139. W. Bockmühl, W. Persch, Aromatic copper-mercaptop compound and a process of preparing it, U.S. Patent, US232344 (1944).
 140. H. R. Kim, H. J. Lee, Y. J. Choi, Y. J. Park, Y. Woo, S. J. Kim, M. H. Park, H. W. Lee, P. Chun, H. Y. Chung, H. R. Moon, *Med. Chem. Commun.* **5** (2014) 1410–1417.
 141. H. Choi, I. Y. Ryu, I. Choi, S. Ullah, H. J. Jung, Y. Park, Y. Jeong, Y. Hwang, S. Hong, I.-S. Yoon, H. Yun, M.-S. Kim, J.-W. Yoo, Y. Jung, P. Chun, H. R. Moon, *Molecules* **26** (2021) 4963.
 142. C. Graenacher, R. Matter, M. Matter, Printing Colors and Process of Printing, U.S. Patent, US2225384 (1940).
 143. G. Sun, X. Xu, J. R. Bickett, J. F. Williams, *Ind. Eng. Chem. Res.* **40** (2001) 1016–1021.
 144. W. D. Stewart, Ureides of Glyoxilic and Glicollic Acids as Catalysts for the Polymerization of Butadiene-1,3 Hydrocarbons, U.S. Patent, US2430591 (1943).
 145. E. I. du Pont de Nemours, and Company, J. F. Walker, British Patent, 564424 (1944).
 146. Deutsche Gold- und Silber-Scheideanstalt Vorm. Rössler, Verfahren zur Darstellung von Indoxyl bzw. dessen Derivaten und Homologen, German Patent, DE142700 (1903).
 147. Farbwerke Vorm. Meister, Lucius and Bruning, Verfahren zur Darstellung von Indigo und dessen Homologen aus α -Arylhydantoinen, German Patent, DE132477 (1902).
 148. A. O. Rogers, 1, 3-Dichloro-5-methyl-5-isobutyl Hydantoin and Method of Preparation, U.S. Patent, US2398598 (1946).
 149. A. O. Rogers, Chlorinated Hydantoins, U.S. Patent, US2398599 (1946).
 150. A. O. Rogers, Chlorinated Methylene-bisdimethyl Hydantoin, U.S. Patent, US2404096 (1946).
 151. F. T. Peters, Rinse Compositions, U.S. Patent, US2422255 (1947).
 152. E. I. du Pont de Nemours, and Company, British Patent, 582719 (1947).
 153. C. G. Kamin, Process of Treating Vinyl Chloride-Containing Polymers, U.S. Patent, US2441360 (1948).
 154. H. E. Schroeder, Treatment of Rubbery Diene Hydrocarbon Polymers Prior to the Incorporation of Compounding Ingredients, U.S. Patent, US2416667 (1947).
 155. R. A. Jacobson, Dithiohydantoins, U.S. Patent, US2143816 (1939).
 156. A. Jancsó, E. Kovács, L. Cseri, B. J. Rózsa, G. Galbács, I. G. Csizmadia, Z. Mucsi,
-

- Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **218** (2019) 161–170.
157. M. M. Moustafa, *Synth. React. Inorg. Met. Chem.* **27** (1997) 1417–1436.
158. S. T. Caldwell, A. G. Cairns, M. Olson, S. Chalmers, M. Sandison, W. Mullen, J. G. McCarron, R. C. Hartley, *Tetrahedron* **71** (2015) 9571–9578.
159. X. Yong, M. Su, W. Wang, Y. Yan, J. Qu, R. Liu, *Org. Biomol. Chem.* **11** (2013) 2254.
160. S. Sasmal, D. Haldar, *ChemistrySelect* **2** (2017) 5832–5837.
161. Y. L. Aly, A. A. El-Barbary, A. A. El-Shehawy, *Phosphorus Sulfur* **179** (2004) 185–202.
162. B. A. Ivin, G. V. Rutkovskii, N. A. Smorygo, E. G. Sochilin, *Zh. Org. Khim.*, **6** (1970) 2601.
163. L. W. Pickett, M. McLean, *J. Am. Chem. Soc.* **61** (1939) 423–425.
164. J. T. Edward, O. J. Chin, *Can. J. Chem.* **41** (1963) 1650–1651.
165. M. J. Bausch, B. David, P. Dobrowolski, V. Prasad, *J. Org. Chem.* **55** (1990) 5806–5808.
166. Y. Shintani, K. Kato, M. Kawami, M. Takano, T. Kumamoto, *Chem. Pharm. Bull.* **69** (2021) 407–410.
167. K. Moribe, A. Ogino, T. Kumamoto, T. Ishikawa, W. Limwikrant, K. Higashi, K. Yamamoto, *J. Pharm. Sci.* **101** (2012) 3413–3424.
168. H. E. Johnson, Bis(hydantoins), U.S. Patent, US3225060 (1965).
169. M. Mudit, M. Khanfar, A. Muralidharan, S. Thomas, G. V. Shah, R. W. M. van Soest, K. A. El Sayed, *Bioorg. Med. Chem.* **17** (2009) 1731–1738.
170. J. Marton, J. Enisz, S. Hosztafi, T. Timar, *J. Agric. Food Chem* **41** (1993) 148–152.
171. G. P. Pendse, S. Dutt, *J. Indian Chem. Soc.* **7** (1930) 953–956.
172. R. Andreasch, *Monatsh. Chem.* **23** (1902) 803–815.
173. L. Siemonsen, *Liebigs Ann. Chem.* **333** (1904) 101–141.
174. W. Marckwald, M. Neumark, R. Stelzner, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **24** (1891) 3278–3298.
175. V. G. Namjoshi, S. Dutt, *J. Indian Chem. Soc.* **8** (1931) 241–246.
176. E. Baumann, F. Hoppe-Seyler, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **7** (1874) 34–38.
177. E. Friedman, *Beitr. Chem. Physiol. Path* **11** (1908) 158–176.
178. C. A. Brautlecht, *J. Biol. Chem.* **10** (1911) 139–146.
179. W. J. A. Jongkees, *Rec. Trav. Chim.* **27** (1908) 287–326.
180. C. K. Ingold, S. Sako, J. F. Thorpe, *J. Chem. Soc.* **121** (1922) 1177–1198.
181. T. B. Johnson, D. A. Hahn, *J. Am. Chem. Soc.* **39** (1917) 1255–1266.
182. B. H. Nicolet, E. D. Campbell, *J. Am. Chem. Soc.* **50** (1928) 1155–1160.
183. T. N. Ghosh, *J. Indian Chem. Soc.* **11** (1934) 23–32.
184. H. L. Wheeler, C. Hoffman, *Am. Chem. J.* **46** (1911) 368–383.
185. T. B. Johnson, J. S. Bates, *J. Am. Chem. Soc.* **38** (1916) 1087–1098.
186. D. A. Hahn, A. G. Renfrew, *J. Am. Chem. Soc.* **47** (1925) 147–163.
187. S. Cortes, H. Kohn, *J. Org. Chem.* **48** (1983) 2246–2254.
188. G. G. Trigo, E. de la Cuesta, P. Ballesteros, *Heterocycles* **16** (1981) 1647.
189. E. Ratajczak, D. Price, *Bull. Acad. Pol. Sci., Chim.* **29** (1981) 315.
190. J.-C. Gramain, R. Remuson, J.-P. Jeandrau, J. Lemaire, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **109** (2010) 325–331.
191. J. H. Bateman, Hydantoin and derivatives, in K. Othmer (Ed.), *Encycl. Chem. Technol.*, 3rd ed., Wiley-Interscience, New York (1980) 692–711.
192. M.-J. Blais, O. Enea, G. Berthon, *Thermochim. Acta* **30** (1979) 45–53.
193. K. Oyaizu, Y. Ohtani, A. Shiozawa, K. Sugawara, T. Saito, M. Yuasa, *Inorg. Chem.* **44** (2005) 6915–6917.
194. A. Bakalova, R. Buyukliev, G. Momekov, D. Ivanov, D. Todorov, S. Konstantinov, M.

- Karaivanova, *Eur. J. Med. Chem.* **40** (2005) 590–596.
195. A. Bakalova, R. Buyukliev, H. Varbanov, G. Momekov, *Inorg. Chim. Acta* **423** (2014) 46–51.
196. A. Bakalova, H. Varbanov, R. Buyukliev, G. Momekov, D. Ferdinandov, S. Konstantinov, D. Ivanov, *Eur. J. Med. Chem.* **43** (2008) 958–965.
197. A. Bakalova, H. Varbanov, R. Buyukliev, G. Momekov, D. Ivanov, *J. Therm. Anal. Calorim.* **95** (2009) 241–246.
198. S. J. Sabounchei, P. Shahriary, Y. Gholiee, S. Salehzadeh, H. R. Khavasi, A. Chehregani, *Inorg. Chim. Acta* **409** (2014) 265–275.
199. S. J. Sabounchei, P. Shahriary, S. Salehzadeh, Y. Gholiee, D. Nematollahi, A. Chehregani, A. Amani, Z. Afsartala, *Spectrochim. Acta A* **135** (2015) 1019–1031.
200. S. J. Sabounchei, P. Shahriary, S. Salehzadeh, Y. Gholiee, A. Chehregani, *CR Chim.* **18** (2015) 564–572.
201. S. J. Sabounchei, P. Shahriary, S. Salehzadeh, Y. Gholiee, D. Nematollahi, A. Chehregani, A. Amani, *New J. Chem.* **38** (2014) 1199.
202. S. J. Sabounchei, P. Shahriary, S. Salehzadeh, Y. Gholiee, H. R. Khavasi, *J. Mol. Struct.* **1051** (2013) 15–22.
203. S. J. Sabounchei, P. Shahriary, H. A. Rudbari, A. Chehregani, *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **25** (2015) 1032–1039.
204. M. Puszyńska-Tuszkano, T. Grabowski, M. Daszkiewicz, J. Wietrzyk, B. Filip, G. Maciejewska, M. Cieślak-Golonka, *J. Inorg. Biochem.* **105** (2011) 17–22.
205. M. Puszyńska-Tuszkano, M. Daszkiewicz, G. Maciejewska, Z. Staszak, J. Wietrzyk, B. Filip, M. Cieślak-Golonka, *Polyhedron* **30** (2011) 2016–2025.
206. X. Hu, X. Xu, D. Wang, Y. Zhang, *Acta Crystallogr. E* **65** (2009) m1426–m1426.
207. M. Ruiz-Castañeda, A. M. Rodríguez, A. H. Aboo, B. R. Manzano, G. Espino, J. Xiao, F. A. Jalón, *Appl. Organomet. Chem.* **34** (2020).
208. P. Arrizabalage, P. Castan, J.-P. Laurent, *Transit. Met. Chem.* **5** (1980) 324–327.
209. S. Abdullah, R. Al Hassani, A. J. Atia, A. Hussein, *Acta Chim. Pharm. Indica* **6** (2016) 80–91.
210. B. Šmit, R. Z. Pavlović, A. Radosavljević-Mihailović, A. Došen, M. G. Čurčić, D. S. Šeklić, M. N. Živanović, *J. Serb. Chem. Soc.* **78** (2013) 217–227.
211. D. C. Dash, F. M. Meher, P. C. Mohanty, J. Nanda, *Indian J. Chem.* **26A** (1987) 698–701.
212. L. A. Ismail, R. Zakaria, E. M. Hassan, M. Y. Alfaifi, A. A. Shati, S. E. I. Elbehairi, A. A. El-Bindary, R. F. M. Elshaarawy, *RSC Adv.* **12** (2022) 28364–28375.
213. A. Fedorchuk, E. Goresnik, Y. Slyvka, M. Mys'kiv, *Acta Chim. Slov.* **67** (2020) 1148–1154.
214. K. Tishchenko, E. Beloglazkina, M. Proskurnin, V. Malinnikov, D. Guk, M. Muratova, O. Krasnovskaya, A. Udina, D. Skvortsov, R. R. Shafikov, Y. Ivanenkov, V. Aladinskiy, I. Sorokin, O. Gromov, A. Majouga, N. Zyk, *J. Inorg. Biochem.* **175** (2017) 190–197.
215. E. K. Beloglazkina, A. G. Majouga, A. V. Mironov, A. V. Yudina, O. Y. Kuznetsova, N. V. Zyk, *Polyhedron* **76** (2014) 45–50.
216. F. Urech, *Liebigs Ann. Chem. Pharm.* **165** (1873) 99–103.
217. C. Harries, M. Weiss, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **33** (1900) 3418–3420.
218. W. J. Boyd, *Biochem. J.* **27** (1933) 1838–1848.
219. H. D. Dakin, *Am. Chem. J.* **44** (1910) 48–60.
220. A. Kossel, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **24** (1891) 4145–4156.
221. T. B. Johnson, B. H. Nicolet, *J. Am. Chem. Soc.* **36** (1914) 355–364.

222. W. T. Read, *J. Am. Chem. Soc.* **44** (1922) 1746–1755.
223. T. B. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **35** (1913) 780–784.
224. T. B. Johnson, B. H. Nicolet, *Am. Chem. J.* **49** (1913) 197–204.
225. P. Schlach, W. Kumpf, *Z. Physiol. Chem.* **154** (1926) 125–170.
226. V. Haridas, S. Sadanandan, G. Hundal, C. H. Suresh, *Tetrahedron Lett.* **53** (2012) 5523–5527.
227. A. Takahashi, H. Matsuoka, Y. Uda, *Environ. Mutagen Res.* **26** (2004) 1–8.
228. I. B. Douglass, F. B. Dains, *J. Am. Chem. Soc.* **56** (1934) 719–721.
229. K. M. Haring, T. B. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **55** (1933) 395–402.
230. L. F. Fieser, H. J. Creech, *J. Am. Chem. Soc.* **61** (1939) 3502–3506.
231. H. J. Creech, *J. Am. Chem. Soc.* **63** (1941) 576–578.
232. H. Heymann, L. F. Fieser, *J. Am. Chem. Soc.* **67** (1945) 1979–1986.
233. E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **34** (1901) 433–454.
234. L. Konnert, B. Reneaud, R. M. de Figueiredo, J.-M. Campagne, F. Lamaty, J. Martinez, E. Colacino, *J. Org. Chem.* **79** (2014) 10132–10142.
235. J. R. Bailey, D. F. Snyder, *J. Am. Chem. Soc.* **37** (1915) 935–942.
236. P. Ventosa-Andrés, J. A. González-Vera, M. T. García-López, R. Herranz, *Org. Lett.* **15** (2013) 632–635.
237. M. Bergmann, A. Miekeley, *Liebigs Ann. Chem.* **458** (1927) 40–75.
238. P. Edman, *Acta Chem. Scand.* **4** (1950) 283–293.
239. P. Edman, G. Begg, *Eur. J. Biochem.* **1** (1967) 80–91.
240. L. Konnert, L. Gonnet, I. Halasz, J.-S. Suppo, R. M. de Figueiredo, J.-M. Campagne, F. Lamaty, J. Martinez, E. Colacino, *J. Org. Chem.* **81** (2016) 9802–9809.
241. T. L. Davis, K. C. Blanchard, *J. Am. Chem. Soc.* **51** (1929) 1790–1801.
242. F. Leuthardt, R. Brunner, *Helv. Chim. Acta* **30** (1947) 964–965.
243. A. Angeli, *Atti Accad. Lincei* **17** (1908) 311–314.
244. A. K. Liton, M. R. Islam, *Bangladesh J. Pharmacol.* **1** (2008).
245. B. Bhat, K. Dhar, S. Puri, M. Spiteller, *Synlett* **2006** (2006) 2723–2726.
246. H. Biltz, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **42** (1909) 1792–1800.
247. H. Biltz, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **41** (1908) 1379–1393.
248. D. Sachdev, A. Dubey, *Catal. Commun.* **11** (2010) 1063–1067.
249. Y. Tang, Q. Cheng, S. Wang, J. Zhang, *Monats. Chem.* **145** (2014) 1501–1506.
250. J. Safari, H. Naeimi, M. M. Ghanbari, O. Sabzi Fini, *Russ. J. Org. Chem.* **45** (2009) 477–479.
251. F. A. Gbaguidi, S. S. D. Kpoviessi, C. N. Kapanda, G. G. Muccioli, D. M. Lambert, G. C. Accrombessi, M. Mansourou, J. H. Poupert, *African J. Pure Appl. Chem.* **5** (2011) 168–175.
252. N. M. Arani, J. Safari, *Ultrason. Sonochem.* **18** (2011) 640–643.
253. J. Safari, N. Moshtael Arani, A. Ramezan Isfahani, *Chinese J. Chem.* **28** (2010) 255–258.
254. T. T. Du, J. F. Li, L. J. Min, *Adv. Mater. Res.* **518–523** (2012) 3917–3920.
255. I. A. Hashmi, A. Aslam, S. K. Ali, V. Ahmed, F. I. Ali, *Synth. Commun.* **40** (2010) 2869–2874.
256. Z. Jerzmanowska-Sienkiewiczowa, *Rocz. Chem.* **15** (1935) 202–208.
257. S. Ruhemann, H. E. Stapleton, *J. Chem. Soc.* **77** (1900) 239–251.
258. R. Davies, P. Rydberg, E. Westberg, H. V. Motwani, E. Johnstone, M. Törnqvist, *Chem. Res. Toxicol.* **23** (2010) 540–546.
259. T. B. Johnson, A. J. Hill, E. B. Kelsey, *J. Am. Chem. Soc.* **42** (1920) 1711–1720.

260. A. J. Hill, E. B. Kelsey, *J. Am. Chem. Soc.* **44** (1922) 2357–2369.
261. A. Morel, *Compt. Rend.* **143** (1906) 119–121.
262. F. Wessely, M. John, *Z. Physiol. Chem.* **170** (1927) 167–182.
263. S. Kodama, *J. Chem. Soc. Japan* **42** (1921) 1005–1017.
264. W. Hentschel, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **31** (1898) 508–510.
265. N. Teno, K. Gohda, Y. Yamashita, T. Otsubo, M. Yamaguchi, K. Wanaka, Y. Tsuda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **26** (2016) 2259–2261.
266. C. Tropp, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **61** (1928) 1431–1439.
267. E. Koenigs, B. Mylo, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **41** (1908) 4427–4443.
268. A. G. Chemische Fabrik von Heyden, German patent, Verfahren zur Herstellun von Hydantoinen, DE310427 (1919).
269. T. B. Johnson, L. H. Chernoff, *J. Am. Chem. Soc.* **34** (1912) 1208–1213.
270. A. Baeyer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **8** (1875) 612–614.
271. B. Hepner, S. Frenkenberg, *J. Prakt. Chem.* **134** (1932) 249–256.
272. T. J. Thompson, H. L. Bedell, G. M. Buffett, *J. Am. Chem. Soc.* **47** (1925) 874–876.
273. H. R. Henze, R. J. Speer, *J. Am. Chem. Soc.* **64** (1942) 522–523.
274. G. Ciamician, P. Silber, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **47** (1914) 1806–1814.
275. H. Bergs, German patent, 566,094, 1929.
276. H. T. Bucherer, H. Barsch, *J. Prakt. Chem.* **140** (1934) 151–171.
277. H. T. Bucherer, W. Steiner, *J. Prakt. Chem.* **140** (1934) 291–316.
278. H. T. Bucherer, V. A. Lieb, *J. Prakt. Chem.* **141** (1934) 5–43.
279. P. Pfeiffer, A. Diebold, *J. Prakt. Chem.* **148** (1937) 24–34.
280. H. R. Henze, L. M. Long, *J. Am. Chem. Soc.* **63** (1941) 1941–1943.
281. H. R. Henze, L. G. Nunn, *J. Org. Chem.* **12** (1947) 543–546.
282. A. O. Rogers, Hydantoin manufacture, U. S. patent, US2391799 (1945).
283. W. F. Gresham, C. E. Schweitzer, Preparation of hydantoin, U. S. patent, US2402134, 1946.
284. R. A. Jacobson, *J. Am. Chem. Soc.* **67** (1945) 1996–1998.
285. C. Montagne, J. J. Shiers, M. Shipman, *Tetrahedron Lett.* **47** (2006) 9207–9209.
286. C. Montagne, M. Shipman, *Synlett* **2006** (2006) 2203–2206.
287. R. G. Murray, D. M. Whitehead, F. Le Strat, S. J. Conway, *Org. Biomol. Chem.* **6** (2008) 988.
288. M. Kondo, T. Nishi, T. Hatanaka, Y. Funahashi, S. Nakamura, *Angew. Chem. Int. Ed.* **54** (2015) 8198–8202.
289. J. Safari, L. Javadian, *CR Chim.* **16** (2013) 1165–1171.
290. K. Faghihi, K. Zamani, A. Mobinikhaledi, *Turk. J. Chem.* **28** (2004) 345–350.
291. J. Monteiro, B. Pieber, A. Corrêa, C. Kappe, *Synlett* **27** (2015) 83–87.
292. H. Rheineck, *Ann. Chem. Pharm.* **134** (1865) 219–228.
293. C. Neubauer, *Ann. Chem. Pharm.* **137** (1866) 288–298.
294. J. Tafel, L. Reindl, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **34** (1901) 3286–3291.
295. H. Biltz, D. Heidrich, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **54** (1921) 1829–1833.
296. P. E. Ivashkin, K. A. Lukyanov, S. Lukyanov, I. V. Yampolsky, *J. Org. Chem.* **76** (2011) 2782–2791.
297. I. M. Wyzlic, W. Tjarks, A. H. Soloway, D. J. Perkins, M. Burgos, K. P. O'Reilly, *Inorg. Chem.* **35** (1996) 4541–4547.
298. H. Kaur, B. Halliwell, *Chem. Biol. Interact.* **73** (1990) 235–247.
299. H. Yu, J. C. Niles, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum, *Org. Lett.* **6** (2004) 3417–3420.

-
300. L. F. Cavalieri, V. E. Blair, G. B. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **70** (1948) 1240–1242.
301. J. E. B. McCallum, C. Y. Kuniyoshi, C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004) 16777–16782.
302. J. C. Niles, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum, *Chem. Res. Toxicol.* **17** (2004) 1510–1519.
303. S. S. Hah, H. M. Kim, R. A. Sumbad, P. T. Henderson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15** (2005) 3627–3631.
304. J.-L. Ravanat, G. R. Martinez, M. H. G. Medeiros, P. Di Mascio, J. Cadet, *Tetrahedron* **62** (2006) 10709–10715.
305. A. M. Fleming, A. M. Orendt, Y. He, J. Zhu, R. K. Dukor, C. J. Burrows, *J. Am. Chem. Soc.* **135** (2013) 18191–18204.
306. X. Chen, A. M. Fleming, J. G. Muller, C. J. Burrows, *New J. Chem.* **37** (2013) 3440.
307. B. Karwowski, F. Dupeyrat, M. Bardet, J.-L. Ravanat, P. Krajewski, J. Cadet, *Chem. Res. Toxicol.* **19** (2006) 1357–1365.
308. Y. Ye, J. G. Muller, C. J. Burrows, *J. Org. Chem.* **71** (2006) 2181–2184.
309. H. Müller, T. Carell, *Eur. J. Org. Chem.* **2007** (2007) 1438–1445.
310. S. Gourdain, A. Martinez, C. Petermann, D. Harakat, P. Clivio, *J. Org. Chem.* **74** (2009) 6885–6887.
311. K. V. Nguyen, J. G. Muller, C. J. Burrows, *Tetrahedron Lett.* **52** (2011) 2176–2180.
312. C. M. B. Neves, M. M. Q. Simões, I. C. M. S. Santos, F. M. J. Domingues, M. G. P. M. S. Neves, F. A. Almeida Paz, A. M. S. Silva, J. A. S. Cavaleiro, *Tetrahedron Lett.* **52** (2011) 2898–2902.
313. J. Rivière, F. Bergeron, S. Tremblay, D. Gasparutto, J. Cadet, J. R. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004) 6548–6549.
314. J. Rivière, K. Klarskov, J. R. Wagner, *Chem. Res. Toxicol.* **18** (2005) 1332–1338.
315. F. Samson-Thibault, G. S. Madugundu, S. Gao, J. Cadet, J. R. Wagner, *Chem. Res. Toxicol.* **25** (2012) 1902–1911.
316. H. C. Carrington, *J. Chem. Soc.* (1947) 684.
317. B. Šmit, M. Rodić, R. Pavlović, *Synthesis (Stuttg.)* **48** (2015) 387–393.
318. P. G. C. de Carvalho, J. M. Ribeiro, R. P. B. Garbin, G. Nakazato, S. F. Yamada Ogatta, Â. de Fátima, M. de Lima Ferreira Bispo, F. Macedo, *Lett. Drug Des. Discov.* **17** (2020) 94–102.
319. Z. Rajic, B. Zorc, S. Raic-Malic, K. Ester, M. Kralj, K. Pavelic, J. Balzarini, E. De Clercq, M. Mintas, *Molecules* **11** (2006) 837–848.
320. A. Takahashi, H. Matsuoka, K. Yamada, Y. Uda, *Food Chem. Toxicol.* **43** (2005) 521–528.
321. I. J. Bruno, J. C. Cole, M. Kessler, J. Luo, W. D. S. Motherwell, L. H. Purkis, B. R. Smith, R. Taylor, R. I. Cooper, S. E. Harris, A. G. Orpen, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **44** (2004) 2133–2144.
322. C. Jelsch, K. Ejsmont, L. Huder, *IUCrJ* **1** (2014) 119–128.
323. A. M. Al-Obaid, H. I. El-Subbagh, A. Khodair, M. M. A. Elmazar, *Anticancer Drugs* **7** (1996) 873–880.
324. M. M. W. Habib, M. A. O. Abdelfattah, A. H. Abadi, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **348** (2015) 868–874.
325. J. Handzlik, E. Szymańska, R. Wójcik, A. Dela, M. Jastrzębska-Więsek, J. Karolak-Wojciechowska, A. Fruziński, A. Siwek, B. Filipek, K. Kieć-Kononowicz, *Bioorg. Med. Chem.* **20** (2012) 4245–4257.
326. S. S. Arya, J. E. Rookes, D. M. Cahill, S. K. Lenka, *Adv. Tradit. Med.* **21** (2021) 1–17.
-

-
327. D. P. Bezerra, A. K. N. Soares, D. P. de Sousa, *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016** (2016) 1–9.
328. C. Dhanalakshmi, T. Manivasagam, J. Nataraj, A. Justin Thenmozhi, M. M. Essa, *Evid.-Based Compl. Alt.* **2015** (2015) 1–11.
329. R. Yadav, D. Saini, D. Yadav, *Turk. J. Pharm. Sci.* (2018).
330. M. Scipioni, G. Kay, I. Megson, P. Kong Thoo Lin, *Eur. J. Med. Chem.* **143** (2018) 745–754.
331. M. Scipioni, G. Kay, I. L. Megson, P. Kong Thoo Lin, *Medchemcomm* **10** (2019) 764–777.
332. A. Takahashi, H. Matsuoka, Y. Ozawa, Y. Uda, *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 5037–5042.
333. L. Drobnička, J. Augustin, *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **30** (1965) 99–104.
334. K. Cejpek, J. Valusek, J. Velisek, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 3560–3565.
335. F. Susanne, D. S. Smith, A. Codina, *Org. Process Res. Dev.* **16** (2012) 61–64.
336. M. Garrido, M. S. Larrechi, F. X. Rius, L. A. Mercado, M. Galià, *Anal. Chim. Acta* **583** (2007) 392–401.
337. M. Khajeh, A. Botana, M. A. Bernstein, M. Nilsson, G. A. Morris, *Anal. Chem.* **82** (2010) 2102–2108.
338. H. Zeng, Y. Lee, C. Hilty, *Anal. Chem.* **82** (2010) 8897–8902.
339. I. L. Barsukov, *NMR Methods for Kinetic Analysis*, in *Encyclopedia of Biophysics*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg (2013) 1724–1727.
340. J. Bart, A. J. Kolkman, A. J. Oosthoek-de Vries, K. Koch, P. J. Nieuwland, H. Janssen, J. van Bentum, K. A. M. Ampt, F. P. J. T. Rutjes, S. S. Wijmenga, H. Gardeniers, A. P. M. Kentgens, *J. Am. Chem. Soc.* **131** (2009) 5014–5015.
341. M. D. Christianson, E. H. P. Tan, C. R. Landis, *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010) 11461–11463.
342. G.-J. Cheng, X. Zhang, L. W. Chung, L. Xu, Y.-D. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **137** (2015) 1706–1725.
343. R. A. Friesner, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102** (2005) 6648–6653.
344. Q. N. N. Nguyen, D. J. Tantillo, *Chem. Asian J.* **9** (2014) 674–680.
345. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, N. J. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian 09, Revision C.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
346. P. Hohenberg, W. Kohn, *Phys. Rev.* **136** (1964) B864–B871.
347. J. A. Pople, *Angew. Chemie Int. Ed.* **38** (1999) 1894–1902.
348. W. Kohn, *Rev. Mod. Phys.* **71** (1999) 1253–1266.
349. A. Rimola, S. Ferrero, A. Germain, M. Corno, P. Ugliengo, *Minerals* **11** (2020) 26.
350. C. Møller, M. S. Plesset, *Phys. Rev.* **46** (1934) 618–622.
351. P. E. M. Siegbahn, *The Configuration Interaction Method*, in *Lect. Notes Chem.* (1992) 255–293.
-

352. W. Kohn, L. J. Sham, *Phys. Rev.* **140** (1965) A1133–A1138.
353. S. F. Sousa, P. A. Fernandes, M. J. Ramos, *J. Phys. Chem. A* **111** (2007) 10439–10452.
354. J. P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof, *Phys. Rev. Lett.* **77** (1996) 3865–3868.
355. W.-M. Hoe, A. J. Cohen, N. C. Handy, *Chem. Phys. Lett.* **341** (2001) 319–328.
356. N. C. Handy, A. J. Cohen, *Mol. Phys.* **99** (2001) 403–412.
357. J. P. Perdew, J. A. Chevary, S. H. Vosko, K. A. Jackson, M. R. Pederson, D. J. Singh, C. Fiolhais, *Phys. Rev. B* **46** (1992) 6671–6687.
358. J. P. Perdew, K. Burke, Y. Wang, *Phys. Rev. B* **54** (1996) 16533–16539.
359. A. D. Becke, *Phys. Rev. A* **38** (1988) 3098–3100.
360. C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B* **37** (1988) 785–789.
361. A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 1372–1377.
362. A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 5648–5652.
363. J. P. Perdew, M. Ernzerhof, K. Burke, *J. Chem. Phys.* **105** (1996) 9982–9985.
364. C. Adamo, V. Barone, *J. Chem. Phys.* **110** (1999) 6158–6170.
365. J.-D. Chai, M. Head-Gordon, *J. Chem. Phys.* **128** (2008).
366. Y. Zhao, D. G. Truhlar, *J. Chem. Phys.* **125** (2006).
367. Y. Zhao, D. G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.* **120** (2008) 215–241.
368. S. F. Boys, F. Bernardi, *Mol. Phys.* **19** (1970) 553–566.
369. P. J. Hay, W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.* **82** (1985) 299–310.
370. W. R. Wadt, P. J. Hay, *J. Chem. Phys.* **82** (1985) 284–298.
371. P. J. Hay, W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.* **82** (1985) 270–283.
372. R. E. Skyner, J. L. McDonagh, C. R. Groom, T. van Mourik, J. B. O. Mitchell, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17** (2015) 6174–6191.
373. K. Kucwaj-Brysz, G. Latacz, S. Podlewska, E. Żesławska, J. Handzlik, A. Lubelska, G. Satała, W. Nitek, J. Handzlik, *Bioorg. Chem.* **106** (2021) 104466.
374. A. M. Lazić, L. D. Radovanović, B. Đ. Božić, B. Đ. Božić Nedeljković, V. D. Vitnik, Ž. J. Vitnik, J. R. Rogan, N. V. Valentić, G. S. Ušćumlić, N. P. Trišović, *J. Mol. Struct.* **1180** (2019) 48–62.
375. A. I. Khodair, S. B. Bakare, M. K. Awad, S. A. Al-Issa, M. S. Nafie, *J. Heterocycl. Chem.* **59** (2022) 664–685.
376. V. Deval, A. Kumar, V. Gupta, A. Sharma, A. Gupta, P. Tandon, K.-K. Kunimoto, *Spectrochim. Acta A* **132** (2014) 15–26.
377. G. E. Delgado, A. J. Mora, L. E. Seijas, L. Rincón, G. Marroquin, J. Cisterna, A. Cárdenas, I. Brito, *J. Mol. Struct.* **1236** (2021) 130361.
378. B. A. Nogueira, A. Milani, G. O. Ildiz, J. A. Paixão, C. Castiglioni, R. Fausto, *CrystEngComm* **22** (2020) 6347–6359.
379. M. Shabaniyan, H. Moghanian, M. Hajibeygi, A. Mohamadi, *Arab. J. Chem.* **9** (2016) S776–S780.
380. S. Yamabe, N. Tsuchida, S. Yamazaki, *Int. J. Chem. Kinet.* **51** (2019) 831–839.
381. S. E. Gunal, I. Azizoglu, O. Arica, Z. P. Haslak, V. Aviyente, I. Dogan, *Org. Biomol. Chem.* **20** (2022) 7622–7631.
382. G. O. Ildiz, I. Boz, O. Unsalan, *Opt. Spectrosc.* **112** (2012) 665–670.
383. A. Sharma, V. Gupta, R. Mishra, P. Tandon, S. Maeda, K.-K. Kunimoto, *J. Mol. Struct.* **1004** (2011) 237–247.
384. M. E. Filkina, D. N. Baray, E. K. Beloglazkina, Y. K. Grishin, V. A. Roznyatovsky, M. E. Kukushkin, *Int. J. Mol. Sci.* **24** (2023) 1289.
385. T. Marcelli, F. Olimpieri, A. Volonterio, *Org. Biomol. Chem.* **9** (2011) 5156.

386. B. M. Šmit, R. Z. Pavlović, D. A. Milenković, Z. S. Marković, *Beilstein J. Org. Chem.* **11** (2015) 1865–1875.
387. Z. P. Haslak, S. Agopcan Cinar, S. Sarigul Ozbek, G. Monard, I. Dogan, V. Aviyente, *Org. Biomol. Chem.* **18** (2020) 2233–2241.
388. S. Georgieva, P. Todorov, A. Bezfamilnyi, A. Georgiev, *J. Mol. Struct.* **1166** (2018) 377–387.
389. A. Bakalova, B. Nikolova-Mladenova, R. Buyukliev, E. Cherneva, G. Momekov, D. Ivanov, *Chem. Pap.* **70** (2016).
390. P. G. Camargo, M. Fabris, T. U. Silva, C. H. Silva Lima, S. Paula Machado, L. T. D. Tonin, M. Lima Ferreira Bispo, F. Macedo, *ChemistrySelect* **6** (2021) 10429–10435.
391. P. Stanić, B. Šmit, D. Milenković, *React. Chem. Eng.* **8** (2023) 699–706.
392. A. Galano, *J. Mex. Chem. Soc.* **59** (2015) 231–262.
393. M. Brenner, V. J. Hearing, *Photochem. Photobiol.* **84** (2008) 539–549.
394. S. Chadwick, R. Heath, M. Shah, *Indian J. Plast. Surg.* **45** (2012) 403–411.
395. A.-Y. Lee, *Int. J. Mol. Sci.* **22** (2021) 3727.
396. R. Speeckaert, M. Van Gele, M. M. Speeckaert, J. Lambert, N. van Geel, *Pigment Cell Melanoma Res.* **27** (2014) 512–524.
397. A. Guerra-Tapia, Á. Asensio Martínez, J. García Campayo, *Actas Dermo-Sifiliogr.* **106** (2015) 699–702.
398. L. d’Orsi Metsavaht, *Surg. Cosmet. Dermatol.* **9** (2017) 201–203.
399. Z. D. Draelos, *Dermatol. Ther.* **20** (2007) 308–313.
400. F. J. Enguita, A. L. Leitão, *Biomed Res. Int.* **2013** (2013) 1–14.
401. C. L. Burnett, W. F. Bergfeld, D. V. Belsito, R. A. Hill, C. D. Klaassen, D. C. Liebler, J. G. Marks, R. C. Shank, T. J. Slaga, P. W. Snyder, F. A. Andersen, *Int. J. Toxicol.* **29** (2010) 244S–273S.
402. R. Monteiro, Bn. Kishore, R. Bhat, D. Sukumar, J. Martis, Hk. Ganesh, *Indian J. Dermatol.* **58** (2013) 157.
403. M. Blaut, A. Braune, S. Wunderlich, P. Sauer, H. Schneider, H. Glatt, *Food Chem. Toxicol.* **44** (2006) 1940–1947.
404. H. Zhou, J. K. Kepa, D. Siegel, S. Miura, Y. Hiraki, D. Ross, *Mol. Pharmacol.* **76** (2009) 579–587.
405. S. King, J. Campbell, R. Rowe, M. Daly, G. Moncrieff, C. Maybury, *J. Cosmet. Dermatol.* **22** (2023) 2650–2662.
406. A. Mayer-da-Silva, *J. Dermatolog. Treat.* **1** (1989) 11–15.
407. V. Arulmozhi, K. Pandian, S. Mirunalini, *Colloid Surface B* **110** (2013) 313–320.
408. J. B. Veselinović, A. M. Veselinović, T. Ilic-Tomic, R. Davis, K. O’Connor, A. Pavic, J. Nikodinovic-Runic, *Bioorg. Med. Chem.* **25** (2017) 6286–6296.
409. T. Pillaiyar, M. Manickam, V. Namasivayam, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **32** (2017) 403–425.
410. S.-Y. Seo, V. K. Sharma, N. Sharma, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 2837–2853.
411. S. Chow, *WIREs Comput. Stat.* **6** (2014) 304–312.
412. J. Ebanks, R. Wickett, R. Boissy, *Int. J. Mol. Sci.* **10** (2009) 4066–4087.
413. T.-Y. Choi, T.-I. Choi, Y.-R. Lee, S.-K. Choe, C.-H. Kim, *Exp. Mol. Med.* **53** (2021) 310–317.
414. K. Howe, M. D. Clark, C. F. Torroja, J. Torrance, C. Berthelot, M. Muffato, J. E. Collins, S. Humphray, K. McLaren, L. Matthews, S. McLaren, I. Sealy, M. Caccamo, C. Churcher, C. Scott, J. C. Barrett, R. Koch, G.-J. Rauch, S. White, W. Chow, B. Kilian, L. T. Quintais,

- J. A. Guerra-Assunção, Y. Zhou, Y. Gu, J. Yen, J.-H. Vogel, T. Eyre, S. Redmond, R. Banerjee, J. Chi, B. Fu, E. Langley, S. F. Maguire, G. K. Laird, D. Lloyd, E. Kenyon, S. Donaldson, H. Sehra, J. Almeida-King, J. Loveland, S. Trevanion, M. Jones, M. Quail, D. Willey, A. Hunt, J. Burton, S. Sims, K. McLay, B. Plumb, J. Davis, C. Clee, K. Oliver, R. Clark, C. Riddle, D. Elliott, G. Threadgold, G. Harden, D. Ware, S. Begum, B. Mortimore, G. Kerry, P. Heath, B. Phillimore, A. Tracey, N. Corby, M. Dunn, C. Johnson, J. Wood, S. Clark, S. Pelan, G. Griffiths, M. Smith, R. Glithero, P. Howden, N. Barker, C. Lloyd, C. Stevens, J. Harley, K. Holt, G. Panagiotidis, J. Lovell, H. Beasley, C. Henderson, D. Gordon, K. Auger, D. Wright, J. Collins, C. Raisen, L. Dyer, K. Leung, L. Robertson, K. Ambridge, D. Leongamornlert, S. McGuire, R. Gilderthorp, C. Griffiths, D. Manthravadi, S. Nichol, G. Barker, S. Whitehead, M. Kay, J. Brown, C. Murnane, E. Gray, M. Humphries, N. Sycamore, D. Barker, D. Saunders, J. Wallis, A. Babbage, S. Hammond, M. Mashreghi-Mohammadi, L. Barr, S. Martin, P. Wray, A. Ellington, N. Matthews, M. Ellwood, R. Woodmansey, G. Clark, J. D. Cooper, A. Tromans, D. Grafham, C. Skuce, R. Pandian, R. Andrews, E. Harrison, A. Kimberley, J. Garnett, N. Fosker, R. Hall, P. Garner, D. Kelly, C. Bird, S. Palmer, I. Gehring, A. Berger, C. M. Dooley, Z. Ersan-Ürün, C. Eser, H. Geiger, M. Geisler, L. Karotki, A. Kirn, J. Konantz, M. Konantz, M. Oberländer, S. Rudolph-Geiger, M. Teucke, C. Lanz, G. Raddatz, K. Osoegawa, B. Zhu, A. Rapp, S. Widaa, C. Langford, F. Yang, S. C. Schuster, N. P. Carter, J. Harrow, Z. Ning, J. Herrero, S. M. J. Searle, A. Enright, R. Geisler, R. H. A. Plasterk, C. Lee, M. Westerfield, P. J. de Jong, L. I. Zon, J. H. Postlethwait, C. Nüsslein-Volhard, T. J. P. Hubbard, H. R. Crollius, J. Rogers, D. L. Stemple, *Nature* **496** (2013) 498–503.
415. C. Lawrence, *Aquaculture* **269** (2007) 1–20.
416. G. D’Agati, R. Beltre, A. Sessa, A. Burger, Y. Zhou, C. Mosimann, R. M. White, *Dev. Biol.* **430** (2017) 11–17.
417. E. E. Patton, L. I. Zon, D. M. Langenau, *Nat. Rev. Drug Discov.* **20** (2021) 611–628.
418. K. Dietrich, I. A. Fiedler, A. Kurzyukova, A. C. López-Delgado, L. M. McGowan, K. Geurtzen, C. L. Hammond, B. Busse, F. Knopf, *J. Bone Miner. Res.* **36** (2021) 436–458.
419. P. Giardoglou, D. Beis, *Biomedicines* **7** (2019) 15.
420. P. Outtandy, C. Russell, R. Kleta, D. Bockenbauer, *Pediatr. Nephrol.* **34** (2019) 751–762.
421. Hason, Bartůněk, *Genes (Basel)*. **10** (2019) 935.
422. W. T. Frantz, C. J. Ceol, *Cells* **9** (2020) 1289.
423. M. Konantz, C. Schürch, P. Hanns, J. S. Müller, L. Sauter, C. Lengerke, *Dis. Model. Mech.* **12** (2019).
424. J. J. Widrick, M. S. Alexander, B. Sanchez, D. E. Gibbs, G. Kawahara, A. H. Beggs, L. M. Kunkel, *Physiol. Genomics* **48** (2016) 850–860.
425. V. Rea, T. J. Van Raay, *Front. Mol. Neurosci.* **13** (2020).
426. S. J. Neuffer, C. D. Cooper, *Cancers (Basel)*. **14** (2022) 1752.
427. A. F. B. Lajis, *Medicina (B. Aires)*. **54** (2018) 35.
428. S. D’Mello, G. Finlay, B. Baguley, M. Askarian-Amiri, *Int. J. Mol. Sci.* **17** (2016) 1144.
429. I. Braasch, M. Schartl, J.-N. Volff, *BMC Evol. Biol.* **7** (2007) 74.
430. P. C. Agu, C. A. Afiukwa, O. U. Orji, E. M. Ezech, I. H. Ofoke, C. O. Ogbu, E. I. Ugwuja, P. M. Aja, *Sci. Rep.* **13** (2023) 13398.
431. R. N. Sahoo, S. Pattanaik, G. Pattnaik, S. Mallick, R. Mohapatra, *Indian J. Pharm. Sci.* **84** (2022).
432. X.-Y. Meng, H.-X. Zhang, M. Mezei, M. Cui, *Curr. Comput.-Aid. Drug* **7** (2011) 146–157.

433. M. S. Smyth, *Mol. Pathol.* **53** (2000) 8–14.
434. T. Sugiki, N. Kobayashi, T. Fujiwara, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **15** (2017) 328–339.
435. T. Nakane, A. Kotecha, A. Sente, G. McMullan, S. Masiulis, P. M. G. E. Brown, I. T. Grigoras, L. Malinauskaite, T. Malinauskas, J. Miehlings, T. Uchański, L. Yu, D. Karia, E. V. Pechnikova, E. de Jong, J. Keizer, M. Bischoff, J. McCormack, P. Tiemeijer, S. W. Hardwick, D. Y. Chirgadze, G. Murshudov, A. R. Aricescu, S. H. W. Scheres, *Nature* **587** (2020) 152–156.
436. U. Vanitha, R. Elancheran, V. Manikandan, S. Kabilan, K. Krishnasamy, *J. Mol. Struct.* **1246** (2021) 131212.
437. M. K. Teli, S. Kumar, D. K. Yadav, M. Kim, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **39** (2021) 703–717.
438. S. N. Mali, A. Pandey, R. R. Bhandare, A. B. Shaik, *Sci. Rep.* **12** (2022) 16368.
439. C. Michaux, G. G. Muccioli, D. M. Lambert, J. Wouters, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16** (2006) 4772–4776.
440. A. Czopek, M. Kubacka, A. Bucki, A. Siwek, B. Filipek, M. Pawłowski, M. Kołaczkowski, *Pharmacol. Reports* **73** (2021) 1361–1372.
441. E. Cherneva, M. Atanasova, R. Buyukliev, K. Tomovic, Z. Smelcerovic, A. Bakalova, A. Smelcerovic, *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **353** (2020).
442. T.-S. Chang, *Materials (Basel)*. **5** (2012) 1661–1685.
443. N. Fuse, K. -i. Yasumoto, K. Takeda, S. Amae, M. Yoshizawa, T. Udono, K. Takahashi, M. Tamai, Y. Tomita, M. Tachibana, S. Shibahara, *J. Biochem.* **126** (1999) 1043–1051.
444. G. Koch, J. Varney, N. Thompson, O. Moghissi, M. Gould, J. Payer, *NACE Int.* (2016). <http://www.impact.nace.org>.
445. D. Dwivedi, K. Lepková, T. Becker, *RSC Adv.* **7** (2017) 4580–4610.
446. T. J. Harvey, F. C. Walsh, A. H. Nahlé, *J. Mol. Liq.* **266** (2018) 160–175.
447. D. Douche, H. Elmsellem, E. H. Anouar, L. Guo, B. Hafez, B. Tüzün, A. El Louzi, K. Bougrin, K. Karrouchi, B. Himmi, *J. Mol. Liq.* **308** (2020) 113042.
448. A. Y. Musa, A. A. H. Kadhum, M. S. Takriff, A. R. Daud, S. K. Kamarudin, N. Muhamad, *Corros. Eng. Sci. Technol.* **45** (2010) 163–168.
449. N. Errahmany, M. Rbaa, A. S. Abousalem, A. Tazouti, M. Galai, E. H. El Kafssaoui, M. E. Touhami, B. Lakhrissi, R. Tourir, *J. Mol. Liq.* **312** (2020) 113413.
450. E. Akbas, E. Yildiz, A. Erdogan, *J. Serb. Chem. Soc.* **85** (2020) 481–492.
451. F. Bentiss, M. Lagrenée, *J. Mater. Environ. Sci.* **2** (2011) 13–17.
452. K. Tamalmani, H. Husin, *Appl. Sci.* **10** (2020) 3389.
453. G. Gece, *Corros. Sci.* **53** (2011) 3873–3898.
454. C. Verma, E. E. Ebenso, M. A. Quraishi, C. M. Hussain, *Mater. Adv.* **2** (2021) 3806–3850.
455. V. Saraswat, M. Yadav, I. B. Obot, *Colloid Surface A* **599** (2020) 124881.
456. Y. Abboud, O. Tanane, A. El Bouari, R. Salghi, B. Hammouti, A. Chetouani, S. Jodeh, *Corros. Eng. Sci. Technol.* **51** (2016) 557–565.
457. M. Rbaa, F. Benhiba, P. Dohare, L. Lakhrissi, R. Tourir, B. Lakhrissi, A. Zarrouk, Y. Lakhrissi, *Chem. Data Collect.* **27** (2020) 100394.
458. L. H. Madkour, A. M. Hassanein, M. M. Ghoneim, S. A. Eid, *Monatsh. Chem.* **132** (2001) 245–258.
459. L. O. Olasunkanmi, B. P. Moloto, I. B. Obot, E. E. Ebenso, *J. Mol. Liq.* **252** (2018) 62–74.
460. A. O. Yüce, G. Kardaş, *Corros. Sci.* **58** (2012) 86–94.
461. A. O. Yüce, E. Telli, B. D. Mert, G. Kardaş, B. Yazici, *J. Mol. Liq.* **218** (2016) 384–392.
462. M. S. Kumar, S. L. A. Kumar, A. Sreekanth, *Ind. Eng. Chem. Res.* **51** (2012) 5408–5418.
463. R. Kumar, H. Kim, G. Singh, *J. Mol. Liq.* **259** (2018) 199–208.

464. M. Chafiq, A. Chaouiki, H. Lgaz, R. Salghi, S. L. Gaonkar, K. S. Bhat, R. Marzouki, I. H. Ali, M. I. Khan, H. Shimizu, I. M. Chung, *J. Adhes. Sci. Technol.* **34** (2020) 1283–1314.
465. S. T. Arab, *Mater. Res. Bull.* **43** (2008) 510–521.
466. P. Stanic, N. Vukicevic, V. Cvetkovic, M. Pavlovic, S. Dimitrijevic, B. Smit, M. Zivkovic, *J. Serb. Chem. Soc.* **87** (2022) 1409–1423.
467. M. Elfaydy, H. Lgaz, R. Salghi, M. Larouj, S. Jodeh, M. Rbaa, H. Oudda, K. Toumiat, B. Lakhrissi, *J. Mater. Environ. Sci* **7** (2016) 3193–3210.
468. S. Fatima, R. Sharma, F. Asghar, A. Kamal, A. Badshah, H. B. Kraatz, *J. Ind. Eng. Chem.* **76** (2019) 374–387.
469. M. El Faydy, B. Lakhrissi, A. Guenbour, S. Kaya, F. Bentiss, I. Warad, A. Zarrouk, *J. Mol. Liq.* **280** (2019) 341–359.
470. M. T. Alhaffar, S. A. Umoren, I. B. Obot, S. A. Ali, *RSC Adv.* **8** (2018) 1764–1777.
471. M. K. Pavithra, T. V. Venkatesha, K. Vathsala, K. O. Nayana, *Corros. Sci.* **52** (2010) 3811–3819.
472. M. El Faydy, M. Rbaa, L. Lakhrissi, B. Lakhrissi, I. Warad, A. Zarrouk, I. B. Obot, *Surf. Interfaces* **14** (2019) 222–237.
473. A. Yousefi, S. Javadian, N. Dalir, J. Kakemam, J. Akbari, *RSC Adv.* **5** (2015) 11697–11713.
474. M. A. Hegazy, H. M. Ahmed, A. S. El-Tabei, *Corros. Sci.* **53** (2011) 671–678.
475. I. Ahamad, M. A. Quraishi, *Corros. Sci.* **51** (2009) 2006–2013.
476. E. Mccafferty, N. Hackerman, *J. Electrochem. Soc.* **119** (1972) 146–155.
477. M. . Quraishi, J. Rawat, *Mater. Chem. Phys.* **70** (2001) 95–99.
478. R. Hsissou, O. Dagdag, S. About, F. Benhiba, M. Berradi, M. El Bouchti, A. Berisha, N. Hajjaji, A. Elharfi, *J. Mol. Liq.* **284** (2019) 182–192.
479. P. Muthukrishnan, B. Jeyaprabha, P. Prakash, *Arab. J. Chem.* **10** (2017) S2343–S2354.
480. K. Kansal, R. Chopra, R. Kumar, A. Kumar, B. Yadav, R. Kishore Sharma, G. Singh, *Indian J. Chem. Technol.* **24** (2017) 169–177.
481. G. Z. Pavlovich, R. G. Luthy, *Water Res.* **22** (1988) 327–336.
482. D. Kushev, G. Gorneva, V. Enchev, E. Naydenova, J. Popova, S. Taxirov, L. Maneva, K. Grancharov, N. Spassovska, *J. Inorg. Biochem.* **89** (2002) 203–211.
483. M. N. Živanović, J. V. Košarić, B. Šmit, D. S. Šeklić, R. Z. Pavlović, S. D. Marković, *Gen. Physiol. Biophys.* **36** (2017) 187–196.
484. D. Wang, S. J. Lippard, *Nat. Rev. Drug Discov.* **4** (2005) 307–320.
485. S. J. Fischer, L. M. Benson, A. Fauq, S. Naylor, A. J. Windebank, *Neurotoxicology* **29** (2008) 444–452.
486. H. P. Varbanov, D. Ortiz, D. Höfer, L. Menin, M. S. Galanski, B. K. Keppler, P. J. Dyson, *Dalt. Trans.* **46** (2017) 8929–8932.
487. K. J. Laidler, *Chemical kinetics*, 3rd Edition, Harper and Row, New York (1987).
488. C. R. Groom, I. J. Bruno, M. P. Lightfoot, S. C. Ward, *Acta Crystallogr B* **72** (2016) 171–179.
489. Ž. D. Bugarčić, B. M. Mojsilović, V. M. Leovac, *J. Serb. Chem. Soc.* **61** (1996) 659–663.
490. O. Clement, A. W. Roszak, E. Buncel, *Inorg. Chim. Acta* **253** (1996) 53–63.
491. M. Tomé, C. López, A. González, B. Ozay, J. Quirante, M. Font-Bardía, T. Calvet, C. Calvis, R. Messegue, L. Baldomá, J. Badía, *J. Mol. Struct.* **1048** (2013) 88–97.
492. Q.-P. Qin, B.-Q. Zou, F.-L. Hu, G.-B. Huang, S.-L. Wang, Y.-Q. Gu, M.-X. Tan, *Medchemcomm* **9** (2018) 1639–1648.
493. J. Bruce, D. Johnson, W. Cordes, R. Sadoski, *J. Chem. Crystallogr.* **27** (1997) 695–699.

494. T. Li, H. Lin, T. Li, W. He, Y. Li, Y. Zhang, Y. Zhu, Z. Guo, *Inorg. Chim. Acta* **362** (2009) 967–974.
495. L. I. Elding, Å. Oskarsson, *Inorg. Chim. Acta* **130** (1987) 209–213.
496. D. Belli Dell' Amico, L. Labella, F. Marchetti, S. Samaritani, G. A. Hernández-Fuentes, A. N. García-Argáez, L. Dalla Via, *Polyhedron* **119** (2016) 396–402.
497. F. A. Cotton, L. R. Falvello, S. Han, *Inorg. Chem.* **21** (1982) 2889–2891.
498. S. H. Crosby, G. J. Clarkson, R. J. Deeth, J. P. Rourke, *Organometallics* **29** (2010) 1966–1976.
499. B. Kononov, M. D. Živković, J. Z. Milovanović, D. B. Djordjević, A. N. Arsenijević, I. R. Vasić, G. V. Janjić, A. Franich, D. Manojlović, S. Skrivanj, M. Z. Milovanović, M. I. Djuran, S. Rajković, *Dalt. Trans.* **47** (2018) 15091–15102.
500. P. Stanic, D. Asanin, T. Soldatovic, M. Zivkovic, *J. Serb. Chem. Soc.* (2023).
501. P. E. Allegretti, M. de las Mercedes Schiavoni, C. Guzmán, A. Ponzinibbio, J. J. P. Furlong, *Eur. J. Mass Spectrom.* **13** (2007) 291–306.
502. B. F. G. Johnson, J. Puga, P. R. Raithby, *Acta Crystallogr. B.* **37** (1981) 953–956.
503. B. B. Wayland, R. F. Schramm, *Inorg. Chem.* **8** (1969) 971–976.
504. J. Selbin, W. E. Bull, L. H. Holmes, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **16** (1961) 219–224.
505. L. I. Elding, A. B. Gröning, *Inorg. Chim. Acta* **31** (1978) 243–250.
506. M. Brindell, E. Kuliš, S. K. C. Elmroth, K. Urbańska, G. Stochel, *J. Med. Chem.* **48** (2005) 7298–7304.
507. Y. M. Y. Haddad, H. B. Henbest, J. Husbands, T. R. B. Mitchell, J. Trocha-Grimshaw, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (1974) 596.
508. J. M. O'Connor, K. D. Bunker, A. L. Rheingold, L. Zakharov, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 4180–4181.
509. R. D. Willett, K. Chang, *Inorg. Chim. Acta* **4** (1970) 447–451.
510. R. D. Willett, F. H. Jardine, S. A. Roberts, *Inorg. Chim. Acta* **25** (1977) 97–101.
511. A. J. Blake, R. S. Grimditch, S. Parsons, M. Schröder, *Acta Crystallogr. C* **52** (1996) 514–516.
512. P. Chandrasekaran, J. T. Mague, M. S. Balakrishna, *Inorg. Chem.* **45** (2006) 6678–6683.
513. S. Mishra, E. Jeanneau, G. Ledoux, S. Daniele, *Inorg. Chem.* **53** (2014) 11721–11731.
514. A. Vakulka, E. Goresnik, *J. Coord. Chem.* **70** (2017) 556–563.
515. P. Stanic, M. Rodic, T. Soldatovic, A. Pavic, N. Radakovic, B. Smit, M. Zivkovic, *J. Serb. Chem. Soc.* **85** (2020) 1591–1603.
516. S. C. Abrahams, E. T. Keve, *Acta Crystallogr. A* **27** (1971) 157–165.
517. A. W. Addison, T. N. Rao, J. Reedijk, J. van Rijn, G. C. Verschoor, *J. Chem. Soc., Dalt. Trans.* (1984) 1349–1356.
518. R. R. Holmes, Five-Coordinated Structures, in S. J. Lippard (Ed.), *Progress in Inorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd., New York (1984) 119–235.
519. I. Haiduc, *Coord. Chem. Rev.* **338** (2017) 1–26.
520. R. Hachem, H. Hanna, D. Kontoyiannis, Y. Jiang, I. Raad, *Cancer* **112** (2008) 2493–2499.
521. A. Nudelman, Y. Bechor, E. Falb, B. Fischer, B. A. Wexler, A. Nudelman, *Synth. Commun.* **28** (1998) 471–474.
522. J. S. Buck, *Org. Synth.* **13** (1933) 102.
523. A. R. Katritzky, Q. Long, H. Y. He, G. Qiu, A. L. Wilcox, *Arkivoc* **2000** (2000) 868–875.
524. Rigaku Oxford Diffraction, CrysAlisPro Software system, Rigaku Corporation, Wroclaw, Poland (2019).
525. R. H. Blessing, *Acta Crystallogr. A* **51** (1995) 33–38.

526. G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. A* **71** (2015) 3–8.
527. G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. C* **71** (2015) 3–8.
528. C. B. Hübschle, G. M. Sheldrick, B. Dittrich, *J. Appl. Crystallogr.* **44** (2011) 1281–1284.
529. A. L. Spek, *Acta Crystallogr. D* **65** (2009) 148–155.
530. C. F. Macrae, I. Sovago, S. J. Cottrell, P. T. A. Galek, P. McCabe, E. Pidcock, M. Platings, G. P. Shields, J. S. Stevens, M. Towler, P. A. Wood, *J. Appl. Crystallogr.* **53** (2020) 226–235.
531. M. Cossi, N. Rega, G. Scalmani, V. Barone, *J. Comput. Chem.* **24** (2003) 669–681.
532. J. E. Carpenter, F. Weinhold, *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **169** (1988) 41–62.
533. E. D. Glendening, J. K. Badenhoop, A. E. Reed, J. E. Carpenter, J. A. Bohmann, C. M. Morales, F. Weinhold, *NBO 5.9*, Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison (2009).
534. A. Galano, M. Francisco Marquez, A. Pérez-González, *Chem. Res. Toxicol.* **27** (2014) 904–918.
535. A. Galano, J. R. Alvarez-Idaboy, *J. Comput. Chem.* **34** (2013) 2430–2445.
536. E. Dzib, J. L. Cabellos, F. Ortíz-Chi, S. Pan, A. Galano, G. Merino, *Int. J. Quantum Chem.* **119** (2019) e25686.
537. H. Varbanov, R. Buyukliev, A. Bakalova, A. Roller, *Acta Crystallogr. E* **65** (2009) o953–o953.
538. H. R. Drew, R. M. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78** (1981) 2179–2183.
539. S. K. Burley, H. M. Berman, C. Bhikadiya, C. Bi, L. Chen, L. Di Costanzo, C. Christie, J. M. Duarte, S. Dutta, Z. Feng, S. Ghosh, D. S. Goodsell, R. K. Green, V. Guranovic, D. Guzenko, B. P. Hudson, Y. Liang, R. Lowe, E. Peisach, I. Periskova, C. Randle, A. Rose, M. Sekharan, C. Shao, Y.-P. Tao, Y. Valasatava, M. Voigt, J. Westbrook, J. Young, C. Zardecki, M. Zhuravleva, G. Kurisu, H. Nakamura, Y. Kengaku, H. Cho, J. Sato, J. Y. Kim, Y. Ikegawa, A. Nakagawa, R. Yamashita, T. Kudou, G.-J. Bekker, H. Suzuki, T. Iwata, M. Yokochi, N. Kobayashi, T. Fujiwara, S. Velankar, G. J. Kleywegt, S. Anyango, D. R. Armstrong, J. M. Berrisford, M. J. Conroy, J. M. Dana, M. Deshpande, P. Gane, R. Gáborová, D. Gupta, A. Gutmanas, J. Koča, L. Mak, S. Mir, A. Mukhopadhyay, N. Nadzirin, S. Nair, A. Patwardhan, T. Paysan-Lafosse, L. Pravda, O. Salih, D. Sehnal, M. Varadi, R. Vařeková, J. L. Markley, J. C. Hoch, P. R. Romero, K. Baskaran, D. Maziuk, E. L. Ulrich, J. R. Wedell, H. Yao, M. Livny, Y. E. Ioannidis, *Nucleic Acids Res.* **47** (2019) D520–D528.
540. G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **30** (2009) 2785–2791.
541. H. Baruah, M. W. Wright, U. Bierbach, *Biochemistry* **44** (2005) 6059–6070.
542. W. T. Ismaya, H. J. Rozeboom, A. Weijn, J. J. Mes, F. Fusetti, H. J. Wichers, B. W. Dijkstra, *Biochemistry* **50** (2011) 5477–5486.
543. X. Lai, H. J. Wichers, M. Soler-Lopez, B. W. Dijkstra, *Angew. Chem. Int. Ed.* **56** (2017) 9812–9815.
544. D. Rajasekaran, S. Zierow, M. Syed, R. Bucala, V. Bhandari, E. J. Lolis, *FASEB J.* **28** (2014) 4961–4971.
545. V. Pogenberg, M. H. Ögmundsdóttir, K. Bergsteinsdóttir, A. Schepsky, B. Phung, V. Deineko, M. Milewski, E. Steingrímsson, M. Wilmanns, *Genes Dev.* **26** (2012) 2647–2658.
546. K. S. Gajiwala, J. C. Wu, J. Christensen, G. D. Deshmukh, W. Diehl, J. P. DiNitto, J. M.

- English, M. J. Greig, Y.-A. He, S. L. Jacques, E. A. Lunney, M. McTigue, D. Molina, T. Quenzer, P. A. Wells, X. Yu, Y. Zhang, A. Zou, M. R. Emmett, A. G. Marshall, H.-M. Zhang, G. D. Demetri, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106** (2009) 1542–1547.
547. T. A. Graham, D. M. Ferkey, F. Mao, D. Kimelman, W. Xu, *Nat. Struct. Biol.* **8** (2001) 1048–1052.
548. S. Kleinboelting, L. Ramos-Espiritu, H. Buck, L. Colis, J. van den Heuvel, J. F. Glickman, L. R. Levin, J. Buck, C. Steegborn, *J. Biol. Chem.* **291** (2016) 9776–9784.
549. O. Trott, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **31** (2010) 455–461.
550. S. Satyanarayana, J. C. Dabrowiak, J. B. Chaires, *Biochemistry* **31** (1992) 9319–9324.
551. Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, 2016.
552. CLSI.2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, 3rd ed., CLSI document M27-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, n.d.
553. CLSI.2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 9th ed., M07-A9, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, n.d.
554. OECD, Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, in OECD Guidel. Test. Chem. Sect. 2, OECD, 2013.
555. J. Delasoie, A. Pavic, N. Voutier, S. Vojnovic, A. Crochet, J. Nikodinovic-Runic, F. Zobi, *Eur. J. Med. Chem.* **204** (2020) 112583.
556. T.-Y. Choi, J.-H. Kim, D. H. Ko, C.-H. Kim, J.-S. Hwang, S. Ahn, S. Y. Kim, C.-D. Kim, J.-H. Lee, T.-J. Yoon, *Pigment Cell Res.* **20** (2007) 120–127.

6. ПРИЛОГ



J. Serb. Chem. Soc. **00(0)**1-14 (2023)
JSCS-12456

Kinetic investigation of reactions of a 3-arylidene-2-thiohydantoin derivative with palladium(II) salts

PETAR B. STANIĆ*, DARKO P. AŠANIN, TANJA V. SOLDATOVIĆ¹ AND MARIJA D. ŽIVKOVIĆ^{2,3*}

University of Kragujevac, Institute for Information Technologies, Department of Science, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia, ¹State University of Novi Pazar, Department of Natural-Mathematical Sciences, Vuka Karadžića 9, 36300 Novi Pazar, Serbia, ²University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia and ³Center for Harm Reduction of Biological and Chemical Hazards, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

(Received 26 June; Revised 23 July; Accepted 14 August 2023)

Abstract: ¹H NMR spectroscopy was used to monitor the reactions of an arylidene 2-thiohydantoin derivative, 3-((phenylmethylene)amino)-2-thioxo-4-imidazolidinone (**3**), with PdCl₂, *cis*-[PdCl₂(dmsO-S)₂] and K₂[PdCl₄] in DMSO-*d*₆ in order to elucidate the reaction kinetics and mechanism. The 2-thiohydantoin derivative **3** formed *cis*-[Pd(**3-N,S**)(dmsO-S)₂]⁺ complex (**5**) in reactions with PdCl₂ and *cis*-[PdCl₂(dmsO-S)₂], while no reaction with K₂[PdCl₄] was observed. A two-step mechanism for the reactions of **3** with PdCl₂ and *cis*-[PdCl₂(dmsO-S)₂] is proposed, in which fast coordination to the side chain nitrogen occurs in the first step, while chelation and coordination to the sulfur atom in the 2-thiohydantoin ring is the second, slower, rate-determining step. The reaction rate constants were calculated and reactivities of the 2-thiohydantoin derivative **3** towards the palladium(II) salts were compared and discussed. Reaction of **3** with *cis*-[PdCl₂(dmsO-S)₂] was faster than with PdCl₂. The investigated palladium(II) salts also react with the solvent, DMSO-*d*₆, and the influence of these side reactions on the outcome and kinetics of the 2-thiohydantoin derivative complexation reaction is discussed in detail. The obtained results of this study can have an impact in explanation of the coordination behavior of antitumor active palladium(II) and platinum(II) complexes.

Keywords: ¹H NMR spectroscopy; reaction mechanism; 2-thioxo-4-imidazolidinone; coordination; Pd(II) complexes.

*Corresponding authors. E-mail: mzikvovic@kg.ac.rs; petar.stanic@uni.kg.ac.rs.
<https://doi.org/10.2298/JSC230626052S>



J. Serb. Chem. Soc. 87 (12) 1409–1423 (2022)
JSCS–5603

Anticorrosion activity of 2-thiohydantoin–Shiff base derivatives for mild steel in 0.5 M HCl

PETAR B. STANIĆ¹, NATAŠA M. VUKIĆEVIĆ^{2#}, VESNA S. CVETKOVIĆ^{2#},
MIROSLAV M. PAVLOVIĆ^{2#}, SILVANA B. DIMITRIJEVIĆ³, BILJANA ŠMIT^{1**}
and MARIJA D. ŽIVKOVIĆ^{4***}

¹*Institute for Information Technologies Kragujevac, University of Kragujevac, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia,* ²*Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Njegoševa 12, 11000 Belgrade, Serbia,* ³*Mining and Metallurgy Institute Bor, Zeleni bulevar 35, 19210 Bor, Serbia and* ⁴*Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia*

(Received 12 April, revised 12 July, accepted 24 August 2022)

Abstract: Several 2-thiohydantoin–Shiff base derivatives were prepared as eco-friendly corrosion inhibitors for mild steel in acid environment. Their anticorrosion properties were studied on mild steel in 0.5 M HCl solution as corrosion electrolyte by using usual gravimetric and different electrochemical techniques (weight loss measurement, potentiodynamic polarization and potentiostatic electrochemical impedance spectroscopy). Mild steel surface was characterized using two analytical techniques, scanning electron microscopy for surface morphology and elemental composition and atomic force microscopy. The study has shown that the inhibiting action of these environmentally benign inhibitors synthesized from inexpensive commercially available starting materials could be attributed to adsorption on the metal surface.

Keywords: inhibitors; electrochemistry; surface; potentiodynamic polarization.

INTRODUCTION

As corrosion scourges the production of most industries globally, rising financial costs take their toll. According to a report from 2016, the cost of mitigating the effects of corrosion is estimated to US\$ 2.5 trillion, which amounts to about 3.4 % of the global gross domestic product.¹ Mild steel (MS) is a widely used construction material employed in many industries due to its exemplary mechanical properties and substantially low cost. Despite of its attractive properties and uses, low corrosion resistance of mild steel in acidic solutions notably limits its applications.² Aggressive mineral acid solutions are often used in ind-

* Corresponding authors. E-mail: (*)biljana.smit@uni.kg.ac.rs; (**)mzivkovic@kg.ac.rs

Serbian Chemical Society member.

<https://doi.org/10.2298/JSC220412071S>



J. Serb. Chem. Soc. 85 (12) 1591–1603 (2020)
JSCS–5395

Reaction of a 3-arylidene-2-thiohydantoin derivative with polymeric *trans*-[CuCl₂(DMSO)₂]_n complex: unexpected isomerization to dinuclear *cis*-[CuCl(DMSO)₂](μ-Cl)₂

PETAR B. STANIĆ¹, MARKO V. RODIĆ², TANJA V. SOLDATOVIĆ³,
ALEKSANDAR B. PAVIĆ⁴, NATAŠA S. RADAKOVIĆ⁴, BILJANA M. ŠMIT^{5*}
and MARIJA D. ŽIVKOVIĆ^{6**}

¹University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia, ²University of Novi Sad, Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Serbia, ³State University of Novi Pazar, Department of Chemical–Technological Sciences, Vuka Karadžića bb, 36300 Novi Pazar, Serbia, ⁴University of Belgrade, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, Vojvode Stepe 444a, 11000 Belgrade, Serbia, ⁵University of Kragujevac, Institute for Information Technologies, Department of Science, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia and ⁶University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

(Received 17 September, accepted 20 September 2020)

Abstract: The 3-arylidene-2-thiohydantoin derivative, 3-[(2-hydroxybenzylidene)amino]-2-thioxoimidazolidin-4-one, was synthesized in a two-step condensation reaction of 2-hydroxybenzaldehyde, thiosemicarbazide and ethyl chloroacetate. The ligand was structurally characterized by NMR and IR spectroscopy, as well as by elemental analysis. In the reaction of the well-known polymeric *trans*-[CuCl₂(DMSO)₂]_n complex with the polydentate thiohydantoin type ligand, instead of the corresponding copper thiohydantoin complex, unexpectedly, the dinuclear *cis*-[CuCl(DMSO)₂](μ-Cl)₂ complex (**1**) was formed predominantly as the final stable product. The structure of the complex **1** was confirmed by single crystal X-ray diffraction analysis. The *cis*-complex is obtained through assisted isomerization of the *trans*-form, in which the thiohydantoin derivative has a crucial role.

Keywords: Cu(II) complex; spectroscopic characterization; single crystal X-ray analysis; antimicrobial activity.

INTRODUCTION

Thiohydantoin is an important class of heterocyclic compounds. Many of them exhibit diverse biological activities, such as anticonvulsant, antitumor, anti-

* Corresponding authors. E-mail: (*)biljana.smit@uni.kg.ac.rs; (**)mzivkovic@kg.ac.rs
<https://doi.org/10.2298/JSC200917060S>

PAPER



Cite this: *React. Chem. Eng.*, 2023, 8, 699

Received 8th October 2022,
Accepted 6th December 2022

DOI: 10.1039/d2re00423b

rsc.li/reaction-engineering

Kinetics and mechanism of amino acid derived 2-thiohydantoin formation reactions†

Petar Stanić,  Biljana Šmit * and Dejan Milenković 

The reaction of allyl isothiocyanate with some common natural protein amino acids (glycine, L-alanine, L-valine, L-leucine and L-phenylalanine) was monitored. ¹H NMR spectroscopy is used as a practical tool in searching for the intermediates and determining the kinetic parameters of the reaction. The density functional theory (DFT) method is utilized to better apprehend the mechanisms of thiohydantoin formation and kinetics through which these processes are facilitated, as well as for studying important intermediates and transition states. Based on our findings, a two-step mechanism in which the key reaction step is cyclization *via* an internal nucleophile in the doubly charged intermediate product is proposed. The theoretical calculations are in good agreement with our experimental observations, and the reactivity of the amino acid esters is compared and discussed.

Introduction

Hydantoins represent a large family of five-membered cyclic ureides with many intriguing physical and chemical properties.¹ They encompass a wide range of structurally diverse and synthetically attractive compounds.² Hydantoins exhibit many different biological and agricultural activities, and many of them are frequently used in medicine and therapy as marketed drugs.^{2,3} Their sulfur analogues, 2-thiohydantoins, belong to an important subgroup of the hydantoin family due to their activities, such as anticancer,^{4,5} antimicrobial,^{6,7} insecticidal and fungicidal,^{8–10} antimitagenic,¹¹ antithyroidal,¹² anti-ulcer and anti-inflammatory¹³ and anticonvulsant activities.¹⁴ 2-Thiohydantoins are also known for their use as reference standards in C-terminal protein sequencing¹⁵ and pesticides,¹⁶ as well as reagents for dye development.¹⁷

There are many synthetic routes that lead to the formation of thiohydantoins,¹⁸ but one of the more important and frequently used ones is the synthesis from amino acids. The formation of amino acid-derived 2-thiohydantoins does not require rigorous chemical conditions, and thus, it is plausible for them to form under physiological conditions.¹¹

2-Thiohydantoins can be synthesized from amino acids in a number of ways, most notably in the reaction with alkyl or aryl isothiocyanates.¹⁸ Allyl isothiocyanate (AITC) is the main pungent constituent of horse-radish and black mustard and

is a staple in the food industry, often used as a food additive. It readily reacts with free amino acids or amino acids in protein chains, yielding 2-thiohydantoin derivatives.¹¹ 2-Thiohydantoins can possibly form during food cooking processes or during the metabolism of ingested compounds. This, of course, raises a question about the chemical and biological implications of the presence of these amino acid-derived 2-thiohydantoins and, accordingly, the elucidation of the important mechanisms of their formation gains.

One of the pioneering insights into the mechanisms of thiohydantoin formation is certainly Edman's work on peptide sequencing.¹⁹ This method, called 'Edman degradation', involves a one-by-one reaction of amino acids at the N-terminus with phenyl isothiocyanate, which produces the corresponding 2-thiohydantoins. Even though the methodology has received some critics and addendums,^{20,21} it is still an important landmark for not only protein sequencing but also hydantoin chemistry as a whole.

To the best of our knowledge, a kinetic study that explores the reactions of amino acid derived 2-thiohydantoin formation has not been done yet. With all things taken into account, we propose that a mechanistic, kinetic and theoretical study such as this one would prove beneficial for better understanding of the mechanisms of thiohydantoin formation.

Experimental

General

All chemicals and reagents are commercially available and were used as received without further purification. Solvents were purified by distillation prior to use. Anhydrous methanol was prepared by a standard drying procedure.

Institute for Information Technologies, University of Kragujevac, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia. E-mail: biljana.smit@uni.kg.ac.rs

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: <https://doi.org/10.1039/d2re00423b>

БИОГРАФИЈА

Петар Станић је рођен 03.10.1993. године у Крагујевцу, где је завршио Основну школу „Станислав Сремчевић“ и Прву техничку школу као носилац Вукових диплома. Природно-математички факултет у Крагујевцу уписао је 2012. године на Институту за хемију, где је завршио основне академске студије са просеком 9,79 и мастер академске студије са просеком 10,0 на модулу – Истраживање и развој. Више пута је био добитник годишње награде за најбољег студента Института за хемију Природно-математичког факултета у Крагујевцу. Током основних и мастер студија је био добитник стипендије за младе таленте „Доситеја“, а био је и добитник Годишње награде Српског хемијског друштва за изузетан успех постигнут током студирања.

Докторске академске студије Петар Станић је уписао 2017. године на Институту за хемију Природно-математичког факултета у Крагујевцу. Предмет његових научних истраживања је синтеза и карактеризација нових потенцијално биолошких активних деривата 2-тиохидаптоина, испитивање кинетике и механизма реакција њиховог настајања, као и испитивање њихових координационих потенцијала у реакцији са јонима биолошки релевантних метала. До сада има објављених 8 радова у часописима међународног значаја и 26 саопштења на међународним и националним конференцијама.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

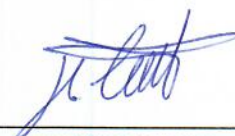
Алкенилски и арилиденски 2-тиохидаптоини: Синтеза, кинетика и механизам настајања, биолошка и електрохемијска евалуација, координациони потенцијал

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

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

У Крагујевцу _____, 12.12.2023. године,



потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

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

Алкенилски и арилиденски 2-тиохидаптоини: Синтеза, кинетика и механизам
настајања, биолошка и електрохемијска евалуација, координациони потенцијал

истоветне.

У Крагујевцу, 12.12.2023 године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Петар Станић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Алкенилски и арилиденски 2-тиохидаптоини: Синтеза, кинетика и механизам настајања, биолошка и електрохемијска евалуација, координациони потенцијал

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

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

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

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

У Крагујевцу __, 12.12.2023. године,



потпис аутора

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