



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Гордана П. Радић

СИНТЕЗА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА НЕКИХ
КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА(II) И ЊИХОВА
ПОТЕНЦИЈАЛНА БИОЛОШКА АКТИВНОСТ

Докторска дисертација

Крагујевац, 2012.

I. Аутор

Име и презиме: **Гордана П. Радић**

Датум и место рођења: **30. 09. 1980. Крагујевац**

Садашње запослење: **Природно-математички факултет, Крагујевац**

II. Докторска дисертација

Наслов: **Синтеза и карактеризација неких комплекса палладијума(II) и њихова потенцијална биолошка активност**

Број страница: **155+13**

Број слика: **43**

Број библиографских јединица: **156**

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

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

Ментор: **Проф. др Срећко Р. Трифуновић**

III. Оцена и одбрана

Датум пријаве тезе:

Комисија за оцену теме и подобности кандидата:

- 1. Др Срећко Р. Трифуновић, ред. професор ПМФ-а у Крагујевцу, Неорганска хемија**
- 2. Др Тибор Ј. Сабо, ред. професор Хемијског факултета у Београду, Неорганска хемија**
- 3. Др Небојша Н. Арсенијевић, ред. професор Медицинског факултета у Крагујевцу, Микробиологија и имунологија; Онкологија**
- 4. Др Љиљана Р. Чомић, ред. професор ПМФ-а у Крагујевцу, Микробиологија**
- 5. Др Биљана В. Петровић, доцент ПМФ-а у Крагујевцу, Неорганска хемија**

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:

Комисија за преглед, оцену и одбрану дисертације:

- 1. Др Срећко Р. Трифуновић, ред. професор ПМФ-а у Крагујевцу, Неорганска хемија**
- 2. Др Тибор Ј. Сабо, ред. професор Хемијског факултета у Београду, Неорганска хемија**
- 3. Др Небојша Н. Арсенијевић, ред. професор Медицинског факултета у Крагујевцу, Микробиологија и имунологија; Онкологија**
- 4. Др Љиљана Р. Чомић, ред. професор ПМФ-а у Крагујевцу, Микробиологија**
- 5. Др Биљана В. Петровић, доцент ПМФ-а у Крагујевцу, Неорганска хемија**

Датум одбране дисертације:

Шему ове докторске дисертације предложио је професор др Срећко Р. Трифуновић, редовни професор Природно-математичког факултета у Крагујевцу, који је руководио овим радом и све време ми указивао свестрену помоћ на чему му искрено захваљујем.

Члановима Комисије професорима др Шибору Сабоу, др Небојши Арсенијевићу, др Љиљани Чомић и др Биљани Петровић захваљујем на уложеном напору за побољшавање квалитета ове дисертације корисним саветима и сугестијама.

Пријатељима из лабораторије, посебно Верици В. Глођовић захваљујем на несебичној помоћи, подршци и заједничком раду.

И на крају, породици хвала на љубави, као и на томе што су, као и увек, веровали у мене.

САДРЖАЈ

ИЗВОД.....	1
SUMMARY.....	5
1. УВОД.....	9
2. ОПШТИ ДЕО.....	13
2.1. Структура квадратно-планарних комплекса паладијума(II) који садрже бидентатне лиганде.....	15
2.1.1. Бидентатни лиганди S,O-типа.....	18
2.2. Комплекси паладијума(II) са O,O'-диалкил естрима edda типа лиганада.....	19
2.3. Биолошка активност комплекса неких прелазних метала.....	23
2.3.1. Антитуморска активност комплекса платине.....	23
2.3.2. Механизам дејства цисплатине.....	26
2.3.3. Развој нових антитуморских лекова.....	28
2.3.4. Антимикробна активност комплекса паладијума(II).....	31
2.3.5. Механизми дејства антимикробних једињења.....	33
2.3.6. Развој нових антимикробних једињења.....	36
2.4. Методе за одређивање структуре комплекса метала са лигандима edda типа.....	40
2.4.1. Нуклеарно-магнетно-резонанциона спектроскопија.....	40
2.4.2. Инфрацрвена спектроскопија.....	41
2.5. Циљ и задатак докторске дисертације.....	41
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО.....	45
3.1. Синтезе лиганада.....	47
3.1.1. Синтеза етилендиамин-N,N'-ди-(S,S)-2-пропанске киселине, H ₂ -(S,S)-eddp.....	47

3.1.2.	Синтеза <i>O,O'</i> -диалкил естара етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-(<i>S,S</i>)- -2-пропанске киселине дихлорхидрата, $R_2-(S,S)\text{-eddp}\cdot 2\text{HCl}$..	47
3.1.3.	Синтеза етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-(<i>S,S</i>)-2-(3-метил)-бутанске киселине, $H_2-(S,S)\text{-eddv}$	49
3.1.4.	Синтеза <i>O,O'</i> -диалкил естара етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-(<i>S,S</i>)- -2-(3-метил)-бутанске киселине дихлорхидрата, $R_2-(S,S)\text{-eddv}\cdot 2\text{HCl}$	50
3.1.5.	Синтеза <i>S</i> -алкил деривата тиосалицилне киселине.....	53
3.1.6.	Синтеза <i>meso</i> -1,2-дифенил-етилендиамин, 1,2-dphen.....	55
3.1.7.	Синтеза <i>meso</i> -1,2-дифенил-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-3- -пропанске киселине дихлорхидрата монохидрата, $H_2\text{-1,2-dpheddp}\cdot 2\text{HCl}\cdot H_2O$	55
3.2.	Синтезе комплекса.....	57
3.2.1.	Синтеза дихлоридо- <i>O,O'</i> -дипропил-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди- -(<i>S,S</i>)-2-пропаноатопаладијум(II) комплекса, $[\text{PdCl}_2(\text{dpr}-(S,S)\text{-eddp})]$	57
3.2.2.	Синтеза дихлоридо- <i>O,O'</i> -дибутил-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди- -(<i>S,S</i>)-2-пропаноатопаладијум(II) комплекса, $[\text{PdCl}_2(\text{dbu}-(S,S)\text{-eddp})]$	58
3.2.3.	Синтеза дихлоридо- <i>O,O'</i> -дипентил-етилендиамин- <i>N,N'</i> - -ди-(<i>S,S</i>)-2-пропаноатопаладијум(II) комплекса, $[\text{PdCl}_2(\text{dpe}-(S,S)\text{eddp})]$	59
3.2.4.	Синтеза хлоридо((<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N</i> -(<i>O</i> -етил-2-(3- -метил)-бутаноат)- <i>N'</i> -2-(3-метил)-бутаноатопаладијум(II) комплекса, $[\text{PdCl}(\text{et}-(S,S)\text{-eddv})]$	60
3.2.5.	Синтеза хлоридо((<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N</i> -(<i>O</i> -пропил-2-(3- -метил)-бутаноат)- <i>N'</i> -2-(3-метил)-бутаноатопаладијум(II) комплекса, $[\text{PdCl}(\text{pr}-(S,S)\text{-eddv})]$	61
3.2.6.	Синтеза хлоридо((<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N</i> -(<i>O</i> -бутил-2-(3- -метил)-бутаноат)- <i>N'</i> -2-(3-метил)-бутаноатопаладијум(II) комплекса, $[\text{PdCl}(\text{bu}-(S,S)\text{-eddv})]$	62

3.2.7.	Синтеза хлоридо((<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N</i> -(<i>O</i> -пентил-2-(3-метил)-бутаноат)- <i>N'</i> -2-(3-метил)-бутаноато)паладијум(II) комплекса, [PdCl(pe-(<i>S,S</i>)-eddv)].....	63
3.2.8.	Синтеза <i>bis</i> -(<i>S</i> -бензил-тиосалицилато)паладијум(II) комплекса, [Pd(S-bz-thiosal) ₂]......	64
3.2.9.	Синтеза <i>bis</i> -(<i>S</i> -метил-тиосалицилато)паладијум(II) комплекса, [Pd(S-met-thiosal) ₂]......	64
3.2.10.	Синтеза <i>bis</i> -(<i>S</i> -етил-тиосалицилато)паладијум(II) комплекса, [Pd(S-et-thiosal) ₂]......	65
3.2.11.	Синтеза <i>bis</i> -(<i>S</i> -пропил-тиосалицилато)паладијум(II) комплекса, [Pd(S-pr-thiosal) ₂]......	66
3.2.12.	Синтеза <i>bis</i> -(<i>S</i> -бутил-тиосалицилато)паладијум(II) комплекса, [Pd(S-bu-thiosal) ₂]......	66
3.2.13.	Синтеза <i>cis</i> -дихлоридо(<i>meso</i> -1,2-дифенил-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-3-пропаноато)паладијум(II) комплекса, <i>cis</i> -[PdCl ₂ (1,2-dpheddp)].....	67
3.2.14.	Синтеза <i>s-cis</i> -дихлоридо(<i>meso</i> -1,2-дифенил-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-3-пропаноато)платина(IV) комплекса, <i>s-cis</i> -[PtCl ₂ (1,2-dpheddp)].....	68
3.3.	Мерења.....	69
3.3.1.	Елементална микроанализа анализа.....	69
3.3.2.	¹ H и ¹³ C нуклеарно-магнетно-резонанциона спектроскопија	69
3.3.3.	Инфрацрвена спектроскопија.....	69
3.3.4.	Рендгенска структурна анализа.....	70
3.3.4.1.	Рендгенска структурна анализа <i>meso</i> -1,2-дифенил-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-3-пропанске киселине дихлорхидрата монохидрата, H ₂ -1,2-dpheddp·2HCl·H ₂ O.....	70
3.3.4.2.	Рендгенска структурна анализа хлоридо((<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N</i> -(<i>O</i> -етил-2-(3-метил)-бутаноат)- <i>N'</i> -2-(3-метил)-бутаноато)паладијум(II) комплекса,	

	[PdCl(et-(<i>S,S</i>)-eddv)].....	71
3.3.4.3.	Рендгенска структурна анализа <i>bis</i> -(<i>S</i> -бензил- -тиосалицилато)паладијум(II) комплекса, [Pd(<i>S</i> -bz-thiosal) ₂].....	73
3.4.	Биолошка мерења	74
3.4.1.	<i>In vitro</i> антимикуробни тест.....	74
3.4.1.1.	Тестирани микроорганизми.....	74
3.4.1.2.	Микродилуциона метода.....	75
3.4.2.	<i>In vitro</i> антитуморска активност.....	77
3.4.2.1.	Испитиване ћелијске линије.....	77
3.4.2.2.	МТТ колориметријски тест.....	78
4.	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	81
4.1.	Синтеза <i>O,O'</i>-диалкил естара етилендиамин-<i>N,N'</i>-ди-(<i>S,S</i>)-2- -пропанске киселине дихлорхидрата, R_2-(<i>S,S</i>)-eddp·2HCl и одговарајућих комплекса паладијума(II), [PdCl₂(R_2-(<i>S,S</i>)-eddp)].	83
4.1.1.	Синтезе лиганата и комплекса.....	83
4.1.2.	Инфрацрвени спектри <i>O,O'</i> -диалкил естара етилендиамин- - <i>N,N'</i> -ди-(<i>S,S</i>)-2-пропанске киселине дихлорхидрата и одговарајућих комплекса паладијума(II).....	85
4.1.3.	Нуклеарно-магнетно-резонанциони (¹ H и ¹³ C) спектри <i>O,O'</i> - -диалкил естара етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-(<i>S,S</i>)-2-пропанске киселине дихлорхидрата и одговарајућих комплекса паладијума(II).....	86
4.1.4.	Микробиолошка активност <i>O,O'</i> -диалкил естара етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-(<i>S,S</i>)-2-пропанске киселине дихлорхидрата и одговарајућих комплекса паладијума(II)....	88
4.2.	Синтеза <i>O,O'</i>-диалкил естара етилендиамин-<i>N,N'</i>-ди-(<i>S,S</i>)-2- -(3-метил)-бутанске киселине дихлорхидрата, R_2-(<i>S,S</i>)-eddv·2HCl и одговарајућих комплекса паладијума(II), [PdCl(R-(<i>S,S</i>)-eddv)].	90
4.2.1.	Синтеза лиганата и комплекса.....	90

4.2.2.	Инфрацрвени спектри <i>O,O'</i> -диалкил естара етилендиамин- - <i>N,N'</i> -ди-(<i>S,S</i>)-2-(3-метил)-бутанске киселине дихлорхидрата и одговарајућих комплекса паладијума(II)....	94
4.2.3.	Нуклеарно-магнетно-резонанциони (^1H и ^{13}C) спектри <i>O,O'</i> -диалкил естара етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-(<i>S,S</i>)-2-(3- -метил)-бутанске киселине дихлорхидрата и одговарајућих комплекса паладијума(II).....	95
4.2.4.	Микробиолошка активност <i>O,O'</i> -диалкил естара етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-(<i>S,S</i>)-2-(3-метил)-бутанске киселине дихлорхидрата и одговарајућих комплекса паладијума(II)....	96
4.2.5.	Кристална структура хлоридо((<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N</i> -(<i>O</i> - -етил-2-(3-метил)-бутаноат)- <i>N'</i> -2-(3-метил)-бутаноато паладијум(II) комплекса, $[\text{PdCl}(\text{et}-(\text{S,S})\text{-eddv})]$	99
4.3.	Синтеза и карактеризација S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса паладијума(II).....	103
4.3.1.	Синтеза лиганда и комплекса.....	103
4.3.2.	Инфрацрвени спектри S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса паладијума(II).....	104
4.3.3.	Нуклеарно-магнетно-резонанциони (^1H и ^{13}C) спектри S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса паладијума(II).....	105
4.3.4.	Кристална структура <i>bis</i> -(S-бензил-тиосалицилато) паладијум(II) комплекса, $[\text{Pd}(\text{S-bz-thiosal})_2]$	106
4.3.5.	Микробиолошка активност S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса паладијума(II).....	108
4.4.	Паладијум(II) и платина(IV) комплекси са <i>meso</i>-1,2-дифенил- -етилендиамин-<i>N,N'</i>-ди-3-пропанском киселином.....	112
4.4.1.	Синтеза лиганда и комплекса.....	112
4.4.2.	Инфрацрвени спектри <i>meso</i> -1,2-дифенил-етилендиамин- - <i>N,N'</i> -ди-3-пропанске киселине и одговарајућих комплекса паладијума(II) и платине(IV).....	114

4.4.3.	Кристална структура <i>meso</i> -1,2-дифенил-етилендиамин- - <i>N,N'</i> -ди-3-пропанске киселине дихлорхидрата монохидрата, $H_2-1,2-dpheddp \cdot 2HCl \cdot H_2O$	116
4.4.4.	Микробиолошка активност <i>meso</i> -1,2-дифенил- -етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-3-пропанске киселине дихлорхидрата монохидрата и одговарајућих комплекса паладијума(II) и платине(IV).....	120
4.4.5.	<i>In vitro</i> антитуморска активност комплекса <i>cis</i> -[PdCl ₂ (1,2-dpheddp)] и <i>s-cis</i> -[PtCl ₂ (1,2-dpheddp)].....	122
5.	ЗАКЉУЧАК	125
6.	ЛИТЕРАТУРА	131
	БИОГРАФИЈА	143
	РАДОВИ У КОЈИМА СУ ШТАМПАНИ РЕЗУЛТАТИ ОВЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ	145
	НАУЧНО-ИСТРАЖИВАЧКИ РАД	147
	ПРИЛОГ	155

СПИСАК СЛИКА

Слика 1.	Структура етилендиамин- <i>N,N'</i> -диацетато лиганда.....	15
Слика 2.	Diamond презентација комплекса паладијума(II) са тетраетил (I) и тетраметил(II) естрима edta.....	21
Слика 3.	Могући изомери $[PtCl_n(R_2\text{-edda-типа})]$, ($n = 2, 4$) и $[PdCl_2(R_2\text{-edda-типа})]$ комплекса.....	22
Слика 4.	Израчунате структуре $[PtCl_n(et_2\text{-edda})]$ (a, b: $n = 4$; c, d: $n = 2$).....	22
Слика 5.	Структура <i>cis</i> -диаминдихлоридоплатина(II) комплекса, познатијег као цисплатина, <i>cis</i> -DDP.....	23
Слика 6.	Структура диамин[1,1-циклобутандикарбоксилато(2)]- <i>O,O'</i> -платина(II) комплекса, карбоплатина.....	25
Слика 7.	Структура (I) <i>cis</i> -диаминциклохексаноксалатоплатина(II), оксалиплатин и (II) <i>cis</i> -диамин(гликолато- <i>O,O'</i>)платина(II), недаплатин.....	25
Слика 8.	Структура (I) <i>cis</i> -диаминдихлоридопаладијум(II), <i>cis</i> - $[PdCl_2(NH_3)_2]$; (II) <i>cis</i> -1,2-диаминциклохександихлоридопаладијум(II), <i>cis</i> - $[PdCl_2(DACH)]$	29
Слика 9.	Комплекс паладијума(II) са дериватом кумарина, активнији приближно 7800 пута од карбоплатине.....	30
Слика 10.	Адаптациони механизам за заштиту ћелије од токсичних ефеката липофилних једињења: (I) реструктурирање фосфолипидног двослоја променом конформације фосфолипида из <i>cis</i> у <i>trans</i> , или променом масних киселина у засићену форму; (II) Модификација липополисахарида у спољашњем омотачу Грам-негативних бактерија; (III) повећање повезаности конституената ћелијског зида и/или промене у његовој	

	хидрофилности; (IV) повећање хидрофилности S-слоја; (V) активна екскреција из ћелије.....	32
Слика 11.	Потенцијална места на бактеријској ћелији за дејство антимикробних супстанци.....	33
Слика 12.	Грађа омотача Грам-негативних и Грам-позитивних бактерија	34
Слика 13.	Паладијум(II)-јон координован за антибиотике из групе тетрациклина.....	37
Слика 14.	Паладијум(II) комплекс са флуорохинолином као лигандом.....	38
Слика 15.	Структура деривата тиосалицилне киселине.....	39
Слика 16.	Могући дијастереоизомери комплекса $[PdCl_2(R_2-(S,S)-eddp)]$, R = <i>pr</i> -, <i>bu</i> - и <i>pe</i> -.....	87
Слика 17.	ORTEP слика $[PdCl(et-(S,S)-eddv)]$ комплекса.....	100
Слика 18.	Начин паковања комплекса $[PdCl(et-(S,S)-eddv)]$	102
Слика 19.	Структура комплекса $[Pd(S-bz-thiosal)_2]$	106
Слика 20.	Два молекула комплекса са интермолекулским интеракцијама....	108
Слика 21.	Теоријски могући геометријски изомери октаедарских комплекса са тетрадентатним лигандима <i>edda</i> типа и два монодентатна лиганда.....	113
Слика 22.	Кристална структура молекула <i>meso</i> -1,2-дифенил-етилендиами- - <i>N,N'</i> -ди-3-пропанске киселине дихлорхидрата монохидрата, $H_2-1,2-dpheddp \cdot 2HCl \cdot H_2O$	117
Слика 23.	Начин паковања молекула $H_2-1,2-dpheddp \cdot 2HCl \cdot H_2O$	119
Слика 24.	<i>In vitro</i> антитуморска активност комплекса <i>cis</i> - $[PdCl_2(1,2-dpheddp)]$ и <i>s-cis</i> - $[PtCl_2(1,2-dpheddp)]$. А) 4T1, Б) В16F1 ћелијске линије су инкубиране 72 сата са различитим концентрацијама комплекса.....	122
Слика 25.	IC ₅₀ вредности <i>cis</i> - $[PdCl_2(1,2-dpheddp)]$ и <i>s-cis</i> - $[PtCl_2(1,2-dpheddp)]$	123

СПИСАК ШЕМА

Шема 1.	Општа шема синтезе edda-типа лиганда по Берсворту.....	17
Шема 2.	Метода синтеза <i>O,O'</i> -диалкил естра H_2 -edda типа лиганда.....	17
Шема 3.	Метода синтезе <i>S</i> -алкил етра тиосалицилне киселине.....	18
Шема 4.	Синтеза комплекса паладијума(II) са тетраметил и тетраетил естрима edta	20
Шема 5.	Пут лека.....	26
Шема 6.	Хидролиза и грађење ДНК-цисплатина адукта.....	27
Шема 7.	Синтеза етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-(<i>S,S</i>)-2-пропанске киселине, (H_2 -(<i>S,S</i>)-eddp).....	83
Шема 8.	Синтеза <i>O,O'</i> -диалкил естара етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-(<i>S,S</i>)-2-пропанске киселине дихлорхидрата, R_2 -(<i>S,S</i>)-eddp·2HCl.....	84
Шема 9.	Синтеза комплекса [PdCl ₂ (R_2 -(<i>S,S</i>)-eddp)].....	85
Шема 10.	Синтеза етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-(<i>S,S</i>)-2-(3-метил)-бутанске киселине, H_2 -(<i>S,S</i>)-eddv.....	91
Шема 11.	Синтеза <i>O,O'</i> -диалкил естара етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-(<i>S,S</i>)-2-(3-метил)-бутанске киселине дихлорхидрата, R_2 -(<i>S,S</i>)-eddv·2HCl.....	92
Шема 12.	Синтеза комплекса [PdCl(R -(<i>S,S</i>)-eddv)].....	93
Шема 13.	Синтеза комплекса [PdCl(et-(<i>S,S</i>)-eddv)].....	99
Шема 14.	Синтеза <i>S</i> -алкил деривата тиосалицилне киселине.....	103
Шема 15.	Синтеза комплекса паладијума(II) са <i>S</i> -алкил-дериватима тиосалицилне киселине.....	104
Шема 16.	Синтеза лиганда H_2 -1,2-dpheddp·2HCl·H ₂ O.....	112
Шема 17.	Синтеза комплекса <i>cis</i> -[PdCl ₂ (1,2-dpheddp)].....	113
Шема 18.	Синтеза комплекса <i>s-cis</i> -[PtCl ₂ (1,2-dpheddp)].....	114

СПИСАК ТАБЕЛА

Табела 1.	Неки тетрадентатни лиганди edda-типа.....	16
Табела 2.	Основни кристалографски подаци и подаци у вези са решавањем и утачњавањем структуре за $H_2-1,2-dpheddp \cdot 2HCl \cdot H_2O$	71
Табела 3.	Основни кристалографски подаци и подаци у вези са решавањем и утачњавањем структуре комплекса $[PdCl(et-(S,S)-eddv)]$	72
Табела 4.	Основни кристалографски подаци и подаци у вези са решавањем и утачњавањем структуре комплекса $[Pd(S-bz-thiosal)_2]$	73
Табела 5.	Списак тестираних микроорганизама.....	75
Табела 6.	Важније траке у инфрацрвеним спектрима $R_2-(S,S)-eddp \cdot 2HCl$ лиганада и одговарајућих паладијум(II) комплекса.....	86
Табела 7.	Резултати антибактеријске и антифунгалне активности бидентатних лиганада $R_2-(S,S)-eddp \cdot 2HCl$ и одговарајућих паладијум(II) комплекса.....	89
Табела 8.	Најважније траке у инфрацрвеним спектрима $R_2-(S,S)-eddv \cdot 2HCl$ и одговарајућих комплекса паладијума(II).....	94
Табела 9.	Резултати антибактеријске и антифунгалне активности бидентатних лиганада $R_2-(S,S)-eddv \cdot 2HCl$ и одговарајућих паладијум(II) комплекса.....	98
Табела 10.	Дужине веза (\AA) и углови веза ($^\circ$) у молекулу $[PdCl(et-(S,S)-eddv)]$	101
Табела 11.	Дужине веза (\AA) и углови веза ($^\circ$) у молекулу $[Pd(S-bz-thiosal)_2]$..	107
Табела 12.	Дужине (\AA), углови ($^\circ$) као и диедарски углови интермолекулских и интрамолекулских водоничних веза у молекулу $[Pd(S-bz-thiosal)_2]$	107
Табела 13.	Резултати антибактеријске и антифунгалне активности бидентатних лиганада S-аликил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих паладијума(II) комплекса.....	110

Табела 14.	Најважније апсорпционе траке у инфрацрвеним спектрима неких комплексних једињења са линеарним O-N-N-O лигандима.....	116
Табела 15.	Дужине веза (Å) и углови веза (°) у H ₂ -1,2-dpheddp·2HCl·H ₂ O.....	118
Табела 16.	Дужине (Å) и углови (°) водоничних веза у молекулу H ₂ -1,2-dpheddp·2HCl·H ₂ O.....	119
Табела 17.	Резултати антибактеријске и антифунгалне активности испитиваног лиганда H ₂ -1,2-dpheddp·2HCl·H ₂ O и одговарајућих комплекса паладијума(II) и платине(IV).....	121

ИЗВОД

СИНТЕЗА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА НЕКИХ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА(II) И ЊИХОВА ПОТЕНЦИЈАЛНА БИОЛОШКА АКТИВНОСТ

Откриће антитуморских особина *cis*-диаминдихлоридоплатина(II) комплекса, познатијег под именом *cis*-ДДР (*cis*-DDP) и сличних комплекса платине повећало је интересовање за добијање још ефикаснијих комплекса других метала и лиганата. Међу првим комплексима коришћеним у клиничким испитивањима против тумора били су паладијум(II) аналози *cis*-ДДР. Иако првобитни резултати нису били охрабрујући, комплекси паладијума(II) су много шире проучавани. Паладијум(II) комплекси су скоро увек показивали мању антитуморску активност у односу на одговарајуће комплексе платине због њихове велике лабилности. Да би се ови проблеми превазишли, многа истраживања су била усмерена ка употреби хелатних лиганата који би умањили реактивност паладијум(II) комплекса.

До сада је синтетисан мали број комплексних једињења паладијума(II) са *O,O'*-диалкил естрима лиганата *edda*-типа као бидентатним лигандима, као и са *S*-алкил дериватима тиосалицилне киселине. Стога је у оквиру ове *Докторске дисертације* описана синтеза и карактеризација неких лиганата *edda*-типа, њихових естара, као и *S*-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса паладијума(II).

У овој *Докторској дисертацији* описана је синтеза и карактеризација већег броја лиганата и одговарајућих комплекса паладијума(II). Прво је описана синтеза

и карактеризација *O,O'*-диалкил естара етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-пропанске киселине ($H_2-(S,S)$ -eddp). Ова једињења су добијена директном реакцијом између тетрадентатног лиганда и одговарајућег апсолутног алкохола (етанол, 1-пропанол, 1-бутанол, 1-пентанол) у молском односу 1:2, уз увођење гасовитог хлороводоника. На претходно описан начин синтетисани су и *O,O'*-диалкил естри етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-(3-метил)-бутанске киселине ($H_2-(S,S)$ -eddv). Такође, приказана је и синтеза *S*-алкил деривата тиосалицилне киселине. Поменути бидентатни *S,O* донорски лиганди добијени су директном реакцијом између натријумове соли тиосалицилне киселине и одговарајућих алкил халогенида (метил-, етил-, пропил-, бутил- и бензил) у молском односу 1:1. На крају приказана је и синтеза тетрадентатног лиганда *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропанске киселине. Структуре и састав изолованих лиганда претпостављене су применом елементарне микроанализе, инфрацрвене, 1H и ^{13}C NMR спектроскопије, а потврђене на бази резултата рендгенске структурне анализе у случају: *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропанске киселине дихлорхидрата монохидрата, (H_2 -1,2-dpheddp·2HCl·H₂O).

Добијени лиганди су употребљени за синтезу одговарајућих комплекса паладијума(II). Састав добијених квадратно-планарних комплекса паладијума(II) потврђен је елементарном микроанализом. Структура изолованих комплекса претпостављена је на основу инфрацрвене, 1H и ^{13}C NMR спектроскопије, а потврђена је на бази рендгенске структурне анализе у случају хлоридо((*S,S*)-етилендиамин-*N*-(*O*-етил-2-(3-метил)-бутаноат)-*N'*-2-(3-метил)-бутаноатопаладијум(II) комплекса, [PdCl(et-(*S,S*)-eddv)] и *bis*-(*S*-бензил-тиосалицилато)паладијум(II) комплекса, [Pd(*S*-bz-thiosal)₂].

In vitro антимикуробна активност синтетисаних лиганда и одговарајућих комплекса паладијума(II) тестирана је микродилуционом методом. Том приликом одређене су минималне инхибиторне (МИК) и минималне микробицидне концентрације (ММК) надрађених једињења. Поједини комплекси су показали

значајну антифунгалну активност на патогеним гљивама *Aspergillus flavus* и *Aspergillus fumigatus*. Међутим, синтетисани паладијум(II) комплекси су показали умерену антибактеријску активност.

In vitro антитуморска активност комплекса *cis*-[PdCl₂(1,2-dpheddp)] као и *s-cis*-[PtCl₂(1,2-dpheddp)], испитивана је на ћелијама тумора 4T1 и B16F1, а број ћелија одређиван након је 72 сата коришћењем МТТ технике. Испитивањем је утврђено да оба једињења показују нижу антитуморску активност у поређењу са цисплатином.

Кључне речи: R₂-(*S,S*)-eddp лиганди, R₂-(*S,S*)-eddv лиганди, S-алкил деривати тиосалицилне киселине, H₂-1,2-dpheddp·2HCl·H₂O, паладијум(II) комплекси, инфрацрвена и NMR спектроскопија, рендгенска структурна анализа, антибактеријска активност, антитуморска активност.

SUMMARY

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF SOME PALLADIUM(II) COMPLEXES AND THEIR POTENTIAL BIOLOGICAL ACTIVITY

The discovery of anticancer activity of cis-diamminedichloridoplatinum(II) complexes, better known as cisplatin (*cis*-DDP) and related platinum complexes has stimulated the interest for obtaining more efficient complexes of other metals and ligands. Some the first complexes used in clinical treatments against tumors were palladium(II) complexes as analogues of cisplatin. Although the first results were not encouraging, palladium complexes have been studied to longer extent. Palladium(II) complexes show less antitumor activity than corresponding platinum complexes due to their high instability. In order to overcome these problems, many studies have been directed toward the use of chelating ligands which would reduce the reactivity of palladium(II) complexes.

So far a small number of complex compounds of palladium(II) have been synthesized with *O,O'*-dialkyl esters edda-type ligands as bidentate ligands, as well as S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Therefore, this dissertation describes the synthesis and characterization of some edda-type ligands, their esters, S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid and corresponding palladium(II) complexes with obtained ligands.

The synthesis and characterization of some ligands and corresponding palladium(II) complexes are described in this PhD thesis. Firstly, the synthesis and characterization of *O,O'*-dialkyl esters of ethylenediamine-*N,N'*-di-(*S,S*)-2-propanoic acid H₂-(*S,S*)-eddp is described. These compounds were obtained by direct reaction between

tetradentate ligand and the corresponding absolute alcohol (ethanol, 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol) in a molar ratio 1:2 with the addition of gaseous hydrogen chloride. As described above, *O,O'*-dialkyl esters of ethylenediamine-*N,N'*-di-(*S,S*)-2-(3-methyl)-butanoic acid, H₂-(*S,S*)-eddv were synthesized was also done. The synthesis of *S*-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Bidentate *S,O* donor ligands were obtained by direct reaction between the sodium salt of thiosalicylic acid and corresponding alkyl halides (methyl, ethyl, propyl, butyl, benzyl) in a molar ratio 1:1. The synthesis of the tetradentate ligand *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid is shown at the end of this dissertation. Structure and composition of the isolated ligands were assumed using by elemental microanalysis, IR, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy, and confirmed by X-ray diffraction analysis in the case of *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid monohydrate dichlorohydrate, H₂-1,2-dpheddp·2HCl·H₂O.

The obtained ligands were used for synthesis of the corresponding palladium(II) complexes. The composition of obtained square-planar palladium(II) complexes was confirmed by elemental microanalysis. The structure of isolated complexes is assumed on basis of infrared, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy and confirmed on basis of X-ray diffraction analysis in the case of chlorido(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-(*O*-ethyl-2-(3-methyl)butanoate)-*N'*-2-(3-methyl)-butanoate-palladium(II) complex, [PdCl(et-(*S,S*)-eddv)] and *bis*-(*S*-benzyl-thiosalicylato)palladium(II) complex, [Pd(*S*-bz-thiosal)₂].

Antimicrobial activity of synthesized ligands and corresponding palladium(II) complexes was tested by microdilution method. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum microbicidal concentration (MMC) were determined in this process. Some complexes showed significant antifungal activity on pathogenic fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus*. However, synthesized palladium(II) complexes showed limited antibacterial activity.

In vitro antitumor activity of the complexes *cis*-[PdCl₂(1,2-dpheddp)] and *s-cis*-[PtCl₂(1,2-dpheddp)] was determined on the tumor cells of the 4T1 and B16F1, and

the number of cells was determined after 72 hours by using MTT technique. The study found that both compounds showed lower antitumor activity compared to cisplatin.

Keywords: R_2 -(*S,S*)-eddp ligands, R_2 -(*S,S*)-eddv ligands, *S*-alkyl derivatives of thiosalicylic acid, H_2 -1,2-dpheddp·2HCl· H_2O , palladium(II) complexes, infrared and NMR spectroscopy, X-ray structural analysis, antimicrobial activity, antitumor activity.

1. УВОД

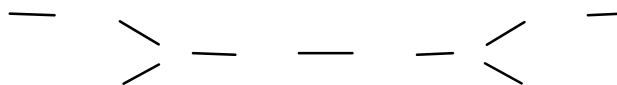
Чињеница је да се многа комплексна једињења сама или у комбинацији са другим једињењима већ дужи низ година користе у медицини за лечење различитих обољења. Откриће антитуморске активности цисплатине условило је повећано интересовање за синтезу и карактеризацију нових комплекса, али и за испитивање њихове биолошке активности. На основу тога расте реална могућност да се открије ново једињење које ће имати ширу примену у медицини.

Комплекси паладијума(II) поседују хемијске особине сличне комплексима платине(II) (имају d^8 електронски систем и граде квадратно-планарне комплексе) због чега је било интересантно синтетисати нове комплексе са бидентатним лигандима, *O,O'*-диалкил естрима тетрадентатних лиганада етилендиамин-*N,N'*-ди-*(S,S)*-2-пропанске киселине (R_2 -*(S,S)*-eddp) и етилендиамин-*N,N'*-ди-*(S,S)*-2-(3-метил)-бутанске киселине (R_2 -*(S,S)*-eddv), као и алкил-дериватима тиосалицилне киселине, утврдити њихову геометрију, *in vitro* испитати њихову антибактеријску, антифунгалну и антитуморску активност.

2. ОПШТИ ДЕО

2.1. СТРУКТУРА КВАДРАТНО-ПЛАНАРНИХ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА(II) КОЈИ САДРЖЕ БИДЕНТАТНЕ ЛИГАНДЕ

Етилендиамин- N,N' -дисирићетна киселина (edda) поседује два доhorsка атома азота и два доhorsка атома кисеоника из карбоксилних група (Слика 1). У случају потпуног координовања понаша се као тетрадентатни лиганд. Заједно са лигандима етилендиамин- N,N' -ди-3-пропанском киселином (eddp), 1,3-пропандиамин- N,N' -дисирићетном киселином (1,3-pdda) и сличним спада у групу киселина које су класификоване као edda-тип лиганата [1a,1b].



edda

Слика 1. Структура етилендиамин- N,N' -диацетато лиганда

Лиганди edda-типа представљају N - или C - супституисане деривате edda лиганда или његове хомологе који садрже продужене ланце и то, на пример, диамински у случају 1,3-пропандиамин- N,N' -дисирићетне киселине и карбоксилатни у случају етилендиамин- N,N' -ди-3-пропанске киселине. У Табели 1 су приказани неки лиганди edda-типа.

Табела 1. Неки тетрадентатни лиганди edda-типа

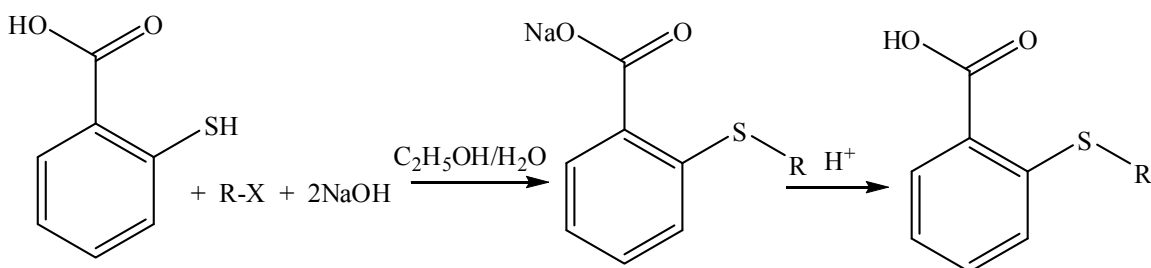
Назив и формула лиганата	Скраћеница
етилендиамин- <i>N,N'</i> -диацетат $\text{^-OOCCH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{COO}^-$	edda
<i>N,N'</i> -диметил-етилендиамин- <i>N,N'</i> -диацетат $\text{^-OOCCH}_2\text{N(CH}_3\text{)CH}_2\text{CH}_2\text{N(CH}_3\text{)CH}_2\text{COO}^-$	dmedda
<i>N,N'</i> -диетил-етилендиамин- <i>N,N'</i> -диацетат $\text{^-OOCCH}_2\text{N(C}_2\text{H}_5\text{)CH}_2\text{CH}_2\text{N(C}_2\text{H}_5\text{)CH}_2\text{COO}^-$	deedda
етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-3-пропаноат $\text{^-OOCCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$	eddp
етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-(<i>S,S</i>)-2-пропаноат $\text{^-OOC(CH}_3\text{)CHNHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH(CH}_3\text{)COO}^-$	(<i>S,S</i>)-eddp
етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-(<i>S,S</i>)-2-(3-метил)-бутаноат $\text{^-OOC(C}_3\text{H}_7\text{)CHNHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH(C}_3\text{H}_7\text{)COO}^-$	(<i>S,S</i>)-eddv
1,3-пропандиамин- <i>N,N'</i> -диацетат $\text{^-OOCCH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{COO}^-$	1,3-pdda (tmdda)
<i>N,N'</i> -bis-(2-аминоетил)глицинат $(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{COO}^-$	i-dtma
<i>N,N'</i> -добензил-етилендиамин- <i>N,N'</i> -диацетат $\text{^-OOCCH}_2\text{N(CH}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{)CH}_2\text{CH}_2\text{N(CH}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{)CH}_2\text{COO}^-$	dbedda
<i>meso</i> -1,2-дифенил-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-3-пропаноат $\text{^-OOCCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH(C}_6\text{H}_5\text{)CH(C}_6\text{H}_5\text{)NHCH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$	1,2-dpheddp

Наведени лиганди се могу синтетисати на основу методе описане патентом који су представили Берсворт (Bersworth) и сарадници (Шема 1) [2], а најчешће се координују тетрадентатно за централни метални јон.

2.1.1. Бидентатни лиганди S,O-типа

Тиосалицилна киселина и њени S-аликил деривати имају разноврсну примену и то као реагенси за одређивање метала [4,5], модификатори графитних електрода [6] и као фотоиницијатори за слободно-радикалске полимеризације, [7] али имају примену и у козметичке сврхе и то у третману за раст косе [8]. Користе се при лечењу разних специфичних запаљенских и алергијских процеса респираторног низа [9] као и за инхибицију раста туморских ћелија [10]. Кето деривати тиосалицилне киселине, такође, имају велику примену и као инхибитори транспорта жучне киселине [11].

S-аликил деривати тиосалицилне киселине (аликил = бензил-, метил-, етил-, пропил- и бутил-) се могу синтетисати на основу претходно описаног поступка [12-15] чију шему добијања можемо срести у раду Смита (Smith) и сарадника, а може се приказати на следећи начин (Шема 3).



Шема 3. Метода синтезе S-аликил етра тиосалицилне киселине

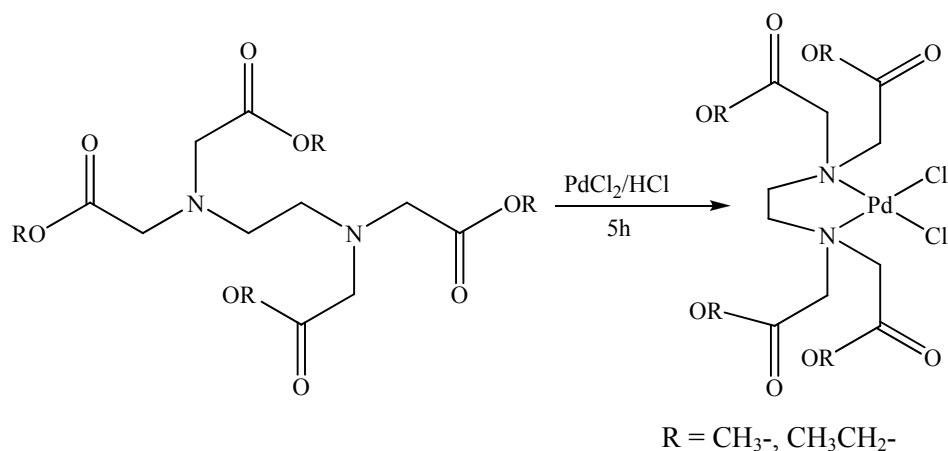
2.2. КОМПЛЕКСИ ПАЛАДИЈУМА(II) СА *O,O'*-ДИАЛКИЛ ЕСТРИМА EDDA ТИПА ЛИГАНДА

Интеракције комплекса платина(II), платина(IV) као и паладијум(II) јона са сумпор- и азот-донорским лигандима су веома важне са хемијског, биолошког и медицинског аспекта. Познато је да комплекси платине(II), а у новије време и комплекси платине(IV) имају широку примену у медицини, а потенцијалну примену у медицини у будућности могу имати и комплекси паладијума(II). Антитуморска активност комплекса ових метала описује се њиховом интеракцијом са молекулима ДНК. Међутим, ови комплекси врло често реагују и са другим биомолекулима у организму (пептидима, протеинима и ензимима). Такође је познато да јони платине(II) имају веома велики афинитет према атому сумпора. Због тога уколико се платина(II)-јон координује преко атома сумпора из *S*-цистеина и *S*-метионина гради врло стабилне комплексе. Све нежељене последице које се јављају током хемиотерапије (нефротоксичност, ототоксичност, неуротоксичност, резистенција и друге) описане су заправо интеракцијом комплекса платине са биомолекулима који садрже сумпор-донорске атоме. Интензивна испитивања интеракција различитих комплекса платине(II) са сумпор-донорским биомолекулима показују да су једињења платине(II) са тиолима (*S*-цистеин, *S*-глутатион) јако стабилна, нереактивна и токсична, док су једињења платине(II) са тioletрима (*S*-метионин, *S*-метил-глутатион) мање стабилна и могу се сматрати интермедијерима у процесу интеракције комплекса са ДНК.

Паладијум је прелазни метал који припада платинској групи метала. Најчешће се у једињењима јавља са оксидационим стањем +2. У природи га има у јако малим количинама и то у комбинацији са другим елементима платинске групе. Паладијум има широку примену у петрохемији као катализатор, а изнад свега у аутомобилској индустрији. Такође велику примену паладијум је нашао и у стоматологији за прављење круница и мостова за зубе.

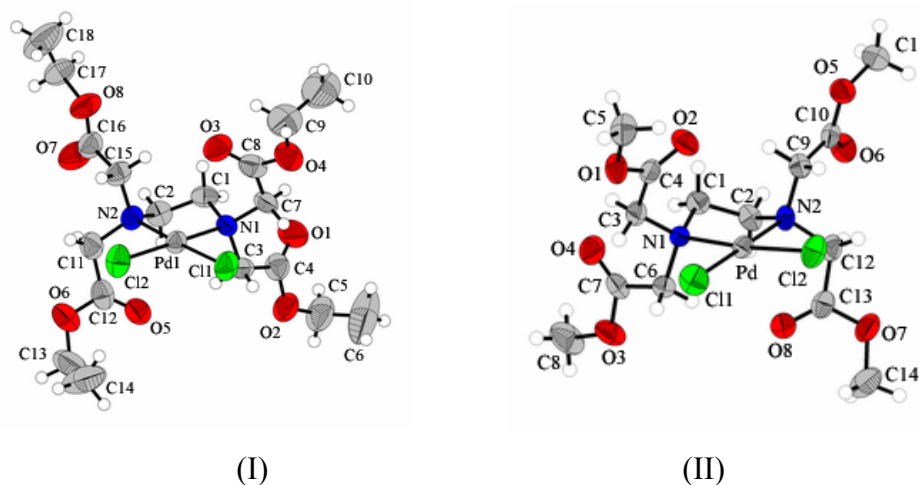
Као и јони осталих прелазних метала и паладијум(II) јон гради комплексна једињења. Комплекси платине и паладијума поседују велику примену у медицини и индустрији. Због тога се ова једињења интензивно изучавају већ дужи низ година. Платина се у комплексима јавља у оксидационим стањима +2 и +4, док се паладијум најчешће јавља у оксидационом стању +2. Ретко се јавља у оксидационом стању +4, јер су једињења са овим оксидационим стањем паладијума врло нестабилна. Хемијске особине платине(II) и паладијума(II) су јако сличне, првенствено због њихове d^8 електронске конфигурације. Због тога они граде и слична комплексна једињења. Комплекси паладијума(II) су квадратно-планарне структуре и дијамагнетични су. За разлику од веома инертних комплекса платине, комплекси паладијума су знатно реактивнији и реагују скоро 10^5 пута брже. Паладијум спада у групу меких Луисових (Lewis) киселина. Има врло изражену тежњу да гради стабилне комплексе са меким Луисовим базама, као што су лиганди са сумпором као доносним атомом.

Синтетисан је и окарактерисан велики број комплексних једињења паладијума(II) са лигандима који садрже азот и кисеоник као доносне атоме. Синтетисани су на пример комплекси паладијума(II) са етилендиамин-тетраацетато лигандом (edta) [16-18], етилендиамином [19,20], као и са аминокиселинама [21-23]. Синтеза комплекса паладијума(II) са тетраметил и тетраетил естрима edta приказана је на Шеми 4.



Шема 4. Синтеза комплекса паладијума(II) са тетраметил и тетраетил естрима edta

У новије време објављене су и кристалне структуре ових комплекса (Слика 2) [24]. Дужине и углови веза су у сагласности са литературним подацима [16-23].

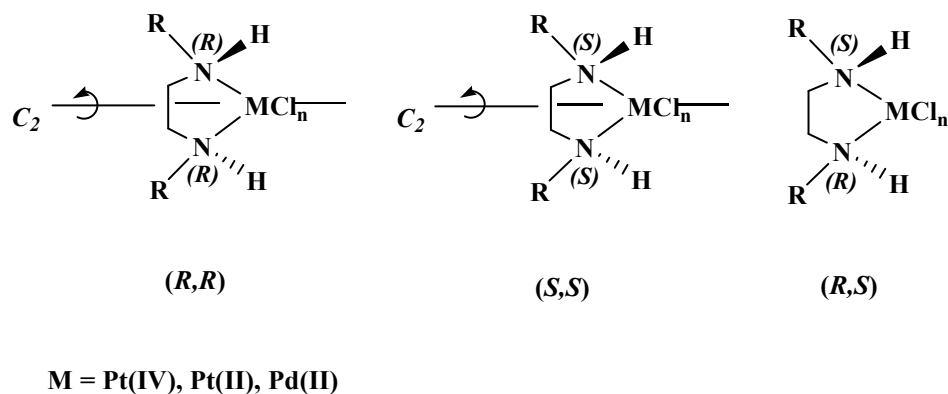


Слика 2. Diamond презентација комплекса паладијума(II) са тетраметил (I) и тетраметил(II) естрима edta

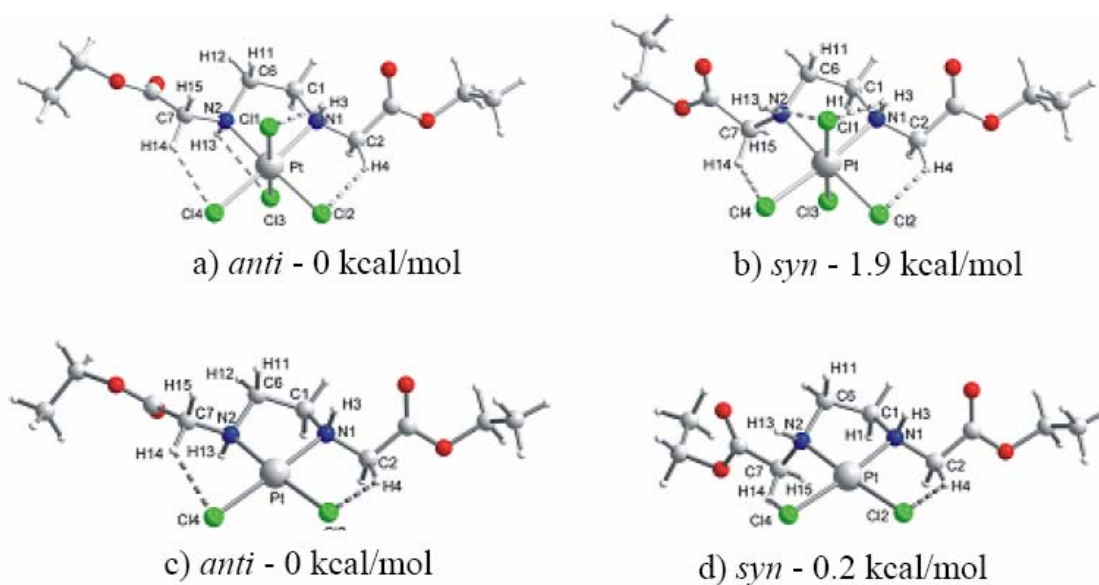
Петочлани прстенови које формира етилендиамински део R_4 -edta са паладијум(II) јоном [24] заузима конформацију полустолице нађену и код других сличних комплекса [25-27]. Торзиони углови N-C-C-O су између *synperiplanarnih* и *gaos* конформација [24].

Координовањем R_2 edda за паладијум(II)-јон азотови атоми постају асиметрични што теоријски даје могућност за настајање три изомера: два енантиомера [(*R,R*) и (*S,S*)] и један дијастереоизомер (*R,S*) конфигурације (Слика 3). Приликом синтезе платина(IV) комплекса са et_2 -edda [28] добијени су само енантиомери ((*R,R*), (*S,S*) и рацемска смеша) у чврстом стању, као и у раствору, што је потврђено рендгенском структурном анализом и NMR спектроскопијом. Да би се објаснио разлог стереоселективности, рађени су DFT прорачуни за *R,R* (*anti*) и *R,S* (*syn*) изомере коришћењем функционала MPW1PW91 [28] (Слика 4).

У случају *anti* изомера утврђено је да је N–H⋯Cl електростатичка интеракција нешто јача, што може бити довољан разлог за стереоселективност [28].



Слика 3. Могући изомери $[PtCl_n(R_2\text{-edda-mina})]$, ($n = 2, 4$) и $[PdCl_2(R_2\text{-edda-mina})]$ комплекса

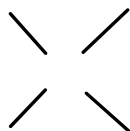


Слика 4. Израчунате структуре $[PtCl_n(et_2\text{-edda})]$ (a, b: $n = 4$; c, d: $n = 2$).

2.3. БИОЛОШКА АКТИВНОСТ КОМПЛЕКСА НЕКИХ ПРЕЛАЗНИХ МЕТАЛА

2.3.1. Антитуморска активност комплекса платине

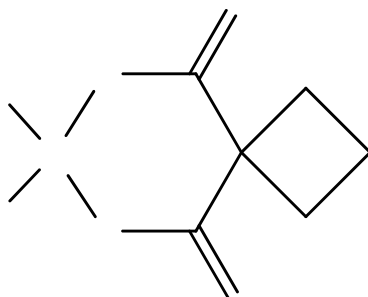
Иако се цисплатина први пут помиње у раду Пирона (Peugone) из 1845. године [29], антитуморска активност остаје непримећена до 1965. године када су Розенберг (Rosenberg) и сарадници открили антипролиферативну активност индуковану на култури *Escherichia coli* услед дејства електричног поља изазваним платинским електродама. Експериментално је потврђено да су том приликом настали неки комплекси платине услед редокс реакција платинских електрода са електролитом. Од награђених комплекса платине цисплатина се сматрала одговорном за ову врсту активности. Цисплатина (Слика 5) је заустављала деобу ћелије блокирајући репликацију ДНК. Даљим испитивањем Розенберг и сарадници показали су да овај лек делује на туморе миша, попут саркома 180 и леукемије 1210 [30,31].



Слика 5. Структура *cis*-диаминдихлоридоплатина(II) комплекса, познатијег као цисплатина, *cis*-DDP

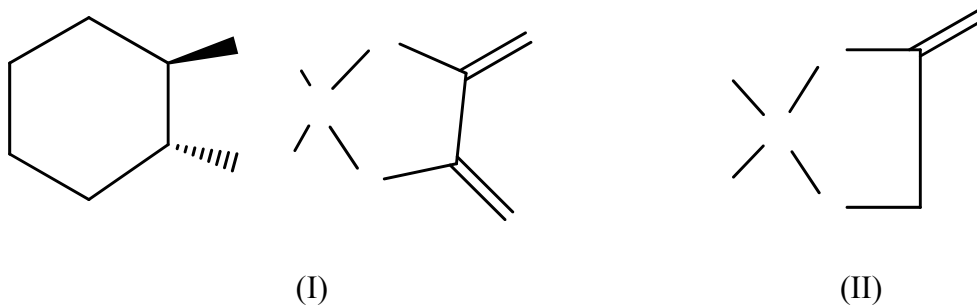
Интересантно је да одговарајући *trans* геометријски изомер *trans*-диаминдихлоридоплатина(II) (трансплатина) није показао антитуморску активност на поменутиим туморима миша [32,33]. Од тада се цисплатина широко користи у терапији разних тумора. Цисплатина је посебно ефикасна у терапији тумора тестиса и јајника, а такође се широко примењује у лечењу тумора бешике, грлића материце, карцинома бронхија, тумора једњака и малигних болести крви [34-43]. Упркос великом успеху приликом лечења неких тумора, цисплатина показује и нежељене ефекте попут високе неуротоксичности, нефротоксичности и повраћања. Нажалост, оваква споредна дејства ограничавају количину дозирања цисплатине код пацијената (100 mg/дан до највише пет узастопних дана терапије). Иако се цисплатина клинички широко користи, њена примена је ипак ограничена на релативно мали број тумора. Неки тумори поседују природну резистенцију према цисплатини, а неки је стичу после одређеног времена терапијске примене. Цисплатина је релативно слабо растворна у води и примењује се интравенски, што условљава њену примену само при хоспитализацији пацијената [44-55].

Након открића антитуморске активности цисплатине, синтетисан је велики број комплекса платине за које се сматрало да су потенцијални антитуморски агенси. Велики број њих је ушао у клиничка испитивања, али је само диамин[1,1-циклобутандикарбоксилато(2)]-*O,O'*-платина(II) комплекс познатији под именом карбоплатина (Слика 6) добио одобрење за рутинску клиничку примену. Карбоплатина је мање токсична од цисплатине и може се пацијентима давати у много већим дозама у односу на цисплатину, али је мање активна [49,50]. Карбоплатина делује у истом спектру тумора као и цисплатина, а примењује се такође интравенски.



Слика 6. Структура диамин[1,1-циклобутандикарбоксилато(2)]-*O,O'*-платина(II) комплекса, карбоплатина

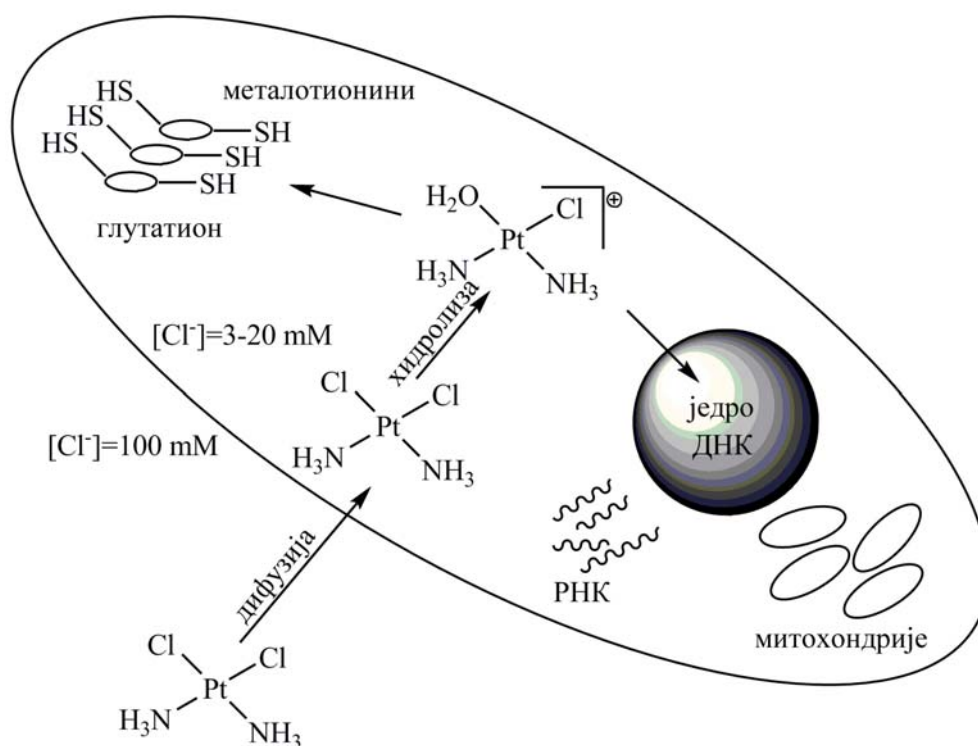
Последњих година су још два комплекса платине(II) *cis-L*-диаминциклохексан)оксалатоплатина(II), оксалиплатин и *cis*-диамин(гликолато-*O,O'*)платина(II), недаплатин (Слика 7) добила ограничено одобрење за коришћење приликом поновног лечења метастатских тумора дебелог црева [52]. Међутим, ни један од ова два комплекса није показао предност у односу на цисплатину и карбоплатину. Због тога су истраживања настављена у правцу синтезе нових комплекса платине и других јона метала који ће показати мању токсичност, шири спектар дејства у односу на цисплатину и могућност оралне примене.



Слика 7. Структура (I) *cis*-диаминциклохексаноксалатоплатина(II), оксалиплатин и (II) *cis*-диамин(гликолато-*O,O'*)платина(II), недаплатин

2.3.2. Механизам дејства цисплатине

Цисплатина испољава антитуморску активност везујући се за ДНК и заустављајући транскрипцију, односно репликацију ДНК [56-61]. Ови поремећаји активирају процес цитотоксичности и доводе до смрти ћелије тумора кроз апоптозу, односно програмирану смрт ћелије. Апоптоза изостаје тј. настаје резистенција ако долази до повећања поправке ДНК-адукта и способности толеранције оштећења ДНК (Шема 5).

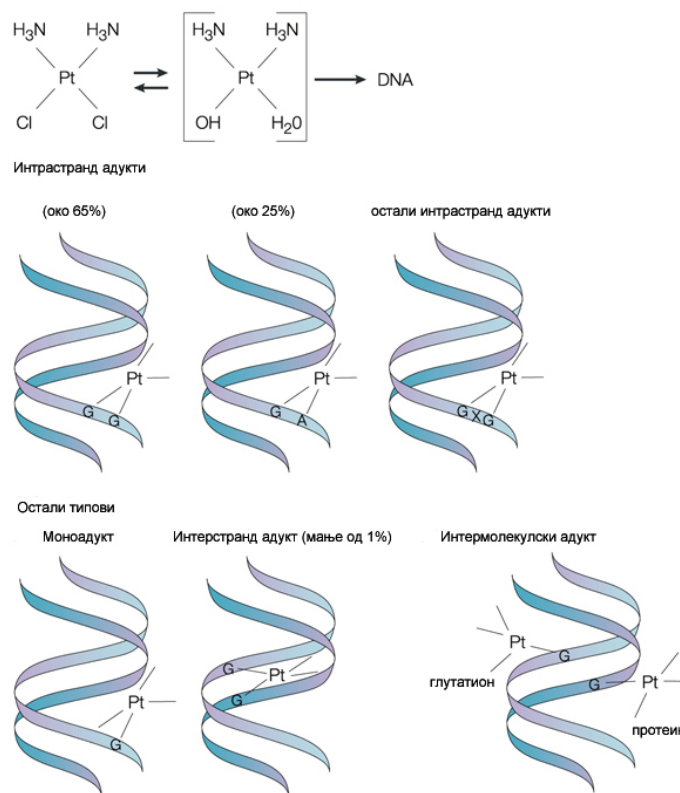


Шема 5. Пут лека

Након интравенског дозирања цисплатине на путу до оболеле ћелије она може да реагује са бројним биомолекулима.

Висока концентрација хлоридо јона у крви (100 mM) спречава хидролизу полазног комплекса. Према томе, цисплатина доспева до туморских ћелија као

неутралан комплекс. Када доспе у ћелију, где је концентрација хлоридо јона приближно 4 mM, долази до замене хлоридо лиганда молекулима воде (Шема 6). Најважнија врста која настаје је $[PtCl(H_2O)(NH_3)_2]^+$ катјон [62-64]. Овај катјон је врло реактиван због тога што је вода у односу на хлоридо лиганд боља одлазећа група [65].



Шема 6. Хидролиза и грађење ДНК-цисплатина адукта

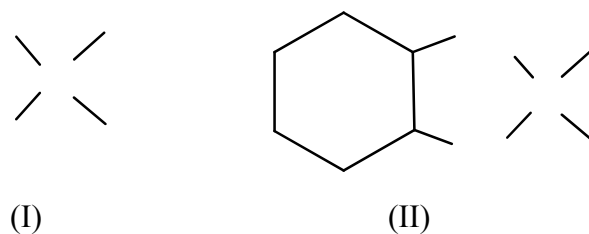
Пре него што уђе у ћелију, цисплатина се може везати за фосфолипиде и фосфатидилсерин из ћелијске мембране. Такође, у организму су присутни многи макробиомолекули који могу бити потенцијална места за везивање платине, укључујући РНА, бројне протеине и пептиде који садрже сумпор [44-48]. Процењено је да се мање од 1% молекула цисплатине који уђу у ћелију везују за ДНК из једра, док се остала количина везује за протеине и друге биомолекуле ћелије [66,67].

Иако се зна да се већи број молекула цисплатине везује за протеине постоје и експериментални докази да ове врсте интеракција имају важну улогу при покретању апоптозе (програмиране смрти ћелије). Осим тога некроза (случајна смрт ћелије), која настаје услед главног неуспеха самог функционисања ћелије, такође је допринела објашњавању механизма којим цисплатина уништава туморске ћелије.

2.3.3. Развој нових антитуморских лекова

Од великог броја синтетисаних комплекса платине, којима је испитана антитуморска активност, знатан број је испитан у односу зависности активности од структуре комплекса. Показано је да комплекси платине(II) који показују антитуморску активност морају имати *cis* геометрију са општом формулом $[Pt(am)_2X_2]$, где је *am* инертни амински лиганд са најмање једном NH групом а X је лако одлазећа група. Одлазећа група мора бити анјон са умерено јаком координацијом за платину, као и да поседује слаби *trans* ефекат да би се избегла лабилизација аминског лиганда. Али и комплекси са релативно добро одлазећим групама, као што су перхлоратни или нитратни анјон, су изразито токсични, док су комплекси са инертним одлазећим групама углавном неактивни.

Откриће антитуморских особина поменутих комплекса платине повећало је интересовање ка добијању евентуално ефикаснијих комплекса других метала и лиганата. Међу првим комплексима коришћеним у клиничким испитивањима против тумора били су комплекси паладијума(II) и то аналози цисплатине, *cis*-диаминдихлоридопаладијум(II), *cis*- $[PdCl_2(NH_3)_2]$ и *cis*-1,2-диаминциклохександихлоридопаладијум(II), *cis*- $[PdCl_2(DACH)]$ комплекси (Слика 8) [68].



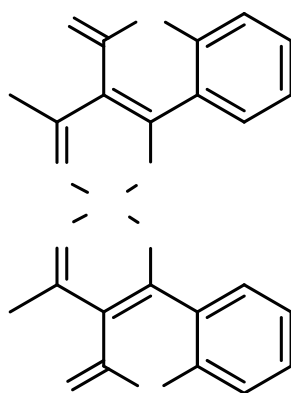
Слика 8. Структура (I) *cis*-диаминдихлоридопаладијум(II), *cis*-[PdCl₂(NH₃)₂];
(II) *cis*-1,2-диамнинциклохександихлоридопаладијум(II), *cis*-[PdCl₂(DACH)]

Познато је да су комплекси платине(II) термодинамички и кинетички стабилнији од паладијум(II) аналога. Паладијум(II) комплекси подлежу хидролизи и измени лиганада чак 10^5 пута брже него одговарајући комплекси платине(II), што условљава нижу антитуморску активност комплекса паладијума и већу токсичност [60,68,69].

Иако први резултати нису показали значајну антитуморску активност комплекса паладијума(II), ови комплекси су ипак много шире проучавани. Углавном су комплекси паладијума(II) због велике реактивности показивали нижу антитуморску активност од цисплатине [60,69]. Сматра се да је нижа активност ових комплекса последица јако брзе измене лиганада и немогућности комплекса да непромењене структуре стигне до биолошке мете, чиме је повећан ризик од неповољних ефеката на биохемијске процесе у ћелији. У циљу превазилажења оваквих проблема многи аутори [70] су предлагали да се паладијум(II) јон координује за хелатне лиганде, чиме би се смањила реактивност паладијумовог центра повећавајући стабилност награђеног комплекса. Антитуморска активност комплекса, односно успех лека, зависи и од коришћеног лиганда за координовање јер од лиганда зависи реактивност и липофилност, као и стабилизовање одређених оксидационих стања метала или могућност супституције [71,72]. До сада је једина примена паладијума у медицини у лечењу брзорастућег канцера простате и то користећи радиоактивни изотоп ^{103}Pd [73,74].

H₃NH₃N

Постоје и комплекси паладијума(II) који показују активност сличну цисплатини или карбоплатини. Комплекс паладијума са лигандом који је дериват кумарина (Слика 9) показује приближно 7800 пута већу активност у односу на карбоплатину на ћелијама A549, HeLa и K562 [75,76]. Тиме је потврђена претпоставка да са волуминознијим лигандима комплекси показују бољу антитуморску активност. Такође је испитиван велики број паладијум(II) комплекса са неутралним лигандима, као што су деривати пиридина [77,78], фосфатни деривати хинолина [89,80] или деривати пиразола [81] и тиме је доказана њихова значајна антитуморкса активност.



Слика 9. Комплекс паладијума(II) са дериватом кумарина, активнији приближно 7800 пута од карбоплатине

У тежњи да се синтетише једињење са већом антитуморском активношћу и мањим нежељеним последицама, вршена су испитивања комплекса других метала који не припадају платинској групи. Међу таквим једињењима су били комплекси рутенијума, злата и сребра [82,83], титанијума [84,85] и калаја [86,87]. Дејсон (Dayson) и сарадници [98-90] су објавили значајне резултате радећи на фероценил-пиридин-арен рутенијум комплексима и на ефекту

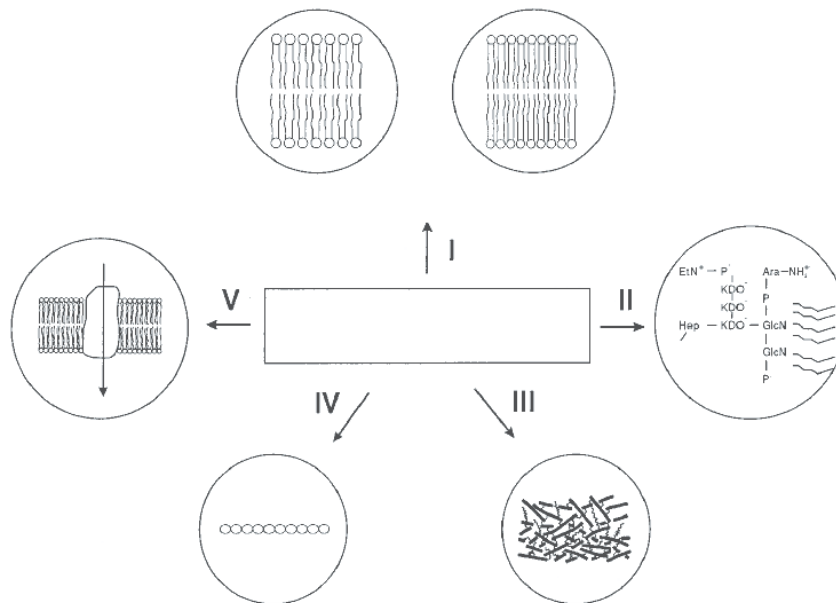
циклопентадиенил прстена на цитотоксичност рутенијумових једињења. Кеплер (Kerpler) и сарадници [82,83,90] су објавили одличне резултате радећи са рутенијумским и паладијумским комплексима. Комплекси злата су такође испитивани, обзиром да је злато(III) изоелектронско и изоструктурно са Pt(II) комплексима. Комплекси злата су лабилнији, али су неки показали велику цитотоксичност [91,92]. Чак и комплексе злата(I) и сребра(I) [93] треба поменути као могуће будуће лекове за лечење тумора.

2.3.4. Антимикробна активност комплекса паладијума(II)

Микроорганизми су хетерогена група организама. Својим комплексним физиолошким и биохемијским потенцијалима представљају неодвојиви део сваког екосистема и од великог су значаја за хуману популацију. Носиоци су бројних процеса значајних за развој савременог друштва. Процењује се да су се први пут појавили на Земљи пре око 3,5 милијарди година и то као *Archebacteria*. За микроорганизме се везују и најзначајније промене у еволуцији: прелаз с прокариота на еукариоте и прелаз из једноћелијских у вишећелијске организме. Ова група организама је произвела и прве молекуле кисеоника на Земљи и утицала на промену хемијског састава атмосфере, хидросфере и литосфере.

Данас постоји велики број различитих врста микроорганизама које се међусобно разликују према морфолошким, физиолошким и биохемијским карактеристикама. При томе поред корисних микроорганизама које употребљавамо у различите сврхе, почев од прехранбене преко медицинске до биотехнолошке употребе, веома значајну групу чине патогени микроорганизми. То је посебна група микроорганизама која изазива обољења код људи. Између људи и патогених бактерија постоји дугогодишња борба. У античко време најпре су биљке коришћене за контролу и лечење хуманих болести изазваних микроорганизмима. Касније, открићем антибиотика напредовала је борба против патогених бактерија и

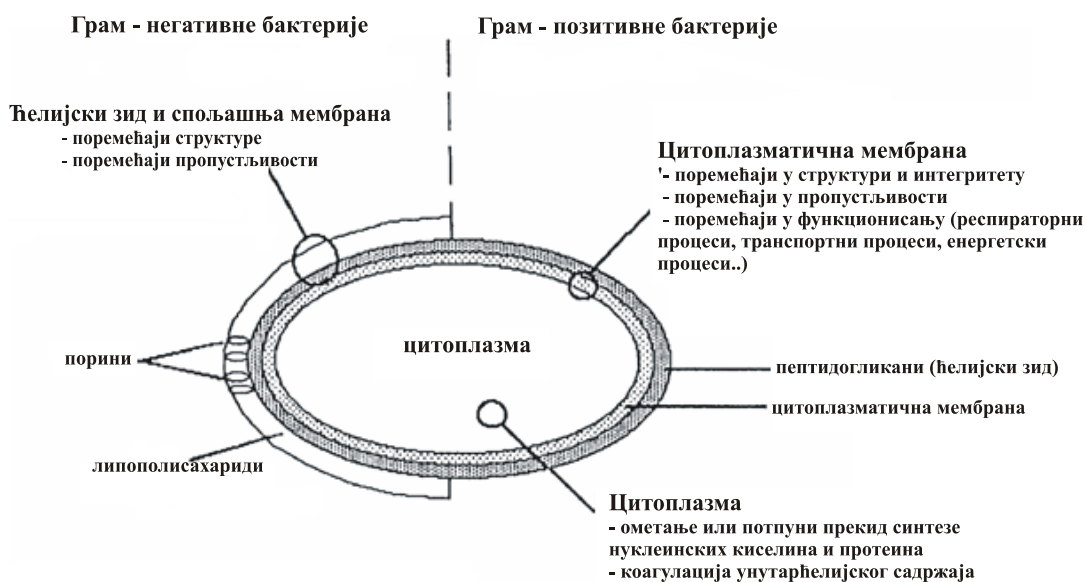
до тада неизлечиве болести су постале излечиве. Међутим, све већом употребом антибиотика јављала се пропорционална резистентност патогених микроорганизама. Резистентност представља одбрамбени механизам микроорганизама на дејство антимикробних супстанци. Сикема (Sikkema) и сарадници (1995. године) су навели широк спектар адаптивних механизма на присуство липофилних једињења. Механизми деловања се могу заснивати на адаптацији ћелијског омотача у погледу његовог састава или функције. Адаптације на нивоу ћелијског зида дешавају се у виду промене (повећања/смањења) његове хидрофилности, што омогућава додатну баријеру за одређене супстанце (Слика 10) [94].



Слика 10. Адаптациони механизам за заштиту ћелије од токсичних ефеката липофилних једињења: (I) реструктурирање фосфолипидног двослоја променом конформације фосфолипида из *cis* у *trans*, или променом масних киселина у засићену форму; (II) Модификација липополисахарида у спољашњем омотачу Грам-негативних бактерија; (III) повећање повезаности конституената ћелијског зида и/или промене у његовој хидрофилности; (IV) повећање хидрофилности S-слоја; (V) активна екскреција из ћелије.

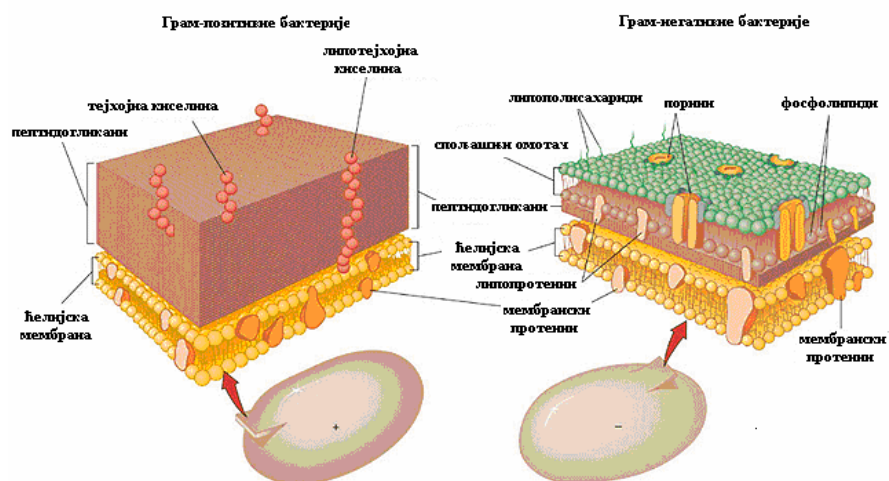
2.3.5. Механизми дејства антимикуробних једињења

Антибактеријско дејство може бити усмерено на више структура у бактеријској ћелији. Дејство може бити усмерено на ћелијски зид, цитоплазматичну мембрану, као и на унутрашњост ћелије (метаболичке процесе ћелије, тј. синтезу нуклеинских киселина и протеина) (Слика 11) [95].



Слика 11. Потенцијална места на бактеријској ћелији за дејство антимикуробних супстанци

Механизам антибактеријског дејства зависи од карактеристика циљних микроорганизама, а суштинска разлика је у различитости грађе ћелијског омотача која постоји између Грам-негативних и Грам-позитивних бактерија као што је приказано на Слици 12.



Слика 12. Грађа омотача Грам-негативних и Грам-позитивних бактерија

Грам-позитивне бактерије имају дебео ћелијски зид који је углавном изграђен од пептидогликана, што представља спољашњи слој око ћелије. Такође, у састав ћелијског зида Грам-позитивних бактерија улази и тејхојна киселине. Тејхојна киселина се састоји од фосфата и алкохола: глицерола и рибитола. Због присуства тејхојне киселине наелектрисање на површини ћелијског зида је негативно. Сложена структура ћелијског зида Грам-позитивних бактерија ипак не представља значајну баријеру [96]. Ћелијски зид Грам-негативних бактерија осим слоја пептидогликана, који је код ових бактерија много тањи, састављен је из једног или више слојева, а садржи и спољашњи слој. Спољашњи слој ћелијског зида, који се налази изнад пептидогликанског слоја, а који се састоји се од фосфолипидног двослоја, липопротеина и липополисахарида. Функције овог слоја су вишеструке: његово негативно наелектрисање спречава деловање одбрамбеног система домаћина (фагоцитоза), као и антимикуробних супстанци (пеницилин), лизозима, детерџената, тешких метала и одређених боја [97]. Полупропустљива је и функционише као препрека за молекуле веће од 600 Da. Хидрофобни макромолекули не могу проћи баријеру спољашњег слоја ћелијског зида Грам-негативних бактерија.

Липополисахариди, који се налазе на спољашњем делу фосфолипидног слоја хидрофилни су и наелектрисани, па стога представљају додатну баријеру за хидрофобне супстанце [94,96].

Због сложености структуре, Грам-негативне бактерије поседују генерално већу отпорност на дејство различитих антимикуробних супстанци у односу на Грам-позитивне бактерије [98].

Циљна места интеракције бактеријске ћелије су и ћелијска мембрана и цитоплазма ћелије.

1. **Ћелијска мембрана.** Интеракцијом липофилних једињења са фосфолипидним делом условљава промене у структури и функцији ћелијске мембране. Уколико дође до акумулације ових једињења долази до губитка интегритета ћелијске мембране, као и разних промена активности ензима мембране [94].
2. **Дејство на унутарћелијске процесе.** Дејство антимикуробних супстанци може утицати и на унутарћелијске процесе у које спадају ометање или потпуни прекид репликације и коагулације унутар ћелијског садржаја [99]. У неким случајевима може доћи до процеса самоуништења ћелија, који је последица метаболичког дисбаланса. Аутоцидни процеси настају као последица два механизма дејства: акумулације слободних радикала и поремећаја јонске хомеостазе [95].

Гљиве су еукариотски организми, по грађи сложенији од бактерија. Велика група гљива, укључујући и гљиве из рода *Aspergillus*, су вишећелијски организми чије је вегетативно тело (мицелија) изграђено од гранатих нити (хифа), док једна мања група представља једноћелијске организме, овалног облика којој припадају квасци. Ћелијски зид гљива је углавном изграђен од аминопалисахарида хитина који је у ћелијском зиду квасаца присутан у нешто мањем проценту.

Будући да су гљиве еукариотски организми, механизми антифунгалног деловања су самим тим и комплекснији. Врло често, због велике сличности између еукариотске ћелије гљива и анималне или хумане ћелије, антифунгални агенси токсично делују и на њих, па је и то један од разлога за откривањем нових, безбедних антифунгалних агенаса. Механизам њиховог деловања се огледа у:

- нарушавању интегритета ћелијске мембране повећавајући њену пропустљивост
- инхибицији синтезе ћелијског зида
- инхибицији синтезе нуклеинских киселина
- инхибицији ћелијске деобе (митозе) [100].

Микроорганизми, који могу изазвати болести, спадају у групу патогених микроорганизама, а квантитативна мера те способности зове се вируленција [101].

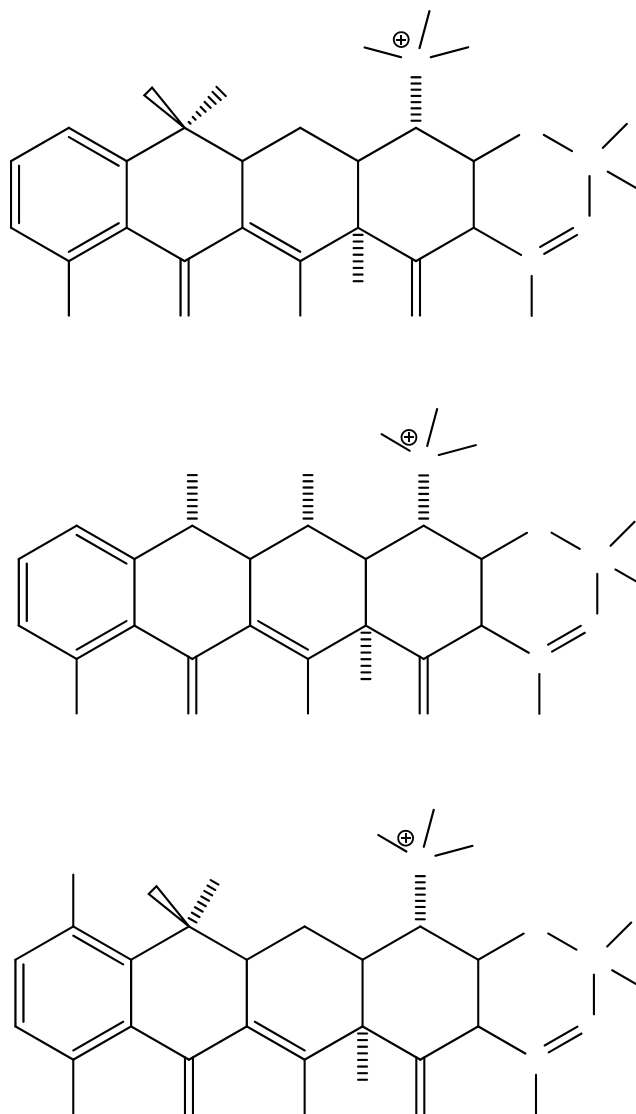
Карактеристике којима се патогени микроорганизми разликују у односу на непатогене јесу поседовање једног или више фактора вируленције у које спадају: способност микроорганизама да продре у домаћина, способност адхеренције и колонизације (инвазивност), способност избегавања имуног одговора домаћина и способност продукције токсина [102].

2.3.6. Развој нових антимикуробних једињења

Микроорганизми су развили бројне одбрамбене механизме на дејство разних антимикуробних супстанци. То је довело до пораста инфекција изазваних резистентним или мање осетљивим бактеријама. Такође, инфекције изазване патогеним бактеријама *Candida albicans* и *Aspergillus sp.* су у све већем порасту. То је навело многе научнике на проналажење нових антимикуробних агенаса који се могу ефикасно применити у борби против инфекција. Најпре су извор разних истраживања била природна једињења, а касније се радило на синтези нових једињења која би показала бољу антимикуробну активност. Значајно антибактеријско и антифунгално дејство такође су показали и многи комплекси прелазних метала. Бројни синтетисани комплекси палладијума(II) су показали

значајну антибактеријску активност, као и утицај на раст и метаболизам различитих група микроорганизама.

Гуера (Guerra) и сарадници су приказали синтезу три комплекса паладијума(II) (Слика 13) са антибиотикима из групе тетрациклина и испитивали њихов утицај на тетрациклин осетљиве и резистентне бактеријске сојеве [103].

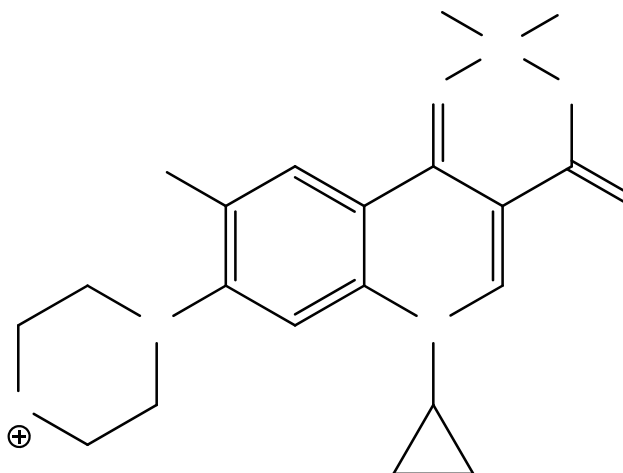


Слика 13. Паладијум(II)-јон координован за антибиотике из групе тетрациклина

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

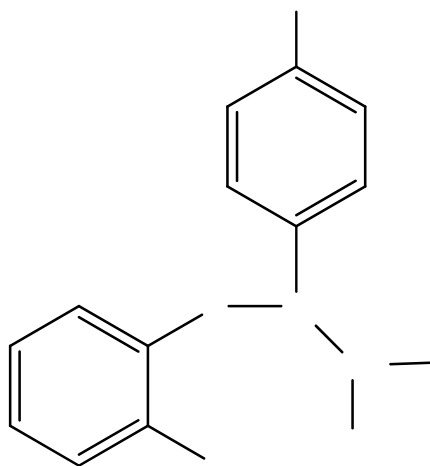
Виера (Viera) и сарадници су 2009. године приказали синтезу и антимикуробну активност комплекса паладијума(II) са биолошки активним лигандом флуорохинолином (Слика 14), при чему је забележена значајна активност комплекса на бактерију *Mycobacterium tuberculosis* вирулентни сој [104]. Флуорохинолин и други биолошки активни молекули коришћени су као лиганди за координовање и за друге металне јоне, који су такође условљавали већу антимикуробну активност.

У литератури постоје бројни радови са синтетисаним комплексима паладијума(II) који су показали значајну активност на различите врсте бактерија и гљива [105-110]



Слика 14. Паладијум(II) комплекс са флуорохинолином као лигандом

Многа ранија истраживања су показала да ароматична и хетероциклична група тиетра игра значајну улогу у антимикумној активности. Бројна једињења овог типа су синтетисана и испитана је њихова антибактеријска и антифунгална активност [111-114]. Њихова активност забележена је на бактеријама *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Многи научници инспирисани оваквим резултатима испитивали су антимикумбну активност S-алкил деривата тиосалицилне киселине [115] (Слика 15). Њихова антибактеријска и антифунгална активност испитана је микродилуционом методом на различитим бактеријским сојевима *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*, док је *in vitro* антифунгална активност испитивана на *Candida albicans* и *Candida krusei*.



Слика 15. Структура деривата тиосалицилне киселине

2.4. МЕТОДЕ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ СТРУКТУРЕ КОМПЛЕКСА МЕТАЛА СА ЛИГАНДИМА EDDA-ТИПА

Одређивање структуре комплекса који садрже бидентатне лиганде *O,O'*-диалкил естре edda-типа и *S*-алкил деривате тиосалицилне киселине вршена је употребом спектроскопских метода: нуклеарно-магнетно-резонанционе (NMR) и инфрацрвене спектроскопије (IR) као и рендгенске структурне анализе.

2.4.1. Нуклеарно-магнетно-резонанциона спектроскопија

Претпостављена координација лигананда прекурсора потврђена је применом протонске нуклеарно-магнетно-резонанционе спектроскопије. За одговарајуће паладијум(II) комплексе у ^1H NMR спектрима сигнали за метиленске протоне етилендиаминског дела молекула из edda-типа лигананда су померени ка вишем магнетном пољу у односу на спектре одговарајућих лигананда R_2 -edda (на 0,1-0,9 ppm) што указује на координацију азотових атома за централни метални јон. Присуство по два сета сигнала у спектрима комплекса паладијума(II) указује на постојање дијастереоизомера што је очекивано према DFT прорачунима рађеним за слична једињења [28].

У ^{13}C NMR спектрима комплекса сигнали за естарске угљеникове атоме налазе се на приближно истим вредностима као у спектрима одговарајућих лигананда, што потврђује да није дошло до координације кисеоникових атома за централни метални јон. Међутим у неким случајевима уочава се значајна разлика у положајима сигнала за естарски угљеников атом и карбоксилни угљеников атом, што указује на тридентатно координовање неких алкил естара edda-типа лигананда.

2.4.2. Инфрацрвена спектроскопија

У инфрацрвеним спектрима изолованих естара уочене су важне апсорпционе траке: за секундарне амонијумове соли $\nu(\text{R}_2\text{NH}_2^+)$, за алкил групе $\nu(\text{CH}_2)$, естарске групе $\nu(\text{C}=\text{O})$ и $\nu(\text{C}-\text{O})$. Приликом координовања за централни метални јон долази до формирања секундарне амино групе.

Као критеријуми за разликовање координованих од некоординованих карбоксилних група у инфрацрвеним спектрима користи се положај фреквенција асиметричних валенционих вибрација ових група [116-118]. Асиметричне валенционе вибрације протонваних карбоксилних група налазе се у области од 1750 до 1700 cm^{-1} , а у случају координовања померају се ка нижим фреквенцијама, односно налазе се у области 1650-1600 cm^{-1} .

N-H валенционе вибрације у комплексима са координованим лигандима edda-типа се налазе у области 3460-3200 cm^{-1} .

2.5. ЦИЉ И ЗАДАТАК ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Комплекси прелазних метала са тетрадентатним и бидентатним лигандима edda-типа (edda = анјон етилендиамин-*N,N'*-дисулфетне киселине) и њихових деривата предмет су изучавања многих истраживача већ дужи низ година, пре свега ради изучавања спектралних особина награђених комплекса.

Шездесетих година прошлог века испитивана је медицинска примена лиганада овог типа у циљу елиминације јона тешких метала приликом оралног тровања. Иако се лиганди, пре свега сам edda као и edta (edta = анјон етилендиаминтетрасулфетне киселина), чији је edda лиганд фрагмент, примењују у медицини у наведену сврху, имају ограничену примену с обзиром да обављају неселективну елиминацију јона метала. Поред елиминације јона метала који су

изазвали тровање, из организма се излучују и јони метала који су неопходни за нормално функционисање организма.

Откриће антитуморских особина цисплатине и сличних комплекса платине је повећало интересовање за добијање још ефикаснијих комплекса других метала и лиганата. Међу првим комплексима коришћеним у клиничким испитивањима против тумора били су паладијум(II) аналози цисплатине. Иако првобитни резултати нису били охрабрујући, комплекси паладијума су много шире проучавани. Паладијум(II) комплекси су скоро увек показивали мању антитуморску активност од цисплатине због своје велике лабилности. Да би се ови проблеми превазишли, многа истраживања су била усмерена ка употреби хелатних лиганата који би умањили реактивност паладијум(II) комплекса.

До сада је синтетисан мали број комплексних једињења паладијума(II) са диалкил естрима edda-типа као бидентатним лигандима, као и S-алкил дериватима тиосалицилне киселина. Стога је у оквиру ове *Докторске дисертације* предвиђена синтеза и карактеризација неких лиганата edda-типа, њихових O,O'-диалкил-естара као и S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса паладијума(II).

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

- Синтетисати тетрадентатни лиганд етилендиамин-N,N'-ди-(S,S)-2-пропанску киселину, (H₂-(S,S)-eddp)
- Синтетисати неке O,O'-диалкил естре тетрадентатног лиганда -етилендиамин-N,N'-ди-(S,S)-2-пропанске киселине, (R₂-(S,S)-eddp)
- Синтетисати одговарајуће паладијум(II) комплексе са O,O'-диалкил естрима (H₂-(S,S)-eddp) лиганда
- Синтетисати тетрадентатни лиганд етилендиамин-N,N'-ди-(S,S)-2-(3-метил)-бутанску киселину, (H₂-(S,S)-eddv)
- Синтетисати неке O,O'-диалкил естре тетрадентатног лиганда -етилендиамин-N,N'-ди-(S,S)-2-(3-метил)-бутанске киселине, (R₂-(S,S)-eddv)

- Синтетисати одговарајуће паладијум(II) комплексе са *O,O'*-диалкил естрима $H_2-(S,S)$ -eddv лиганда
- Синтетисати S-алкил деривате тиосалицилне киселине
- Синтетисати одговарајуће паладијум(II) комплексе са наведеним S-алкил дериватима тиосалицилне киселине
- Синтетисати тетрадентатни лиганд *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропанску киселину
- Синтетисати одговарајуће паладијум(II) и платина(IV) комплексе са наведеним тетрадентатним лигандом *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропанском киселином
- Састав добијених лиганада и комплекса утврдити на основу резултата елементалне микроанализе
- Структуру лиганада и награђених комплекса предвидети на основу њихових инфрацрвених и нуклеарно-магнетно-резонанционих спектра, где год је то могуће
- Структуру лиганада и награђених комплекса потврдити на основу рендгенске структурне анализе, где год је то могуће
- Испитати антимицробну и антитуморску активност награђених лиганада и одговарајућих комплекса

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. СИНТЕЗЕ ЛИГАНАДА

3.1.1. Синтеза етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-пропанске киселине, $H_2-(S,S)$ -eddp

Тетрадентатни лиганд, $H_2-(S,S)$ -eddp, је синтетисан на основу претходно описаног поступка [119]. У раствор који је добијен растварањем 20,00 g (0,50 mol) натријум-хидроксида лагано се, у малим порцијама, додаје 44,40 g (0,50 mol) *S*-аланина. Реакциона смеша се меша уз рефлуктовање и укапавање 47,00 g (0,25 mol) 1,2-дибром-етана и истовремено додавање 26,00 g (0,25 mol) анхидрованог натријум-карбоната. Раствор се рефлуктује још три сата. Након хлађења реакционе смеше и подешавања рН вредности на 5 помоћу раствора HCl (1:1) издваја се бели талог етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-пропанске киселине. Добијени талог се процеди, добро испере водом и суши на ваздуху. Принос: 5,90 g (11,60 %).

Резултати елементалне микроанализе за $H_2-(S,S)$ -eddp,

$$M(C_8H_{16}N_2O_4) = 204,25 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

	C (%)	N (%)	H (%)
Израчунато:	47,04	13,72	7,90
Нађено:	47,01	13,84	7,81

3.1.2. Синтеза *O,O'*-диалкил естара етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-пропанске киселине дихлорхидрата, $R_2-(S,S)$ -eddp·2HCl

O,O'-диалкил естри етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-пропанске киселине синтетисани су на основу претходно описаног поступка [3]. У 50,00 mL

одговарајућег апсолутног алкохола (1-пропанол, 1-бутанол и 1-пентанол) уводи се гасовити хлороводоник, а потом додаје тетрадентатни лиганд, $H_2-(S,S)$ -eddp, 1,53 g (7,5 mmol). Реакциона смеша се рефлукује 12 сати. Након тога добијени бели талог O,O' -диалкил естра етилендиамин- N,N' -ди- (S,S) -2-пропанске киселине у облику дихлорхидрата се одвоји цеђењем, испере водом, етанолом, етром и суши на ваздуху.

За O,O' -дипропил естар етилендиамин- N,N' -ди- (S,S) -2-пропанске киселине дихлорхидрат трихидрат, dpr- (S,S) -eddp·2HCl·3H₂O (**L1**). Принос: 1,62 g (51,92 %). ¹H NMR (200 MHz, D₂O, δ ppm): 3,51 (s, 4H), 3,55 (q, 2H), 1,51 (d, 6H), 4,24 (t, 4H), 1,65 (m, 4H), 0,92 (t, 6H). ¹³C NMR (200 MHz, D₂O, δ ppm): 44,75 (CH₂), 59,07 (CH), 17,18 (CH₃), 173,34 (COO-pr), 72,04 (CH₂-pr), 21,17 (CH₂-pr), 12,45 (CH₃-pr).

Резултати елементалне микроанализе за dpr- (S,S) -eddp·2HCl,

$$M(C_{14}H_{36}Cl_2N_2O_7) = 415,35 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

	C (%)	N (%)	H (%)
Израчунато:	40,48	6,75	8,74
Нађено:	40,06	6,71	8,34

За O,O' -дибутил естар етилендиамин- N,N' -ди- (S,S) -2-пропанске киселине дихлорхидрат трихидрат, dbu- (S,S) -eddp·2HCl·3H₂O (**L2**). Принос: 1,84 g (55,26 %). ¹H NMR (200 MHz, D₂O, δ ppm): 3,34 (s, 4H), 4,26 (q, 2H), 1,35 (d, 6H), 4,32 (t, 4H), 1,67 (m, 4H), 1,47 (m, 4H), 0,92 (t, 6H). ¹³C NMR (200 MHz, D₂O, δ ppm): 44,59 (CH₂), 59,10 (CH), 17,05 (CH₃), 173,01 (COO-bu), 70,40 (CH₂-bu), 32,62 (CH₂-bu), 21,35 (CH₂-bu), 15,62 (CH₃-bu).

Резултати елементалне микроанализе за dbu-(*S,S*)-eddp·2HCl·3H₂O,

$$M(C_{16}H_{40}Cl_2N_2O_7) = 443,40 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

	C (%)	N (%)	H (%)
Израчунато:	43,34	6,32	9,09
Нађено:	43,18	6,38	8,54

За *O,O'*-дипентил естар етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-пропанске киселине дихлорхидрат дихидрат, dpe-(*S,S*)-eddp·2HCl·2H₂O (**L3**). Принос: 1,87 g (55,00 %). ¹H NMR (200 MHz, D₂O, δ ppm): 3,42 (s, 4H), 4,14 (q, 2H), 1,34 (d, 6H), 4,28 (t, 4H), 1,72 (m, 4H), 0,93 (t, 6H). ¹³C NMR (200 MHz, D₂O, δ ppm): 45,14 (CH₂), 58,99 (CH), 17,49 (CH₃), 173,98 (COO-pe), 70,50 (CH₂-pe), 30,28 (CH₂-pe), 30,19 (CH₂-pe), 24,55 (CH₂-pe), 16,16 (CH₃-pe).

Резултати елементалне микроанализе за dpe-(*S,S*)-eddp·2HCl·2H₂O,

$$M(C_{18}H_{42}Cl_2N_2O_6) = 453,44 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

	C (%)	N (%)	H (%)
Израчунато:	47,68	6,18	9,34
Нађено:	46,91	6,12	9,46

3.1.3. Синтеза етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-(3-метил)-бутанске киселине, H₂-(*S,S*)-eddv

Етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-(3-метил)-бутанска киселина, H₂-(*S,S*)-eddv, је синтетисана на начин описан у одељку 3.1.1. У раствор који је добијен растварањем 20,00 g (0,50 mol) натријум-хидроксида лагано се, у малим порцијама додаје 58,57 g (0,50 mol) *S*-валина. Реакциона смеша се меша уз рефлуковање и укапавање 47,00 g (0,25 mol) 1,2-дибром-етана и истовремено додавање 26,00 g (0,25 mol) натријум-карбоната. Раствор се рефлукује још три сата. Након хлађења реакционе

смеше и подешавања рН вредности на 5 помоћу раствора НСl (1:1) издваја се бели талог етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-(3-метил)-бутанске киселине. Добијени талог се процеди, добро испере водом и суши на ваздуху. Принос: 8,15 g (12,52 %).

Резултати елементалне микроанализе за $H_2-(S,S)$ -eddv,

$$M(C_{12}H_{24}N_2O_4) = 260,33 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

	C (%)	N (%)	H (%)
Израчунато:	55,36	10,76	9,29
Нађено:	55,21	10,84	9,41

3.1.4. Синтеза *O,O'*-диалкил естара етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-(3-метил)-бутанске киселине дихлорхидрата, $R_2-(S,S)$ -eddv·2HCl

Диалкил естри етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-(3-метил)-бутанске киселине синтетисани су на начин описа у одељку 3.1.2. У 50,00 mL одговарајућег апсолутног алкохола (етанол, 1-пропанол, 1-бутанол и 1-пентанол) уводи се гасовити хлороводоник, а потом додаје $H_2-(S,S)$ -eddv, 2,50 g (7,50 mmol). Реакциона смеша се рефлуктује 12 сати. Након тога добијени бели талог *O,O'*-диалкил естра етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-(3-метил)-бутанске киселине се одвоји цеђењем, испере водом, етанолом и етром и суши на ваздуху.

За *O,O'*-диетил естар етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-(3-метил)-бутанске киселине дихлорхидрат, $det-(S,S)$ -eddv·2HCl (**L4**). Принос: 1,72 g (59,11 %). 1H NMR (200 MHz, D_2O , δ ppm): 1,1 (m, 12H, $C^{5,6}H_3$), 1,35 (t, 6H, C^8H_3), 2,41 (m, 4H, C^1H_2), 3,62 (m, 2H, C^4H), 3,69 (d, 2H, C^2H), 4,34 (q, 4H, C^7H_2). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 16,25 (C^8H_3), 20,93 (C^5H_3), 21,07 (C^6H_3), 32,58 (C^4H), 46,20 (C^1H_2), 68,64 (C^2H), 70,30 (C^7H_2), 173,77 (C^3OO -et).

Резултати елементалне микроанализе за *det-(S,S)-eddv*·2HCl,

$$M(C_{16}H_{34}Cl_2N_2O_4) = 389,35 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

	C (%)	N (%)	H (%)
Израчунато:	49,35	7,20	8,80
Нађено:	48,84	7,37	8,41

За *O,O'*-дипропил естар етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-(3-метил)-бутанске киселине дихлорхидрат, *dpr-(S,S)-eddv*·2HCl (**L5**). Принос: 1,72 (55,00 %). ^1H NMR (200 MHz, D_2O , δ ppm): 0,91 (t, 6H, C^9H_3), 1,21 (m, 12H, $\text{C}^{5,6}\text{H}_3$), 1,74 (m, 4H, C^8H_2), 2,37 (m, 4H, C^1H_2), 3,52 (m, 2H, C^4H), 4,11 (d, 2H, C^2H), 4,27 (q, 4H, C^7H_2). ^{13}C NMR (50 MHz, D_2O , δ ppm): 12,63 (C^8H_3), 19,47 (C^5H_3), 20,15 (C^6H_3), 24,22 (C^8H_2), 32,48 (C^4H), 46,48 (C^1H_2), 69,35 (C^2H), 72,21 (C^7H_2), 171,6 ($\text{C}^3\text{OO-pr}$). ^1H NMR (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm): 0,86 (t, 6H, C^9H_3), 1,18 (m, 12H, $\text{C}^{5,6}\text{H}_3$), 1,58 (m, 4H, C^8H_2), 2,26 (m, 4H, C^1H_2), 3,46 (m, 2H, C^4H), 4,07 (d, 2H, C^2H), 4,37 (q, 4H, C^7H_2), 4,63 (2H, NH). ^{13}C NMR (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm): 12,48 (C^8H_3), 18,96 (C^5H_3), 20,17 (C^6H_3), 24,89 (C^8H_2), 33,03 (C^4H), 46,41 (C^1H_2), 68,97 (C^2H), 72,06 (C^7H_2), 170,9 ($\text{C}^3\text{OO-pr}$).

Резултати елементалне микроанализе за *dpr-(S,S)-eddv*·2HCl,

$$M(C_{18}H_{38}Cl_2N_2O_4) = 417,40 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

	C (%)	N (%)	H (%)
Израчунато:	51,79	6,71	9,18
Нађено:	51,92	6,73	9,06

За *O,O'*-дибутил естар етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-(3-метил)-бутанске киселине дихлорхидрат, *dbu-(S,S)-eddv*·2HCl (**L6**). Принос: 1,74 g (52,00 %). ^1H NMR (200 MHz, D_2O , δ ppm): 0,91 (t, 6H, C^{10}H_3), 1,13 (m, 12H, $\text{C}^{5,6}\text{H}_3$), 1,37 (m, 4H, C^9H_2), 1,70 (m, 4H, C^8H_2), 2,41 (m, 4H, C^1H_2), 3,56 (m, 2H, C^4H), 3,87 (d, 2H, C^2H), 4,34 (q, 4H, C^7H_2). ^{13}C NMR (50 MHz, D_2O , δ ppm): 15,80 (C^{10}H_3), 19,43 (C^5H_3),

19,76 (C⁶H₃), 21,51 (C⁹H₂), 32,60 (C⁴H), 36,38 (C⁸H₂), 46,19 (C¹H₂), 64,50 (C²H), 70,49 (C⁷H₂), 171,56 (C³OO-bu). ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 0,87 (t, 6H, C¹⁰H₃), 1,17 (m, 12H, C^{5,6}H₃), 1,39 (m, 4H, C⁹H₂), 1,66 (m, 4H, C⁸H₂), 2,28 (m, 4H, C¹H₂), 3,48 (m, 2H, C⁴H), 3,79 (d, 2H, C²H), 4,26 (q, 4H, C⁷H₂), 4,58 (2H, NH). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 14,99 (C¹⁰H₃), 19,37 (C⁵H₃), 19,58 (C⁶H₃), 21,43 (C⁹H₂), 32,54 (C⁴H), 36,26 (C⁸H₂), 46,03 (C¹H₂), 64,57 (C²H), 70,48 (C⁷H₂), 171,51 (C³OO-bu).

Резултати елементарне микроанализе за dbu-(*S,S*)-eddv·2HCl,

$$M(C_{20}H_{42}Cl_2N_2O_4) = 445,46 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

	C (%)	N (%)	H (%)
Израчунато:	53,92	6,29	9,50
Нађено:	53,48	9,54	6,48

За *O,O'*-дипентил естар етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-(3-метил)-бутанске киселине дихлорхидрат, dpe-(*S,S*)-eddv·2HCl (**L7**). Принос: 1,82 g (51,00 %). ¹H NMR (200 MHz, D₂O, δ ppm): 0,90 (t, 6H, C¹¹H₃), 1,10 (m, 12H, C^{5,6}H₃), 1,37 (m, 8H, C^{9,10}H₂), 1,72 (m, 4H, C⁸H₂), 2,40 (m, 4H, C¹H₂), 3,62 (m, 2H, C⁴H), 4,09 (d, 2H, C²H), 4,39 (q, 4H, C⁷H₂). ¹³C NMR (50 MHz, D₂O, δ ppm): 16,13 (C¹¹H₃), 19,48 (C⁵H₃), 20,69 (C⁶H₃), 24,52 (C¹⁰H₂), 30,31 (C⁹H₂), 32,66 (C⁸H₂), 33,92 (C⁴H), 46,29 (C¹H₂), 64,83 (C²H), 70,74 (C⁷H₂), 171,84 (C³OO-pe). ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 0,90 (t, 6H, C¹¹H₃), 1,12 (m, 12H, C^{5,6}H₃), 1,36 (m, 8H, C^{9,10}H₂), 1,68 (m, 4H, C⁸H₂), 2,33 (m, 4H, C¹H₂), 3,64 (m, 2H, C⁴H), 4,02 (d, 2H, C²H), 4,21 (q, 4H, C⁷H₂), 4,76 (2H, NH). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 16,06 (C¹¹H₃), 19,43 (C⁵H₃), 20,32 (C⁶H₃), 24,45 (C¹⁰H₂), 30,29 (C⁹H₂), 32,69 (C⁸H₂), 33,88 (C⁴H), 46,07 (C¹H₂), 64,12 (C²H), 70,76 (C⁷H₂), 171,34 (C³OO-pe).

Резултати елементалне микроанализе за dpe-(*S,S*)-eddv·2HCl,

$$M(C_{22}H_{46}Cl_2N_2O_4) = 473,51 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

	C (%)	N (%)	H (%)
Израчунато:	55,80	5,92	9,79
Нађено:	55,68	6,02	9,76

3.1.5. Синтеза S-алкил деривата тиосалицилне киселине

S-алкил деривати тиосалицилне киселине добијени су реакцијом алкиловања тиосалицилне киселине одговарајућим алкил-халогенидима у базној средини и смеси вода-етанол као растварачу. У раствор добијен растварањем (1 mmol) тиосалицилне киселине у 50,00 mL 30% етанола додаје се раствор натријум-хидроксида (2,00 mmol у 5,00 mL дестиловане воде). Одговарајући алкил-халогенид (бензил-(**L8**), метил-(**L9**), етил-(**L10**), пропил-(**L11**), бутил-(**L12**)) (2,00 mmol) се раствори у 5,00 mL етанола и постепено додаје у малим порцијама у претходно припремљену бистру реакциону смешу. Тако добијена реакциона смеша остави се током ноћи на 60°C. Након тога раствор се пренесе у кристалizacionу шољу и упари на воденом купатилу ради удаљавања етанола. У добијени водени раствор додаје се (2,00 mM) раствор хлороводоничне киселине услед чега се ствара бели талог одговарајућег S-алкил деривата тиосалицилне киселине. Тако добијени производ се одвоји цеђењем, испере великом количином дестиловане воде и суши преко ноћи на вакууму. S-алкил деривати тиосалицилне киселине су добијени у приносу 85-95 %.

S-бензил тиосалицилна киселина (**L8**): IR (KBr, cm^{-1}): 3414, 3061, 2920, 2648, 2559, 1674, 1584, 1562, 1463, 1412, 1317, 1272, 1255, 1154, 1062, 1046, 897, 743, 711, 652, 551. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 4,17 (s, 2H, CH_2), 7,21-8,14 (m, 9H, Ar и bz). ^{13}C NMR (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ ppm): 35,9 (CH_2), 124,1; 125,9;

126,7; 127,3; 127,9; 128,3; 128,6; 129,3; 131,0; 132,4; 136,8; 141,3 (Ar и bz), 167,5 (COOH).

S-метил тиосалицилна киселина (**L9**): IR (KBr, cm^{-1}): 3446, 3068, 2916, 2652, 2560, 1674, 1586, 1561, 1466, 1412, 1308, 1291, 1270, 1255, 1151, 1062, 1048, 892, 743, 699, 652, 556. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 2,48 (s, 3H, CH_3), 7,16-8,18 (m, 4H, Ar). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 15,6 (CH_3), 123,5; 124,4; 125,4; 132,5; 133,6; 144,4 (Ar), 171,6 (COOH).

S-етил тиосалицилна киселина (**L10**): IR (KBr, cm^{-1}): 3435, 3066, 2972, 2652, 2562, 1682, 1588, 1563, 1466, 1414, 1315, 1275, 1252, 1152, 1063, 1049, 884, 740, 704, 690, 651, 550. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 1,42 (t, 3H, CH_3), 2,97 (q, 2H, CH_2), 7,16-8,17 (m, 4H, Ar). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 13,1 (CH_3), 26,2 (CH_2), 124,0; 125,9; 126,4; 132,6; 133,2; 142,9 (Ar), 171,4 (COOH).

S-пропил тиосалицилна киселина (**L11**): IR (KBr, cm^{-1}): 3414, 3056, 2979, 2641, 2555, 1678, 1588, 1562, 1462, 1405, 1310, 1271, 1257, 1150, 1062, 1053, 811, 740, 704, 691, 653, 554. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 1,1 (t, 3H, CH_3), 1,74 (m, 2H, CH_2), 2,92 (t, 2H, CH_2), 7,15-8,15 (m, 4H, Ar). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 13,8 (CH_3), 21,6 (CH_2), 34,1 (CH_2), 123,8; 125,6; 126,2; 132,5; 133,1; 143,1 (Ar), 171,6 (COOH).

S-бутил тиосалицилна киселина (**L12**): IR (KBr, cm^{-1}): 3420, 2955, 2869, 2641, 2556, 1674, 1586, 1560, 1462, 1408, 1320, 1270, 1250, 1153, 1060, 1048, 924, 810, 738, 704, 651, 553. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 0,96 (t, 3H, CH_3), 1,46 (m, 2H, CH_2), 1,78 (m, 2H, CH_2), 2,94 (t, 2H, CH_2), 7,15-8,16 (m, 4H, Ar). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 13,7 (CH_3), 22,3 (CH_2), 30,2 (CH_2), 31,9 (CH_2), 123,8; 125,7; 126,3; 132,5; 133,1; 143,1 (Ar), 171,4 (COOH).

3.1.6. Синтеза *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин, 1,2-dphen

Meso-1,2-дифенил-етилендиамин је синтетисан на основу претходно описаног поступка [120]. Раствор припремљен растварањем амонијум-ацетата (60,00 g) у бензалдехиду (30,00 g) рефлуктује се 3 сата. Након тога реакциона смеша се охлади, а добијени талог се одвоји цеђењем, испере етанолом и суши на ваздуху. Прекристалисавањем из бутанола добијен је *N*-бензоил-*N'*-бензилиден-*meso*-1,2-дифенил-етилендиамин. Хидролизом овог једињења помоћу 70 % воденог раствора сумпорне киселине, уз рефлуктовање добија се *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин.

3.1.7. Синтеза *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропанске киселине дихлорхидрат монохидрата, $H_2-1,2-dpheddp \cdot 2HCl \cdot H_2O$

Раствор добијен растварањем 4,34 g (0,04 mol) 3-хлор-пропанске киселине у 5,00 mL воде охлади се у леденом купатилу и пажљиво неутралише помоћу 5,00 mL хладног раствора NaOH (1,60 g, 0,04 mol) пазећи при томе да температура не пређе 20°C. Добијеном раствору се потом додаје потребна количина *meso*-1,2-дифенил-етилендиамина (4,24 g, 0,02 mol). Реакциона смеша се постепено загрева до температуре од 90°C уз мешање и лагано укапавање раствора 5,00 mL натријум-хидроксида (1,60 g, 0,04 mol) при чему се одржава pH вредност у смеси на 7 током периода загревања од 3 сата. Након хлађења реакциона смеша се неутралише помоћу 5,60 mL 6,00 mol/L хлороводоничне киселине и упари до запремине од 7,00 mL. Тако добијеном раствору се додаје 6,00 mL концентроване хлороводоничне киселине, уз мешање, при чему се издваја већа количина натријум-хлорида који се одвоји цеђењем. Филтрату се затим додаје 6 mL концентроване хлороводоничне киселине, 6,00 mL етанола и 6,00 mL етра и остави

се у фрижидеру преко ноћи. Издвојени бео талог, *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-*-N,N'*-ди-3-пропанска киселина дихлорхидрат (**L13**), се одвоји цеђењем. Тако добијени производ се прекристалише из смеше вода-етанол у односу (1:2). На тај начин је добијен кристал погодан за рендгенску структурну анализу. Принос: 4,00 g (44,69 %).

Резултати елементалне микроанализе за $H_2-1,2-dpheddp \cdot 2HCl \cdot H_2O$,

$$M(C_{20}H_{28}Cl_2N_2O_5) = 447,34 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

	C (%)	N (%)	H (%)
Израчунато:	53,69	6,26	6,31
Нађено:	53,88	6,08	6,70

3.2. СИНТЕЗЕ КОМПЛЕКСА

3.2.1. Синтеза дихлоридо-*O,O'*-дипропил-етилендиамин-*N,N'*-ди-*(S,S)*-2-пропаноатопаладијум(II) комплекса, [PdCl₂(dpr-*(S,S)*-eddp)]

Раствору добијеном растварањем 0,20 g (0,61 mmol) калијум-тетрахлоридопаладата(II) у 10,00 mL дестиловане воде лагано се додаје (0,25 g, 0,61 mmol) *O,O'*-дипропил естра етилендиамин-*N,N'*-ди-*(S,S)*-2-пропанске киселине дихлорхидрата трихидрата (dpr-*(S,S)*-eddp·2HCl·3H₂O). Реакциона смеша се загрева на воденом купатилу уз мешање 2 сата. Током овог периода у малим порцијама се додаје раствор LiOH (0,03 g, 1,23 mmol у 10,00 mL дестиловане воде). Настали жути талог комплекса, [PdCl₂(dpr-*(S,S)*-eddp)] (**C1**), се одвоји цеђењем, испере дестилованом водом и суши на ваздуху. Принос: 0,19 g (66,60 %). Изомер А: ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 2,83 (s, 4H), 3,63 (q, 2H), 2,04 (d, J = 7,37 Hz, 6H), 4,14 (t, 4H), 1,69 (m, 4H), 0,95 (t, 6H), ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 48,62 (CH₂), 57,26 (CH), 14,63 (CH₃), 170,14 (COO-pr), 67,48 (CH₂-pr), 21,76 (CH₂-pr), 10,24 (CH₃-pr). Изомер В: ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 2,85 (s, 4H), 3,21 (q, 2H), 2,47 (d, J = 7,37 Hz, 6H), 4,53 (t, 4H), 1,76 (m, 4H), 0,92 (t, 6H), ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 51,68 (CH₂), 58,69 (CH), 15,93 (CH₃), 171,46 (COO-pr), 67,14 (CH₂-pr), 21,70 (CH₂-pr), 10,24 (CH₃-pr).

Резултати елементарне микроанализе за [PdCl₂(dpr-*(S,S)*-eddp)],

$$M(C_{14}H_{28}Cl_2N_2O_4Pd) = 465,68 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

	C (%)	N (%)	H (%)
Израчунато:	36,11	6,02	6,06
Нађено:	35,81	5,82	6,01

3.2.2. Синтеза дихлоридо-*O,O'*-дибутил-етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)- -2-пропаноатопаладијум(II) комплекса, [PdCl₂(dbu-(*S,S*)-eddp)]

Полазећи од 0,20 g (0,61 mmol) калијум-тетрахлоридопаладата(II) и 0,27 g (0,61 mmol) *O,O'*-дибутил естра етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-пропанске киселине дихлорхидрата трихидрата, dbu-(*S,S*)-eddp·2HCl·3H₂O на начин описан у одељку 3.2.1. синтетисан је [PdCl₂(dbu-(*S,S*)-eddp)] (**C2**), комплекс жуте боје. Принос: 0,18 g (59,50 %). Изомер А: ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 2,83 (s, 4H), 3,62 (q, 2H), 1,29 (d, J = 6,81 Hz, 6H), 4,15 (t, 4H), 1,56 (m, 4H), 1,36 (m, 4H), 0,90 (t, 6H). ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 48,63 (CH₂), 57,25 (CH), 14,64 (CH₃), 170,16 (COO-bu), 65,43 (CH₂-bu), 33,32 (CH₂-bu), 18,97 (CH₂-bu), 13,50 (CH₃-bu). Изомер В: ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 2,49 (s, 4H), 3,20 (q, 2H), 1,37 (d, J = 6,81 Hz, 6H), 4,21 (t, 4H), 1,70 (m, 4H), 1,39 (m, 4H), 0,97 (t, 6H). ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 51,64 (CH₂), 58,69 (CH), 16,95 (CH₃), 171,45 (COO-bu), 65,77 (CH₂-bu), 30,37 (CH₂-bu), 19,00 (CH₂-bu), 13,55 (CH₃-bu).

Резултати елементалне микроанализе за [PdCl₂(dbu-(*S,S*)-eddp)],

$$M(C_{16}H_{32}Cl_2N_2O_4Pd) = 493,74 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

	C (%)	N (%)	H (%)
Израчунато:	38,92	5,68	6,53
Нађено:	38,74	5,57	6,66

3.2.3. Синтеза дихлоридо-*O,O'*-дипентил-етилендиамин-*N,N'*-ди- -*(S,S)*-2-пропаноатопаладијум(II) комплекса, [PdCl₂(dpe-*(S,S)*-eddp)]

Полазећи од 0,20 g (0,61 mmol) калијум-тетрахлоридопаладата(II) и 0,28 g (0,61 mmol) *O,O'*-дипентил естра етилендиамин-*N,N'*-ди-*(S,S)*-2-пропанске киселине дихлорхидрата трихидрата (dpe-*(S,S)*-eddp·2HCl·2H₂O) на начин описан у одељку 3.2.1. синтетисан је [PdCl₂(dpe-*(S,S)*-eddp)] (**C3**), комплекс жуте боје. Принос: 0,19 g (59,65 %). Изомер А: ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 2,82 (s, 4H), 3,64 (q, 2H), 1,24 (d, J = 7,17 Hz, 6H), 4,14 (t, 4H), 1,85 (m, 4H), 1,31 (m, 4H), 1,39 (m, 4H), 0,90 (t, 6H). ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 48,64 (CH₂), 57,27 (CH), 14,67 (CH₃), 170,18 (COO-pe), 65,72 (CH₂-pe), 48,64 (CH₂-pe), 27,85 (CH₂-pe), 22,14 (CH₂-pe), 13,79 (CH₃-pe). Изомер В: ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 2,50 (s, 4H), 3,21 (q, 2H), 1,26 (d, J = 7,17 Hz, 6H), 4,11 (t, 4H), 1,69 (m, 4H), 1,42 (m, 4H), 1,59 (m, 4H), 0,94 (t, 6H). ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 51,62 (CH₂), 58,67 (CH), 15,97 (CH₃), 171,45 (COO-pe), 66,04 (CH₂-pe), 51,62 (CH₂-pe), 28,24 (CH₂-pe), 22,10 (CH₂-pe), 13,87 (CH₃-pe).

Резултати елементалне микроанализе за [PdCl₂(dpe-*(S,S)*-eddp)],

$$M(C_{18}H_{36}Cl_2N_2O_4Pd) = 521,79 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

	C (%)	N (%)	H (%)
Израчунато:	41,43	5,37	6,95
Нађено:	40,92	5,33	7,11

3.2.4. Синтеза хлоридо((*S,S*)-етилендиамин-*N*'-(*O*-етил-2-(3-метил)-бутаноат)-*N*'-2-(3-метил)-бутаноатопаладијум(II) комплекса, [PdCl(et-(*S,S*)-eddv)]

Полазећи од 0,20 g (0,61 mmol) калијум-тетрахлоридопаладата(II) и 0,25 g (0,61 mmol) *O,O'*-диетил естра етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-(3-метил)-бутанске киселине дихлорхидрата (det-(*S,S*)-eddv·2HCl) на начин описан у одељку 3.2.1. синтетисан је [PdCl(et-(*S,S*)-eddv)] (**C4**), комплекс жуте боје. Кристали погодни за рендгенску структурну анализу добијени су прекристалисавањем комплекса из система диметилсулфоксид-вода. Принос: 0,15 g (61,02 %). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,95 (d, 6H, C^{6,7}H₃), 1,02 (d, 6H, C^{11,12}H₃), 1,25 (t, 3H, C¹⁵H₃), 2,23 (m, 4H, C^{1,2}H₂), 2,45 (q, 1H, C³H), 2,87 (q, 1H, C¹⁰H), 3,91 (d, 1H, C⁹H), 4,16 (d, 1H, C⁵H), 4,45 (q, 2H, C¹⁴H₃). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 14,23 (C¹⁵H₃), 17,93 (C^{6,7}H₃), 19,34 (C^{11,12}H₃), 28,41 (C¹⁰H), 30,58 (C³H), 46,95 (C¹H₂), 49,76 (C²H₂), 50,52 (C⁵H), 61,88 (C⁹H), 68,01 (C¹⁴H₃), 169,25 (C⁴OO⁻), 171,93 (C¹³OO-et).

Резултати елементалне микроанализе за [PdCl(et-(*S,S*)-eddv)],

	$M(C_{14}H_{27}ClN_2O_4Pd) = 429,25 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$		
	C (%)	N (%)	H (%)
Израчунато:	39,17	6,53	6,34
Нађено:	39,34	6,38	6,41

3.2.5. Синтеза хлорида((*S,S*)-етилендиамин-*N*-(*O*-пропил-2-(3-метил)-бутаноат)-*N'*-2-(3-метил)-бутаноатопаладијум(II) комплекса, [PdCl(*pr*-(*S,S*)-*eddv*)]

Полазећи од 0,20 g (0,61 mmol) калијум-тетрахлоридопаладата(II) и 0,26 g (0,61 mmol) *O,O'*-дипропил естра етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-(3-метил)-бутанске киселине дихлорхидрата, (*dpr*-(*S,S*)-*eddv*·2HCl) на начин описан у одељку 3.2.1. синтетисан је [PdCl(*pr*-(*S,S*)-*eddv*)] (**C5**), комплекс жуте боје. Принос: 0,23 g (72,00 %). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,94 (t, 3H, C¹⁵H₃), 1,11 (d, 6H, C^{6,7}H₃), 1,21 (d, 6H, C^{10,11}H₃), 1,61 (m, 2H, C¹⁴H₂), 1,94 (m, 4H, C^{1,2}H₂), 2,24 (m, 1H, C⁵H), 2,48 (m, 1H, C⁹H), 3,71 (d, 1H, C³H), 4,10 (d, 1H, C⁸H), 4,28 (t, 2H, C¹³H₂). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 10,68 (C¹⁵H₃), 19,25 (C⁶H₃), 19,34 (C⁷H₃), 21,15 (C¹⁰H₃), 22,15 (C¹¹H₃), 30,58 (C¹⁴H₂), 46,83 (C⁵H), 49,70 (C⁹H), 50,56 (C¹H₂), 56,61 (C²H₂), 65,29 (C⁸H), 68,75 (C³H), 72,99 (C¹³H₂), 171,73 (C¹²), 178,74 (C⁴). ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 0,92 (t, 3H, C¹⁵H₃), 1,03 (d, 6H, C^{6,7}H₃), 1,23 (d, 6H, C^{10,11}H₃), 1,58 (m, 2H, C¹⁴H₂), 1,89 (m, 4H, C^{1,2}H₂), 2,13 (m, 1H, C⁵H), 2,45 (m, 1H, C⁹H), 3,59 (d, 1H, C³H), 4,02 (d, 1H, C⁸H), 4,29 (t, 2H, C¹³H₂), 5,83 (2H, NH). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 11,12 (C¹⁵H₃), 18,87 (C⁶H₃), 19,36 (C⁷H₃), 21,07 (C¹⁰H₃), 22,17 (C¹¹H₃), 30,53 (C¹⁴H₂), 46,74 (C⁵H), 49,72 (C⁹H), 50,55 (C¹H₂), 56,16 (C²H₂), 65,39 (C⁸H), 68,74 (C³H), 72,87 (C¹³H₂), 171,56 (C¹²), 178,28 (C⁴).

Резултати елементалне микроанализе за [PdCl(*pr*-(*S,S*)-*eddv*)],

$$M(C_{15}H_{29}ClN_2O_4Pd) = 443,27 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

	C (%)	N (%)	H (%)
Израчунато:	40,64	6,32	6,59
Нађено:	41,00	6,43	6,57

**3.2.6. Синтеза хлоридо((*S,S*)-етилендиамин-*N*-(*O*-бутил-2-(3-метил)-
-бутаноат)-*N'*-2-(3-метил)-бутаноатопаладијум(II) комплекса,
[PdCl(bu-(*S,S*)-eddv)]**

Полазећи од 0,20 g (0,61 mmol) калијум-тетрахлоридопаладата(II) и 0,27 g (0,61 mmol) *O,O'*-дибутил естра етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-(3-метил)-бутанске киселине дихлорхидрат, (dbu-(*S,S*)-eddv·2HCl) на начин описан у одељку 3.2.1. синтетисан је [PdCl(bu-(*S,S*)-eddv)] (**C6**), комплекс жуте боје. Принос: 0,19 g (71,00 %). $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 0,91 (t, 3H, C^{16}H_3), 0,99 (d, 6H, $\text{C}^{6,7}\text{H}_3$), 1,17 (d, 6H, $\text{C}^{10,11}\text{H}_3$), 1,35 (m, 2H, C^{15}H_2), 1,59 (m, 2H, C^{14}H_2), 2,19 (m, 4H, $\text{C}^{1,2}\text{H}_2$), 2,56 (m, 1H, C^5H), 2,84 (m, 1H, C^9H), 3,50 (d, 1H, C^3H), 4,08 (d, 1H, C^8H), 4,29 (t, 2H, C^{13}H_2). $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 13,64 (C^{16}H_3), 17,99 (C^6H_3), 18,17 (C^7H_3), 19,24 (C^{10}H_3), 19,44 (C^{11}H_3), 21,58 (C^{15}H_2), 28,34 (C^5H), 29,68 (C^9H), 30,55 (C^{14}H_2), 38,68 (C^1H_2), 41,52 (C^2H_2), 59,40 (C^8H), 61,40 (C^3H), 67,21 (C^{13}H_2), 170,81 (C^{12}), 177,84 (C^4). $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm): 0,88 (t, 3H, C^{16}H_3), 0,93 (d, 6H, $\text{C}^{6,7}\text{H}_3$), 0,98 (d, 6H, $\text{C}^{10,11}\text{H}_3$), 1,23 (m, 2H, C^{15}H_2), 1,46 (m, 2H, C^{14}H_2), 2,06 (m, 4H, $\text{C}^{1,2}\text{H}_2$), 2,51 (m, 1H, C^5H), 2,79 (m, 1H, C^9H), 3,39 (d, 1H, C^3H), 3,56 (d, 1H, C^8H), 4,12 (t, 2H, C^{13}H_2), 5,85 (2H, NH). $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm): 13,53 (C^{16}H_3), 17,85 (C^6H_3), 18,79 (C^7H_3), 19,70 (C^{10}H_3), 19,87 (C^{11}H_3), 21,79 (C^{15}H_2), 21,99 (C^5H), 27,83 (C^9H), 30,44 (C^{14}H_2), 49,93 (C^1H_2), 53,96 (C^2H_2), 64,36 (C^8H), 64,64 (C^3H), 71,23 (C^{13}H_2), 171,37 (C^{12}), 179,20 (C^4).

Резултати елементалне микроанализе за [PdCl(bu-(*S,S*)-eddv)],

$$M(\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{Pd}) = 457,29 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

	C (%)	N (%)	H (%)
Израчунато:	42,02	6,13	6,83
Нађено:	42,23	5,99	7,10

3.2.7. Синтеза хлоридо((*S,S*)-етилендиамин-*N*-(*O*-пентил-2-(3-метил)-бутаноат)-*N'*-2-(3-метил)-бутаноатопаладијум(II) комплекса, [PdCl(pe-(*S,S*)-eddv)]

Полазећи од 0,20 g (0,61 mmol) калијум-тетрахлоридопаладата(II) и 0,29 g (0,61 mmol) *O,O'*-дипентил естра етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-(3-метил)-бутанске киселине дихлорхидрат (dpe-(*S,S*)-eddv·2HCl) на начин описан у одељку 3.2.1. синтетисан је [PdCl(pe-(*S,S*)-eddv)] (**C7**), комплекс жуте боје. Принос: 0,19 g (70,53 %). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,93 (t, 3H, C¹⁷H₃), 0,99 (d, 6H, C^{6,7}H₃), 1,11 (d, 6H, C^{10,11}H₃), 1,32 (m, 2H, C¹⁵H₂), 1,45 (m, 2H, C¹⁶H₂), 1,60 (m, 2H, C¹⁴H₂), 2,09 (m, 4H, C^{1,2}H₂), 2,46 (m, 1H, C⁵H), 2,79 (m, 1H, C⁹H), 3,51 (d, 1H, C³H), 3,63 (d, 1H, C⁸H), 4,07 (t, 2H, C¹³H₂). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 17,92 (C¹⁷H₃), 18,43 (C⁶H₃), 19,98 (C⁷H₃), 21,87 (C¹⁰H₃), 22,09 (C¹¹H₃), 27,79 (C¹⁶H₂), 27,94 (C¹⁵H₂), 30,14 (C¹⁴H₂), 36,72 (C⁵H), 37,28 (C⁹H), 41,55 (C¹H₂), 49,90 (C²H₂), 54,07 (C⁸H), 64,50 (C³H), 71,20 (C¹³H₂), 171,62 (C¹²), 179,46 (C⁴). ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 0,91 (t, 3H, C¹⁷H₃), 1,02 (d, 6H, C^{6,7}H₃), 1,13 (d, 6H, C^{10,11}H₃), 1,41 (m, 2H, C¹⁵H₂), 1,58 (m, 2H, C¹⁶H₂), 1,74 (m, 2H, C¹⁴H₂), 2,18 (m, 4H, C^{1,2}H₂), 2,58 (m, 1H, C⁵H), 2,92 (m, 1H, C⁹H), 3,50 (d, 1H, C³H), 3,69 (d, 1H, C⁸H), 4,33 (t, 2H, C¹³H₂), 6,05 (2H, NH). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 18,60 (C¹⁷H₃), 19,08 (C⁶H₃), 19,92 (C⁷H₃), 21,94 (C¹⁰H₃), 22,87 (C¹¹H₃), 28,81 (C¹⁶H₂), 29,35 (C¹⁵H₂), 32,34 (C¹⁴H₂), 38,74 (C⁵H), 39,93 (C⁹H), 45,56 (C¹H₂), 51,18 (C²H₂), 55,46 (C⁸H), 67,53 (C³H), 74,74 (C¹³H₂), 171,38 (C¹²), 178,92 (C⁴).

Резултати елементалне микроанализе за [PdCl(pe-(*S,S*)-eddv)],

$$M(C_{17}H_{33}ClN_2O_4Pd) = 471,32 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

	C (%)	N (%)	H (%)
Израчунато:	43,32	5,94	7,06
Нађено:	43,43	5,89	6,98

3.2.8. Синтеза *bis*-(S-бензил-тиосалицилато)паладијум(II) комплекса, [Pd(S-bz-thiosal)₂]

Раствору добијеном растварањем 0,10 g (0,31 mmol) калијум-тетрахлоридопаладата(II) у 10,00 mL дестиловане воде лагано се додаје (0,15 g, 0,61 mmol) S-бензил етар тиосалицилне киселине. Реакциона смеша се загрева на воденом купатилу уз мешање 2 сата. Током овог периода у малим порцијама се додаје раствор литијум-хидроксида (0,03 g, 0,61 mmol у 10,00 mL дестиловане воде). Настали жути талог комплекса, [Pd(S-bz-thiosal)₂] (**C8**), одвоји се цеђењем, испере дестилованом и суши на ваздуху. Кристали погодни за рендгенску структурну анализу добијени су прекристалисавањем из система диметилсулфоксид-вода. Принос: 0,11 g (58,70 %). IR (KBr, cm⁻¹): 3420, 3057, 1634, 1616, 1562, 1327, 1146, 753, 708, 698. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 4,05 (s, 4H, CH₂), 7,08-8,10 (m, 9H, Ar и bz). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 25,9 (CH₂), 124,1; 125,6; 125,7; 126,2; 126,3; 126,8; 127,3; 127,8; 129,5; 133,2; 136,2; 139,7 (Ar и bz), 171,5 (COO⁻).

Резултати елементалне микроанализе за [Pd(S-bz-thiosal)₂],

$$M(C_{28}H_{22}O_4S_2Pd) = 592,98 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

	C (%)	S (%)	H (%)
Израчунато:	56,71	10,82	3,74
Нађено:	56,43	10,75	3,85

3.2.9. Синтеза *bis*-(S-метил-тиосалицилато)паладијум(II) комплекса, [Pd(S-met-thiosal)₂]

Полазећи од 0,10 g (0,31 mmol) калијум-тетрахлоридопаладата(II) и 0,10 g (0,61 mmol) S-метил етра тиосалицилне киселине на начин описан у одељку

3.2.8. синтетисан је $[\text{Pd}(\text{S-met-thiosal})_2]$ (**C9**), комплекс жуте боје. Принос: 0,08 g (59,80 %). IR (KBr, cm^{-1}): 3419, 1619, 1597, 1399, 1385, 1332, 1306, 1142, 960, 865, 741, 693, 654. ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 2,35 (s, 6H, CH_3), 7,19-8,08 (m, 8H, Ar). ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 14,6 (CH_3), 123,6; 125,1; 125,2; 129,0; 132,7; 135,7 (Ar), 171,8 (COO^-).

Резултати елементалне микроанализе за $[\text{Pd}(\text{S-met-thiosal})_2]$,

$$M(\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{S}_2\text{Pd}) = 440,67 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

	C (%)	S (%)	H (%)
Израчунато:	43,61	14,52	3,20
Нађено:	43,41	14,21	3,39

3.2.10. Синтеза *bis*-(S-етил-тиосалицилато)паладијум(II) комплекса, $[\text{Pd}(\text{S-et-thiosal})_2]$

Полазећи од 0,10 g (0,31 mmol) калијум-тетрахлоридопаладата(II) и 0,11 g (0,61 mmol) S-етил етра тиосалицилне киселине на начин описан у одељку 3.2.8. синтетисан је $[\text{Pd}(\text{S-et-thiosal})_2]$ (**C10**), комплекс жуте боје. Принос: 0,08 g (57,90 %). IR (KBr, cm^{-1}): 3436, 1587, 1518, 1393, 752. ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 1,27 (t, 6H, CH_3), 2,83 (q, 4H, CH_2), 7,11–8,08 (m, 8H, Ar). ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 14,4 (CH_3), 13,8 (CH_2), 124,8; 125,3; 126,1; 128,7; 133,2; 135,9 (Ar), 172,0 (COO^-).

Резултати елементалне микроанализе за $[\text{Pd}(\text{S-et-thiosal})_2]$,

$$M(\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{S}_2\text{Pd}) = 468,86 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

	C (%)	S (%)	H (%)
Израчунато:	46,11	13,68	3,87
Нађено:	45,97	13,54	3,93

3.2.11. Синтеза *bis*-(S-пропил-тиосалицилато)паладијум(II) комплекса, [Pd(S-pr-thiosal)₂]

Полазећи од 0,10 g (0,31 mmol) калијум-тетрахлоридопаладата(II) и 0,12 g (0,61 mmol) S-пропил етра тиосалицилне киселине на начин описан у одељку 3.2.8. синтетисан је [Pd(S-pr-thiosal)₂] (**C11**), комплекс жуте боје. Принос: 0,0889 g (58,40 %). IR (KBr, cm⁻¹): 3421, 1589, 1541, 1520, 1397, 752. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 0,98 (t, 6H, CH₃), 1,76 (m, 4H, CH₂), 2,84 (t, 4H, CH₂), 7,20-8,25 (m, 8H, Ar). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 13,2 (CH₃), 22,0 (CH₂), 27,6 (CH₂), 125,1; 126,6; 126,7; 130,5; 134,2; 137,2 (Ar); 172,5 (COO⁻).

Резултати елементалне микроанализе за [Pd(S-pr-thiosal)₂],

$$M(C_{20}H_{22}O_4S_2Pd) = 496,91 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

	C (%)	S (%)	H (%)
Израчунато:	48,34	12,91	4,46
Нађено:	48,52	12,73	4,11

3.2.12. Синтеза *bis*-(S-бутил-тиосалицилато)паладијум(II) комплекса, [Pd(S-bu-thiosal)₂]

Полазећи од 0,10 g (0,31 mmol) калијум-тетрахлоридопаладата(II) и 0,13 g (0,61 mmol) S-бутил етра тиосалицилне киселине на начин описан у одељку 3.2.8. синтетисан је [Pd(S-bu-thiosal)₂] (**C12**), комплекс жуте боје. Принос: 0,09 g (58,43 %). IR (KBr, cm⁻¹): 3420, 1634, 1616, 1561, 1327, 1146, 753, 698. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 0,95 (t, 6H, CH₃), 1,33 (m, 4H, CH₂), 1,62 (m, 4H, CH₂), 2,79 (t, 4H, CH₂), 7,24-8,19 (m, 8H, Ar). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 13,4 (CH₃), 20,5 (CH₂), 21,6 (CH₂), 33,7 (CH₂), 123,8; 124,4; 126,3; 130,2; 131,9; 135,9 (Ar), 171,9 (COO⁻).

Резултати елементалне микроанализе за $[\text{Pd}(\text{S-bu-thiosal})_2]$,

$$M(\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{S}_2\text{Pd}) = 524,96 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

	C (%)	S (%)	H (%)
Израчунато:	50,33	12,22	4,99
Нађено:	50,52	12,56	4,51

3.2.13. Синтеза *cis*-дихлоридо(*meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропаноато)паладијум(II) комплекса, *cis*- $[\text{PdCl}_2(1,2\text{-dpheddp})]$

У раствор добијен растварањем 0,20 g (0,61 mmol) калијум-тетрахлоридопаладата(II) у 10,00 mL воде додаје се 0,27 g (0,61 mmol) *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропанске киселине дихлорхидрата монохидрата. Реакциона смеша се загрева 2 сата уз мешање на 60°C. Током тог периода у малим порцијама додаје се раствор литијум-хидроксида (0,06 g, 2,45 mmol у 10,00 mL воде). Настали жути талог комплекса *cis*- $[\text{PdCl}_2(1,2\text{-dpheddp})]$ (C13) одвоји се цеђењем, испере дестилованом водом и суши на ваздуху. Принос: 0,25 g (76,43 %).

Резултати елементалне микроанализе за комплекс *cis*- $[\text{PdCl}_2(1,2\text{-dpheddp})]$,

$$M(\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{O}_4\text{N}_2\text{Pd}) = 533,73 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

	C (%)	N (%)	H (%)
Израчунато:	45,00	5,25	4,53
Нађено:	45,64	5,31	4,87

**3.2.14. Синтеза *s-cis*-дихлоридо(*meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-
-*N,N'*-ди-3-пропаноато)платина(IV) комплекса,
s-cis-[PtCl₂(1,2-dpheddp)]**

У раствор добијен растварањем 0,20 g (0,41 mmol) калијум-хексахлоридоплатината(IV) у 10,00 mL воде додаје се 0,18 g (0,41 mmol) *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропанске киселине дихлорхидрата монохидрата. Реакциона смеша се загрева 12 сати уз мешање на 60°C. Током тог периода у малим порцијама додаје се раствор литијум-хидроксида (0,04 g, 1,65 mmol у 10,00 mL воде). Настали жути талог комплекса *s-cis*-[PtCl₂(1,2-dpheddp)] (**C14**) одвоји се цеђењем, испере дестилованом водом и суши на ваздуху. Принос: 0,09 g (37,25 %).

Резултати елементалне микроанализе за комплекс *s-cis*-[PtCl₂(1,2-dpheddp)],

$$M(C_{20}H_{26}Cl_2N_2O_4Pt) = 620,39 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

	C (%)	N (%)	H (%)
Израчунато:	38,72	4,52	3,57
Нађено:	38,38	4,61	3,81

3.3. МЕРЕЊА

3.3.1. Елементална микроанализа

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

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

Снимање нуклеарно-магнетно-резонанционих спектра синтетисаних једињења вршена су помоћу спектрофотометра Varian Gemini-200 NMR користећи D_2O (за синтетисане лиганде) и CDCl_3 и $\text{DMSO}-d_6$ (за одговарајуће комплексе паладијума(II)) као раствараче. Хемијска померања су дата у односу на триметилсилан (TMS), употребом DDS као инертног стандарда.

3.3.3. Инфрацрвена спектроскопија

Инфрацрвени спектри снимљени су помоћу спектрофотометра Perkin Elmer FTIR 31725X (КВг техника).

3.3.4. РЕНДГЕНСКА СТРУКТУРНА АНАЛИЗА

3.3.4.1. Рендгенска структурна анализа *meso*-1,2-дифенил- -етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропанске киселине дихлорхидрата монохидрата, $H_2-1,2-dpheddp \cdot 2HCl \cdot H_2O$

Монокристали *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропанске киселине дихлорхидрата монохидрата ($H_2-1,2-dpheddp \cdot 2HCl \cdot H_2O$) погодни за рендгенску структурну анализу добијени су прекристалисавањем из смеше етанол-вода у односу 1:2. Дифракциони подаци сакупљени су на собној температури помоћу дифрактометра Oxford Diffraction Xcalibur Gemini S опремљен $CuK\alpha$ зрачењем на таласној дужини $\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$ (Табела 2). Подаци су обрађени помоћу CrysAlis софтвера [121], а кориговани су аналитичком нумеричком методом [122]. Кристална структура је решена применом директне методе, Sir2002 [123], а утачњена коришћењем програма SHEXL [124]. Геометријска израчунавања су извршена помоћу PARTS97 [125], а слика молекула применом ORTEP-3 [126]. Основни кристалографски подаци и подаци у вези са решавањем и утачњавањем структуре за $H_2-1,2-dpheddp \cdot 2HCl \cdot H_2O$ приказани су у Табели 2.

Табела 2. Основни кристалографски подаци и подаци у вези са решавањем и утацњавањем структуре за $\text{H}_2\text{-1,2-dpheddp}\cdot 2\text{HCl}\cdot \text{H}_2\text{O}$

Формула	$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$	F(000)	476
M	445,33	Z	2
Кристални систем	Триклиничан	D_c (g·mL)	1,4195
Просторна група	P_1	λ (Å)	1,54184
Величина кристала (mm)	0,12 x 0,07 x 0,04	μ (mm ⁻¹)	3,047
a (Å)	8,6989(18)	Температура (K)	293(2)
b (Å)	10,086(2)	Θ (°)	3,40-27,10
c (Å)	13,461(3)	Сакупљене рефлексije	4136
α (°)	104,143(17)	Независне рефлексije	4136
β (°)	105,795(17)	Посматране рефлексije	3775
γ (°)	100,754(18)	$I > 2\sigma(I)$	$R_1=0,1762$
V (Å ³)	1060,7(4)	wR_2	0,3267

3.3.4.2. Рендгенска структурна анализа хлоридо((*S,S*)- -етилендиамин-*N*-(*O*-етил-2-(3-метил)-бутаноат)-*N'*-2-(3-метил)- бутаноатопаладијум(II) комплекса, [PdCl(et-(*S,S*)-eddv)]

Претходно синтетисани комплекс хлоридо((*S,S*)-етилендиамин-*N*-(*O*-етил-2(3-метил)-бутаноат)-*N'*-2-(3-метил)-бутаноатопаладијум(II) комплекс, [PdCl(et-(*S,S*)-eddv)], кристалисао је из система диметилсулфоксид-вода тако што је добијени талог комплекса растворен у малој количини диметилсулфоксида. Добијен раствор је заједно са чашом остављен у већој чаши са дестилованом водом. Већа чаша је затворена парафилмом и остављена на тамном месту. Након неколико дана добијени су жуто-наранџасти кристали који су били погодни за рендгенску структурну анализу.

Кристалографски подаци су сакупљени на 294 К помоћу Bruker-Nonius Карра CCD дифрактометра користећи $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) зрачење монохроматизовано графитним монохроматором. Лоренцови и поларизациони ефекти су кориговани, а примењена је и нумеричка апсорпциона корекција [127]. Структура је решена применом директних метода и побољшана коришћењем full-matrix, least-square процедура [128]. Кристалографски подаци као и подаци у вези са решавањем структуре комплекса $[\text{PdCl}(\text{et}-(S,S)\text{-eddv})]$ приказани су у Табели 3.

Табела 3. Основни кристалографски подаци и подаци у вези са решавањем и утачавањем структуре комплекса $[\text{PdCl}(\text{et}-(S,S)\text{-eddv})]$

Формула	$\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{Pd}$	F(000)	880
M	429,23	Z	4
Кристални систем	Орторомбичан	D_c (g·mL)	1,523
Просторна група	$P2_12_12_1$	λ (Å)	0,71073
Величина кристала (mm)	0,55 x 0,35 x 0,18	μ (mm ⁻¹)	1,150
a (Å)	6,1062(2)	Температура (K)	294(2)
b (Å)	10,5325(4)	Θ (°)	3,40-27,10
c (Å)	29,1149(11)	Сакупљене рефлексije	4136
α (°)	90	Независне рефлексije	4136
β (°)	90	Посматране рефлексije	3775
γ (°)	90	$I > 2\sigma(I)$	$R_1=0,0583, wR_2=0,1402$
V (Å ³)	1872,5(2)	R	$R_1=0,0636, wR_2=0,1429$

3.3.4.3. Рендгенска структурна анализа *bis*-(S-бензил- -тиосалицилато)паладијум(II) комплекса, [Pd(S-bz-thiosal)₂]

Одговарајући кристали комплекса *bis*-(S-бензил-тиосалицилато) паладијум(II) комплекса, [Pd(S-bz-thiosal)₂], за рендгенску кристалну анализу добијени су прекристализацијом из система диметилсулфоксид-вода на начин описан у одељку 3.3.3.2. Резултати су сакупљени на 123 К коришћењем Bruker-Nonius Карра CCD дифрактометра са APEXII детектором користећи MoK_α (λ = 0,71073 Å) монохроматизовано зрачење графитног монохроматора. Структура награђеног комплекса је решена применом директних метода SIR-2004 [129] и SHELXL-97 [124]. Лоренцови и поларизациони ефекти су кориговани, а примењена је и нумеричка апсорпциона корекција [130]. Основни кристалографски подаци и подаци у вези са решавањем и утачњавањем структуре комплекса дате су у Табели 4.

Табела 4. Основни кристалографски подаци и подаци у вези са решавањем и утачњавањем структуре комплекса [Pd(S-bz-thiosal)₂]

Формула	C ₂₈ H ₂₂ O ₄ S ₂ Pd	F(000)	1200
М	592,98	Z	4
Кристални систем	Моноклиничан	D _c (g·mL)	1,640
Просторна група	P2 ₁ /c	λ (Å)	0,71073
Величина кристала (mm)	0,16 x 0,04 x 0,02	μ (mm ⁻¹)	0,981
a (Å)	12,0280(5)	Температура (K)	123(2)
b (Å)	21,0330(8)	Θ (°)	2,96-25,02
c (Å)	9,5049(4)	Сакупљене рефлексije	13559
α (°)	90	Независне рефлексije	4212
β (°)	92,578(2)	Посматране рефлексije	3775
γ (°)	90	I>2σ(I)	R ₁ =0,0624,wR ₂ =0,1034
V (Å ³)	2402,16(17)	R	R ₁ =0,1215,wR ₂ =0,1179

3.4. БИОЛОШКА МЕРЕЊА

3.4.1. *In vitro* антимикробни тест

3.4.1.1. Тестирани микроорганизми

Антимикробна активност бидентатних лиганата диалкилестара edda-типа лиганда, деривата тиосалицилне киселине и њихових одговарајућих комплекса је одређена тестирањем на 26 врста микроорганизма. Експерименти су извођени на 14 врста патогених бактерија, укључујући 7 стандардних врста и 9 клиничких изолата; 4 врсте пробиотских бактерија и 9 врста гљива укључујући 5 врста буђи и 4 врсте квасца. Сви тестирани микроорганизми приказани су у Табели 5. Сви клинички изолати патогених бактерија добијени су на поклон од Института за јавно здравље, Крагујевац. Остале врсте микроорганизма су из колекције микроорганизма Лабораторије за микробиологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу.

Бактеријске суспензије и суспензије квасца су припремљене тако што су колоније узимане директно са подлоге и суспендоване у 5 mL стерилног физиолошког раствора. Густина почетне суспензије је подешавана упоређивањем са 0,5 Mc Farland стандардом (0,50 mL 1,17% w/v BaCl₂ · 2H₂O + 99,50 mL 1% w/v H₂SO₄) [131]. Густина стандарда 0,5 Mc Farland одговара бактеријској суспензији која садржи око 10⁸ CFU/mL и суспензији квасца од 10⁶ CFU/mL. Почетне суспензије бактерија и квасца су разблажене у односу 1:1000 стерилним 0,85% физиолошким раствором. Суспензија спора гљива је припремљена пажљивим скидањем спора са мицелије. Таква суспензија је потом разблажена у односу 1:1000 стерилним физиолошким раствором.

Табела 5. Списак тестираних микроорганизама

Бактерије	Гљиве
Грам-позитивне бактерије	Квасци
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Rhodotorula sp.</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	
<i>Sarcina lutea</i>	Гљиве изазивачи буђи
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Aspergillus restrictus</i>
Грам-негативне бактерије	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	
<i>Proteus mirabilis</i>	
<i>Salmonella enterica</i>	
<i>Salmonella typhimurium</i>	
Пробиотици	
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	

3.4.1.2. Микродилуциона метода

Ова метода омогућава испитивање антимикробне активности одређивањем минималне инхибиторне концентрације (МИК) и минималне микробицидне концентрације (ММК) употребом микротитрационих плоча уз помоћ ресазурина

[132]. Коришћена је плоча са 96 бунарића у која су стављена по 100 μL хранљиве подлоге, Mueller-Hinton бујон за бактерије и Sabouraud dextrose бујон за гљиве и квасце. По 100 μL раствора испитиваних једињења почетне концентрације 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ је додато у први ред микротитрационе плоче. Двоструким разблажењем користећи мултиканалну пипету добијени су раствори концентрација у области од 500 до 0,24 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Затим је додавано по 10 μL суспензија бактерија, квасца или спора. Тестирана једињења су испитана на концентрацији бактерија од 10^5 CFU/mL, и концентрацији квасца и спора гљива од 10^3 CFU/mL. Коначно, у сваки бунарић додат је ресазурин. Ресазурин је индикатор ћелијског раста. У периоду инкубације, ресазурин плаво-љубичасте боје под утицајем оксидоредуктаза живе ћелије прелази у резорурфин розе флуоросцентне боје [133]. Тако припремљене плоче су инкубиране на 37°C 24 сата за бактерије, на 28°C 48 сати и на 28°C 72 сата за гљиве. МИК је дефинисана као најнижа концентрација испитиваних супстанци на којој није дошло до промене боје ресазурина из плаве у ружичасту. Код гљива МИК представља најнижу концентрацију испитиваних једињења која спречава раст мицелије. Резултати су читавани визуелно.

Минимална микробицидна концентрација је одређена пресејавањем 10 μL узорка из бунарића у којима није уочен раст на плочаст агар. Концентрација на којој после периода инкубације није уочен раст дефинисана је као минимална микробицидна концентрација.

Доксицилин и флуконазол су коришћени као позитивна контрола. Такође праћен је и утицај растварача етанола и диметилсулфоксида (10%) на раст микроорганизама. Установљено је експериментално да поменуте концентрације растварача не делују на раст микроорганизама.

3.4.2. *In vitro* антитуморска активност

3.4.2.1. Испитиване ћелијске линије

Цитотоксичност комплекса паладијума(II) и платине(IV) је испитивана на ћелијским линијама мишјег тумора дојке (American Type Culture Collection, Manassas, ATCC VA, USA; CRL-2539) и мишјег малигног меланома (American Type Culture Collection CRL-6323, ATCC, USA). Туморске ћелије су култивисане у комплетном DMEM медијуму (Dulbecco's Modified Eagles Medium) који садржи: 4,5 g/L глукозе, 10% феталног бовиног серума (FBS), 2 mmol/L *S*-глутамина, 1 mmol/L натријум пирувата, 10 mmol/L HEPES-а, 100 U/mL пеницилина, 100 µg/mL стрептомицина и 1 mmol/L мешаних неесенцијалних аминокиселина (Sigma, USA).

Ћелије су култивисане у фласковима-T25(BD Falcon) у стерилним условима у инкубатору са стандардним условима (температура 37°C и процентуални удео угљен-диоксида, CO₂, у ваздуху 5%). Једнослојне субконфлуенте ћелијске културе су пасажиране сваког трећег дана. Укратко, ћелије су након прања у PBS (енгл. Phosphate Buffered Saline-Сони фосфатни пуфер, PAA Laboratories GmbH) прикупљене из флашка третирањем трипсином (0,25% трипсин са хелатором 0,02% EDTA који су растворени у PBS) 2 до 5 минута у инкубатору, како би се одлепиле. Ћелије су после одлепљивања покупљене и пребачене у епрувету која садржи 14 mL комплетног медијума, затим су ресуспендоване и пребачене у 3 нова T25 флашка (по 5 mL у сваки).

3.4.2.2. МТТ колориметријски тест

Ефекат испитиване супстанце одређује се поређењем интензитета боје који дају ћелије излагане само медијуму и интензитета који дају ћелије излагане испитиваној супстанци. Продуковани формаган се раствара у органским растварачима и интензитет боје се одређује спектрофотометријски на таласној дужини од 570 nm.

Цитотоксичност комплекса је одређивана МТТ тестом [134]. Ћелије у експоненцијалној фази раста прикупљене су из флашка на претходно описани начин. Број ћелија је одређен коришћењем *Neubauer*-ове коморе уз искључење мртвих ћелија тј. ћелија обојених трипан плавим. Трипан плаво је боја која може да прође само кроз оштећену ћелијску мембрану невијабилних ћелија и боји цитоплазму, док је код вијабилних ћелија ова могућност искључена. Ћелије су разблажене до густине 3×10^4 ћелија/mL. У микротитар плоче са 96 отвора је сипано 100 μL (3.000 ћелија) суспензије по отвору. У посебне отворе је сипан медијум без ћелија како би се одредила оптичка густина самог медијума, бленк. Плоча се преко ноћи инкубирала на температури од 37°C и у присуству 5% CO₂. За 24 сата су се ћелије полепиле па је медијум одливен и замењен са 100 μL комплекса раствореног у комплетном медијуму у концентрацијама 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 7,8; 3,9 $\mu\text{mol/L}$. Тестирана једињења су растварана у диметилсулфоксиду. За свако разблажење рађен је трипликат. У контролне отворе је поново сипан чист медијум. Плоча је инкубирана 72 сата под истим условима.

По истеку 72 сата, из свих бунарчића је уклоњена течност и додато је по 100 μL чистог DMEM-а са 15 % МТТ раствора (5 mg/mL у PBS, Phosphate buffer saline-сони фосфатни пуфер). Плоче су инкубиране још 2 до 4 сата. По истеку инкубације медијум је одливен и у сваки отвор је сипано по 150 μL

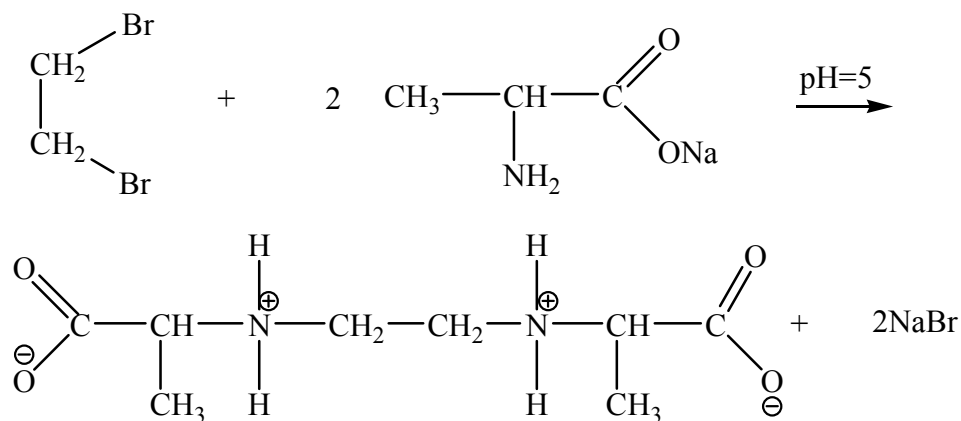
диметилсулфооксида (Sigma Aldrich, Немачка) и 20 μ L глицинског пуфера (pH-10,5). Плоче су вортексоване до растварања кристала формаза и оптичка густина узорака је мерена мултифункционалним читачем микротитар плоча, Zenyth 3100. Процент мртвих ћелија је израчунат на основу формуле:
% цитотоксичности = $100 - ((E - B) / (K - B) \times 100)$; E-означава отвор са испитиваним супстанцама; B-бленк; K-отвор са нетретираним ћелијама.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. Синтеза *O,O'*-диалкил естара етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-пропанске киселине дихлорхидрата, R_2 -(*S,S*)-eddp·2HCl и одговарајућих комплекса паладијума(II), [PdCl₂(R_2 -(*S,S*)-eddp)]

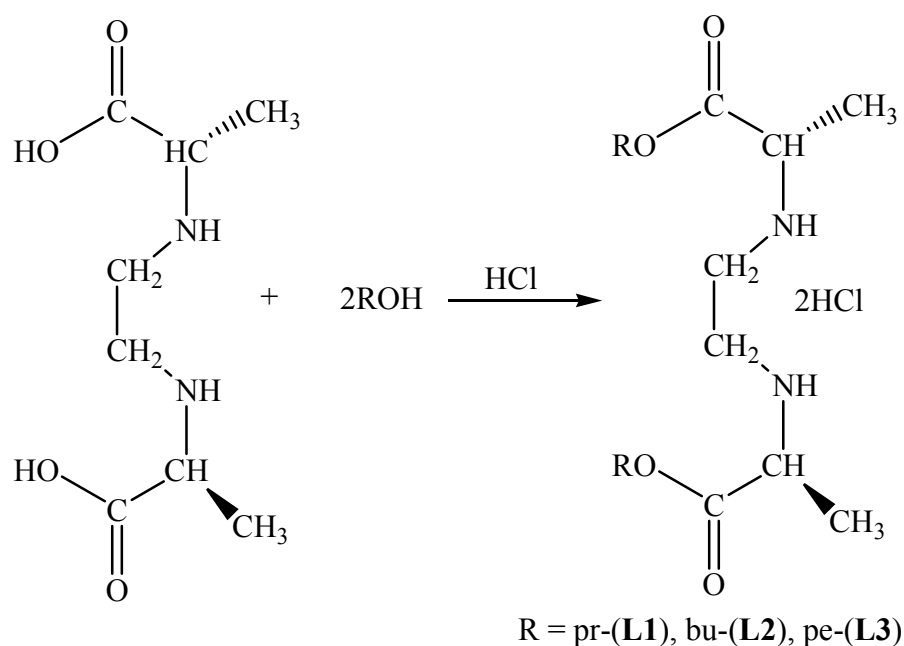
4.1.1. Синтезе лиганата и комплекса

Тетрадентатни лиганд етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-пропанска киселина (H_2 -(*S,S*)-eddp) је добијен у реакцији натријумове соли *S*-аланина и 1,2-дибром-етана у молском односу 1:1 (Шема 7). Подешавањем рН вредности на 5 добијен је наведени лиганд у облику унутрашње соли (*zwitter* јона).



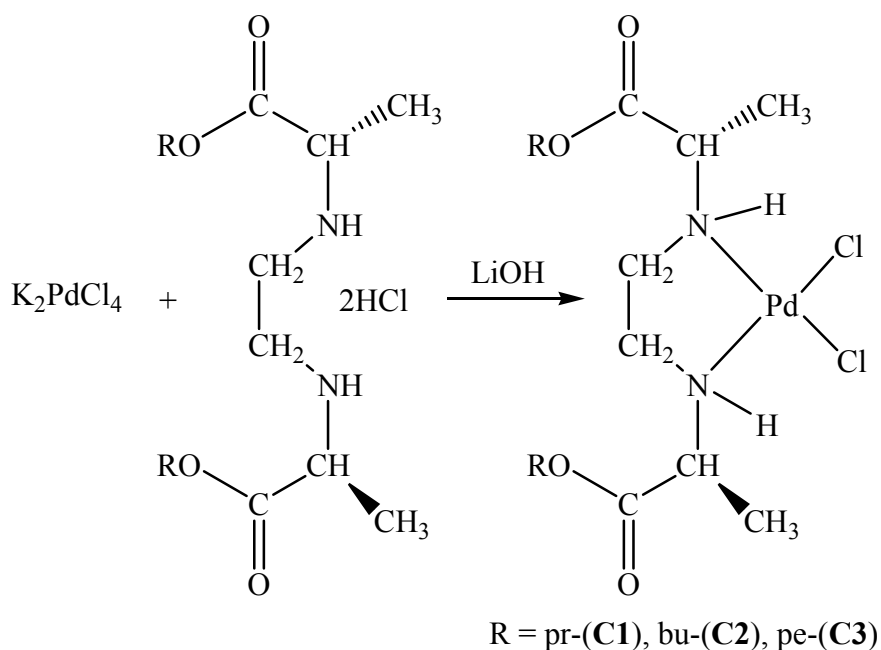
Шема 7. Синтеза етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-пропанске киселине, (H_2 -(*S,S*)-eddp),

Добијена H_2 -(*S,S*)-eddp киселина је естерификована при чему су добијени пропил-, бутил- и пентил- естри етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-пропанске киселине (Шема 8).



Шема 8. Синтеза *O,O'*-диалкил естара етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-пропанске киселине дихлорхидрата, R_2 -(*S,S*)-*eddp*·2HCl

Синтетисани естри нису добро растворни у води и неким органским растварачима. Реакцијом између добијених естара R_2 -(*S,S*)-*edpp* и калијум-тетрахлоридопаладата(II) у молском односу 1:1 и уз додатак литијум-хидроксида синтетисани су одговарајући квадратно-планарни комплекси $[PdCl_2(R_2-(S,S)-eddp)]$ (Шема 9). Синтетисани комплекси су растворни у метилхлориду, метиленхлориду, хлороформу, угљентетрахлориду, метанолу и етанолу, али нису растворни у води. Резултати елементалне микроанализе за награђене лиганде и комплексе су у сагласности са израчунатим вредностима (експериментални део 3.1.2. за лиганде и 3.2.1.-3.2.3. за комплексе).



Шема 9. Синтеза комплекса $[PdCl_2(R_2-(S,S)-eddp)]$

4.1.2. Инфрацрвени спектри *O,O'*-диалкил естара етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-пропанске киселине дихлорхидрата и одговарајућих комплекса паладијума(II)

У Табели 6 дате су најважније траке у инфрацрвеним спектрима изолованих бидентатних лиганата (**L1**, **L2**, **L3**) и одговарајућих паладијум(II) комплекса (**C1**, **C2**, **C3**). Инфрацрвени спектри наведених комплекса потврђују бидентатно координовање $R_2-(S,S)-eddp$ лиганата преко два азотова атома за паладијум(II)-јон. Претпоставка да су $R_2-(S,S)-eddp$ лиганди координовани преко два азотова атома може се потврдити присуством трака које припадају валенционим вибрацијама секундарне амино групе на 3130 cm^{-1} за комплекс (**C1**);

3120 cm^{-1} (C2) и 3118 cm^{-1} за комплекс (C3). Такође, наведени комплекси $[\text{PdCl}_2(\text{R}_2\text{-(S,S)-eddp})]$ немају апсорпциону траку протоноване амино групе која је уочена у спектрима диалкил-естра $\text{R}_2\text{-(S,S)-eddp}$ и то на 3461 cm^{-1} за лиганд (L1), на 3461 cm^{-1} за (L2) и на 3462 cm^{-1} за лиганд (L3). Остале апсорпционе траке нађене су у истим областима у комплексима, али и у полазним лигандима, што нам указује да координација није извршена преко кисеоникових атома карбоксилних група.

Табела 6. Важније траке у инфрацрвеним спектрима $\text{R}_2\text{-(S,S)-eddp} \cdot 2\text{HCl}$ лиганада и одговарајућих паладијум(II) комплекса

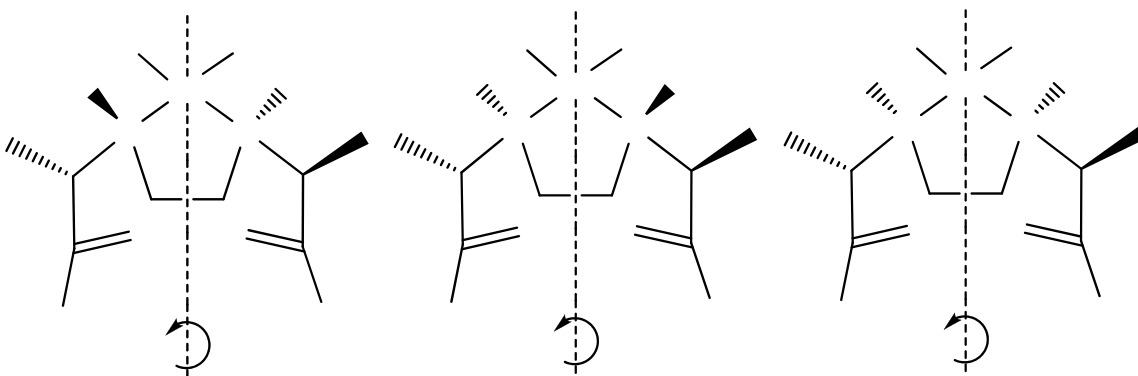
	$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{C-O})$	$\nu(\text{CH}_3)$	$\nu(\text{R-NH}_2^+)$	$\nu(\text{R-NH})$
dpr-(S,S)-eddp·2HCl (L1)	1745	1231	2968	3461	-
dbu-(S,S)-eddp·2HCl (L2)	1745	1223	2976	3461	-
dpe-(S,S)-eddp·2HCl (L3)	1746	1231	2977	3462	-
$[\text{PdCl}_2(\text{dpr-(S,S)-eddp})]$ (C1)	1735	1215	2971	-	3130
$[\text{PdCl}_2(\text{dbu-(S,S)-eddp})]$ (C2)	1740	1241	2960	-	3120
$[\text{PdCl}_2(\text{dpe-(S,S)-eddp})]$ (C3)	1741	1229	2958	-	3118

4.1.3. Нуклеарно-магнетно-резонанциони (^1H и ^{13}C) спектри O,O' -диалкил естара етилендиамин- N,N' -ди-(S,S)-2-пропанске киселине дихлорхидрата и одговарајућих комплекса паладијума(II)

NMR спектроскопски подаци за сва три паладијум(II) комплекса потврђују претпоставку да је координација лиганада за паладијум(II)-јон извршена преко два азотова атома из O,O' -диалкил естара етилендиамин- N,N' -ди-(S,S)-2-пропанске киселине ($\text{R}_2\text{-(S,S)-eddp}$) (одељак 3.1.2. за лиганде и 3.2.1.-3.2.3. за комплексе). Поређењем хемијских померања за водоникове атоме $-\text{CH}_2-$ групе из етилендиаминског дела лиганда са хемијским померањем истих

водоникових атома у одговарајућем комплексу (у области око 0,9 ppm) потврђује се координовање преко два азотова атома. Такође, хемијска померања водоникових атома са угљеникових атома из R-остатака алкохола налазе се у очекиваним областима [135-137].

Број сигнала у ^{13}C NMR спектрима изолованих комплекса $[\text{PdCl}_2(\text{R}_2-(S,S)\text{-eddp})]$ потврђују координовање O,O' -диалкил естра етилендиамин- $-N,N'$ -ди- (S,S) -2-пропанске киселине ($\text{R}_2-(S,S)\text{-eddp}$) за паладијума(II)-јон (одељак 3.1.2. за лиганде и 3.2.1.-3.2.3. за комплексе). Координовањем лиганда ($\text{R}_2-(S,S)\text{-eddp}$) за паладијум(II)-јон оба асиметрична угљеникова атома из eddp остатка задржали су S апсолутну конфигурацију. Истовремено, координовањем азотови атоми из етилендиаминског прстена постају асиметрични. Због тога је могуће очекивати три диастереоизомера комплекса $[\text{PdCl}_2(\text{R}_2-(S,S)\text{-eddp})]$ као што је приказано на Слици 16 [(R,R) , $(R,S\equiv S,R)$ и (S,S)]. За (R,R) и (S,S) енантиомере, због присутне C_2 симетрије молекула у ^{13}C NMR спектрима, можемо очекивати само један сигнал услед идентичног положаја естарских остатака. Појава по два сета сигнала различитих интензитета у ^{13}C NMR спектрима $[\text{PdCl}_2(\text{R}_2-(S,S)\text{-eddp})]$ комплекса указује на присуство (R,S) дијастереоизомера, као што је и публиковано раније [137-139] за паладијум(II) комплексе са истим типом лиганда (Слика 16).



Слика 16. Могући дијастереоизомери комплекса $[\text{PdCl}_2(\text{R}_2-(S,S)\text{-eddp})]$,

$R = pr-, bu-$ и $pe-$

4.1.4. Микробиолошка активност *O,O'*-диалкил естара етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-пропанске киселине дихлорхидрата и одговарајућих комплекса паладијума(II)

У Табели 7 приказани су резултати *in vitro* испитивања антибактеријске и антифунгалне активности за три нова бидентатна лиганда и три комплекса паладијума(II). У истој табели су такође приказане и вредности за МИК и ММК доксицилина и флуконазола због поређења. Растварач 10% етанол није успоравао раст тестираних микроорганизама. Испитивани комплекси паладијума(II) су показивали различите степене антимикуробне активности на различите тестиране врсте. Заправо, интензитети антимикуробне активности зависе од групе микроорганизама (бактерије или гљиве) као и од концентрације испитиваног комплекса. Експериментално је показано да сва три комплекса показују сличну активност у односу на стандардне и клинички изоловане сојеве бактерија. У односу на позитивну контролу ови комплекси показују умерену антибактеријску активност. Као што се може видети у Табели 7, МИК вредности су у распону од 31,25 до 125 $\mu\text{g/mL}$, а ММК вредности од 125 до 500 $\mu\text{g/mL}$ у зависности од соја бактерије. Најбољу активност показао је комплекс $[\text{PdCl}_2(\text{dbu}-(\text{S,S})\text{-eddp})]$ (C2) на *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и *Escherichia coli* и имао вредност МИК 31,25 $\mu\text{g/mL}$.

Пробиотици су показали осетљивост сличну осталим бактеријама осим на комплекс $[\text{PdCl}_2(\text{dbu}-(\text{S,S})\text{-eddp})]$ (C2). Раст *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* IP 5832, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* је био успорен дејством комплекса $[\text{PdCl}_2(\text{dbu}-(\text{S,S})\text{-eddp})]$ (C2) концентрације 15,6 $\mu\text{g/mL}$.

Треба нагласити да су испитивани комплекси показали значајну антифунгалну активност. Сва три комплекса су успоравала раст *Aspergillus flavus* при концентрацији од 0,49 $\mu\text{g/mL}$, док је $[\text{PdCl}_2(\text{dpe}-(\text{S,S})\text{-eddp})]$ (C3) утицао на раст

Aspergillus fumigatus и на нижим концентрацијама (МИК = 7,8 µg/mL). МИК вредности за квасце *Candida albicans* су биле 125 µg/mL за сва три комплекса, док су вредности за ММК биле 250 µg/mL за све комплексе осим за [PdCl₂(dbu-(S,S)-eddp)] где је износила 500 µg/mL.

Упоређивањем вредности закључено је да је у највећем броју случајева активност сва три лиганда била мања од активности одговарајућих комплекса паладијума (II) (Табела 7).

Табела 7. Резултати антибактеријске и антифунгалне активности бидентатних лиганата R₂-(S,S)-eddp·2HCl и одговарајућих паладијум(II) комплекса

	(L1)		(C1)		(L2)		(C2)	
	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>500	>500	125	250	125	>500	125	125
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	>500	>500	125	250	125	>500	62,5	250
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	>500	>500	125	250	>500	>500	31,25	125
<i>P.mirabilis</i>	>500	>500	62,5	500	>500	>500	125	>500
<i>E. coli</i>	125	>500	62,5	125	31,25	>500	31,25	>250
<i>B. animalis subsp. lactis</i>	125	>500	62,5	125	7,8	>500	15,6	125
<i>L. plantarum</i>	125	>500	62,5	125	15,6	125	15,6	125
<i>B. subtilis</i> IP 5832	125	>500	62,5	125	62,5	>500	15,6	125
<i>S. boulardii</i>	>500	>500	125	250	500	>500	125	250
<i>C. albicans</i>	>500	>500	125	250	>500	>500	125	500
<i>A. fumigatus</i>	>500	>500	31,25	31,25	>500	>500	31,25	31,25
<i>A. flavus</i>	>500	>500	0,49	0,49	>500	>500	0,49	0,49

Табела 7. Резултати антибактеријске и антифунгалне активности бидентатних лиганата $R_2-(S,S)\text{-eddp}\cdot 2\text{HCl}$ и одговарајућих паладијум(II) комплекса (наставак)

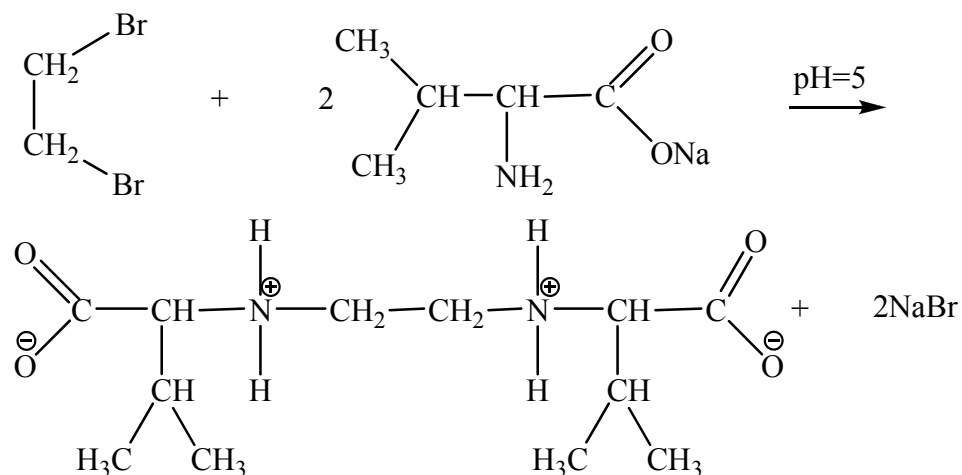
	(L3)		(C3)		докисицилин	флуконазол
	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК
<i>E. coli</i> ATCC 25922	125	>500	62,5	250	25/25	/
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	>500	>500	62,5	250	50/50	/
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	>250	>500	125	125	12,5/50	/
<i>P.mirabilis</i>	>250	>500	125	125	50/>50	/
<i>E. coli</i>	>250	>500	125	>500	12,5/12,5	/
<i>B. animalis subsp. lactis</i>	0,98	>31,25	125	>500	0,024/>0,19	/
<i>L. plantarum</i>	1,95	>62,5	125	>500	0,012/>0,098	/
<i>B. subtilis</i> IP 5832	62,5	>500	62,5	>500	0,003/0,024	/
<i>S. boulardii</i>	62,5	125	125	125	/	6,25/>50
<i>C. albicans</i>	500	500	125	125	/	3,125/>50
<i>A. fumigatus</i>	62,5	125	7,8	7,8	/	>500
<i>A. flavus</i>	62,5	125	0,49	0,49	/	>500

МИК-минимална инхибиторна концентрација ($\mu\text{g/mL}$); ММК- минимална микробицидна концентрација ($\mu\text{g/mL}$).
"/" – није испитивана; Антибиотик-докисицилин; Антимикотик-флуконазол

4.2. Синтеза O,O' -диалкил естара етилендиамин- N,N' -ди- (S,S) -2-(3-метил)-бутанске киселине дихлорхидрата, $R_2-(S,S)\text{-eddv}\cdot 2\text{HCl}$ и одговарајућих комплекса паладијума(II), $[\text{PdCl}(\text{R-}(S,S)\text{-eddv})]$

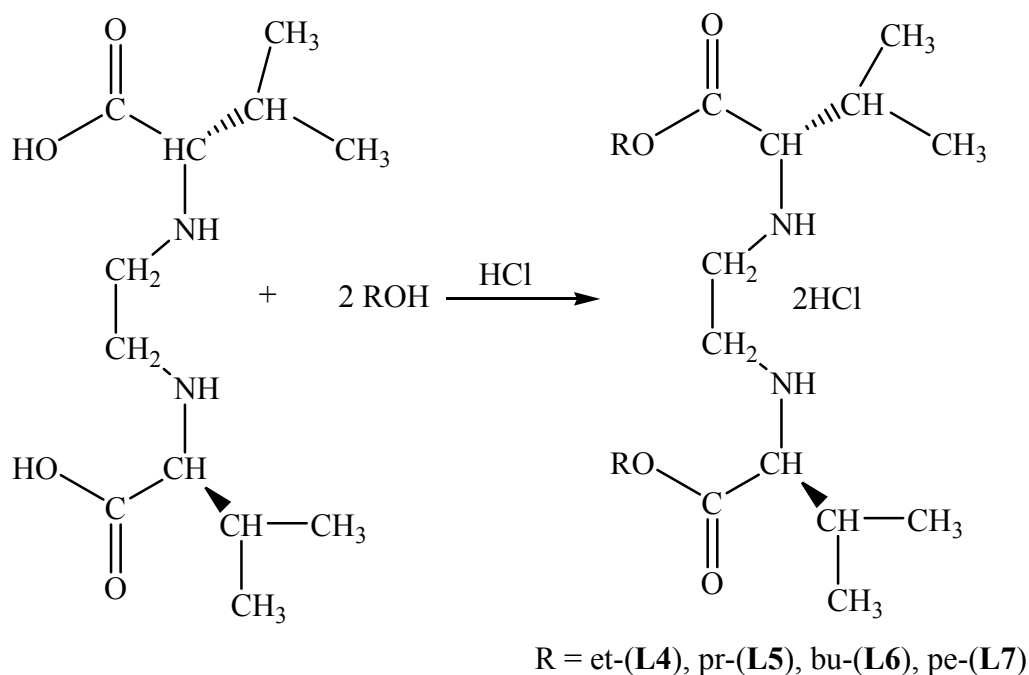
4.2.1. Синтеза лиганата и комплекса

Етилендиамин- N,N' -ди- (S,S) -2-(3-метил)-бутанска киселина, $\text{H}_2-(S,S)\text{-eddv}$ добијена је на начин описан у одељку 4.1. У реакцији натријумове соли S -валина и 1,2-диброметана у молском односу 1:1 и подешавањем рН вредности на 5 добија се етилендиамин- N,N' -ди- (S,S) -2-(3-метил)-бутанска киселина која се издвајала у облику унутрашње соли (*zwitter* јона) (Шема 10).



Шема 10. Синтеза етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-(3-метил)-бутанске киселине, *H*₂-(*S,S*)-*eddv*

Након сушења добијени производ коришћен је за реакцију естерификације. У закишељен апсолутни алкохол (етанол, 1-пропанол, 1-бутанол, 1-пентанол) додат је тетрадентатни лиганд етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-(3-метил)-бутанска киселина. Након рефлуктовања од 12 сати добијен је *O,O'*-диалкил естар етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-(3-метил)-бутанске киселине дихлорхидрат, *R*₂-(*S,S*)-*eddv*·2HCl (Шема 11).

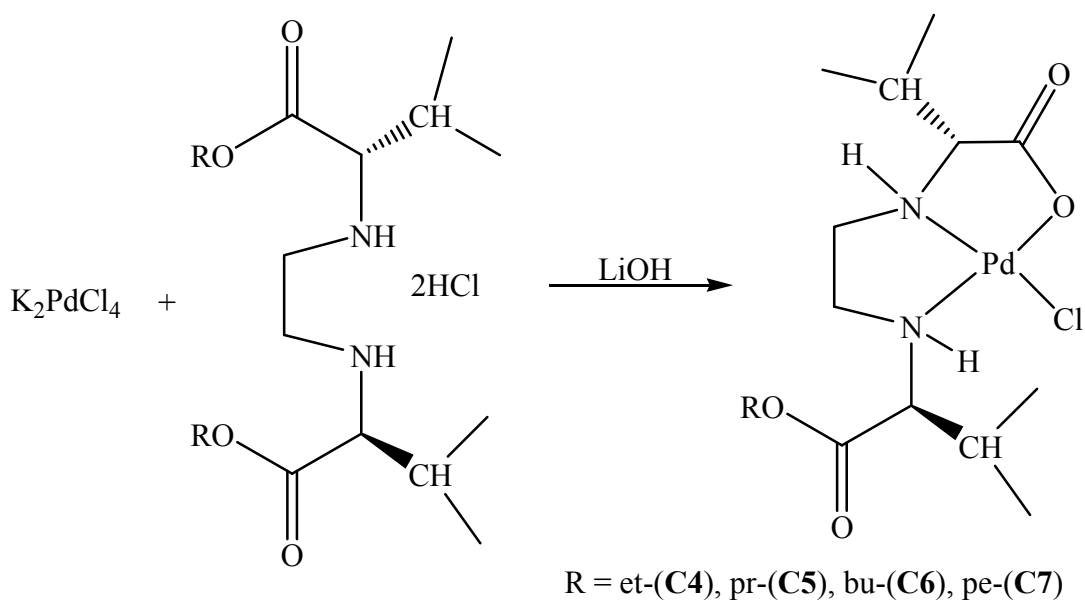


Шема 11. Синтеза *O,O'*-диалкил естара етилендиамин-*N,N'*-ди-*(S,S)*-2-(3-метил)-бутанске киселине дихлорхидрата, R_2 -*(S,S)*-eddv·2HCl

Добијени естри (**L4-L7**) су слабо растворни у хлороформу, али се боље растварају у води, метанолу, диметилсулфоксиду и одговарајућим алкохолима који су коришћени у реакцијама естерификације.

Одговарајући комплекси паладијума(II) (**C4-C7**) добијени су директном реакцијом калијум-тетрахлоридопаладата(II) и лиганда у молском односу 1:1, уз додатак воденог раствора литијум-хидроксида који је коришћен због депротовања амино група (Шема 12). Тако добијени комплекси нису растворни у води, али су веома добро растворни у хлороформу и диметилсулфоксиду. Мада смо очекивали бидентатну координацију синтетисаних диестара (*S,S*)-eddv лиганда као и у случају одговарајућих естара (*S,S*)-eddp лиганда. Резултати елементарне микроанализе, инфрацрвене и нуклеарно-магнетно-резонанционе спектроскопије (NMR ^1H и ^{13}C) сугеришу да је дошло до делимичне хидролизе диестра, а потом до

тридентатне координације за паладијум(II)-јон што је и потврђено рендгенском структурном анализом за комплекс $[PdCl(et-(S,S)-eddv)]$. Ова чињеница се може објаснити померањем хемијске равнотеже између реакције естерификација и реакције хидролизе у правцу хидролизе таложењем нерастворних паладијум(II) комплекса. Ово се није десило у случају $[PdCl_2(R_2-(S,S)-eddp)]$ комплекса јер су наведени комплекси довољно растворни у води. Састав комплекса и лиганата потврђен је елементалном микроанализом чији су резултати у сагласности са израчунатим вредностима за угљеник, водоник и азот (експериментални део 3.1.4 за лиганде и 3.2.4.–3.2.7. за комплексе).



Шема 12. Синтеза комплекса $[PdCl(R-(S,S)-eddv)]$

4.2.2. Инфрацрвени спектри *O,O'*-диалкил естара етилендиамин- -*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-(3-метил)-бутанске киселине дихлорхидрата и одговарајућих комплекса паладијума(II)

У Табели 8 дате су најважније траке у инфрацрвеним спектрима *O,O'*-диалкил естара етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-(3-метил)-бутанске киселине дихлорхидрата, $R_2-(S,S)\text{-eddv}\cdot 2\text{HCl}$ и одговарајућих комплекса паладијума(II).

Табела 8. Најважније траке у инфрацрвеним спектрима $R_2-(S,S)\text{-eddv}\cdot 2\text{HCl}$ и одговарајућих комплекса паладијума(II)

	$\nu(\text{C}=\text{O})$	$\nu(\text{C}-\text{O})$	$\nu(\text{CH}_3)$	$\nu(\text{R}-\text{NH}_2^+)$	$\nu(\text{R}-\text{NH})$
det-(<i>S,S</i>)-eddv·2HCl (L4)	1733	1228	2977	3415	-
dpr-(<i>S,S</i>)-eddv·2HCl (L5)	1734	1202	2973	3437	-
dbu-(<i>S,S</i>)-eddv·2HCl (L6)	1737	1215	2967	3428	-
dpe-(<i>S,S</i>)-eddv·2HCl (L7)	1736	1230	2964	3439	-
[PdCl(et-(<i>S,S</i>)-eddv)] (C4)	1735, 1640	1267	2970	-	3178
[PdCl(pr-(<i>S,S</i>)-eddv)] (C5)	1731, 1652	1267	2970	-	3181
[PdCl(bu-(<i>S,S</i>)-eddv)](C6)	1716, 1640	1267	2966	-	3180
[PdCl(pe-(<i>S,S</i>)-eddv)] (C7)	1716, 1642	1267	2969	-	3180

У спектрима лиганата уочене су апсорпционе траке секундарне амино групе $\text{R}-\text{NH}_2^+$ и то на 3415 cm^{-1} за (**L4**), 3437 cm^{-1} за (**L5**), 3428 cm^{-1} за (**L6**), 3439 cm^{-1} за (**L7**) (Табела 8), што указује на протоновану форму азотових атома у наведеним естрима.

У инфрацрвеним спектрима комплекса паладијума(II) (C4-C7) нађене су апсорпционе траке секундарне амино групе и то на 3178 cm^{-1} , 3181 cm^{-1} , 3180 cm^{-1} и 3180 cm^{-1} што указује на координацију преко азотових атома $R_2-(S,S)\text{-eddv}$ лиганда за паладијум(II)-јон. Такође, постоји једна апсорпциона трака у области око 1730 cm^{-1} карактеристична за естарску групу. Међутим, у IR спектрима свих комплекса постоје две апсорпционе траке валенционих асиметричних вибрација C=O група, које указују на постојање две различите C=O групе (Табела 8). Трака у области око 1650 cm^{-1} може се приписати депротонованој, односно деестерификованој карбоксилној групи $R_2-(S,S)\text{-eddv}$ лиганда, док је трака у области $1700\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$ (Табела 8) на готово истим положајима као и код одговарајућег естра. На бази ових резултата може се претпоставити да је дошло до хидролизе једне алкил групе из $R_2-(S,S)\text{-eddv}$ лиганда (Шема 12).

Све остале апсорпционе траке нађене су у очекиваним областима за све лиганде и њихове одговарајуће комплексе.

4.2.3. Нуклеарно-магнетно-резонанциони (^1H и ^{13}C) спектри O,O' -диалкил естара етилендиамин- N,N' -ди- (S,S) -2-(3-метил)-бутанске киселине дихлорхидрата и одговарајућих комплекса паладијума(II)

Положаји сигнала за протоне у NMR спектрима добијених лиганда и комплекса паладијума(II) нађени су у очекиваним областима. Сигнал за протоне $-\text{CH}_2-$ група из диаминског дела лиганда на око 0,9 ppm потврђују претпостављену координацију лиганда преко азотових донорских атома за паладијум(II)-јон. (експериментални део одељак 3.2.4.-3.2.7.). Хемијска померања за протоне са свих метил група нађена су у области од 0,9-1,21 ppm. N,N координацију лиганда потврђује и померање NH сигнала (4,5 ppm за лиганде и 5,8 ppm за комплексе).

Положаји сигнала за угљеникове атоме у ^{13}C NMR спектрима $\text{R}_2\text{-(S,S)-eddv}$ лиганада и одговарајућих паладијум(II) комплекса јављају се у очекиваним областима. Уочена је појава два сигнала за угљеникове атоме из карбоксилних група на око 170 ppm за све синтетисане комплексе. То потврђује претпоставку изведену на бази IR спектра комплекса да је једна естарска група лиганда хидролизована и да је координација тако добијених лиганада извршена преко кисеониковог атома деестерификоване карбоксилне групе (сигнал на вишој вредности, експериментални део одељак 3.2.4.–3.2.7).

4.2.4. Микробиолошка активност *O,O'*-диалкил естара етилендиамин-*N,N'*-ди-*(S,S)*-2-(3-метил)-бутанске киселине дихлорхидрата и одговарајућих комплекса паладијума(II)

У Табели 9 приказани су резултати *in vitro* антибактеријске и антифунгалне активности за четири нова комплекса паладијума(II) и одговарајућих лиганада. Такође, приказане су вредности МИК и ММК доксицилина и флуконазола ради поређења. Експериментално је потврђено да растварач (10% диметилсулфоксид) не успорава раст испитиваних микроорганизама.

Интензитет антимикуробне активности варира у зависности од врсте микроорганизама, као и од типа и концентрације испитиваног једињења. Углавном, испитивани лиганди (**L4-L7**), са малим изузецима, показују веома малу антимикуробну активност, док паладијум(II) комплекси (**C4-C7**) показују селективну и умерену активност (Табела 9). Статистички значајна разлика антимикуробне активности између лиганада и њихових одговарајућих комплекса је изражена на нивоу МИК вредности ($p < 0,05$). Није забележена различита активност ниједног од тестираних јединицења у зависности од групе микроорганизама.

Добијени резултати показују да координациона једињења показују већу активност од одговарајућих лиганата. Повећана активност комплекса може се разумети само са аспекта хелатне теорије. Према овој теорији опадање поларизабилности металног јона повећава липофилност комплексног једињења, а тиме и антимикуробну активност [140].

Сва испитивана једињења показују селективну и умерену антимикуробну активност у односу на тестиране стандардне и клиничке сојеве бактерија. У поређењу са позитивном контролом ова једињења су показала нижу антимикуробну активност. Занимљиво је истаћи да лиганди (**L6**), (**L7**) и комплекси (**C6**), (**C7**) показују значајну активност на *Echerichia coli* (клинички изолат). МИК су у области од 7,813 µg/mL до 31,25 µg/mL.

Пробиотске бактерије су показале већу резистентност на дејство испитиваних једињења. МИК вредности су биле у области између 125 µg/mL и 1000 µg/mL, ММК вредности у области између 500 µg/mL и 1000 µg/mL. Највећу осетљивост је показала *Lactobacillus plantarum* на (**C6**) и (**C7**) (МИК је мања од 7,813 µg/mL).

Тестирани лиганди и одговарајући паладијум(II) комплекси су показали нижу антифунгалну активност. МИК вредности су биле од 125 µg/mL до 1000 µg/mL, док су ММК вредности између 500 µg/mL и 1000 µg/mL. Испитивана једињења не показују утицај на раст квасца или је њихова активност веома ниска (МИК/ММК вредности су биле од 1000 µg/mL и веће од 1000 µg/mL).

Табела 9. Резултати антибактеријске и антифунгалне активности бидентатних лиганада R₂-(S,S)-eddv·2HCl и одговарајућих паладијум(II) комплекса

	(L4)		(C4)		(L5)		(C5)		(L6)	
	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	500	1000	>1000	>1000
<i>P. aerugin.</i> ATCC 27853	1000	1000	500	1000	>1000	>1000	500	1000	>1000	>1000
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	500	500	500	1000	>1000	>1000	500	>1000	1000	>1000
<i>E. coli</i>	500	1000	125	500	125	1000	125	500	15.63	500
<i>P. mirabilis</i>	1000	1000	500	1000	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000
<i>B. an. subsp. lactis</i>	250	500	125	1000	500	>1000	250	>1000	62.5	1000
<i>L.plantarum</i>	250	>1000	250	>1000	500	>1000	250	>1000	62.5	250
<i>B. subtilis</i> IP 5832	125	500	15.63	>1000	62.5	>1000	7.813	1000	250	>1000
<i>S. boulardii</i>	1000	1000	1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000
<i>C.albicans</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000
<i>A.niger</i>	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000	500	>1000	>1000	>1000
<i>A. niger</i> ATCC 16404	>1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	500	1000	>1000	>1000
<i>A. flavus</i>	1000	>1000	500	500	1000	>1000	500	500	>1000	>1000
<i>A.fumigatus</i>	1000	>1000	250	500	>1000	>1000	500	1000	>1000	>1000
<i>A. restrictus</i>	1000	>1000	500	500	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000

Табела 9. Резултати антибактеријске и антифунгалне активности бидентатних лиганада R₂-(S,S)-eddv·2HCl и одговарајућих паладијум(II) комплекса (наставка)

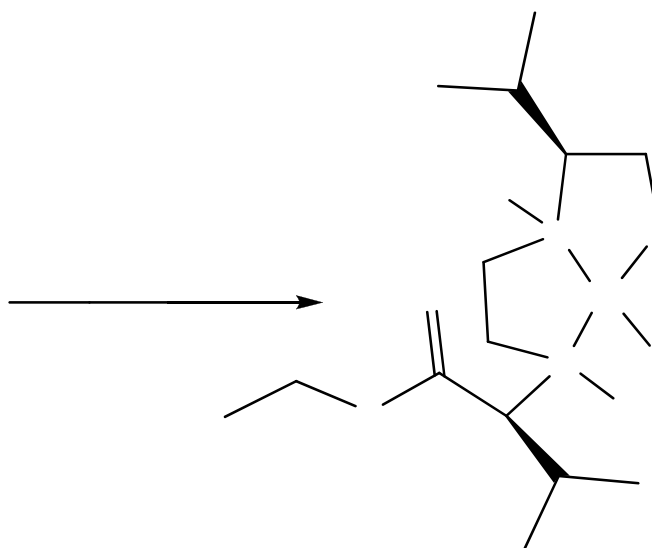
	(C6)		(L7)		(C7)		доксацилин / флуконазол	
	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1000	1000	>1000	>1000	500	1000	7.81	15.63
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	500	1000	500	>1000	500	1000	62.5	125
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	500	1000	1000	>1000	500	1000	7.81	62.5
<i>E.coli</i>	31.25	500	15.63	125	<7.813	125	7.81	15.63
<i>P. mirabilis</i>	1000	1000	>1000	>1000	500	1000	250	> 250
<i>Bifidobac.an. subsp. lactis</i>	62.5	1000	62.5	500	125	>1000	31.3	62.5
<i>L.plantarum</i>	<7.813	125	62.5	250	<7.813	62.5	0.45	7.81
<i>B. subtilis</i> IP 5832	500	1000	1000	>1000	500	<1000	1.95	15.63
<i>S. boulardii</i>	1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	31.3	1000
<i>C.albicans</i>	1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	62.5	1000
<i>A.niger</i>	500	1000	>1000	>1000	1000	1000	500	1000
<i>A. niger</i> ATCC 16404	250	500	>1000	>1000	500	1000	62.5	62.5
<i>A. flavus</i>	250	500	>1000	>1000	1000	1000	1000	1000
<i>A.fumigatus</i>	500	500	>1000	>1000	125	500	500	1000
<i>A. restrictus</i>	500	500	500	1000	250	500	500	2000

МИК-минимална инхибиторна концентрација (µg/mL); ММК- минимална микробицидна концентрација (µg/mL).

"/" – није испитивана; Антибиотик-доксацилин; Антимикотик-флуконазол

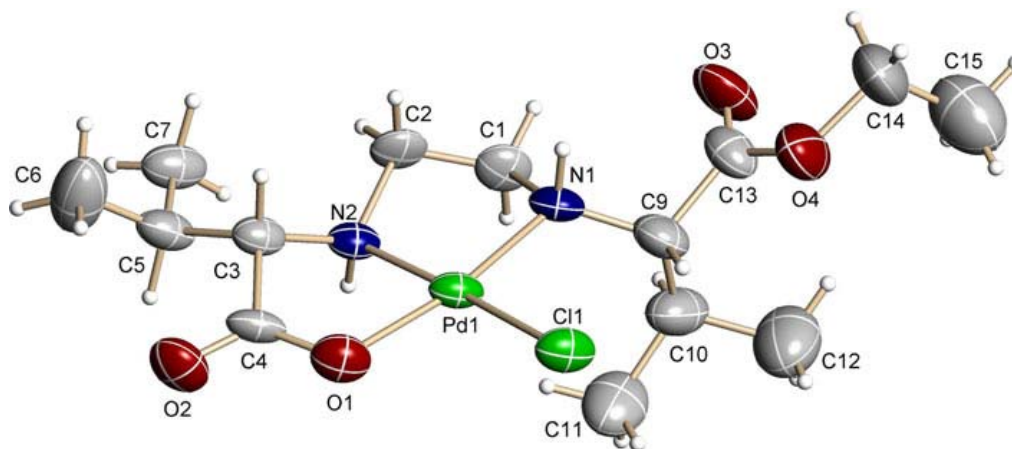
4.2.5. Кристална структура хлоридо((*S,S*)-етилендиамин-*N*-(*O*-етил- -2-(3-метил)-бутаноат)-*N'*-2-(3-метил)-бутаноатопаладијум(II) комплекса, [PdCl(et-(*S,S*)-eddv)]

Реакцијом воденог раствора лиганда (et)₂-(*S,S*)-(eddv)·2HCl и раствора калијум-тетрахлоридопаладата(II) уз додатак литијум-хидроксида у молском односу 1:1:2, као што је приказано на Шеми 13, добијен је комплекс [PdCl(et-(*S,S*)-eddv)] (**C4**). Као што је већ речено (4.2.2. и 4.2.3.) анализа IR и NMR спектра указала је на делимичну хидролизу естарских група R₂-(*S,S*)-(eddv)·2HCl лиганда и тридентатну координацију насталих полуестара (*S,S*)-eddv. Ова претпоставка је потврђена рендгенском структурном анализом [PdCl(et-(*S,S*)-eddv)], односно, паладијум(II)-јон је наградио квадратно планарни комплекс са полухидролизованом естром координовањем преко кисеониковог атома и два азотова атома, док хлоридо лиганд заузима четврто координационо место (Шема 13).



Шема 13. Синтеза комплекса [PdCl(et-(*S,S*)-eddv)]

Иzolовани комплекс кристалише у орторомбичном кристалном систему просторне групе $P2_12_12_1$ (Слика 17).



Слика 17. ORTEP слика $[PdCl(et-(S,S)-eddv)]$ комплекса

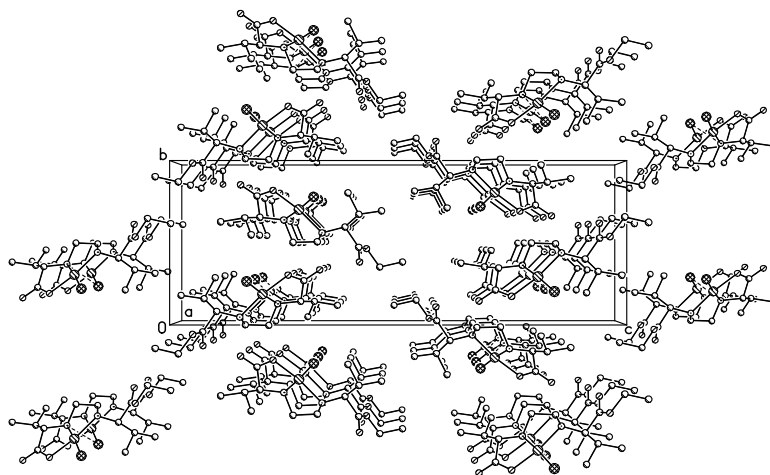
У Табели 10 приказане су одговарајуће дужине и углови веза изолованог комплекса $[PdCl(et-(S,S)-eddv)]$. Дужине Pd-N веза (2,028(7) и 2,043(7)Å) незнатно одступају од одговарајућих веза нађених у комплексу $[PdCl\{(S,S)-(ipr)eddip\}]$ (1,995(5)-2,047(6)Å) [138] и у комплексу паладијума(II) са етилендиамином (2,03-2,09 Å) [19,141]. С друге стране, Pd-N везе су краће него у комплексима паладијума(II) са тетраалкил лигандима edta-типа (2,098(4)-2,106(7) Å) [24, 16-18]. Pd-O веза у изолованом комплексу је (1,990(6) Å) и нешто је краћа од исте везе у комплексу $[PdCl\{(S,S)-(ipr)eddip\}]$ (2,019(5) Å), али је у очекиваној области за петочлане и шесточлане прстенове који садрже Pd-O везу (1,999(6)-2,105(3) Å) [142,143]. Такође, веза Pd-Cl у добијеном комплексу (2,308(2) Å) је

нешто краћа него у комплексима [PdCl{(S,S)-(iPr)eddip}] (2,325(1) Å), [PdCl₂(R₄edta)] и [PdCl₂(edta)]·xH₂O (R = Me, Et; x = 5,6; 2,287(2)-2,298(2) и 2,30(1) Å [17,18,24].

Табела 10. Дужине веза (Å) и углови веза (°) у молекулу [PdCl(et-(S,S)-eddv)]

	[PdCl(et-(S,S)-eddv)]	(R,R)-2c	(R,S)-2c	(S,R)-2c	(S,S)-2c
Pd-N(2)	2,028(7)	2,051	2,054	2,075	2,055
Pd-O(1)	1,990(6)	1,990	1,991	2,011	2,007
Pd-N(1)	2,043(7)	2,079	2,095	2,120	2,099
Pd-Cl(1)	2,308(2)	2,345	2,342	2,345	2,343
C(4)-O(1)	1,30(1)	1,332	1,332	1,349	1,338
C(4)-O(2)	1,21(1)	1,243	1,243	1,259	1,243
C(13)-O(3)	1,18(2)	1,234	1,231	1,274	1,232
C(13)-O(4)	1,345(2)	1,378	1,370	1,464	1,367
C(14)-O(4)	1,49(2)	1,480	1,480	1,488	1,481
C(2)-N(2)	1,486(9)	1,498	1,493	1,522	1,496
C(1)-N(1)	1,51(1)	1,499	1,506	1,529	1,508
N(2)-Pd-N(1)	87,4(3)	87,2	87,6	85,8	84,9
N(2)-Pd-Cl(1)	176,5(2)	177,0	176,0	179,1	175,7
O(1)-Pd-N(1)	169,9(3)	169,9	170,0	165,1	161,0
O(1)-Pd-Cl(1)	93,2(2)	97,4	95,4	98,6	95,9
O(1)-Pd-N(2)	83,3(3)	83,1	82,5	81,2	84,4
N(1)-Pd-Cl(1)	96,1(2)	92,0	94,5	94,3	93,6
N(2)-C(2)-C(1)	109,2(7)	108,3	108,6	110,8	106,6
N(1)-C(1)-C(2)	108,4(7)	109,8	112,2	107,6	111,9
Pd-N(1)-C(1)	104,8(5)	105,2	104,2	100,3	105,1
Pd-N(1)-C(9)	122(1)	116,7	122,1	118,2	123,8
Pd-N(2)-C(2)	103,1(5)	103,4	104,4	107,0	99,0
Pd-N(2)-C(3)	106,5(5)	107,5	107,6	102,2	108,9

У молекулу добијеног комплекса $[PdCl(et-(S,S)-eddv)]$ уочене су две интрамолекулске водоничне везе $N(1)-H\cdots O(2)$ дужине $3,002(9)$ Å, као и интермолекулска водонична веза $N(2)-H(2)\cdots Cl(1)$ дужине $3,263(7)$ Å. Такође, уочено је и неколико необичних интрамолекулских водоничних веза $C-H\cdots A$ ($C(1)\cdots O(3) = 3,07(1)$ Å, $C(6)\cdots O(2) = 2,99(2)$ Å, $C(9)\cdots Cl(1) = 3,36(1)$ Å, $C(14)\cdots O(3) = 2,78(3)$ Å), као и интермолекулска водонична веза $C-H\cdots O$ ($C(2)\cdots O(1) = 3,26(1)$ Å) [144]. На основу резултата рендгенске структурне анализе може се закључити да су наведене водоничне везе одговорне за начин паковања изолованог комплексног једињења $[PdCl(et-(S,S)-eddv)]$ што се може видети на Слици 18.

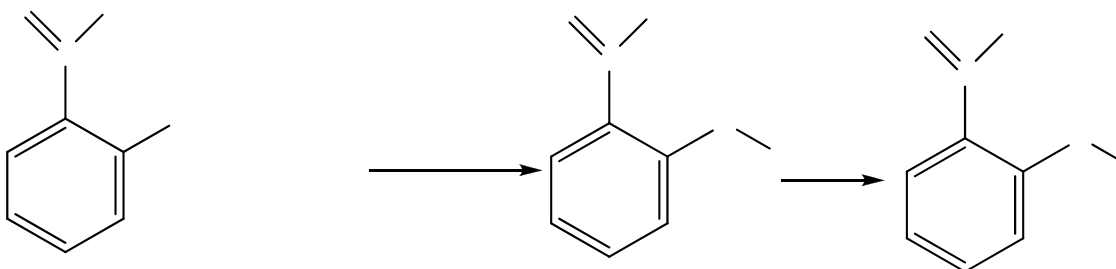


Слика 18. Начин паковања комплекса $[PdCl(et-(S,S)-eddv)]$

4.3. Синтеза и карактеризација S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса паладијума(II)

4.3.1. Синтеза лиганата и комплекса

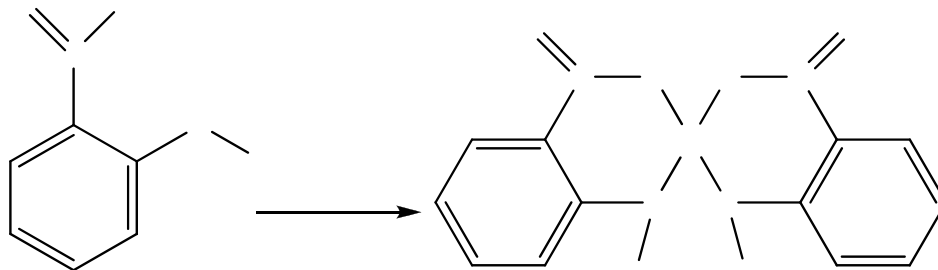
S-аликил деривати тиосалицилне киселине добијени су директном реакцијом тиосалицилне киселине и одговарајућих алкил халогенида у базној средини. Као растварач коришћена је смеша етанол-вода (Шема 14).



R = бензил-(L8), метил-(L9), етил-(L10), пропил-(L11), бутил-(L12)

Шема 14. Синтеза S-алкил деривата тиосалицилне киселине

Одговарајући комплекси паладијума(II) $[Pd(S-R-thiosal)_2]$ добијени су реакцијом калијум-тетрахлоридопаладата(II) и S-алкил деривата тиосалицилне киселине у молском односу 1:2 уз додатак воденог раствора литијум-хидроксида (Шема 15). Приноси реакција били су преко 50%.



R = бензил-(C8), метил-(C9), етил-(C10), пропил-(C11), бутил-(C12)

Шема 15. Синтеза комплекса паладијума(II) са S-алкил-дериватима тиосалицилне киселине

4.3.2. Инфрацрвени спектри S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса паладијума(II)

Бидентатна координација (S-O) лиганата (**L8-L12**) за паладијум(II)-јон је очекивана. Недостатак S-H валенционих вибрација у спектрима комплекса (**C8-C12**) у области $2600-2550\text{ cm}^{-1}$ [145] (2559 cm^{-1} за (**L8**), 2560 cm^{-1} за (**L9**), 2562 cm^{-1} за (**L10**), 2555 cm^{-1} за (**L11**) и 2556 cm^{-1} за (**L12**)) указује на чињеницу да се депротонувана -SH група координује за паладијум(II)-јон (одељак 3.1.5. за лиганде и 3.2.8.–3.2.12. за комплексе). Асиметричне валенционе вибрације карбоксилних група изолованих лиганата (1674 cm^{-1} за (**L8**) и (**L9**), 1682 cm^{-1} за (**L10**), 1678 cm^{-1} за (**L11**) и 1674 cm^{-1} за (**L12**)) су уочене на нижим вредностима од очекиваних ($1700-1750\text{ cm}^{-1}$) [145, 146] што би се могло објаснити присуством велике R-S групе у *ortho* положају. Положаји ових трака у одговарајућим комплексима (**C8-C12**) налазе се у очекиваној области ($1600-1650\text{ cm}^{-1}$) [111] (1633

и 1616 cm^{-1} за (C8), 1619 cm^{-1} за (C9), 1587 cm^{-1} за (C10), 1589 cm^{-1} за (C11) и 1633 и 1615 cm^{-1} за (C12)) што потврђује њихово депротоновање и координовање за метал. Присуство по две апсорпционе траке за COO^- групе у инфрацрвеним спектрима комплекса (C8) и (C12) указује на мале разлике у енергијама, које су последица присутних великих алкил група (бензил- и бутил-) и њихов стерни утицај на фенил групе из тиосалицилне киселине.

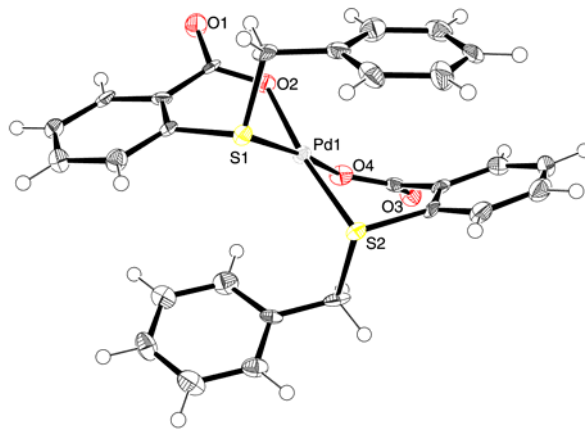
4.3.3. Нуклеарно-магнетно-резонанциони (^1H и ^{13}C) спектри S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса паладијума(II)

Хемијска померања воденикових и угљеникових атома добијених S-алкил деривата тиосалицилне киселине, као и одговарајућих комплекса паладијума(II), нађена су на очекиваним и скоро истим хемијским померањима. Уочене су само незнатне разлике у хемијским померањима угљеникових атома карбоксилних група S-аликил деривата тиосалицилне киселине (за S-бензил $167,5$; за S-метил $171,6$; S-етил $171,4$; S-пропил $171,6$; S-бутил $171,4$ ppm) и одговарајућих комплекса паладијума(II) ($171,5$; $171,8$; $172,0$; $172,5$; $171,9$ ppm). Овакве разлике у хемијским померањима карбоксилне групе могу се објаснити координовањем лиганата преко кисеониковог атома из карбоксилне група за паладијум(II)-јон (одељак 3.1.5. за лиганде и 3.2.8.-3.2.12. за комплексе).

На основу инфрацрвених и нуклеарно-магнетно резонанционих спектра добијених алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса паладијума(II) може се закључити да је дошло до бидентатног координовања S-алкил деривата за метални јон. На овај начин није се могла предвидети геометрија награђених паладијум(II) комплекса.

4.3.4. Кристална структура *bis*-(S-бензил- -тиосалицилато)паладијум(II) комплекса, [Pd(S-bz-thiosal)₂]

Рендгенска структурна анализа комплекса [Pd(S-bz-thiosal)₂] (**C8**), потврђује квадратно-планарну геометрију комплекса као што је приказано на Слици 19.



Слика 19. Структура комплекса [Pd(S-bz-thiosal)₂]

Као што се са Сlike 19 може видети два молекула S-бензил деривата тиосалицилне киселине координована су бидентатно за паладијум(II) јон преко сумпора и кисеоника као доносних атома. Рендгенска структурна анализа указује да они поседују *cis*-S-*cis*-O геометрију [147].

Одабране дужине и углови веза у [Pd(S-bz-thiosal)₂] комплексу дати су у Табели 11.

Табела 11. Дужине веза (Å) и углови веза (°) у молекулу [Pd(S-bz-thiosal)₂]

дужине веза		углови веза	
Pd(1)-O(2)	2,024(4)	O(2)-Pd(1)-O(4)	88,4(2)
Pd(1)-O(4)	2,034(4)	O(2)-Pd(1)-S(1)	89,84(14)
Pd(1)-S(1)	2,246(2)	O(4)-Pd(1)-S(1)	172,52(15)
Pd(1)-S(2)	2,254(2)	O(2)-Pd(1)-S(2)	172,77(14)
S(1)-C(3)	1,778(7)	O(4)-Pd(1)-S(2)	89,70(14)
S(1)-C(8)	1,829(7)	S(1)-Pd(1)-S(2)	92,94(7)
S(2)-C(17)	1,787(7)	C(3)-S(1)-C(8)	105,9(3)
S(2)-C(22)	1,830(7)	C(3)-S(1)-Pd(1)	100,0(2)
O(2)-C(1)	1,278(8)	C(8)-S(1)-Pd(1)	104,4(2)
O(4)-C(15)	1,279(8)	C(17)-S(2)-C(22)	105,9(3)
O(1)-C(1)	1,229(8)	C(17)-S(2)-Pd(1)	99,1(2)
O(3)-C(15)	1,235(8)	C(22)-S(2)-Pd(1)	105,7(2)
C(16)-C(15)	1,516(10)	C(1)-O(2)-Pd(1)	128,5(4)
C(2)-C(1)	1,518(9)	C(15)-O(4)-Pd(1)	127,5(5)
C(22)-C(23)	1,493(9)		
C(9)-C(8)	1,506(10)		

У Табели 12 дате су дужине и углови водоничних веза које стабилизују систем и утичу на начин паковања комплексних јединица у кристалу.

Табела 12. Дужине (Å), углови (°) као и диедарски углови интермолекулских и интрамолекулских водоничних веза у молекулу [Pd(S-bz-thiosal)₂]

	H...A (Å)	D...A(Å)	(°)		(°)
C(6)-H(6)···O(4) ^a		3,318(9)	125	Pd(1)-S(2)-C(22)-C(23)	-69,1(5)
C(11)-H(11)···O(2) ^b		3,414(9)	155	Pd(1)-S(1)-C(8)-C(9)	-52,0(5)
C(14)-H(14)···O(3) ^c		3,293(9)	156	Pd(1)-S(1)-C(3)-C(2)	-42,3(6)
C(20)-H(20)···O(1) ^b		3,305(9)	127	Pd(1)-S(2)-C(17)-C(16)	-40,5(6)
C(22)-H(22b)···O(3) ^d		3,380(9)	134	C(3)-C(2)-C(1)-O(2)	29,2(11)
C(24)-H(24)···O(3) ^d		3,471(9)	144	C(17)-C(16)-C(15)-O(4)	34,2(10)
C(25)-H(25)···O(1) ^c		3,388(9)	168		
C(27)-H(27)···O(1) ^a		3,223(10)	127		
C(4)-H(4)···π ^{d,g}	2,71	3,653(10)	174		
C(18)-H(18)···π ^{d,g}	2,71	3,617(10)	159		
C(22)-H(22a)···π ^{f,h}	2,87	3,778(10)	153		
π···π ^{d,h}		3,308(10)			

Симетријске операције за положаје одговарајућих атома:

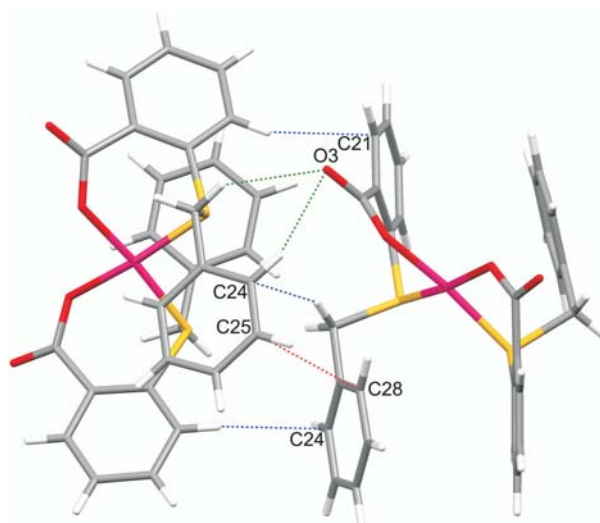
^a -x, -y+1, -z. ^b -x+1, -y+1, -z. ^c x, y,z+1. ^d x,-y+1/2, z+1/2.

^e -x,y-1/2, -z+1/2. ^f x,-y+1/2,z-1/2. ^g растојање најближих С атома

^h растојање од С до најближег С атома

Шесточлани прстенови укључујући паладијум(II)-јон заузимају полустоличасту конформацију. Такође, бензил и фенил групе нису паралелно оријентисане што условљава да молекул у целини није симетричан. Просторна оријентација бензил група није идентична, што се може закључити и на основу вредности диедарских углова, Pd(1)-S(1)-C(8)-C(9) и Pd(1)-S(2)-C(22)-C(23) (-52.0(5) и -69,1(5)) Табелу 12.

Као што се може видети из Табеле 12 уочене су слабе C-H...O интеракције и три C-H... π интеракције (Слика 20).



Слика 20. Два молекула комплекса са интермолекулским интеракцијама

4.3.5. Микробиолошка активност S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса паладијума(II)

Резултати *in vitro* испитивања антимикробне активности за пет нових бидентатних лиганата (L8-L12) и одговарајућих паладијум(II) комплекса (C8-C12)

приказани су у Табели 13. За извођење експеримената коришћен је растварач 10% диметилсулфоксид за који је најпре утврђено да не успорава раст испитиваних микроорганизама.

Интензитет антимикробне активности варира у зависности од врсте микроорганизама и типа испитиваног једињења. Активност комплексних једињења била је знатно виша у односу на одговарајуће лиганде ($p < 0,05$). МИК и ММК вредности за лиганде су биле у области од 15,68 до 1000 $\mu\text{g/mL}$, а за комплексе од 7,8 до 1000 $\mu\text{g/mL}$. Најбољу активност су показали (L10) и (L11) од лиганада и (C10) и (C11) од комплекса ($p < 0,05$).

Паладијум(II) комплекси су показали значајну антифунгалну активност. Најосетљивије врсте су биле *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* и *Aspergillus restrictus*. Активност комплекса је била боља од позитивне контроле флуконазола ($p < 0,5$). Концентрација паладијумових комплекса која успорава раст гљива из рода *Aspergillus* је од 7,8 до 500 $\mu\text{g/mL}$. Стандардни и клинички сој *Aspergillus niger* не показује уобичајену осетљивост, као што је претпостављено, а МИК вредности су биле од 250 до 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Табела 13).

Испитивана једињења нису показала утицај на раст квасца или је њихова активност била веома ниска. МИК и ММК вредности за квасце су биле од 500 до 1000 $\mu\text{g/mL}$, осим за комплексе (C10) и (C11) испитиване на *Rhodotorula sp.* где је МИК била од 250 до 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Сва испитивана једињења су показала слабу антибактеријску активност. Грам-позитивне бактерије су показале значајнију осетљивост у односу на Грам-негативне бактерије и то на испитиване комплексе. Највећу осетљивост показала је *Staphylococcus aureus* са вредностима МИК 125 $\mu\text{g/mL}$ за комплекс (C12). МИК вредности Грам-негативних бактерија биле су од 500 до 1000 $\mu\text{g/mL}$. Тестирани комплекси (C9) и (C10) су показали значајно већу антибактеријску активност на *Pseudomonas aeruginosa* АТСС 27853 (МИК = 250 $\mu\text{g/mL}$).

Пробиотици су показали сличну осетљивост. МИК вредности су биле од 250 до 1000 µg/mL, док су ММК вредности биле од 500 до 1000 µg/mL.

Табела 13. Резултати антибактеријске и антифунгалне активности бидентатних лиганада S-аликил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих паладијума(II) комплекса

	(L8)		(C8)		(L9)		(C9)		(L10)	
	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК
<i>B. anim. subsp. lactis</i>	500	500	500	1000	500	500	1000	1000	1000	1000
<i>B. subtilis</i> IP5832	500	500	500	500	500	500	500	500	1000	>1000
<i>L. plantarum</i>	500	1000	250	500	500	500	500	500	500	>1000
<i>L. rhamnosus</i>	>1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	500	1000	1000	1000
<i>S. lutea</i>	500	1000	250	500	1000	1000	500	500	500	>1000
<i>E. faecalis</i>	1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	500	500	>1000	>1000
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	1000	1000	500	500	1000	1000	500	1000	500	1000
<i>B. subtilis</i>	500	500	250	500	125	500	500	500	1000	>1000
<i>B. subtilis</i> ATCC6633	500	500	250	500	1000	1000	500	500	>1000	>1000
<i>S. aureus</i>	250	500	250	500	500	>1000	500	500	1000	>1000
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	500	1000	500	1000	1000	1000	500	1000	1000	1000
<i>E. coli</i>	>1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	500	500	1000	>1000
<i>E. coli</i> ATCC25922	1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	500	500	>1000	>1000
<i>P. aeruginosa</i>	1000	>1000	1000	1000	500	>1000	500	1000	1000	>1000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	500	>1000	500	1000	500	>1000	250	500	500	>1000
<i>P. mirabilis</i>	1000	>1000	500	1000	1000	>1000	500	1000	1000	>1000
<i>S. enterica</i>	1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	500	500	1000	>1000
<i>S. Typhimurium</i>	1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	500	1000	1000	1000
<i>C. albicans</i>	>1000	>1000	500	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<i>Rhodotorula sp.</i>	>1000	>1000	500	1000	500	1000	500	1000	500	1000
<i>S. boulardii</i>	1000	>1000	500	1000	1000	>1000	1000	1000	1000	1000
<i>A. niger</i>	>1000	>1000	500	1000	500	500	500	1000	500	1000
<i>A. niger</i> ATCC16404	>1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	1000	1000	1000	>1000
<i>A. restrictus</i>	500	>1000	125	250	500	1000	500	1000	500	1000
<i>A. fumigatus</i>	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	250	<7,8	16,68	15,68	15,68
<i>A. flavus</i>	31,25	250	<7,8	<7,8	1000	1000	15,7	15,68	125	125

Табела 13. Резултати антибактеријске и антифунгалне активности бидентатних лиганада S-аликил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих паладијума(II) комплекса (наставак)

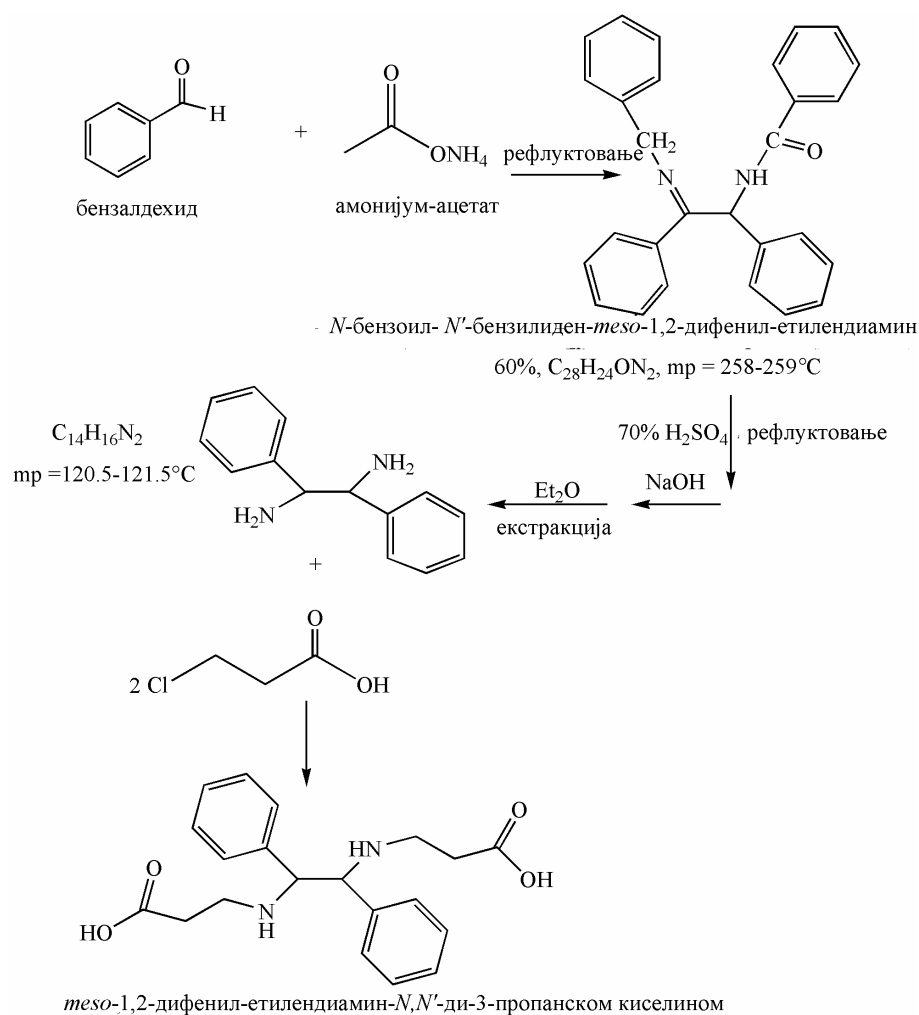
	(C10)		(L11)		(C11)		(L12)		(C12)		ДОКСИЦИЛИН /ФЛУКОНАЗОЛ	
	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК
<i>B. anim. subsp. lactis</i>	500	500	500	1000	250	500	1000	1000	500	1000	31,25	62,5
<i>B. subtilis</i> IP5832	250	500	500	500	250	250	1000	>1000	250	500	1,953	15,63
<i>L. plantarum</i>	250	500	250	>1000	250	500	1000	>1000	500	500	0,448	7,81
<i>L. rhamnosus</i>	500	500	1000	>1000	500	>1000	>1000	>1000	1000	1000	7,81	31,25
<i>S. lutea</i>	250	250	500	>1000	250	250	1000	>1000	250	500	<0,448	3,75
<i>E. faecalis</i>	500	500	1000	>1000	500	500	>1000	>1000	1000	1000	7,81	62,5
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	250	500	500	1000	250	500	1000	1000	500	1000	7,81	62,5
<i>B. subtilis</i>	250	250	500	1000	250	250	1000	>1000	250	500	0,112	1,953
<i>B. subtilis</i> ATCC6633	250	250	1000	>1000	250	250	1000	>1000	250	500	1,953	31,25
<i>S. aureus</i>	250	250	250	1000	250	250	1000	>1000	125	500	0,448	7,81
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	500	500	500	1000	500	500	>1000	>1000	500	500	0,224	3,75
<i>E. coli</i>	500	500	1000	>1000	500	500	>1000	>1000	1000	1000	7,81	15,63
<i>E. coli</i> ATCC25922	500	500	1000	>1000	500	500	>1000	>1000	1000	1000	15,625	31,25
<i>P. aeruginosa</i>	500	500	500	>1000	500	1000	1000	>1000	1000	1000	250	>250
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	250	500	500	>1000	500	1000	500	>1000	500	1000	62,5	125
<i>P. mirabilis</i>	500	500	1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	500	1000	250	>250
<i>S. enterica</i>	500	500	1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	1000	1000	15,625	31,25
<i>S. Typhimurium</i>	500	500	1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	1000	1000	15,625	125
<i>C. albicans</i>	500	1000	1000	1000	500	1000	1000	1000	500	1000	62,5	1000
<i>Rhodotorula sp.</i>	250	500	1000	1000	250	500	500	1000	500	1000	62,5	1000
<i>S. boulardii</i>	500	1000	1000	1000	500	1000	500	1000	500	1000	31,25	1000
<i>A. niger</i>	500	1000	500	1000	250	500	1000	>1000	250	500	500	1000
<i>A. niger</i> ATCC16404	500	1000	500	1000	500	500	1000	1000	500	1000	62,5	62,5
<i>A. restrictus</i>	125	250	500	1000	31,3	125	250	250	31,3	250	500	2000
<i>A. fumigatus</i>	<7,8	<7,8	15,68	125	<7,8	<7,8	62,5	62,5	31,3	31,25	500	1000
<i>A. flavus</i>	62,5	500	125	500	62,5	62,5	125	1000	125	250	1000	1000

МИК-минимална инхибиторна концентрација (µg/mL); ММК- минимална микробицидна концентрација (µg/mL).
Антибиотик-доксацилин; Антимикотик-флуконазол

4.4. Палاديјум(II) и платина(IV) комплекси са *meso*-1,2- -дифенил-етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропанском киселином

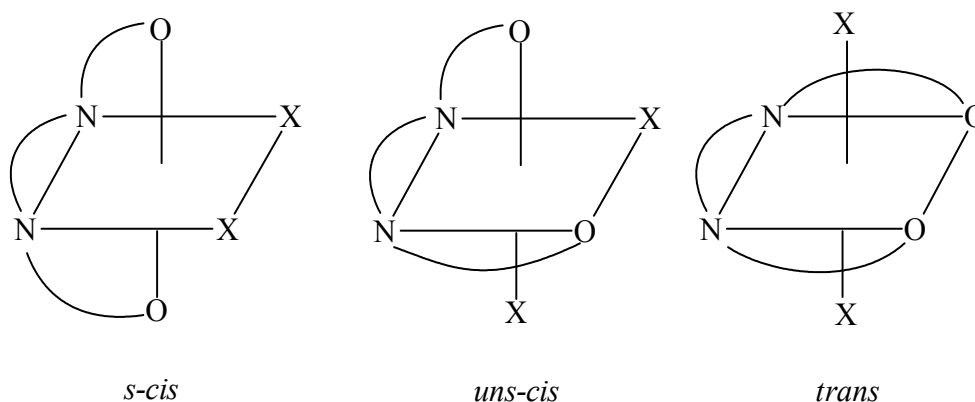
4.4.1. Синтеза лиганда и комплекса

Тетрадентни лиганд *edda* типа, *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропанска киселина (**L13**) добијен је директном реакцијом између *meso*-1,2-дифенил-етилендиамина и 3-хлор-пропанске киселине у молском односу 1:2 као што се може видети на Шеми 16.



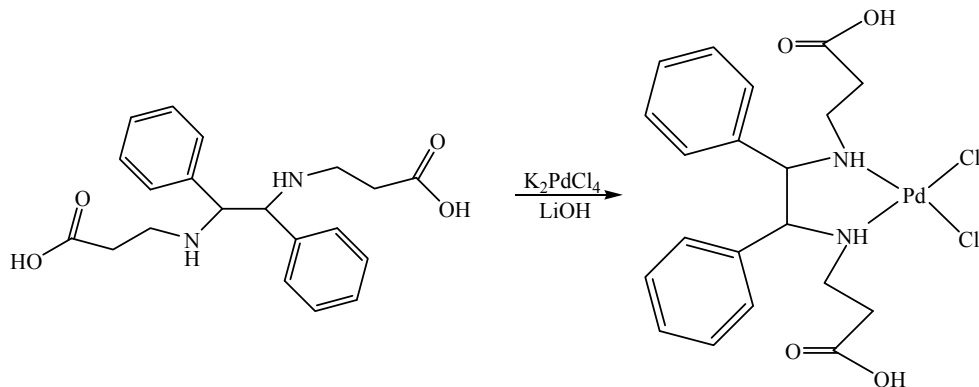
Шема 16. Синтеза лиганда H_2 -1,2-*dpheddp*·2HCl· H_2O

Код комплекса платине(IV) са тетрадентатним лигандима edda типа и два монодентатна лиганда могућа су три геометријска изомера: *s-cis*, *uns-cis* и *trans* (Слика 21).



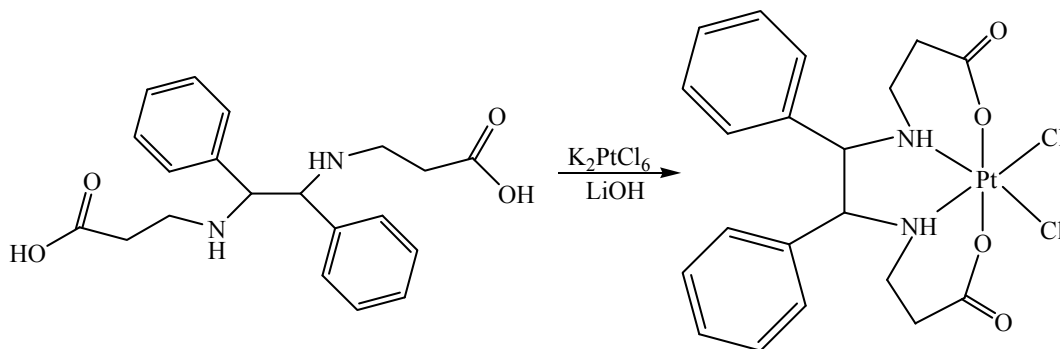
Слика 21. Теоријски могући геометријски изомери октаедарских комплекса са тетрадентатним лигандима edda типа и два монодентатна лиганда

Наведени лиганд *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропанска киселина употребљен је и за синтезу одговарајућег паладијум(II) комплекса, као што је приказано на Шеми 17 и то директном реакцијом калијум-тетрахлоридопаладата(II) и *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропанске киселине у молском односу 1:1 у присуству воденог раствора литијум-хидроксида. Синтетисан је квадратно-планарни *cis*-дихлоридо-(*meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-*N,N'*-ди-пропаноато)паладијум(II) комплекс (**C13**) (Шема 17).



Шема 17. Синтеза комплекса *cis*-[PdCl₂(1,2-dpheddp)]

У овом раду *s-cis*-дихлоридо-(*meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропаноато)платина(IV) комплекс (C14) добијен је директном реакцијом калијум-хексахлоридоплатината(IV) и *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропанске киселине у молском односу 1:1 уз додатак воденог раствора литијум-хидроксида. Наведена реакција може се приказати следећом реакционом Шемом 18.



Шема 18. Синтеза комплекса *s-cis*-[PtCl₂(1,2-*dpheddp*)]

Добијени комплекси паладијума(II) и платине(IV) показали су врло слабу растворљивост у води и у већини органских растварача.

4.4.2. Инфрацрвени спектри *meso*-1,2- -дифенил-етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропанске киселине и одговарајућих комплекса паладијума(II) и платине(IV)

Као што је описано у ранијим радовима где је централни метални јон везан за аминокиселину [148,149] асиметричне валенционе вибрације карбоксилних

група петочланих прстенова [148] леже на вишим енергијама од одговарајућих фреквенција шесточланих хелатних прстенова [149]. Касније су Нил и Рос (Neal и Rose) [150] и Даглас и сарадници [151,152], који су синтетисали комплекс са хексадентатним лигандима и смешом петочланих и шесточланих прстенова као што су *trans*-(O₅)-[M(*S,S*)-edds)]⁻ (M = Co(III) или Cr(III); (*S,S*)-edds = (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-дићилибарна киселина) [150-152], показали да постоје две веома јаке и добро раздвојене траке у области асиметричних валенционих вибрација карбоксилних група. Ове траке COO група припадају карбонилним валенционим вибрацијама у оквиру петочланог прстена на вишим енергијама, док су за шесточлани прстен на нижим енергијама.

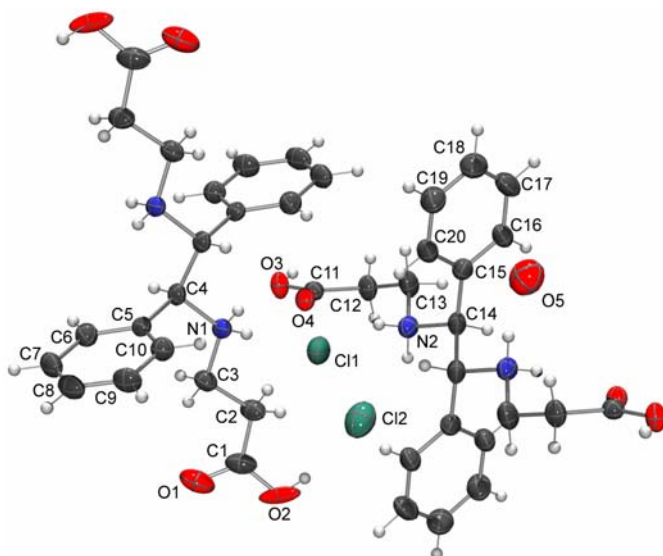
Иzolовани комплекси платине(IV) и паладијума(II) показују асиметричне валенционе вибрације C=O групе у области (1618 cm⁻¹ и 1610 cm⁻¹ за комплекс платине(IV) и на 1643 cm⁻¹ и 1580 cm⁻¹ у комплексу паладијума(II) као што је приказано у Табели 14). Поменути дублети леже на нешто нижим енергијама од одговарајућих трака петочланих хелатних прстенова [149,151]. Одсуство апсорпционе траке између 1700-1750 cm⁻¹ указује на то да је координовање H₂-1,2-dpheddp лиганда извршено преко обе карбоксилне групе за платина(IV)-јон. Добијени лиганд, *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропанска киселина у инфрарцвеном спектру показује апсорпционе траке асиметричних валенционих вибрација C=O групе у области између 1700-1750 cm⁻¹ (1754 cm⁻¹ и 1732 cm⁻¹, Табела 14). Две вредности апсорпционих трака указују на мале разлике у енергијама присутних карбоксилних група.

Табела 14. Најважније апсорпционе траке у инфрацрвеним спектрима неких комплексних једињења са линеарним О-Н-Н-О лигандима

једињење	$\nu_{\text{as}}(\text{COOH})$	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$	референца
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (H ₂ -edta)]	1775; 1764	1691; 1678	[153]
<i>uns-cis</i> -[PtCl ₂ (H ₂ -edta)]	1758; 1742	1692; 1685	[153]
<i>cis</i> -[PtCl ₂ (H ₂ -edta)]	1753; 1741	1725; 1716	[153]
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (eddp)]·H ₂ O	-	1637; 1630	[154]
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (1,3-pdda)]·H ₂ O	-	1696; 1660	[155]
<i>trans</i> -[PtBr ₂ (pdda)]·H ₂ O	-	1684; 1648	[156]
<i>s-cis</i> -[PtCl ₂ (1,2-dpheddp)]	-	1618; 1610	овај рад
H ₂ -1,2-dpheddp	1754; 1732	-	овај рад
<i>cis</i> -[PdCl ₂ (1,2-dpheddp)]	-	1643; 1580	овај рад

4.4.3. Кристална структура *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропанске киселине дихлорхидрата монохидрата, H₂-1,2-dpheddp·2HCl·H₂O

Резултати рендгенске структурне анализе потврђују да је изоловано једињење *meso*-1,2-дифенил-етилендиами-*N,N'*-ди-3-пропанска киселина кристалисало у претпостављеној *meso* оријентацији фенил група као дихлорхидрат монохидрат. Као што се може видети на Слици 22, кристална јединица се састоји од два независна молекула са делимично различитим конформацијама.



Слика 22. Кристална структура молекула *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-
-*N,N'*-ди-3-пропанске киселине дихлорхидрата монохидрата,
 $H_2-1,2-dpheddp \cdot 2HCl \cdot H_2O$

Неке дужине и углови веза у лиганду $H_2-1,2-dpheddp \cdot 2HCl \cdot H_2O$ дати су у Табели 15.

Табела 15. Дужине веза (Å) и углови веза (°) у $\text{H}_2\text{-1,2-dpheddr}\cdot 2\text{HCl}\cdot \text{H}_2\text{O}$

дужине веза		углови веза	
O(1)-C(1)	1,207(12)	O(1)-C(1)-C(2)	122,8(9)
O(2a)-C(1)	1,307(17)	O(2a)-C(1)-O(1)	125(3)
O(2b)-C(1)	1,306(17)	O(2a)-C(1)-C(2)	112(2)
O(3)-C(11)	1,234(8)	O(2b)-C(1)-O(1)	118(2)
O(4)-C(11)	1,270(8)	O(2b)-C(1)-C(2)	119(3)
N(1)-C(4)	1,498(8)	O(3)-C(11)-C(12)	120,0(6)
N(1)-C(3)	1,472(9)	O(3)-C(11)-O(4)	124,2(6)
N(2)-C(13)	1,494(11)	O(4)-C(11)-C(12)	115,8(6)
N(2)-C(14)	1,507(9)	N(1)-C(3)-C(2)	110,6(6)
C(1)-C(2)	1,482(12)	N(1)-C(4)-C(5)	110,5(5)
C(2)-C(3)	1,506(11)	N(2)-C(14)-C(15)	112,3(6)
C(4)-C(5)	1,499(10)	N(2)-C(13)-C(12)	114,6(6)
C(5)-C(6)	1,368(10)	C(4)-N(1)-C(3)	115,2(5)
C(5)-C(10)	1,397(10)	C(14)-N(2)-C(13)	110,0(6)
C(6)-C(7)	1,391(11)	C(1)-C(2)-C(3)	114,4(7)
C(8)-C(7)	1,372(13)	C(4)-C(5)-C(6)	121,6(6)
C(8)-C(9)	1,332(13)	C(4)-C(5)-C(10)	119,3(6)
C(9)-C(10)	1,401(12)	C(5)-C(6)-C(7)	120,2(7)
C(11)-C(12)	1,498(10)	C(5)-C(10)-C(9)	119,7(8)
C(12)-C(13)	1,510(10)	C(6)-C(7)-C(8)	119,7(8)
C(14)-C(15)	1,510(11)	C(8)-C(8)-C(9)	121,4(8)
C(15)-C(16)	1,380(11)	C(8)-C(9)-C(10)	120,0(8)
C(15)-C(20)	1,396(11)	C(6)-C(5)-C(10)	119,1(7)
C(16)-C(17)	1,377(12)	C(11)-C(12)-C(13)	114,6(6)
C(17)-C(18)	1,368(14)	C(14)-C(15)-C(16)	118,3(7)
C(18)-C(19)	1,377(15)	C(14)-C(15)-C(20)	119,0(7)
C(19)-C(20)	1,352(12)	C(15)-C(20)-C(19)	120,3(8)
		C(15)-C(16)-C(17)	119,7(8)
		C(16)-C(17)-C(18)	120,9(9)
		C(16)-C(15)-C(20)	119,0(7)
		C(17)-C(18)-C(19)	119,2(8)
		C(18)-C(19)-C(20)	120,9(9)

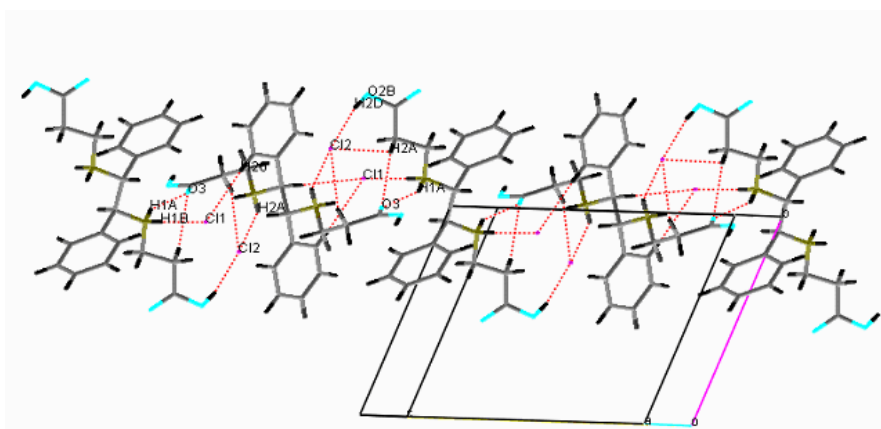
У Табели 16 дате су дужине и углови водоничних веза које су одговорне за конформације молекула и начин паковања молекула.

Табела 16. Дужине (Å) и углови (°) водоничних веза у молекулу $H_2-1,2-dpheddp \cdot 2HCl \cdot H_2O$

D-H...A (Å)	D-H	H...A	D...A	D-H...A
N(2)-H(2b)···O(3) ⁱ	0,90	2,16	2,750(8)	122
N(1)-H(1a)···O(3) ⁱ	0,90	2,00	2,786(8)	145
C(2)-H(22a)···O(3) ⁱ	0,97	2,52	3,176(10)	125
N(1)-H(1a)···O(4) ⁱⁱ	0,90	2,56	3,111(9)	120
C(13)-H(13b)···O(1) ⁱⁱⁱ	0,97	2,46	3,076(11)	121
C(13)-H(13a)···O(5) ⁱ	0,97	2,45	3,415(16)	174
O(2a)-H(2c)···O(5) ^{iv}	0,82	2,06	2,72(3)	137
O(2b)-H(2d)···C1(2) ⁱ	0,82	2,24	3,05(5)	168
N(1)-H(1b)···C1(2) ⁱ	0,90	2,20	3,089(7)	169
N(2)-H(2a)···C1(2) ⁱ	0,90	2,33	3,137(8)	148
C(20)-H(20)···Cl(1) ⁱ	0,93	2,73	3,651(10)	169
C(2)-H(22a)···Cl(2) ⁱ	0,97	2,75	3,324(9)	118

Симетричне операције за положаје одговарајућих атома:
⁽ⁱ⁾ x, y, z; ⁽ⁱⁱ⁾ -x+1, -y+2, -z+2; ⁽ⁱⁱⁱ⁾ x, +y+1, +z; ^(iv) x, +y-1, +z.

На Слици 23 приказан је начин паковања $H_2-1,2-dpheddp \cdot 2HCl \cdot H_2O$.



Слика 23. Начин паковања молекула $H_2-1,2-dpheddp \cdot 2HCl \cdot H_2O$

4.4.4. Микробиолошка активност *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин- -*N,N'*-ди-3-пропанске киселине дихлорхидрата монохидрата и одговарајућих комплекса паладијума(II) и платине(IV)

Резултати *in vitro* испитивања антибактеријског и антифунгалног дејства лиганда $H_2-1,2-dpheddr \cdot 2HCl \cdot H_2O$ и одговарајућих комплекса паладијума(II) и платине(IV) као и МИК и ММК вредности доксицилина и флуконазола ради поређења приказани су у Табели 17.

Као и у претходним резултатима и у овом сличају интензитет активности испитиваних једињења је зависио од врсте микроорганизама, и од типа испитиваног једињења. Углавном је активност комплекса била виша у односу на лиганд, а посебно је примећена висока активност паладијум(II) комплекса. Такође, комплекси платине(IV) и паладијума(II) показују знатно већи утицај на успоравање раста бактерија него раста гљива.

Паладијум(II) комплекс показује знатно вишу антибактеријску активност (Табела 16) што се може видети на основу вредности МИК, која је била у опсегу од 15,63 до 500 $\mu g/mL$, док је ММК вредност била од 125 до 1000 $\mu g/mL$ у зависности од врсте испитиване бактерије. Грам-позитивне бактерије су показале знатно већу осетљивост од Грам-негативних бактерија са вредностима МИК у опсегу од 31,25 до 62,5 $\mu g/mL$. Занимљиво је да испитивани комплекси поседују велику антибактеријску активност на *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (МИК = 15,63 $\mu g/mL$). Комплекс паладијума(II) показује веома слабу антифунгалну активност осим на *Aspergillus niger* (МИК = 31,25 $\mu g/mL$). Тестирани лиганд $H_2-1,2-dpheddr \cdot 2HCl \cdot H_2O$ и одговарајући комплекси паладијума(II) и платине(IV) су показали слабу антимикуробну активност. МИК вредности су биле у опсегу од 125 до 1000 $\mu g/mL$, док су вредности ММК биле у опсегу од 500 до 1000 $\mu g/mL$. Коришћене концентрације испитиваних једињења нису показале утицај на раст клиничких изолата: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteric*, *Candida albicans* и *Aspergillus flavus*.

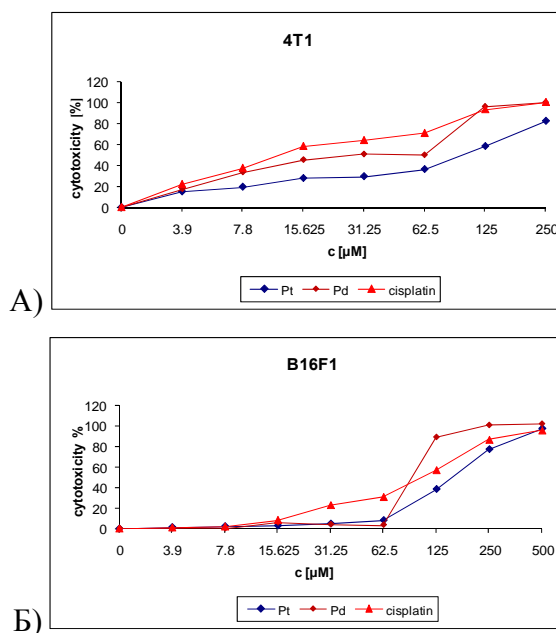
Табела 17. Резултати антибактеријске и антифунгалне активности испитиваног лиганда $H_2-1,2-dpheddp \cdot 2HCl \cdot H_2O$ и одговарајућих комплекса паладијума(II) и платине(IV)

	(L13)		паладијум(II) комплекс		платина(IV) комплекс		доксацилин	флуконазол
	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК/ММК	МИК/ММК
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>1000	>1000	500	1000	500	1000	7,81/15,625	/
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	250	>1000	15.63	500	125	500	62,5/125	/
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	500	>1000	31.25	500	250	500	0,224/3,75	/
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	500	>1000	62.5	500	125	500	< 0,448/7,81	/
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	500	>1000	62.5	500	250	500	1,953/31,25	/
<i>Enter. faecalis</i> ATCC 29212	500	>1000	31.25	500	250	500	7,81/62,5	/
<i>B. pumilus</i> NCTC 8241	>1000	>1000	62.5	500	250	500	0,112/7,81	/
<i>E. coli</i>	>1000	>1000	250	500	>1000	>1000	7,81/15,625	/
<i>P. aeruginosa</i>	500	>1000	500	1000	500	1000	250/>250	/
<i>S. aureus</i>	>1000	>1000	250	500	>1000	>1000	0,448/7,81	/
<i>Sarcina lutea</i>	500	>1000	62.5	500	250	500	< 0,448/3,75	/
<i>B. subtilis</i>	500	>1000	31.25	500	250	>1000	0,112/1,953	/
<i>E. faecalis</i>	>1000	>1000	250	500	>1000	>1000	7,81/62,5	/
<i>Proteus mirabilis</i>	>1000	>1000	500	500	>1000	>1000	250/>250	/
<i>S. enterica</i>	>1000	>1000	250	500	>1000	>1000	15,625/31,25	/
<i>B. animalis subsp. lactis</i>	>1000	>1000	31.25	125	250	500	31,25/62,5	/
<i>L. plantarum</i>	500	>1000	125	500	250	500	0,448/7,81	/
<i>B. subtilis</i> IP 5832	500	>1000	250	500	250	500	1,953/15,625	/
<i>S. boulardii</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	/	31,25/1000
<i>C. albicans</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	/	62,5/1000
<i>R. sp.</i>	1000	1000	500	1000	1000	1000	/	62,5/1000
<i>A. niger</i>	125	>1000	31.25	1000	125	>1000	/	500/1000
<i>A. restrictus</i>	250	250	500	500	1000	1000	/	500/2000
<i>A. fumigatus</i>	1000	1000	1000	1000	500	1000	/	500/1000
<i>A. flavus</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	/	1000/1000

МИК-минимална инхибиторна концентрација ($\mu\text{g/mL}$); ММК- минимална микробицидна концентрација ($\mu\text{g/mL}$).
Антибиотик-доксацилин; Антимикотик-флуконазол

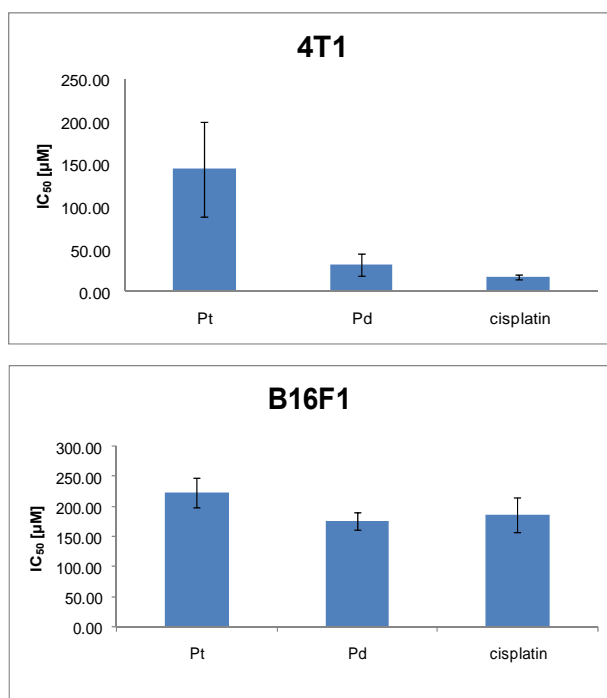
4.4.5. *In vitro* антитуморска активност комплекса *cis*-[PdCl₂(1,2-dpheddp)] и *s-cis*-[PtCl₂(1,2-dpheddp)]

In vitro антитуморска активност комплекса *cis*-[PdCl₂(1,2-dpheddp)] и *s-cis*-[PtCl₂(1,2-dpheddp)] испитивана је на ћелијским линијама мишијег тумора дојке (4T1) и мишијег малигног меланома (B16F1). Цитотоксичност комплекса је одређиван МТТ тестом. На Слици 24 приказана је антитуморска активност комплекса у поређењу са цисплатином. Као што се може са слике видети комплекс паладијума(II) показује вишу антитуморску активност на обе ћелијске линије у односу на активност комплекса платине(IV). Међутим, у поређењу са антитуморском активношћу цисплатине оба испитивана једињења показују нижу активност, осим комплекса паладијума(II) при концентрацијама вишим од 62,5 μМ и то на ћелијама B16F1.



Слика 24. *In vitro* антитуморска активност комплекса *cis*-[PdCl₂(1,2-dpheddp)] и *s-cis*-[PtCl₂(1,2-dpheddp)]. А) 4T1, Б) B16F1 ћелијске линије су инкубиране 72 сата са различитим концентрацијама комплекса.

Стандардне девијације IC_{50} вредности испитиваних једињења за В16F1 ћелијску линију износе за комплекс $cis-[PdCl_2(1,2-dpheddp)]$ $157,51 \pm 14,09$; за $s-cis-[PtCl_2(1,2-dpheddp)]$ $223,38 \pm 25,12$ и за цисплатину $186,63 \pm 55,3$ (Слика 25). Комплекс паладијума(II) показује значајно вишу активност на ћелијама 4T1 ($IC_{50} = 17,34 \pm 2,25$) у поређењу са комплексом платине(IV) ($IC_{50} = 144,69 \pm 55,3$).



Слика 25. IC_{50} вредности $cis-[PdCl_2(1,2-dpheddp)]$ и $s-cis-[PtCl_2(1,2-dpheddp)]$

5. ЗАКЉУЧАК

У овој Докторској дисертацији описане су синтезе:

- Етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-пропанске киселине, ($H_2-(S,S)$ -eddp),
- *O,O'*-диалкил естара етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-пропанске киселине дихлорхидрата, ($R_2-(S,S)$ -eddp·2HCl), (R = пропил-, бутил-, пентил-)
- Одговарајућих паладијум(II) комплекса са наведеним *O,O'*-диалкил естрима ($H_2-(S,S)$ -eddp) киселине
- Етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-(3-метил)-бутанске киселине, ($H_2-(S,S)$ -eddv)
- *O,O'*-диалкил естара етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-(3-метил)-бутанске киселине дихлорхидрата, ($R_2-(S,S)$ -eddv·2HCl) (R = етил-, пропил-, бутил-, пентил-)
- Одговарајућих паладијум(II) комплекса са наведеним *O,O'*-диалкил естрима $H_2-(S,S)$ -eddv киселине
- S-алкил деривата тиосалицилне киселине (алкил = бензил-, метил-, етил-, пропил-, бутил-)
- Одговарајућих паладијум(II) комплекса са наведеним S-алкил дериватима тиосалицилне киселине
- *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропанске киселине
- Одговарајућих паладијум(II) и платина(IV) комплекса са наведеним тетраденатним лигандом *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропанском киселином

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

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

Анализом IR спектра утврђено је да се *O,O'*-диалкил естри етилендиамин-*-N,N'*-ди-(*S,S*)-2-пропанске киселине (R_2 -(*S,S*)-eddp) координују за паладијум(II)-јон бидентатно преко два азотова атома из диаминског ланца лиганата, док се *O,O'*-диалкил естри етилендиамин-*-N,N'*-ди-(*S,S*)-2-(3-метил)-бутанске киселине R_2 -(*S,S*)-eddv координују тридентатно, преко азотових атома диаминског ланца и преко једног кисеониковог атома из хидролизоване естарске групе. Координација бидентатних лиганата *S*-алкил деривата тиосалицилне киселине извршена је преко донорских атома сумпора из тиолне групе и преко атома кисеоника из карбоксилатног дела.

- Број, положај и изглед сигнала у ^1H и ^{13}C NMR спектрима потврђују структуру полазних лиганата и добијених одговарајућих паладијум(II) комплекса.
- Рендгенске структурне анализе потврђују да је лиганд *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-*-N,N'*-ди-3-пропанска киселина кристалисао као дихлорхидрат монохидрат, H_2 -1,2-dpheddp \cdot 2HCl \cdot H $_2$ O. Такође, рендгенска структурна анализа [PdCl(et-(*S,S*)-eddv)] комплекса је потврдила претпостављену структуру на бази анализе инфрацрвених и NMR спектра, односно да је комплекс [PdCl(et-(*S,S*)-eddv)] награђен тридентатним координовањем *O,O'*-диетил естара етилендиамин-*-N,N'*-ди-(*S,S*)-2-(3-метил)-бутанске киселине. Исто тако рендгенска структурна анализа комплекса [Pd(S-bz-thiosal) $_2$] је потврдила бидентатно координовање *S*-бензил-тиосалицилне киселине преко атома сумпора и атома кисеоника.
- Испитивањем антимицробне активности свих награђених лиганата и одговарајућих комплекса паладијума(II) уврђено је да су комплекси показивали знатно вишу активност у односу на одговарајуће лиганде.
- Испитивањем антитуморске активности комплекса паладијума(II) и платине(IV) са тетрадентатним лигандом *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-

-*N,N'*-ди-3-пропанском киселином на ћелијама 4T1 и B16F1 закључено је да комплекс паладијума(II) показује вишу антитуморску активност у поређењу са комплексом платине(IV) на обе ћелијске линије. Међутим, такође потврђено је да је антитуморска активност на наведеним ћелијским линијама тумора знатно нижа у односу на антитуморску активност цисплатине.

Резултати ове *Докторске дисертације* су верификовани објављивањем резултата испитивања у три научна рада у часописима са SCI листе, једне монографске студије/поглавље у књизи, три научна рада послатих на рецензију и већег броја саопштења на домаћим и међународним конференцијама.

6. ЛИТЕРАТУРА

- [1a] T. J. Sabo, S. R. Grgurić-Šipka, S. R. Trifunović, *Synth. React. Inorg. Met.-org. Chem.* **32** (2002) 1661
- [1b] D. J. Radanović, *Coord. Chem. Rev.* **54** (1984) 159
- [2] F. C. Bersworth, British Patent 723, 316 (1955)
- [3] D. B. Haydock, T. P. C. Mulholland, *J. Chem. Soc. C* (197) 2389
- [4] A. Kumar Chhakkar, L. Rai Kakkar, Fresenius, *J. Anal. Chem.* **347** (1993) 483
- [5] G. R. E. C. Gregory, P. G. Jeffery, *Analyst.* **92** (1967) 293
- [6] M. J. Gismera, J. R. Procopio, M. Teresa-Sevilla, L. Hernandez, *Electroanalysis* **15** (2003) 126
- [7] M. Aydin, N. Arsu, Y. Yagci, *Macromol, Rapid. Commun.* **24** (2003) 718
- [8] D. Shander, G. Ahluwalia, D. Grosso, US Patent 5411991
- [9] H. Jacobelli, US Patent 20050267095
- [10] J. Halaschek-Wiener, Y. Kloog, V. Wacheck, B. Jansen, *J. Invest. Dermat.* **120** (2003) 109
- [11] I. Sadao, S. Fujio, M. Eiichi, K. Keita, Kokai Tokkyo Koho, 2000, pp. 127
- [12] J. D. Smith, *J. Org. Chem.* **76** (6) (2011) 1513
- [13] H. V. Huynh, *Organometallic* **29** (6) (2010) 1479
- [14] J. Nakayama, T. Fujita, M. Hoshino, *Chem. Lett.* **11** (1982) 1777
- [15] J. J. Donleavy, J. English Jr, *J. Am. Chem. Soc.* **62** (1940) 220
- [16] M. Kalpun, M. Sandström, D. Boström, A. Shchukarev. P. Peresson, *Inorg. Chim. Acta* **358** (2005) 527
- [17] D. J. Robinson, C. H. L. Kennard, *J. Chem. Soc. A* (1970) 1008
- [18] X.-M. Luo, X.-H. Chen, S. Shanmuga Sundara Raj, H.-K. Fun, L.-G. Zhu, *Acta Crystallogr. Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* **55** (1999) 1220
- [19] S. Baggio, L. M. Amzel, L. N. Becka, *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.* **26** (1970) 1968
- [20] J. R. Wiesner, E. C. Lingafelter, *Inorg. Chem.* **5** (1966) 1770

- [21] I. A. Baidina, N. V. Podberezskaya, V. V. Bakakin, E. V. Golubovskaya, N. A. Shestakova, G. D. Malchikov, *J. Struct. Vhem.* **20** (1979) 463
- [22] I. A. Baidina, N. V. Podberezskaya, S. V. Borisov, *J. Struct. Chem.* **21** (1980) 659
- [23] V. Z. Pletnev, Yu. A. Zolotarev, N. M. Galitskii, A. I. Verenich, *J. Struct. Chem.* **33** (1992) 98
- [24] G. N. Kaluđerović, H. Schmidt, Ch. Wagner, K. Merzweiler, D. Steinborn, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **72** (2007) 560
- [25] A. L. Spek, *J. Appl. Crystallogr.* **36** (2003) 7
- [26] D. Cremer, J. A. Pople, *J. Am. Chem. Soc.* **97** (1975) 1354
- [27] D. Cremer: *Acta Crystallogr. Sect. B: Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.* **40** (1984) 498
- [28] G. N. Kaluđerović, H. Schmidt, S. Schwieger, Ch. Wagner, R. Paschke, A. Dietrich, T. Mueller, D. Steinborn, *Inorg. Chim. Acta.* **361** (2008) 1395
- [29] M. Peyrone, *Ann. Chem. Pharm.* **51** (1845) 1
- [30] B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, *Nature* **205** (1965) 698
- [31] B. Rosenberg, L. Van Camp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, *Nature* **222** (1969) 385
- [32] M. Tucker, C. Colvin, D. Martin, Jr. *Inorg. Chem.* **3** (1964) 1373
- [33] B. Rosenberg, D. Tucket, *Cancer Res.* **42** (1982) 3565
- [34] I. Piel, D. Meyer, C. Perlia, V. Wolf, *Cancer Chemother. Rep.* pt 1. **58** (1974) 871
- [35] F. Cavelli, R. Sonntag, H. Ryssel, L. Tschopp, K. Brunner, *Schweiz. Med. Wochenschr.* **106** (1976) 754
- [36] C. Merrin, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* **17** (1976) 243
- [37] H. Brucker, C. Cohen, R. Wallach, B. Kabakow, G. Deppe, E. Greenspan, S. Gusberg, J. Holland, *Cancer Treat. Rep.* **62** (1978) 555
- [38] K. Briscoe, M. Pasmanteir, J. Brown, B. Kennedy, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* **19** (1978) 378
- [39] R. Yong, B. Chabner, S. Hubbard, R. Fischer, R. Bender, T. Anderson, V. De Vita, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* **19** (1978) 393
- [40] J. Hill, E. Loeb, A. MacLellan, N. Hill, A. Khan, *Cancer Chemother. Rep.* **59** (1975) 647

- [41] W. Hong, S. Shapshay, R. Bhutani, M. Craft, V. Alptekin, K. Yamaguchi, C. Vaughan, M. Strong, *Cancer Res.* **44** (1979) 26
- [42] M. Soloway, J. De Kernion, D. Rose, I. Persky, *Surg. Forum.* **13** (1973) 542
- [43] L. Kvols, R. Eagan, E. Creagan, R. Dalton, *Proc. Am. Assoc. Cancer. Res.* **19** (1978) 82
- [44] J. Reedijk, *Inorg. Chim. Acta* **198-200** (1992) 873
- [45] M. J. Bloemink, J. Reedijk in *Metal ions in biological systems*, ed. H. Sigel and A. Sigel, M. Dekker, New York, (1996) vol. 32, pp. 641-685
- [46] J. Reedijk, *Chem. Comm.* (1996) 801
- [47] T. W. Hambley, *Coord. Che. Rev.* **166** (1997) 181
- [48] T. G. Appleton, *Coord. Che. Rev.* **166** (1997) 313
- [49] B. K. Keppler, In: *Metal Complexes in Cancer Chemoterapy*, Ed. B. K. Keppler, VCH, Weinheim, Germany, 1993, p. 3.
- [50] M. Hartman, B. K. Keppler, *Comments Inorg. Chem.* **16** (1995) 339
- [51] M. H. Heim, In: *Metal Complexes in Cancer Chermotherapy*, Ed. B. K. Keppler, VCH, Wienheim, Germany, 1993, p. 16
- [52a] C. P. Saris, P. J. M. Van de Vaart, F. A. Blommert, R. Rietbroek, A. C. Begg, *Proceedings of 7th International Symposium on Platinum and other metal coordination compounds in Cancer Chermotherapy (ISPCC)*, Amsterdam, The netherlands, 1995, 042;
- [52b] F. Levi, D. Machover, M. Marty, E. Diaz-Rubio, A. De Gramont, C. Garufi, M. Itzhaki, E. Cvitkovic, S. Brienza, *ibid.*, 044.
- [53a] N. Farrell, *Transition Metal Complexes as Drugs and Chemotherapeutic Agents*, Kluwe Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands 1989, p. 57;
- [53b] N. Farrell, S. G. De Almeida, K. A. Skov, *J. Am. Chem. Soc.* **110** (1988) 5018
- [54] K. Kamisango, T. Matsumoto, K. Akamatsu, K. Morikawa, T. Tashiro, K. Koizumi, *Jap. J. Cancer. Res.* **83** (1992) 304
- [55] T. Matsumoto, K. Endoh, K. Akamatsu, K. Morikawa, T. Tashiro, K. Koizumi, K. Morikawa, M. Koizumi, T. Matsuno, *Br. J. Cancer* **64** (1991) 41

- [56] D. Lebwohl, R. Canetta, *Eur. J. Cancer* **33** (1998) 1522
- [57] D. P. Gately, S. B. Howell, *Br. J. Cancer* **67** (1993) 1171
- [58] G. Chu, *J. Biol. Chem.* **269** (1994) 787
- [59] K. Wang, J. Lu, R. Li, *Coord. Chem. Rev.* **151** (1996) 53
- [60] E. R. Jamieson, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **99** (1999) 2467
- [61] P. Jordan, M. Carmo-Fonseca, *Cell. Mol. Life Sci.* **57** (2000) 1299
- [62] S. E. Miller, D. A. House, *Inorg. Chim. Acta* **166** (1989) 189
- [63] T. G. Appleton, J. R. Hall, S. F. Ralph, C. S. M. Thompson, *Inorg. Chem.* **28** (1989) 1989
- [64] S. J. Berners-Price, T. A. Frenkiel, U. Frey, J. D. Ranford, P. J. Sadler, *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.* (1992) 789
- [65] S. E. Miller, D. A. House, *Inorg. Chim. Acta* **187** (1991) 125
- [66] R. P. Pérez, *Eur. J. Cancer* **34** (1998) 1535
- [67] E. L. M. Lempers, J. Reedijk, *Adv. Inorg. Chem.* **37** (1991) 175
- [68] J. L. Butour, S. Wimmer, F. Wimmer, P. Castan, *Chem. Biol. Inter.* **104** (1997) 165
- [69] J. Ruiz, J. Lorenzo, L. Sanglas, N. Cutillas, C. Vicente, M. D. Villa, F. X. Avilés, G. López, V. Moreno, J. Pérez, D. Bautista, *Inorg. Chem.* **45** (2006) 6347
- [70] C. Navarro-Ranninger, J. M. Pérez, F. Zamora, V. M. González, J. R. Masaguer, C. Alonso, *J. Inorg. Biochem.* **52** (1993) 37
- [71] S. Ray, R. Mohan, J. K. Singh, M.K. Samantaray, M.M. Shaikh, D. Panda, P. Ghosh, *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007) 15042
- [72] T. Storr, K. H. Thompson, C. Orvig, *Chem. Soc. Rev.* **35** (2006) 534
- [73] N. N. Stone, P. G. Stock, *Eur. Urol.* **41** (2002) 427
- [74] L. Potters, Y. Cao, E. Calugaru, T. Torre, P. Fearn, X. H. Wang, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **50** (2001) 605
- [75] E. Budzisz, B. K. Keppler, G. Giester, M. Woźniczka, A. Kufelnicki, B. Nawrot, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2004) 4412
- [76] E. Budzisz, U. Krajewska, M. Rozalski, *Pol. J. Pharmacol.* **56** (2004) 473

- [77] G. Zhao, H. Lin, P. Yu, H. Sun, S. Zhu, X. Su, Y. Chen, *J. Inorg. Biochem.* **73** (1999) 145-149
- [78] F. Huq, H. Tayyem, P. Beale, J. Q. Yu, *J. Inorg. Biochem.* **101** (2007) 30-35
- [79] L. Tušek-Božić, J. Matijašić, G. Bocelli, P. Sgarbotto, A. Furlani, V. Scarcia, A. Papaioannou, *Inorg. Chim. Acta* **185** (1991) 229
- [80] L. Tušek-Božić, J. Matijašić, G. Bocelli, G. Calestani, A. Furlani, V. Scarcia, A. Papaioannou, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1991) 195
- [81] T. A. K. Al-Allaf, L. J. Rahan, *Boll. Chim. Farm.* **140** (2001) 205
- [82] S. Grgurić-Šipka, M. A. A. M. Alshtewi, D. Jeremić, G. N. Kaluđerović, S. Gómez-Ruiz, Ž. Žižak, Z. Juranić, T. J. Sabo, *J. Serb. Chem. Soc.* **73** (2008) 619
- [83] S. Grguric-Šipka, C. R. Kowol, S. Valiahdi, R. Eichinger, M. A. Jakupec, A. Roller, S. Shova, V. B. Arion, B. K. Keppler, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2007) 2870
- [84] S. Gómez-Ruiz, G. N. Kaluđerović, S. Prashar, D. Polo-Cerón, M. Fajardo, Ž. Žižak, T. J. Sabo, Z. D. Juranić, *J. Inorg. Biochem.* **102** (2008) 1558
- [85] S. Gómez-Ruiz, G. N. Kaluđerović, D. Polo-Cerón, S. Prashar, M. Fajardo, Ž. Žižak, Z. D. Juranić, T. J. Sabo, *Inorg. Chem. Comm.* **10** (2007) 748
- [86] S. Gómez-Ruiz, G. N. Kaluđerović, S. Prashar, E. Hey-Hawkins, A. Erić, Ž. Žižak, Z. D. Juranić, *J. Inorg. Biochem.* **102** (2008) 2087
- [87] M. Gielen, E. R. T. Tiekink, in: M. Gielen, E. R. T. Tiekink (Eds.), *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: the use of metals in medicine*, John Wiley & Sons Ltd. (2005) 421
- [88] M. Auzias, B. Therrien, G. Suss-Fink, P. Štěpnička, W. Han Ang, P. J. Dyson, *Inorg. Chem.* **47** (2008) 578
- [89] B. Dutta, C. Sclaro, R. Scopelliti, P. J. Dyson, K. Severin, *Organometallics* **27** (2008) 1355
- [90] E. Budzisz, M. Malecka, B. K. Keppler, V. B. Arion, G. Andrijewski, U. Krajewska, M. Rozalski, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2007) 3728
- [91] A. Casini, Ch. Hartinger, Ch. Gabbiani, E. Mini, P. J. Dyson, B. K. Keppler, L. Messori, *J. Inorg. Biochem.* **102** (2008) 564

- [92] S. Y. Ho, E. R. T. Tiekink, in: M. Gielen, E. R. T. Tiekink (Eds.), *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: the use of metals in medicine*, John Wiley & Sons Ltd. (2005) 507
- [93] J. J. Liu, P. Galettis, A. Farr, L. Maharaj, H. Samarasingha, A. C. McGechan, B. C. Baguley, R. J. Bowen, S. J. Berners-Price, M. J. McKeage, *J. Inorg. Biochem.* **102** (2008) 303
- [94] J. Sikkema, J.A.M. de Bont, B. Poolman, *Microbiology Reviews* **59(2)** (1995) 201
- [95] S. P. Denyer, G. S. A. B. Stewart, *International Biodeterioration and Biodegradation* **41(3)** (1998) 261
- [96] M. Cristani, M. D'Arrigo, G. Mandalari, F. Castelli, M.G. Sarpietro, D. Micieli, V. Venuti, G. Bisignano, A. Saija, D Trombetta, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55(5)** (2007) 6300
- [97] G. J. Tortora, B. R. Funke, C. L. Case. *Microbiology: an introduction*. 7th ed. Pearson Education, San Francisco, CA 2002
- [98] M. Nevas, A. Korhonen, M. Lindstrom, P. Turkki, H. Korkeala, *Journal of Food Protection* **67(1)** (2004) 199
- [99] S. A. Burt, R. D. Reinders, *Letters in Applied Microbiology* **36(3)** (2004) 162
- [100] M. Madigan, J. Martinko, P. Dunlap, D. Clark 2009. *Brock Biology of Microorganisms* 12 ed., Pearson Education Inc., San Francisco, USA
- [101] W. E. Levinson, E. Jawetz. *Medical microbiology and immunology. Examination & Board Review. Second Edition*, Prentice Hall, London (1992)
- [102] P. R. Murray, G. S. Kobayashi, M. A. Pfaller, K. S. Rosenthal, *Medical Microbiology* 2nd ed. St. Louis: Mosby Year Book (1994).
- [103] W. Guerra, E. De Andrade Azevedo, A. R. de Souza Monteiro, M. Becciarelli-Rodriguz, E. Chartone-Souza, A.M. Amaral Nascimento, A.P. Soares Fontes, I. Le. Moyes, E.C. Pereira-Maia, *J. Inorg. Biochem.* **99** (2005) 2348
- [104] L. M. M. Vieira, M. V. de Almeida, M. C. S. Lourenco, F. A. F. M. Bezerra, A. P. S. Fontes, *European Journal of Medicinal Chemistry* **44** (2009) 4107
- [105] D. Kovala-Demertzi, m.A Demertzis, J. R. Miller, C. Papadopoulou, C. Dodorou, G. Filousis, *J. Inorg. Biochem.* **86** (2001) 555

- [106] R. R. Coombs, M. K. Ringer, J. M. Blacquire, J. C. Smith, J. S. Neilsen, Y.-S. Uh, J. B. Gilbert, L. J. Leger, H. Zhang, A. M. Irving, S. L. Wheaton, C. M. Vogels, S. A Westoctt, *Transition Metal Chem.* **30** (2005) 411
- [107] M. Ali, M. Aminul, R. Butcher, C. Karen, *Transition Met. Chem.* **31** (2006) 79
- [108] I. Kizilcikli, Y. D. Kurt, B. Akkurt, A.Y. Genel, S. Birteksöz, G. Ötük, B. Ülküseven, *Folia Mikrobiol.* **52** (2007) 15
- [109] N. M. Aghatabay, M. Somer, M. Senel, B. Dulger, F. Guçin, *Eur. J. Med. Chem.* **42** (2007) 1069
- [110] M. K. Biyala, K. Sharma, S. Swami, N. Fahmi, R. Vir Singh, *Tran. Met. Chem.* **33** (2008) 377
- [111] V. Climesova, J. Koci, M. Pour, J. J. Stachel, K. Waisser, J. Kaustova, *Eur. J. Pharm. Chem.* **37** (2002) 409
- [112] J. Valdez. R. Cedillo, A. Hernandez/Campos, L. Yepey, F. Hernandez-Luis, G. Navarrete-Vazquez, A. Tapia, R. Cortes, M. Hernandez, R. Castillo, *Bioorganic and Medicinal Chem. Letters* **12** (2002) 2221
- [113] T. C. Kühler, M. Swanson, B. Christenson, C.A. Klintonberg, B. Lamm, J. Fagerhag, G. Roberto, M. Ölwegard-Halvarsson, V. Shcherbuchin, T. Elebring, E. Sjöström, *J. Med. Chem.* **45** (2002) 4282
- [114] M. Andrzejewska, L. Yepez-mulia, A. Tapia, R. Cedillo-Rivera, A.E. Laudy, B.J. Starsciak, Z. Kazimierczuk, *Eur.J. Pharm. Chem.* **21** (2004) 323
- [115] M. Gökç, S. Utku, E. Berçin, B. Özçelik, T. Karaoğlu, N. Noyanalpan, *Turk. J. Chem.* **29** (2005) 207
- [116] K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordiantion Compounds*, New York (1986)
- [117] D. H. Busch, J. C. Bailar, *J. Am. Chem. Soc.* **75** (1953) 4574
- [118] M. L. Morris, D. H. Busch, *J. Am. Chem. Soc.* **78** (1956) 5178
- [119] V. V. Glodović, G. P. Radić, S. M. Stanić, F. W. Heinemann and S. R. Trifunović, *J. Serb. Chem. Soc.* **76** (2001) 995
- [120] Tri Pett, *S. J. Chem. Soc.* (1957) 4407

- [121] Oxford Diffraction, CrysAlis CCD and CrysAlis RED Versions 1.171.32.24. Oxford Diffraction Ltd., Abington, England, 2008
- [122] R. C. Clark and J. S. Reid, *Acta Cryst.* **A51** (1995) 887
- [123] SIR2002 - M.C. Burla, M. Camalli, B. Carrozzini, G.L. Cascarano, C. Giacovazzo, G. Polidori and R. Spagna. *J. Appl. Cryst.* **36** (2003) 1103
- [124] G. M. Sheldrick, *Acta Cryst.* **A64** (2008) 112
- [125] M. Nardelli. *Comput. Chem.* **7** (1983) 95
- [126] L. J. Farrugia. *J. Appl. Cryst.* **30** (1997) 565
- [127] SADABS 2.06, Bruker Axs. Ins. (2002), Madison, Wi, USA
- [128] SHELXTL NT 6.12, Bruker-Axs INC (2002) Madison, Wi, USA
- [129] M. C. Burla, M. Camalii, B. Carrozzini, G. L. Cascarano, C. Giacovazzo, G. Polidori, R. Spagna. *J. Appl. Crystallog.* **38** (2005) 381
- [130] G. M. Sheldrick, SADABS, University of Gottingen, Germany (1996)
- [131] J. M. Andrews, *J. Antimicrob Chemother.* **56** (2005) 60
- [132] S. D. Sarker, L. Naher, Y. Kumarasamy, *Methods* **42** (2007) 321
- [133] E. Banfi, G. Scialino, C. Monti-Bragadin, *J. Antimicrob. Chemother* **52** (2003) 796
- [134] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **65(1,2)** (1983) 55
- [135] B. B. Krajinović, G. N. Kaluđerović, D. Steinborn, H. Schmidt, Ch. Wagner, Z. Žižak, Z. D. Juranić, S. R. Trifunović, T. J. Sabo, *J. Inorg. Biochem.* **102** (2008) 892
- [136] G. N. Kaluđerović, V. M. Đinović, Z. D. Juranić, T. P. Stanojkovic, T. J. Sabo, J. *Inorg. Biochem.* **99** (2005) 488
- [137] G. N. Kaluđerović, H. Schmidt, S. Schwieger, Ch. Wagner, R. Paschke, A. Dietrich, T. Mueller, D. Steinborn, *Inorg. Chim. Acta* **361** (2008) 1395
- [138] B. B. Krajinović, G. N. Kaluđerović, D. Steinborn, H. Schmidt, Ch. Wagner, K. Merzweiler, S. R. Trifunović, T. J. Sabo, *J. Serb. Chem. Soc.* **74** (2009) 389
- [139] B. B. Zmejkovski, G.N. Kaluđerović, S. Gómez-Ruiz, Z. Žižak, D. Steinborn, H. Schmidt, R. Paschke, Z. Juranić, T. Sabo, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 3452

- [140] R. S. Srivastava, *Inorg. Chim. Acta* **56** (1981) 65
- [141] J. R. Wiesner, E. C. Lingafelter *Inorg. Chem.* **5** (1966) 1770
- [142] A. K. Singh, J. Sooriyakumar, S. Husebye, K. W. Tornroos *J. Organomet. Chem.* (2000) 612
- [143] D. R. Billodeaux, F. R. Fronczek, A. Yoneda, G. R. Newkome *Acta. Cryst.* **54** (1998) 1439
- [144] T. H. Steiner *Cryst. Rev.* **6** (1996) 1
- [145] R. M. Silverstein, C. G. Bassler, T. C. Morrill, Spectrometric Identification of Organic Compounds third ed. Wiley International Edition 1974 p. 113
- [146] K. Nakamoto, Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds (1963) p. 206 (Wiley, New York)
- [147] D. A. Langs, C. R. Hare, R. G. Little, *Chem. Commun.* (London) (1967) 1080
- [148] K. Nakamoto, Y. Morimoto, A. E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.* **83** (1961) 4528.
- [149] M. B. Čelap, S. R. Niketić, T. J. Janjić, V. N. Nikolić, *Inorg. Chem.* **6** (1967) 2063
- [150] J. A. Neal, N. J. Rose, *Inorg. Chem.* **7** (1968) 2405; **12** (1973) 1226
- [151] D. J. Radanović, B. E. Douglas, *J. Coord. Chem.* **4** (1975) 191
- [152] K. D. Gailey, D. J. Radanović, M. I. Đuran, B. E. Douglas, *J. Coord. Chem.* **8** (1978) 161
- [153] T. G. Appleton, J. R. Hall, M. A. Williams, *Inorg. Chim. Acta* **61** (1982) 51
- [154] G. N. Kaluđerović, G. A. Bogdanović, T. J. Sabo, *J. Coord. Chem.* **55** (2002) 817
- [155] V. M. Đinović, G. A. Bogdanović, S. Novaković, T. J. Sabo, *J. Coord. Chem.* **8** (2004) 535
- [156] V. M. Đinović, L. Mančić, G. Bogdanović, P. Vulić, G. Del Rosario, T. J. Sabo, O. B. Milošević, *J. Mater. Res.* **20** (2005) 102

БИОГРАФИЈА

Гордана П. Радић (девојачко Васић) је рођена 30. 09. 1980. године у Крагујевцу. Основну школу и Другу крагујевачку гимназију, општег смера, завршила је са одличним успехом. Студије хемије, смер за истраживање и развој, на Природно-математичком факултету у Крагујевцу уписала је 1999. године, где је и дипломирала 2004. године са просечном оценом 9,14.

Магистарске студије, смер Неорганска хемија, уписала је школске 2004/2005 године, а након ступања на снагу новог Закона о високом образовању уписала се на Докторске студије, смер Неорганска хемија, у Институту за хемијске науке Природно-математичког факултета у Крагујевцу.

Након дипломирања од 01. 01. 2005. године ангажована је на Пројекту број 142008 под насловом „Синтеза нових комплексних јона прелазних метала и механизам њихових реакција са биолошки значајним лигандима” у периоду од 2006/2010. године код Министарства просвете и науке Републике Србије. Од 01. 01. 2011. године ангажована је на Пројекту број 172016 под насловом „Синтеза, моделовање, физичко-хемијске и биолошке особине неорганских једињења и одговарајућих комплекса метала” у периоду од 2011/2014. године код Министарства просвете и науке Републике Србије. Такође активно учествује у реализацији пројектних задатака програма научне и технолошке сарадње између Републике Србије и Републике Белорусије „Развој нових фармацеутских препарата за комбиновану хемотерапију инфекција” и ТЕМПУС пројекта под називом “Modernisation of Post Graduate Studies in Chemistry and Chemistry Related Programmes” (511044-TEMPUS-1-2010-1-UK-TEMPUS-JPCR).

Изабрана је у звање истраживач-приправник на Природно-математичком факултету у Крагујевцу 24. 05. 2006. године (одлука број 170/IX-2), а у звање истраживач-сарадник 13. 05. 2009. године (одлука број 310/VII-1). У периоду

април-мај 2009. године боравила је у Солуну (Грчка) по CPCTAS пројекту (Centre for Pre-Clinical Testing of Active Substances).

Откада је уписала последипломске студије Гордана П. Радић активно учествује у раду са студентима изводећи вежбе из предмета: АО5 Лекови 1: Хемија и дизајн лекова, БО4 Медицинска хемија и дизајн лекова 1.

Од 2007. године активно учествује у раду Центра за таленте радећи са талентованим ученицима основних и средњих школа.

У оквиру свог истраживачког рада на Природно-математичком факултету Гордана П. Радић је до сада објавила 7 научних радова у водећим часописима са SCI листе, коаутор је једне монографске студије/поглавље у књизи, 10 саопштења на међународним и 7 саопштења на домаћим научним скуповима.

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

1. G. P. Vasić, V. V. Glođović, I. D. Radojević, O. D. Stefanović, Lj. R. Čomić, V. M. Đinović and S. R. Trifunović,
Stereospecific ligand and their complexes. V. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with some alkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoic acid, Inorg. Chim. Acta **363** (2010) 3606-3610; ISSN: 0020-1693; DOI: 10.1016/j.ica.2010.05.046;
M22

2. G. P. Radić, V. V. Glođović, G. N. Kaluđerović, F. W. Heinemann and S. R. Trifunović,
Palladium(II) complexes with R₂edda derived ligands. Part V. Reaction of O,O'-diethyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-methyl)butanoate with K₂[PdCl₄], Trans. Met. Chem. **36** (2011) 331-336
ISSN: 0340-4285; DOI: 10.1007/s11243-011-9473-3;
M23

3. G. P. Radić, V. V. Glođović, I. D. Radojević, O. D. Stefanović, Lj. R. Čomić, Z. R. Ratković, A. Valkonen, K. Rissanen and S. R. Trifunović,
Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with some alkyl derivates of thiosalicylic acids. Crystal structure of bis(S-benzil-thiosalicylate)-palladium(II) complex, [Pd(S-bz-thiosal)₂], Polyhedron, **31** (2012) 69-76; DOI: 10.1016/j.poly. 2011.08.042;
M21

4. I. D. Radojević, V. V. Glođović, G. P. Radić, J. M. Vujić, O. D. Stefanović, Lj. R. Čomić and S. R. Trifunović,
From Synthesis to Antibacterial Activity of Some New Palladium(II) and Platinum(IV) Complexes, Chapter in "Antibacterial Agents/Book1"
ISBN: 979-953-307-281-3;
M14
5. G. P. Radić, V.V. Glođović, Z. R. Ratković, S. B. Novaković, S. G. Granda, L. Roces, L. M. Taboada, I. D. Radojević, O. D. Radojević. Lj. R. Čomić and S. R. Trifunović,
*Synthesis, characterization and antimicrobial activity of novel platinum(IV) and palladium(II) complexes with 1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid. Crystal structure of $H_2-1,2-dpheddp \cdot 2HCl \cdot H_2O$, submitted (J. Mol. Struct.)*
6. G. P. Radić, V. V. Glođović, I. D. Radojević, O. D. Stefanović, Lj. R. Čomić, V. M. Đinović and S. R. Trifunović
*Stereospecific ligands and their complexes. X. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with some alkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl)-butanoic acid, submitted (Inorg. Chim. Acta)*
7. G. P. Radić, V. V. Glođović, Z. R. Ratković, M. Milovanović, V. Volarević, N. Arsenijević and S. R. Trifunović,
*Synthesis, characterization and cytotoxicity of novel platinum(IV) and palladium(II) complexes with meso-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid, submitted (Polyhedron)*

НАУЧНО-ИСТРАЖИВАЧКИ РАД

1. Списак радова

- 1.1. V. M. Đinović, V. V. Glođović, G. P. Vasić, V. Trajković, O. Klisurić, S. Stanković, T. J. Sabo and S. R. Trifunović,
*Stereospecific ligand and their complexes. IV. Synthesis, characterization and cytotoxicity of novel platinum(IV) complexes with ethylenediamine-*N,N'*-di-*S,S*-2-propanoic acid and halogenido ligands: Crystal structure of *s-cis*-[Pt(*S,S*-eddp)Cl₂] \cdot 4H₂O and *uns-cis*-[Pt(*S,S*-eddp)Br₂], Polyhedron* **29** (2010) 1933-1938;
ISSN: 0277-5387; DOI:10.1016/j.poly.2010.03.004;
M21
- 1.2. G. P. Vasić, V. V. Glođović, I. D. Radojević, O. D. Stefanović, Lj. R. Čomić, V. M. Đinović and S. R. Trifunović,
*Stereospecific ligand and their complexes. V. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with some alkyl esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoic acid, Inorganica Chimica Acta* **363** (2010) 3606-3610;
ISSN: 0020-1693; DOI:10.1016/j.iva.2010.05.046;
M22
- 1.3. S. R. Trifunović, D. D. Dimitrijević, G. P. Vasić, N. Radulović, M. Vukićević, F. W. Heinemann, R. D. Vukićević,
*New Simple Synthesis of *N*-Substitutde 1,3-Oxazinan-2-ones, Synthesis-Stuttgart* **6** (2010) 0943-0946;
ISSN: 0039-7881; DOI: 10.1055/s-0029-1218642; ID:T20509SS
M22

- 1.4. G. P. Radić, V. V. Glođović, G. N. Kaluđerović, F. W. Heinemann and S. R. Trifunović,
Palladium(II) complexes with R₂edda derived ligands. Part V. Reaction of O,O'-diethyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-methyl)butanoate with K₂[PdCl₄],
Trans. Met. Chem. **36** (2011) 331-336
ISSN: 0340-4285; DOI: 10.1007/s11243-011-9473-3;
M23
- 1.5. V. V. Glođović, G. P. Radić, S. M. Stanić, F. W. Heinemann and S. R. Trifunović,
Stereospecific ligands and their complexes. VI. The crystal structure of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoic acid hydrochloride, (S,S)-H₂-eddp-HCl, *J. Serb. Chem. Soc.* **76** (7) (2011)995-1001;
ISSN: 0352-5139; DOI: 10.2298/JSC101025088G
M23
- 1.6. M. Z. Stanković, G. P. Radić, V. V. Glođović, I. D. Radojević, O. D. Stefanović, Lj. R. Čomić, O. R. Klisurić, V. M. Đinović and S. R. Trifunović,
Stereospecific ligands and their complexes. IX: Synthesis, characterization and antimicrobial activity of ethyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoic and (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-methyl)-butanoic acids and corresponding platinum(IV) complexes: Crystal structure of tetrachlorido-(O,O'-diethyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoato)platinum(IV),
[PtCl₄(det-S,S-eddp)], Polyhedron **30** (2011) 2203-2209;
ISSN:0020-1693; DOI: 10.1016/j.poly.2011.05.034;
M21
- 1.7. G. P. Radić, V. V. Glođović, I. D. Radojević, O. D. Stefanović, Lj. R. Čomić, Z. R. Ratković, A. Valkonen, K. Rissanen and S. R. Trifunović
Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with some alkyl derivates of thiosalicylic acids. Crystal structure of bis(S-benzyl-

-thiosalicylate)-palladium(II) complex, [Pd(S-bz-thiosal)₂], Polyhedron **31** (2012) 69-76: DOI: 10.1016/j.poly. 2011.08.042;

M21

- 1.8. G. P. Radić, V.V. Glođović, Z. R. Ratković, S. B. Novaković, S. G. Granda, L. Roces, L. M. Taboada, I. D. Radojević, O. D. Radojević. Lj. R. Čomić and S. R. Trifunović,
Synthesis, characterization and antimicrobial activity of novel platinum(IV) and palladium(II) complexes with 1,2-diphenyl-ethylenediamine-N,N'-di-3-propanoic acid. Crystal structure of H₂-1,2-dpheddp·2HCl·H₂O, submitted (J. Mol. Struct.)
- 1.9. G. P. Radić, V. V. Glođović, I. D. Radojević, O. D. Stefanović, Lj. R. Čomić, V. M. Đinović and S. R. Trifunović
Stereospecific ligands and their complexes. X. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with some alkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-methyl)-butanoic acid, submitted (Inorg. Chim. Acta)
- 1.10. G. P. Radić, V. V. Glođović, Z. R. Ratković, M. Milovanović, V. Volarević, N. Arsenijević and S. R. Trifunović,
Synthesis, characterization and cytotoxicity of novel platinum(IV) and palladium(II) complexes with meso-1,2-diphenyl-ethylenediamine-N,N'-di-3-propanoic acid, submitted (Polyhedron)
- 1.11. I. D. Radojević, V. V. Glođović, G. P. Radić, J. M. Vujić, O. D. Stefanović, Lj. R. Čomić and S. R. Trifunović,
From Synthesis to Antibacterial Activity of Some New Palladium(II) and Platinum(IV) Complexes, Chapter in "Antibacterial Agents/Book I"
ISBN: 979-953-307-281-3;

M14

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

- 2.1. V. V. Glodović, G. P. Vasić, S. R. Trifunović and V. M. Đinović,
Synthesis and characterization of the ruthenium(III) complex with ethylenediamine-N,N'-di-S,S-2-propionate ligand,
37th International Conference of COOrdination Chemistry, Cape Town, South Africa 2006, p. 592;
M34
- 2.2. V. V. Glodović, G. Vasić, S. R. Trifunović and V. M. Đinović,
Synthesis and characterization of the platinum(IV) complex with ethylenediamine-N,N'-di-S,S-2-propionate ligand,
5th International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries, Ohrid 2006, ICH-13, p. 313;
M34
- 2.3. V. V. Glodović, G. Vasić, S. R. Trifunović and V. M. Đinović,
Synthesis and characterization of the platinum(IV) complex with (S,S)-ethylenediamine-N,N'-(4,4-dimethyl-2,2-di-pentaoate ligand,
5th International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries, Ohrid 2006, OCH-64, p. 488;
M34
- 2.4. V. V. Glodović, G. Vasić, S. R. Trifunović, V. M. Đinović and T. J. Sabo,
Novel complex of platinum(IV) with ethyl ester of ethylenedimine –N,N'-di S,S-2-propanoic acid,
6th International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries, Sofia 2008, 3-P25, 166;
M34

- 2.5. G. P. Vasić, V. V. Glođović, S. R. Trifunović and Z. Ratković,
Synthesis and characterization of meso-1,2-diphenyl-ethylenediamine-N,N'-di-3-propanoic acid and corresponding platinum(IV) complex,
6th International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries, Sofia 2008, 3-P42, 183;
M34
- 2.6. G. P. Radić, V. V. Glođović, I. D. Radojević, O. D. Stefanović, Lj. R. Čomić, V. M. Đinović and S. R. Trifunović,
Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with some alkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoic acid,
10th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Thessaloniki 2010, PO-085;
M34
- 2.7. G. P. Radić, V. V. Glođović, Z. Ratković, M. Milovanović, V. Volarević, N. Arsenijević and S. R. Trifunović,
Antitumor activity of platinum(IV) and palladium(II) complexes with tetradentate ligand 1,2-diphenyl-ethylenediamine-N,N'-di-3-propanoic acid,
10th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Thessaloniki 2010, PO-207;
M34
- 2.8. M. Z. Stanković, G. P. Radić, V. V. Glođović, I. D. Radojević, O. D. Stefanović, Lj. R. Čomić and S. R. Trifunović,
Antimicrobial activity of ethyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoic and (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-methyl)-butanoic acids and corresponding platinum(IV) complexes,
Preclinical Testing of Active Substances and Cancer Research with International

Symposium on Anti-cancer Agents, Cardiotoxicity and Neurotoxicity Kragujevac, 2011;

M34

- 2.9. I. D. Radojević, O. D. Stefanović, G. P. Radić, V. V. Glođović, Lj. R. Čomić and S. R. Trifunović,

Antimicrobial activity of novel platinum(IV) and palladium(II) complexes with 1,2-diphenyl-ethylenediamine-N,N'-di-3-propanoic acid,

Preclinical Testing of Active Substances and Cancer Research with International Symposium on Anti-cancer Agents, Cardiotoxicity and Neurotoxicity Kragujevac, 2011;

M34

- 2.10. D. S. Đačić, S. D. Marković, V. V. Glođović, G. P. Radić and S. R. Trifunović.

The antiproliferative effects of cisplatin and buthyl and pentyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoic acid and corresponding platinum(IV) complexes,

Preclinical Testing of Active Substances and Cancer Research with International Symposium on Anti-cancer Agents, Cardiotoxicity and Neurotoxicity Kragujevac, 2011;

M34

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

- 3.1. S. Trifunović, M. Stanković, Z. Matović, G. Vasić, A. Meetsma, P. J. Van Koningsburggen,

The Crystal structure of complex [Ni(S,S-eddp)]·2H₂O

XIII Conference of the Serbian Crystallographic Society, Novi Sad 2006, 26;

M64

- 3.2. S. R. Trifunović, V. V. Glođović, G. P. Vasić, V. M. Đinović, T. J. Sabo, O. Klisurić and S. Stanković
*Crystal structure of uns-cis-dibromo(ethylenediamine-*N,N'*-di-*S,S*-2-propionato)platinum(IV) complex, uns-cis-[Pt(*S,S*-eddp)Br₂],*
XV Conference of the Serbian Crystallographic Society, Donji Milanovac 2008, 24;
M64
- 3.3. G. P. Vasić, S. R. Trifunović V. V. Glođović, V. M. Đinović, T. J. Sabo, O. Klisurić and S. Stanković,
*The crystal structure of the s-cis-dichloro-(ethylenediamine-*N,N'*-di-*S,S*-2-propionato)-platinum(IV) complex, s-cis-[Pt(*S,S*-eddp)Cl₂],*
XV Conference of the Serbian Crystallographic Society, Donji Milanovac 2008, 28;
M64
- 3.4. G. P. Radić, V. V. Glođović, S. G. Granda, L. M. Taboada, Z. Ratković and S. R. Trifunović
*Crystal structure of 1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid dihydrochloride,*
XVII Conference of the Serbian Crystallographic Society, Ivanjica 2010, 36;
M64
- 3.5. G. P. Radić, V. V. Glođović, F. W. Heinemann and S. R. Trifunović,
*Synthesis and crystal structure of palladium(II) complex with *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl)butanoate,*
XVII Conference of the Serbian Crystallographic Society, Ivanjica 2010, 60;
M64

- 3.6. M. Z. Stanković, G. P. Radić, V. V. Glođović, O. R. Klisurić, S. R. Trifunović
*Synthesis and crystal structure of tetrachlorido-(O,O'-diethyl-(S,S)-
-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoato)-platinum(IV)*
XVIII Conference of the Serbian Crystallographic Society, Andrevlje, Fruška
Gora, 2011, 42;
M64
- 3.7. D. P. Dimitrijević, G. P. Radić, V. V. Glođović, I. D. Radojević, O. D. Stefanović,
Lj. R. Čomić, Z. R. Ratković, A. Valkonen, K. Rissanen, S. R. Trifunović,
*Crystal structure of bis-(benzyl-thiosalicylate)-palladium(II) complex,
[Pd(S-bz-thiosal)₂],*
XVIII Conference of the Serbian Crystallographic Society, Andrevlje, Fruška
Gora, 2011, 42;
M64

ПРИЛОГ



Note

Stereospecific ligands and their complexes. V. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with some alkyl esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoic acid [☆]

Gordana P. Vasić^a, Verica V. Glodjović^a, Ivana D. Radojević^b, Olgica D. Stefanović^b, Ljiljana R. Čomić^b, Vesna M. Djinović^c, Srećko R. Trifunović^{a,*}

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

^b Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

^c Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 16, 11000 Belgrade, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 November 2009

Received in revised form 30 March 2010

Accepted 21 May 2010

Available online 1 June 2010

Keywords:

Palladium(II) complexes

(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoic acid

Antimicrobial activity

ABSTRACT

Three new ligands and their palladium(II) complexes of general formula [PdCl₂(R₂-*S,S*-eddp)] (R = *n*-propyl, *n*-butyl and *n*-pentyl) have been synthesized and characterized by microanalysis, infrared and ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. Antimicrobial activity of these ligands and complexes was tested by microdilution method and both minimal inhibitory and microbicidal concentration were determined. These tested complexes demonstrated the significant antifungal activity against pathogenic fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus*. On the other hand, these complexes demonstrated moderate antibacterial activity.

© 2010 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Microorganisms have developed numerous defensive mechanisms against antimicrobial factors. That led to the increase of infection number caused by resistant or less susceptible bacteria. Besides, opportunistic infections caused by pathogen *Candida albicans* or mold infections caused by *Aspergillus* sp. are increasing.

Faced with this problem, the search for new antimicrobial agents has been intensified in the last decade. The main aim of many research groups is to find medicines that could be efficient in the infection treatment. The natural occurring compounds or synthesized compounds are great source of inspiration for the future researches.

Pd(II) has a very similar chemistry to Pt(II) forming square planar complexes and less frequently trigonal bipyramidal. Both Pd(II) and Pt(II) are soft Lewis acids and form stronger bonds with nitrogen or sulfur donors (soft bases) than oxygen donors (hard bases). In general, Pt(II) complexes are thermodynamically and kinetically more stable than those of Pd(II). Pd(II) complexes undergo aqua-

tion and ligand exchange reactions 10⁵ time faster than corresponding Pt(II) complexes.

The synthesis and evaluation of the biological activity of the new metal-based compounds is the field of growing interest. Numerous complexes based on palladium(II) ion have been synthesized and their different biological activities have been documented [1–3]. The impact of different palladium complexes on the growth and metabolism of various groups of microorganisms has been studied. Garoufis et al. [4] reviewed numerous scientific papers on anti-viral, antibacterial and antifungal activity of palladium(II) complexes with different types of ligands (sulfur and nitrogen donor ligands, Schiff base ligands and drugs as ligands). Guerra et al. [5] synthesized three palladium complexes with antibiotics of the tetracycline family and they tested their effects on tetracycline sensitive and resistant bacterial strains. The palladium complex with tetracycline was 16 times stronger than the tetracycline itself against resistant strain. Vieira et al. [6] prepared new palladium(II) and platinum(II) complexes with fluoroquinolones which showed activity to *Mycobacterium tuberculosis*. There are other papers in the literature showing different intensity of palladium complexes activity on various species of bacteria and fungi [7–12].

Pd(II) complexes with R₂-*S,S*-eddp ligands (R = *i*Pr [13a], *i*Bu [13b], *c*Pe [14] and Cy [14]) were synthesized and characterized. The authors concluded from NMR spectra that the mixture of

[☆] For Part IV see V.M. Djinović, V.V. Glodjović, G.P. Vasić, V. Trajković, O. Klisurić, S. Stanković, T.J. Sabo, S.R. Trifunović, Polyhedron (2010), doi:10.1016/j.poly.2010.03.004

* Corresponding author. Tel.: +381 34 300263; fax: +381 34 335040.
E-mail address: srecko@kg.ac.rs (S.R. Trifunović).

diastereoisomers of the $[\text{PdCl}_2(\text{R}_2\text{-eddip})]$ complexes was obtained. The antitumoral investigations of these complexes were performed [14].

The aim of this paper is to synthesize new palladium complexes and *in vitro* research of their antibacterial and antifungal activities. The second objective is to evaluate the impact of newly synthesized palladium complexes on probiotics. Probiotics are used as supplements and they play significant role in protecting and maintaining the balance of intestinal microflora in antibiotic therapy.

2. Experimental

2.1. Chemistry

2.1.1. Reagents and instruments

All chemicals were obtained commercially and used without further purification. For infrared spectra a Perkin–Elmer Spectrum One FT-IR spectrometer was employed. ^1H and ^{13}C spectra were recorded on a Varian Gemini-2000 (200 MHz) NMR spectrometer using TMS in CDCl_3 for complexes and TMS in D_2O for ligands. Elemental microanalysis for C, H and N were performed by standard methods on a Vario III CHNS Elemental Analyzer, Elementar-Analysensysteme GmbH. (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoic acid (*H*₂-*S,S*-eddip) was prepared using a previously described procedure [15].

2.1.2. Preparation of *O,O'*-dialkyl esters of the (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoic acid dihydrochloride, *R*₂-*S,S*-eddip·2HCl

In 50 mL of dry alcohol (1-propanol, 1-butanol or 1-pentanol), saturated with gas HCl, 1.53 g (7.5 mmol) of *H*₂-*S,S*-eddip was added and the mixture was refluxed for 12 h. The mixture was filtered and left in the refrigerator over night. The obtained white powder was filtered and air-dried.

O,O'-dipropyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate dihydrochloride trihydrate, dpr-*S,S*-eddip·2HCl·3H₂O (**L1**) Yield: 1.62 g (51.92%). *Anal. Calc.* for $\text{C}_{14}\text{H}_{36}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_7$ ($M_r = 415.348$): C, 40.48; H, 8.74; N, 6.75. Found: C, 40.06; H, 8.34; N, 6.71%. ^1H NMR (200 MHz, D_2O , δ ppm): 3.51 (s, 4H), 3.55 (q, 2H), 1.51 (d, 6H), 4.24 (t, 4H), 1.65 (m, 4H), 0.92 (t, 6H), ^{13}C NMR (200 MHz, D_2O , δ ppm): 44.75 (CH₂), 59.07 (CH), 17.18 (CH₃), 173.34 (COO-*n*-Pr), 72.04 (CH₂-*n*-Pr), 21.17 (CH₂-*n*-Pr), 12.45 (CH₃-*n*-Pr).

O,O'-dibutyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate dihydrochloride trihydrate, dbu-*S,S*-eddip·2HCl·3H₂O (**L2**) Yield: 1.84 g (55.26%). *Anal. Calc.* for $\text{C}_{16}\text{H}_{40}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_7$ ($M_r = 443.4$): C, 43.34; H, 9.09; N, 6.32. Found: C, 43.18; H, 8.54; N, 6.38%. ^1H NMR (200 MHz, D_2O , δ ppm): 3.34 (s, 4H), 4.26 (q, 2H), 1.35 (d, 6H), 4.32 (t, 4H), 1.67 (m, 4H), 1.47 (m, 4H), 0.92 (t, 6H). ^{13}C NMR (200 MHz, D_2O , δ ppm): 44.59 (CH₂), 59.10 (CH), 17.05 (CH₃), 173.01 (COO-*n*-Bu), 70.40 (CH₂-*n*-Bu), 32.62 (CH₂-*n*-Bu), 21.35 (CH₂-*n*-Bu), 15.62 (CH₃-*n*-Bu).

O,O'-dipentyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate dihydrochloride dihydrate, dpe-*S,S*-eddip·2HCl·2H₂O (**L3**) Yield: 1.87 g (55.00%). *Anal. Calc.* for $\text{C}_{18}\text{H}_{42}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_6$ ($M_r = 453.436$): C, 47.68; H, 9.34; N, 6.18. Found: C, 46.91; H, 9.46; N, 6.12%. ^1H NMR (200 MHz, D_2O , δ ppm): 3.42 (s, 4H), 4.14 (q, 2H), 1.34 (d, 6H), 4.28 (t, 4H), 1.72 (m, 4H), 0.93 (t, 6H), ^{13}C NMR (200 MHz, D_2O , δ ppm): 45.14 (CH₂), 58.99 (CH), 17.49 (CH₃), 173.98 (COO-*n*-Pe), 70.50 (CH₂-*n*-Pe), 30.28 (CH₂-*n*-Pe), 30.19 (CH₂-*n*-Pe), 24.55 (CH₂-*n*-Pe), 16.16 (CH₃-*n*-Pe).

2.1.3. Preparation of dichloro-(*O,O'*-dipropyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate)-palladium(II), $[\text{PdCl}_2(\text{dpr-}S,S\text{-eddip})]$

$\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$ (0.200 g, 0.613 mmol) was dissolved in 10 mL of water on a steam bath and *O,O'*-dipropyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate dihydrochloride trihydrate, dpr-*S,S*-eddip·

2HCl·3H₂O, (0.2546 g, 0.613 mmol) was added. The mixture was stirred for 2 h and during this period water solution of LiOH (0.0294 g, 1.226 mmol in 10 mL of water) was introduced. The complex, $[\text{PdCl}_2(\text{dpr-}S,S\text{-eddip})]$ (**C1**) as a yellow precipitate, was filtered, washed with water and air-dried. Yield: 0.19 g (66.60%). *Anal. Calc.* for $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_4\text{Pd}$ ($M_r = 465.68$): C, 36.11; H, 6.06; N, 6.02. Found: C, 35.81; H, 6.01; N, 5.82%. Isomer A: ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 2.83 (s, 4H), 3.63 (q, 2H), 2.04 (d, $J = 7.37$ Hz, 6H), 4.14 (t, 4H), 1.69 (m, 4H), 0.95 (t, 6H), ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 48.62 (CH₂), 57.26 (CH), 14.63 (CH₃), 170.14 (COO-*n*-Pr), 67.48 (CH₂-*n*-Pr), 21.76 (CH₂-*n*-Pr), 10.24 (CH₃-*n*-Pr). Isomer B: ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 2.85 (s, 4H), 3.21 (q, 2H), 2.47 (d, $J = 7.37$ Hz, 6H), 4.53 (t, 4H), 1.76 (m, 4H), 0.92 (t, 6H), ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 51.68 (CH₂), 58.69 (CH), 15.93 (CH₃), 171.46 (COO-*n*-Pr), 67.14 (CH₂-*n*-Pr), 21.70 (CH₂-*n*-Pr), 10.24 (CH₃-*n*-Pr).

2.1.4. Preparation of dichloro-(*O,O'*-dibutyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate)-palladium(II), $[\text{PdCl}_2(\text{dbu-}S,S\text{-eddip})]$

The complex, $[\text{PdCl}_2(\text{dbu-}S,S\text{-eddip})]$, (**C2**) was prepared as described in Section 2.1.3, using *O,O'*-dibutyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate dihydrochloride trihydrate, dbu-*S,S*-eddip·2HCl·3H₂O, (0.2718 g, 0.613 mmol) instead of dpr-*S,S*-eddip·2HCl·3H₂O. Yield: 0.18 g (59.50%). *Anal. Calc.* for $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_4\text{Pd}$ ($M_r = 493.74$): C, 38.92; H, 6.53; N, 5.68. Found: C, 38.74; H, 6.66; N, 5.57%. Isomer A: ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 2.83 (s, 4H), 3.62 (q, 2H), 1.29 (d, $J = 6.81$ Hz, 6H), 4.15 (t, 4H), 1.56 (m, 4H), 1.36 (m, 4H), 0.90 (t, 6H), ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 48.63 (CH₂), 57.25 (CH), 14.64 (CH₃), 170.16 (COO-*n*-Bu), 65.43 (CH₂-*n*-Bu), 33.32 (CH₂-*n*-Bu), 18.97 (CH₂-*n*-Bu), 13.50 (CH₃-*n*-Bu). Isomer B: ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 2.49 (s, 4H), 3.20 (q, 2H), 1.37 (d, $J = 6.81$ Hz, 6H), 4.21 (t, 4H), 1.70 (m, 4H), 1.39 (m, 4H), 0.97 (t, 6H), ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 51.64 (CH₂), 58.69 (CH), 16.95 (CH₃), 171.45 (COO-*n*-Bu), 65.77 (CH₂-*n*-Bu), 30.37 (CH₂-*n*-Bu), 19.00 (CH₂-*n*-Bu), 13.55 (CH₃-*n*-Bu).

2.1.5. Preparation of dichloro-(*O,O'*-dipentyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate)-palladium(II), $[\text{PdCl}_2(\text{dpe-}S,S\text{-eddip})]$

The complex, $[\text{PdCl}_2(\text{dpe-}S,S\text{-eddip})]$, (**C3**) was prepared as described in Section 2.1.3, using *O,O'*-dipentyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate dihydrochloride dihydrate, dpe-*S,S*-eddip·2HCl·2H₂O, (0.2780 g, 0.613 mmol) instead of dpr-*S,S*-eddip·2HCl·3H₂O. Yield: 0.19 g (59.65%). *Anal. Calc.* for $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_4\text{Pd}$ ($M_r = 521.79$): C, 41.43; H, 6.95; N, 5.37. Found: C, 40.92; H, 7.11; N, 5.33%. Isomer A: ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 2.82 (s, 4H), 3.64 (q, 2H), 1.24 (d, $J = 7.17$ Hz, 6H), 4.14 (t, 4H), 1.85 (m, 4H), 1.31 (m, 4H), 1.39 (m, 4H), 0.90 (t, 6H). ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 48.64 (CH₂), 57.27 (CH), 14.67 (CH₃), 170.18 (COO-*n*-Pe), 65.72 (CH₂-*n*-Pe), 48.64 (CH₂-*n*-Pe), 27.85 (CH₂-*n*-Pe), 22.14 (CH₂-*n*-Pe), 13.79 (CH₃-*n*-Pe). Isomer B: ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 2.50 (s, 4H), 3.21 (q, 2H), 1.26 (d, $J = 7.17$ Hz, 6H), 4.11 (t, 4H), 1.69 (m, 4H), 1.42 (m, 4H), 1.59 (m, 4H), 0.94 (t, 6H). ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 51.62 (CH₂), 58.67 (CH), 15.97 (CH₃), 171.45 (COO-*n*-Pe), 66.04 (CH₂-*n*-Pe), 51.62 (CH₂-*n*-Pe), 28.24 (CH₂-*n*-Pe), 22.10 (CH₂-*n*-Pe), 13.87 (CH₃-*n*-Pe).

2.2. *In vitro* antimicrobial assay

2.2.1. Test substances

The tested compounds were dissolved in ethanol and then diluted into nutrient liquid medium to achieve a concentration of 10%. An antibiotic, doxycycline (Galenika A.D., Belgrade), was dissolved in nutrient liquid medium, a Mueller–Hinton broth

(Torlak, Beograd), while an antimycotic, fluconazole (Pfizer Inc., USA) was dissolved in Sabouraud dextrose broth (Torlak, Belgrade).

2.2.2. Test microorganisms

Antimicrobial activity of three palladium complexes was tested for 12 microorganisms including five strains of pathogenic bacteria (standard and clinical strains): *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* (clinical isolate) and *E. coli* (clinical isolate); two species of pathogenic fungi *Aspergillus fumigatus* PMFKG-F23 and *Aspergillus flavus* PMFKG-F24 and one yeast species *C. albicans*; four species of probiotics: *Lactobacillus plantarium* PMFKG-P31, *Bacillus subtilis* IP 5832 PMFKG-P32, *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* PMFKG-P33 and *Saccharomyces boulardii* PMFKG-P34. All clinical isolates were a generous gift from the Institute of Public Health, Kragujevac. The other microorganisms were provided from a collection held by the Microbiology Laboratory Faculty of Science, University of Kragujevac.

2.2.3. Suspension preparation

Bacterial suspensions and yeast suspension were prepared by the direct colony method. The colonies were taken directly from the plate and were suspended in 5 mL of sterile 0.85% saline. The turbidity of initial suspension was adjusted by comparing with 0.5 McFarland's standard (0.5 mL 1.17% w/v $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 99.5 mL 1% w/v H_2SO_4) [16]. When adjusted to the turbidity of the 0.5 McFarland's standard, bacteria suspension contains about 10^8 colony forming units (CFU)/mL and suspension of yeast contains 10^6 CFU/mL. Ten-fold dilutions of initial suspension were additionally prepared into sterile 0.85% saline. The suspensions of fungal spores were prepared by gentle stripping of spore from slopes with growing aspergilli. The resulting suspensions were 1:1000 diluted in sterile 0.85% saline to obtain inoculum of approximately 10^4 CFU/mL.

2.2.4. Microdilution method

Antimicrobial activity was tested by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal or fungicidal concentration (MBC/MFC) by using microdilution plate method [17]. The 96-well plates were prepared by dispensing 100 μL of nutrient broth, Mueller–Hinton broth for bacteria and Sabouraud dextrose broth for fungi and yeasts, into each well. A 100 μL from the stock solution of tested compound (concentration of 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added into the first row of the plate. Then, twofold, serial dilutions were performed by using a multichannel pipette. The obtained concentration range was from 500 to 0.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A 10 μL of diluted bacterial, yeast suspension and suspension of spores was added to each well to give a final concentration of 5×10^5 CFU/mL for bacteria and 5×10^3 CFU/mL for fungi and yeast. Finally, 10 μL resazurin solution was added to each well inoculated with bacteria and yeast. Resazurin is an oxidation–reduction indicator used for the evaluation of microbial growth. It is a blue non-fluorescent dye that becomes pink and fluorescent when reduced to resorufin by oxidoreductases within viable cells [18]. The inoculated plates were incubated at 37 °C for 24 h for bacteria, 28 °C for 48 h for the yeast and 28 °C for 72 h for fungi. MIC was defined as the lowest concentration of tested substance that prevented resazurin color change from blue to pink. For fungi, MIC values of the tested substance were determined as the lowest concentration that visibly inhibited mycelia growth.

Doxycycline and fluconazole were used as a positive control. Solvent control test was performed to study an effect of 10% ethanol on the growth of microorganism. It was observed that 10% ethanol did not inhibit the growth of microorganism. Also, in the experiment, the concentration of ethanol was additionally decreased because of the twofold serial dilution assay (the working

concentration was 5% and lower). Each test included growth control and sterility control. All tests were performed in duplicate and MICs were constant.

Minimum bactericidal and fungicidal concentration was determined by plating 10 μL of samples from wells, where no indicator color change was recorded, on nutrient agar medium. At the end of the incubation period the lowest concentration with no growth (no colony) was defined as minimum microbicidal concentration.

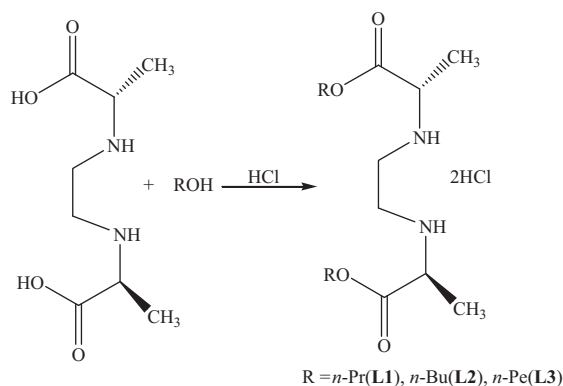
3. Results and discussion

3.1. Synthesis and characterization

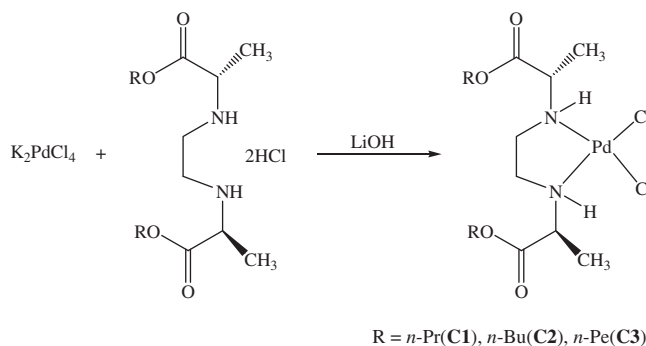
The synthesis of the propyl, butyl and pentyl esters of the (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoic acid (H_2 -*S,S*-eddp) as a dihydrochloride, can be presented by the next reaction scheme (Scheme 1).

The esters are slightly soluble in water and in common organic solvents. The $[\text{PdCl}_2(\text{R}_2\text{-S,S-eddp})]$ complexes were synthesized by mixing aqueous solution of the $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$ and corresponding esters (Scheme 2). The resulting complexes are soluble in chloromethane, dichloromethane, trichloromethane and tetrachloromethane, methanol and ethanol, but not in water and other common organic solvents. The results of microanalysis confirmed the predicted content of the isolated complexes.

The most important bands in the infrared spectra of the isolated dialkyl esters (**L1**, **L2** and **L3**) of the *S,S*-eddp ligand and corresponding palladium(II) complexes (**C1**, **C2** and **C3**) are given in Table 1. The infrared spectra of the listed complexes confirm the expected *N–N* coordination of the $\text{R}_2\text{-S,S-eddp}$ ligands to the palladium(II) ion. Indication of the $\text{R}_2\text{-S,S-eddp}$ coordination via nitrogen ligand atoms can be proved by the presence of the bands for



Scheme 1. The preparation of the propyl, butyl and pentyl esters of H_2 -*S,S*-eddp.



Scheme 2. The preparation of the $[\text{PdCl}_2(\text{R}_2\text{-S,S-eddp})]$.

Table 1

The most important IR absorption bands of ligands and [PdCl₂(R₂-S,S-eddp)] complexes (cm⁻¹).

Compound	$\nu(\text{C}=\text{O})$	$\nu(\text{C}-\text{O})$	$\nu(\text{CH}_3)$	$\nu(\text{R}-\text{NH}_2^+)$	$\nu(\text{R}-\text{NH})$
dpr-S,S-eddp·2HCl (L1)	1745	1231	2968	3461	–
dbu-S,S-eddp·2HCl (L2)	1745	1223	2976	3461	–
dpe-S,S-eddp·2HCl (L3)	1746	1231	2977	3462	–
[PdCl ₂ (dpr-S,S-eddp)] (C1)	1735	1215	2971	–	3130
[PdCl ₂ (dbu-S,S-eddp)] (C2)	1740	1241	2960	–	3120
[PdCl ₂ (dpe-S,S-eddp)] (C3)	1741	1229	2958	–	3118

secondary amino groups [3130 cm⁻¹ (**C1**); 3120 cm⁻¹ (**C2**) and 3118 cm⁻¹ (**C3**)] and none of the [PdCl₂(R₂-S,S-eddp)] show the absorption band for the protonated secondary ammonium group, as it was found in spectra of R₂-S,S-eddp precursors [3461 cm⁻¹ (**L1**); 3461 cm⁻¹ (**L2**); 3462 cm⁻¹ (**L3**)] (Table 1). All other absorption bands are found at almost the same positions as in the corresponding spectra of the free ligands, indicating that oxygen atoms from carboxylic groups are not coordinated.

NMR spectroscopic data for all three complexes give proofs for their structures and N–N coordination R₂-S,S-eddp esters to the palladium(II) ion. Chemical shifts arising from the carbon and hydrogen atoms of this type of esters are found at the expected positions [14,19,20].

Comparison of chemical shifts of methylene hydrogen atoms from ethylenediamine part of esters with chemical shifts of the same hydrogen atoms in the complexes (up to 0.9 ppm) indicates

that the coordination of the R₂-S,S-eddp esters performed via nitrogen ester atoms.

The number of the signals in ¹³C NMR spectra of the isolated [PdCl₂(R₂-S,S-eddp)] complexes confirm the coordination of the R₂-S,S-eddp esters to the palladium(II) ion. By the coordination of the R₂-S,S-eddp esters to the palladium(II) the both asymmetric carbon atoms from the eddp part of the molecule retain S absolute configurations. But, in the same time the nitrogen atoms from the diamine ring of the eddp ligand become asymmetric. Thus three diastereoisomers can be expected for [PdCl₂(R₂-S,S-eddp)] complexes [(R,R), (R,S) ≡ (S,R) and (S,S), Fig. 1]. The (R,R) and (S,S) enantiomers, due to C₂ symmetry, should give rise to one signal in NMR spectra, each for their ester branches. The last (R,S) diastereoisomer will give rise to two sets of NMR signals because the ester branches are not equivalent. The presence of two sets of signals in NMR spectra of the isolated complexes with different intensities suggests the mixture of the diastereoisomers, as it was concluded in previously published results [13a,20,21] for Pd(II) complexes with the same type of ligands.

3.2. Microbiology

The results of *in vitro* testing antibacterial and antifungal activities of the three new palladium complexes are shown in Table 2. For comparison, MIC and MBC/MFC values of doxycycline and fluconazole are also listed in Table 2. The solvent (10% ethanol) did not inhibit the growth of the tested microorganisms. The tested palladium(II) complexes showed different degrees of antimicrobial activity in relation to the tested species. The intensity of antimicrobial action varied depending on the groups of microorganisms

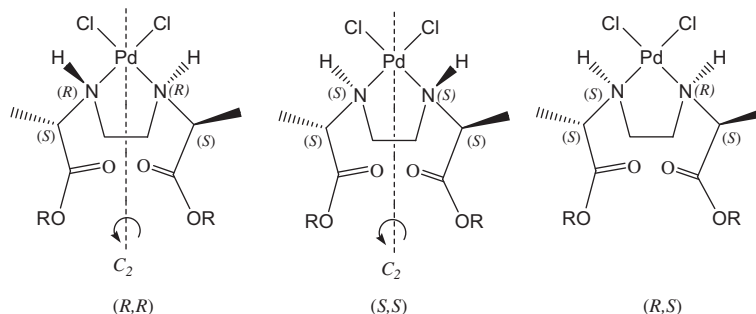


Fig. 1. Diastereoisomers of [PdCl₂(R₂-S,S-eddp)], R = *n*-Pr, *n*-Bu and *n*-Pe.

Table 2

Antibacterial and antifungal activity of the tested [PdCl₂(R₂-S,S-eddp)] complexes and corresponding ligands.

Species	L1		C1		L2		C2		L3		C3		Doxycycline /fluconazol	
	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC/MMC	MIC/MMC
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>500	>500	125	250	125	>500	125	125	125	>500	62.5	250	25/25	/
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	>500	>500	125	250	125	>500	62.5	250	>500	>500	62.5	250	50/50	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>500	>500	125	250	>500	>500	31.25	125	>250	>500	125	125	12.5/50	/
<i>Proteus mirabilis</i>	>500	>500	62.5	500	>500	>500	125	>500	>250	>500	125	125	50/50	/
<i>Escherichia coli</i>	125	>500	62.5	125	31.25	>500	31.25	>250	>250	>500	125	>500	12.5/12.5	/
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>	125	>500	62.5	125	7.8	>500	15.6	125	0.98	>31.25	125	>500	0.024/>0.19	/
<i>Lactobacillus plantarum</i>	125	>500	62.5	125	15.6	125	15.6	125	1.95	>62.5	125	>500	0.012/>0.098	/
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	125	>500	62.5	125	62.5	>500	15.6	125	62.5	>500	62.5	>500	0.003/0.024	/
<i>Saccharomyces boulardii</i>	>500	>500	125	250	500	>500	125	250	62.5	125	125	125	/	6.25/>50
<i>Candida albicans</i>	>500	>500	125	250	>500	>500	125	500	500	500	125	125	/	3.125/>50
<i>Aspergillus fumigatus</i>	>500	>500	31.25	31.25	>500	>500	31.25	31.25	62.5	125	7.8	7.8	/	>500
<i>Aspergillus flavus</i>	>500	>500	0.49	0.49	>500	>500	0.49	0.49	62.5	125	0.49	0.49	/	>500

MIC, minimum inhibitory concentration (μg/mL).

MMC, minimum microbiocidal concentration (μg/mL).

/, not tested.

(bacteria or fungi) and on the type and concentration of the complex.

All three complexes demonstrated approximately similar activity in relation to the tested standard and clinical strains of bacteria. Being compared to positive control, these complexes showed moderate antibacterial activity. MIC values were in range from 31.25 to 125 µg/mL, and MBC values from 125 to 500 µg/mL depending on the species of bacteria. The best activity was shown by [PdCl₂(dbu-S,S-eddp)] to *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *E. coli* (MIC was 31.25 µg/mL).

The probiotics showed sensitivity similar to the sensitivity of the other bacteria to the tested complexes, except in the case of [PdCl₂(dbu-S,S-eddp)]. The growth of *Lactobacillus plantarum*, *B. subtilis* IP 5832, *B. animalis subsp. lactis* was inhibited at concentration of 15.6 µg/mL [PdCl₂(dbu-S,S-eddp)].

Compared to the tested fungi, the complexes showed significant antifungal activity. All three complexes inhibited the growth of *A. flavus* at concentration of 0.49 µg/mL while [PdCl₂(dpe-S,S-eddp)] affected *A. fumigatus* at low concentration (MIC was 7.8 µg/mL). MIC values for yeast *C. albicans* were 125 µg/mL for all three complexes, while MFC was 250 µg/mL except for [PdCl₂(dbu-S,S-eddp)] where it was 500 µg/mL.

In most cases the activity of free ligands was lower than that of the complexes (Table 2).

4. Conclusion

R₂-S,S-eddp-type esters and the corresponding Pd(II) complexes were synthesized and characterized by IR, ¹H and ¹³C NMR spectroscopies and elemental analysis. From NMR spectra we can observe the presence of the mixture of diastereoisomeric forms.

The results of antimicrobial activity show that [PdCl₂(R₂-S,S-eddp)] complexes have significantly higher activity than corresponding ligands. The antimicrobial activities of complexes vary depending on the group of microorganisms and the type of complexes. Pd(II)-complexes showed limited activity to strains of pathogenic bacteria (standard and clinical strains), probiotics and yeast. Fungi *Aspergillus* sp. were extremely sensitive to the reported complexes, so these complexes could be evaluated as potential pharmaceutical agents.

Acknowledgements

The authors are grateful for financial support to the Ministry of Science and Technological Development (Project No. 142008) and EC under FP7 research potential program (GA No. 206809).

References

- [1] B.T. Khan, J. Bhatt, K. Najmoddin, S. Shamsuddin, K. Annapoorna, J. Inorg. Biochem. 44 (1991) 55.
- [2] C. Navarro-Eanninger, J.M. Peréz, F. Zamora, V.M. Gonzáles, J.M. Masaguer, C. Alonso, J. Inorg. Biochem. 52 (1993) 37.
- [3] I. Brudzinska, Y. Mikata, M. Obata, C. Ohtsuki, S. Yano, Bioorg. Med. Chem. Lett. 14 (2004) 2533.
- [4] A. Garoufis, S.K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, Coord. Chem. Rev. 253 (2009) 1384.
- [5] W. Guerra, E. de Andrade Azevedo, A.R. de Souza Monteiro, M. Bucciarelli-Rodriguez, E. Chartone-Souza, A.M. Amaral Nascimento, A.P. Soares Fontes, L. Le Moyec, E.C. Pereira-Maia, J. Inorg. Biochem. 99 (2005) 2348.
- [6] L.M.M. Vieira, M.V. de Almeida, M.C.S. Lourenço, F.A.F.M. Bezerra, A.P.S. Fontes, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 4107.
- [7] D. Kovala-Demertzi, M.A. Demertzis, J.R. Miller, C. Papadopoulou, C. Dodorou, G. Filousis, J. Inorg. Biochem. 86 (2001) 555.
- [8] R.R. Coombs, M.K. Ringer, J.M. Blacquiere, J.C. Smith, J.S. Neilsen, Y.-S. Uh, J.B. Gilbert, L.J. Leger, H. Zhang, A.M. Irving, S.L. Wheaton, C.M. Vogels, S.A. Westcott, A. Decken, F.J. Baerlocher, Transition Met. Chem. 30 (2005) 411.
- [9] M.A. Ali, A.H. Mirza, R.J. Butcher, K.A. Crouse, Transition Met. Chem. 31 (2006) 79.
- [10] I. Kizilcikli, Y.D. Kurt, B. Akkurt, A.Y. Genel, S. Birteksöz, G. Ötük, B. Ülküseven, Folia Microbiol. 52 (2007) 15.
- [11] N.M. Aghatabay, M. Somer, M. Senel, B. Dulger, F. Gucin, Eur. J. Med. Chem. 42 (2007) 1069.
- [12] M.K. Biyala, K. Sharma, M. Swami, N. Fahmi, R. Vir Singh, Transition Met. Chem. 33 (2008) 377.
- [13] (a) B.B. Krajinović, G.N. Kaludjerović, D. Steinborn, Ch. Wagner, K. Merzweiler, S.R. Trifunović, T.J. Sabo, J. Serb. Chem. Soc. 74 (2009) 389; (b) B.B. Zmejovski, G.N. Kaludjerović, S. Gómez-Ruiz, T.J. Sabo, J. Serb. Chem. Soc. 74 (2009) 1249.
- [14] B.B. Krajinović, G.N. Kaludjerović, D. Steinborn, H. Schmidt, Ch. Wagner, Z. Žižak, Z.D. Juranić, S.R. Trifunović, T.J. Sabo, J. Inorg. Biochem. 102 (2008) 892.
- [15] L.N. Schoenberg, D.W. Cooke, C.F. Liu, Inorg. Chem. 7 (1968) 2386.
- [16] J.M. Andrews, J. Antimicrob. Chemother. 56 (2005) 60.
- [17] S.D. Sarker, L. Nahar, Y. Kumarasamy, Methods 42 (2007) 321.
- [18] E. Banfi, G. Scialino, C. Monti-Bragadin, J. Antimicrob. Chemother. 52 (2003) 796.
- [19] G.N. Kaludjerović, V.M. Djinović, Z.D. Juranić, T.P. Stanojkovic, T.J. Sabo, J. Inorg. Biochem. 99 (2005) 488.
- [20] G.N. Kaludjerović, H. Schmidt, S. Schwieger, Ch. Wagner, R. Paschke, A. Dietrich, T. Mueller, D. Steinborn, Inorg. Chim. Acta 361 (2008) 1395.
- [21] B.B. Zmejovski, G.N. Kaludjerović, S. Gómez-Ruiz, Z. Žižak, D. Steinborn, H. Schmidt, R. Paschke, Z. Juranić, T. Sabo, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 3452.

Palladium(II) complexes with R₂edda-derived ligands. Part V. Reaction of *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl)butanoate with K₂[PdCl₄]

Gordana P. Radić · Verica V. Glođović ·
Goran N. Kaluđerović · Frank W. Heinemann ·
Srećko R. Trifunović

Received: 27 December 2010 / Accepted: 18 February 2011 / Published online: 18 March 2011
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract The reaction of K₂[PdCl₄] with [(*S,S*)-H₂(Et)₂-eddv]Cl₂ diester (*O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl)butanoate) (**1**) resulted in [PdCl₂{(*S,S*)-(Et)eddv-κ²*N,N',κO*}] (**2**) complex with one hydrolyzed ester group. The compound was characterized by spectroscopic methods and it was found that the reaction is diastereoselective (¹H and ¹³C NMR; one diastereoisomer of four possible). In addition, the structure of **2** was confirmed by X-ray diffraction analysis, indicating that the product is the (*R,R*)-*N,N'*-configured isomer. DFT calculations support the formation of one diastereoisomer of **2**.

Introduction

The reactions between [H₂(R)₂eddp]Cl₂ ligand precursors (R₂eddp = esters of ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid; R = Me, Et, *n*Pr, *n*Bu, *n*Pe) and potassium hexa-

chloroplatinate(IV) have been recently investigated. Depending on the R moiety, the reaction gave different products (Fig. 1a, b) [1, 2]. For R shorter than *n*Bu, these reactions proceeded with the hydrolysis of the ester groups yielding *trans*-[PtCl₂(eddp-κ²*N,N',κ²O,O'*)] (Fig. 1a), which was confirmed by X-ray structural analysis. On the other hand, when R was *n*Bu or *n*Pe, the isolated platinum(IV) complexes were [PtCl₄(R₂eddp-κ²*N,N'*)] with intact ester functions of the ligand (Fig. 1b) [1]. In contrast, sodium hexachloroplatinate(IV) reacted with homologous acetato [H₂(R)₂edda]Cl₂ ligand precursors (esters of ethylenediamine-*N,N'*-diacetic acid; R = Me, Et, *n*Pr) yielding only [PtCl₄(R₂edda-κ²*N,N'*)] complexes (Fig. 1c), without hydrolysis of the ester function [2].

Chiral branched-chain [(*S,S*)-H₂(R)₂eddp]Cl₂ esters [(*S,S*)-R₂eddp = (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoic acid; R = Et, *n*Pr, *n*Bu, *n*Pe, *i*Pr, *i*Bu] were also used in the synthesis of corresponding platinum(II/IV) complexes, [PtCl_n{(*S,S*)-R₂eddp}] (*n* = 2, 4; Fig. 1d) [3]. The reaction of [(*S,S*)-H₂(R)₂eddp]Cl₂ and hexachloroplatinate(IV) affords complexes in which the ligands have retained their ester functional groups without hydrolyzing. This class of platinum(II/IV) complexes is also interesting regarding antitumoral activity. In some cases, platinum(IV) complexes with R₂edda-derived ligands showed higher cytotoxicity than cisplatin, and the kinetics of the tumor cell death process induced by these complexes is considerably faster in comparison with that induced by cisplatin [4, 5].

Because of the similar coordination modes and chemical properties of palladium(II) and platinum(II) compounds (besides the fact that palladium(II) complexes are kinetically less stable than platinum(II) complexes [6, 7]), synthesis and characterization of palladium(II) complexes with edta tetraalkyl esters and ethylenediammonium-*N,N'*-di-3-propanoic acid were performed [8, 9]. Nevertheless, some

G. P. Radić · V. V. Glođović · S. R. Trifunović (✉)
Department of Chemistry, Faculty of Science,
University of Kragujevac, R. Domanovića 12,
34000 Kragujevac, Serbia
e-mail: srecko@kg.ac.rs

G. N. Kaluđerović (✉)
Institut für Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg, Kurt-Mothes-Straße 2, 06120 Halle, Germany
e-mail: goran.kaluderovic@chemie.uni-halle.de

G. N. Kaluđerović
Biozentrum, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Weinbergweg 22, 06120 Halle, Germany

F. W. Heinemann
Department of Chemistry and Pharmacy, Inorganic Chemistry,
Universität Erlangen-Nürnberg, Egerlandstrasse 1,
91058 Erlangen, Germany

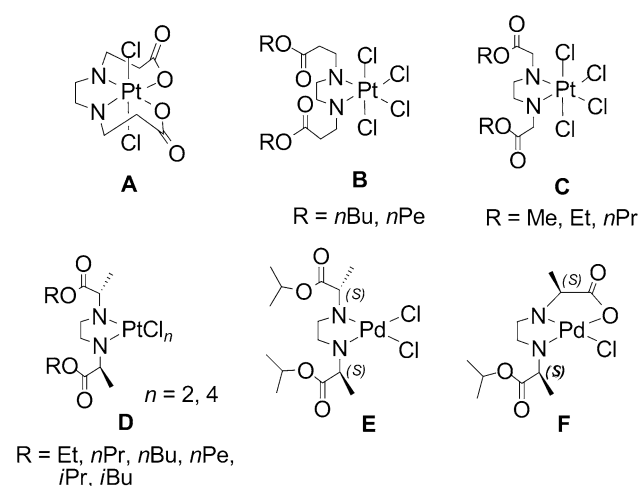


Fig. 1 Platinum(II/IV) and palladium(II) complexes containing R₂edda-derived ligands

palladium(II) complexes with R₂edda-derived ligands exhibited very high antiproliferative activity [10–13]. Furthermore, the diisopropyl ester of (*S,S*)-edvip reacts with K₂[PdCl₄] and yields two complexes [PdCl₂{(*S,S*)-(*i*Pr)₂edvip}] and [PdCl{(*S,S*)-(*i*Pr)edvip}] (Fig. 1e, f), with intact and with partly hydrolyzed ester ligand, respectively.

The reactivity of K₂[PdCl₄] with [(*S,S*)-H₂(Et)₂eddv]Cl₂ diester ligand precursor is reported further in this paper. The obtained compound **2** was characterized by IR, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy, elemental analysis, and X-ray crystallography. In addition, DFT calculations were performed for four possible diastereoisomers of the complex.

Experimental

All chemicals were obtained commercially and used without further purification. For infrared spectra, a Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR spectrometer was employed. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Varian “Gemini 2000” (200 MHz) NMR spectrometer in CDCl₃ using tetramethylsilane as internal standard for the complex and in D₂O using tetramethylsilane as internal standard for the ligand precursor. Elemental analyses for C, H, and N were done on a Vario III C, H, N, S Elemental Analyzer, Elemental Analysensystem GmbH.

Synthesis of *O,O'*-diethyl ester of the (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl)butanoic acid dihydrochloride, [(*S,S*)-H₂(Et)₂eddv]Cl₂ **1**

[(*S,S*)-H₂(Et)₂eddv]Cl₂, **1**, (Fig. 2) was prepared using an esterification reaction as previously described [14]. To

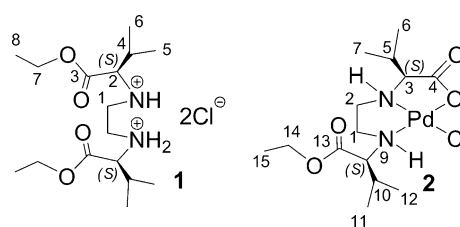


Fig. 2 Numbering of compounds used for NMR data

50 mL of dry ethanol, saturated with HCl gas, 2 g (6 mmol) of [(*S,S*)-H₂eddv]Cl₂ was added and the mixture was refluxed for 12 h. The mixture was filtered and left in the refrigerator overnight. The obtained white powder was filtered and air-dried. Yield: 1.21 g (51.71%). Found: C, 49.84; H, 8.41; N, 7.37 (%). Anal. Calcd. for **1**, C₁₆H₃₄Cl₂N₂O₄: C, 49.35; H, 8.80; N, 7.20. IR (cm⁻¹): 3,414.93, 2,977.11, 2,759.11, 2,533.10, 1,733.29, 1,469, 1,227.63, 1,047, 850.93, 563.48. ¹H NMR (200 MHz, D₂O, δ, ppm): 1.1 (m, 12H, C^{5,6}H₃), 1.35 (t, 6H, C⁸H₃), 2.41 (m, 4H, C¹H₂), 3.62 (m, 2H, C⁴H), 3.69 (d, 2H, C²H), 4.34 (q, 4H, C⁷H₂). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 16.25 (C⁸), 20.93 (C⁵), 21.07 (C⁶), 32.58 (C⁴), 46.20 (C¹), 68.64 (C²), 70.30 (C⁷), 173.77 (C³).

Synthesis of {PdCl[(*S,S*)-(Et)eddv]}, **2**

K₂[PdCl₄] (0.200 g, 0.613 mmol) was dissolved in water (10 mL) on a steam bath and **1** (0.2546 g, 0.613 mmol) was added. The mixture was stirred for 2 h, and during this period, a solution of LiOH (0.0294 g, 1.226 mmol in 10 mL of water) was introduced. The complex, {PdCl[(*S,S*)-(Et)eddv]}, **2** (Fig. 2) as a yellow precipitate, was filtered off, washed with water, and air-dried. The compound was crystallized from DMSO–water. Yield: 0.1473 g (61.02%). Found: C, 39.34; H, 6.41; N, 6.38 (%). Anal. Calcd. for **2**, C₁₄H₂₇ClN₂O₄Pd: C, 39.17; H, 6.34; N, 6.53. IR (cm⁻¹): 3,435.93, 3,177.78, 3,108.09, 2,970.05, 1,735.14, 1,640.49, 1,394.11, 1,266.68, 1,197.50, 1,022.50, 865.20, 591.67, 463.46. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 0.95 (d, 6H, C^{6,7}H₃), 1.02 (d, 6H, C^{11,12}H₃), 1.25 (t, 3H, C¹⁵H₃), 2.23 (m, 4H, C^{1,2}H₂), 2.45 (q, 1H, C³H), 2.87 (q, 1H, C¹⁰H), 3.91 (d, 1H, C⁹H), 4.16 (d, 1H, C⁵H), 4.45 (q, 2H, C¹⁴H₂). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 14.23 (C¹⁵), 17.93 (C^{6,7}), 19.34 (C^{11,12}), 28.41 (C¹⁰), 30.58 (C³), 46.95 (C¹), 49.76 (C²), 50.52 (C⁵), 61.88 (C⁹), 68.01 (C¹⁴), 169.25 (C⁴), 171.93 (C¹³).

X-ray crystallographic data collection and refinement

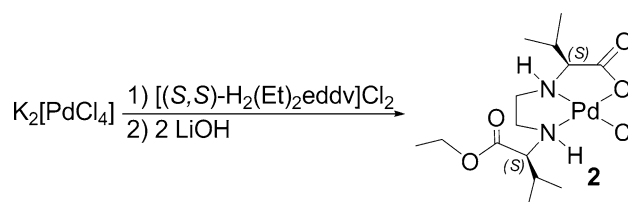
A single crystal of the complex suitable for X-ray data collection was mounted on a Bruker-Nonius Kappa CCD

diffractometer equipped with graphite-monochromated MoK α ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) radiation. The diffraction intensities were corrected for Lorentz and polarization effects. The absorption effects were corrected on semiempirical basis using multiple scan (SADABS) [15]. The structure was solved by direct methods and refined by full-matrix, least-square calculations against F^2 [16]. All non-hydrogen atoms were refined with anisotropic displacement parameters. The positions of all hydrogen atoms were derived from a difference Fourier synthesis, and all hydrogen atoms were refined with individual isotropic displacement parameters. Disorder was observed for the atoms O3, O4, and C9–C15, where two different orientations were refined, resulting in site occupancy factors of 64(1) % for the major fraction and 36(1) % for the minor fraction (O3A, O4A, C9A–C15A). SAME restraints were applied in the refinement of the disordered structure part (atoms O3–C15 and O3A–C15A). SIMU restraints were used for the refinement of the atoms O4, O4A, C14, and C14A, and ISOR restraints for the atoms C9A, C12, C15, and C15A. The distances N1–C9 and N1–C9A were restricted to be of approximately the same length using an SADI restraint. Empirical formula, $C_{14}H_{27}ClN_2O_4Pd$; formula weight, 429.23; crystal system, orthorhombic; space group, $P2_12_12_1$; a (\AA), 6.1062(2); b (\AA), 10.5325(4); c (\AA), 29.115(1); $\alpha = \beta = \gamma$ ($^\circ$), 90; volume (\AA^3), 1,872.5(1); Z , 4; D_{calcd} (g cm^{-3}), 1.523; μ Mo- $K\alpha$ (mm^{-1}), 1.150; $F(000)$, 880; θ_{ranged} ($^\circ$), 3.40–27.10; refln. collected, 4,136; refln. observed [$I > 2\sigma(I)$], 3,775; refln. independent, 4,136; data/restraints/parameters, 4136/60/289; goodness of fit (F^2), 1.031; $R1$ [$I > 2\sigma(I)$], 0.0574; $wR2$, 0.1376; $R1$ (all data), 0.0627; $wR2$, 0.1400; $\Delta\rho$ ($e/\text{\AA}^3$), 1.53/–2.36.

CCDC 795802 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.

Computational details

Geometry optimizations were performed by the Gaussian 03 package [17]. All the structures were optimized using the MPW1PW91 functional [18]. The SDD basis set for all atoms was employed in the calculations [19, 20]. The appropriateness of the chosen functional and basis set for palladium has been stated elsewhere [21]. All systems were optimized without symmetry restrictions. The resulting geometries were characterized as equilibrium structures by the analysis of the force constants of normal vibrations. Supplementary data associated with quantum chemical calculations can be obtained from the authors upon request.



Scheme 1 Reaction of $K_2[PdCl_4]$ with $[(S,S)\text{-}H_2(Et)_2\text{eddvd}]\text{Cl}_2$

Results and discussion

The reaction of an aqueous solution containing ligand precursor $[(S,S)\text{-}H_2(Et)_2\text{eddvd}]\text{Cl}_2$ with the solution of a $K_2[PdCl_4]$ followed by the addition of a stoichiometric amount of base (molar ratio 1:1:2) results in the formation of **2** (Scheme 1). The $\kappa^2N,N',\kappa O$ coordination mode of $[(S,S)\text{-}(Et)\text{eddvd}]^-$ ligand in **2** arises from the hydrolysis of one of the two ester groups of the original $[(S,S)\text{-}(Et)_2\text{eddvd}]$ ligand.

Spectroscopic properties

The IR spectrum of compound **2** shows specific absorption bands $\nu(\text{C}=\text{O})$ at $1,735 \text{ cm}^{-1}$ (strong) (typical absorption for aliphatic esters), $\nu(\text{C}-\text{O})$ at $1,230 \text{ cm}^{-1}$ (strong), $\nu(\text{CH}_3)$ at $2,970 \text{ cm}^{-1}$ (medium) (for comparison **1**: $1,733$, $1,228$, and $2,977 \text{ cm}^{-1}$, respectively [3]). For **2**, there are two absorption bands for $\nu(\text{C}=\text{O})$ at $1,735$ and $1,640 \text{ cm}^{-1}$, which indicates two different C=O groups, being in correspondence with hydrolysis of one of the ethyl groups, and coordination of the residual oxygen atom. The $\nu(\text{N}-\text{H})$ absorption bands at $3,215$ (for **1**) and $3,177 \text{ cm}^{-1}$ (**2**) (both typical absorptions for secondary amino groups) may indicate that coordination occurred via nitrogen atoms [1–3].

The constitution of complex **2** has been proved by NMR spectroscopic measurements. In the ^1H NMR spectrum, the signals of methylene hydrogen atoms from ethylenediamine moiety show shifts up to 0.9 ppm, which indicate that the coordination occurred via nitrogen atoms. Chemical shifts for carbon atoms belonging to the COO moiety were found in the same area but at very different shift values in the ^{13}C NMR spectrum. From comparison of the ^{13}C NMR spectra of **1** and previously reported $[\text{PdCl}\{(S,S)\text{-}(i\text{Pr})\text{ed-dip}\}]$ complex with **2**, it can be concluded that the signal at 169.2 ppm belongs to the ester carbon atom, and the signal at 171.9 ppm belongs to the carbon atom of the carboxyl group that participates in coordination with its oxygen atom. The coordination of the N atoms gives rise to the formation of chiral centers, thus in principle four diastereoisomers are possible: (R,R) -, (S,S) -, (S,R) -, and (R,S) -**2** (vide infra Quantum Chemical Calculations), but only one set of signals was found in both ^1H and ^{13}C NMR spectra.

Fig. 3 Molecular structure of [PdCl{(S,S)-(Et)eddv}] (**2**) (50% probability ellipsoids, hydrogen atoms drawn at arbitrary size, disorder not shown for clarity)

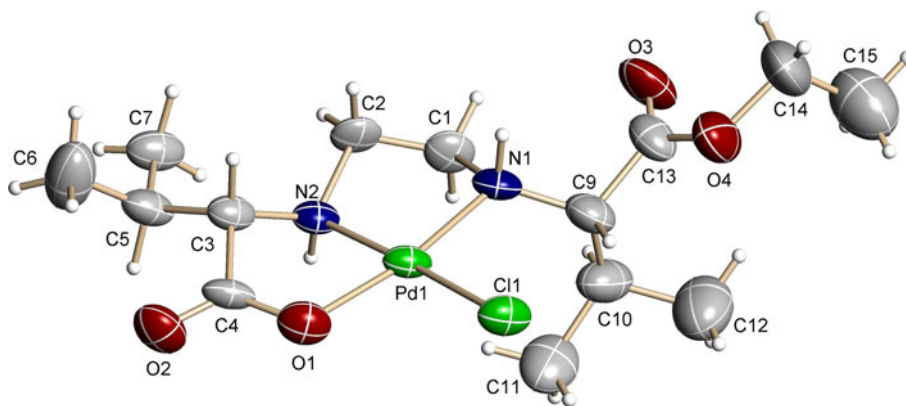


Table 1 Selected experimentally found bond lengths (Å) and angles (°) in molecular structure of **2** and calculated values (**2c**) for diastereoisomers of **2**

Compound	2	(<i>R,R</i>)- 2c	(<i>R,S</i>)- 2c	(<i>S,R</i>)- 2c	(<i>S,S</i>)- 2c
Å, °					
Pd–N2	2.028(7)	2.051	2.054	2.075	2.055
Pd–O1	1.990(6)	1.990	1.991	2.011	2.007
Pd–N1	2.043(7)	2.079	2.095	2.120	2.099
Pd–Cl1	2.308(2)	2.345	2.342	2.345	2.343
C4–O1	1.30 (1)	1.332	1.332	1.349	1.338
C4–O2	1.21(1)	1.243	1.243	1.259	1.243
C13–O3	1.18(2)	1.234	1.231	1.274	1.232
C13–O4	1.345(2)	1.378	1.370	1.464	1.367
C14–O4	1.49(2)	1.480	1.480	1.488	1.481
C2–N2	1.486(9)	1.498	1.493	1.522	1.496
C1–N1	1.51(1)	1.499	1.505	1.529	1.508
N2–Pd–N1	87.4(3)	87.2	87.6	85.8	84.9
N2–Pd–Cl1	176.5(2)	177.0	176.0	179.1	175.7
O1–Pd–N1	169.9(3)	169.6	170.0	165.1	161.0
O1–Pd–Cl1	93.2(2)	97.4	95.4	98.6	95.9
O1–Pd–N2	83.3(3)	83.1	82.5	81.2	84.4
N1–Pd–Cl1	96.1(2)	92.0	94.5	94.3	93.6
N2–C2–C1	109.2(7)	108.3	108.6	110.8	106.6
N1–C1–C2	108.4(7)	109.8	112.2	107.6	111.9
Pd–N1–C1	104.8(5)	105.2	104.2	100.3	105.1
Pd–N1–C9	122(1)	116.7	122.1	118.2	123.8
Pd–N2–C2	103.1(5)	103.4	104.4	107.0	99.0
Pd–N2–C3	106.5(5)	107.5	107.6	102.2	108.9

Solid-state structure of **2**

The complex [PdCl{(S,S)-(Et)eddv}] is found to crystallize in orthorhombic crystal system in the chiral space group $P2_12_12_1$. The molecular structure is shown in Fig. 3, and selected bond lengths and angles are listed in Table 1.

The Pd atom is in a square-planar coordination geometry with one tridentate [(S,S)-(Et)eddv][−] ligand coordinated

through one carboxylic oxygen and two nitrogen atoms ($\kappa^2N,N',\kappa O$ coordination mode). The chloro ligand occupies the fourth coordination site. A five-membered ring is formed by the coordination of the [(S,S)-(Et)eddv][−] ligand to Pd(II), and ethylenediamine and aminocarboxylate are in envelope conformation on C2 and N2, respectively. The X-ray structural analysis showed that the isolated compound is the (*R,R*)-*N,N'*-configured isomer.

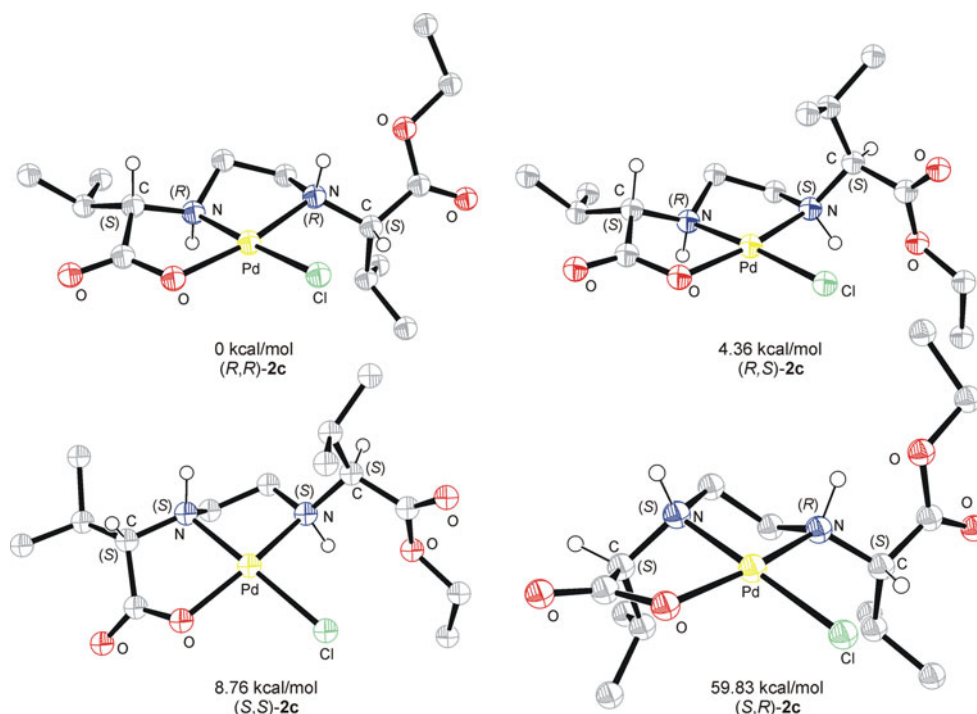
The Pd–N bond lengths (2.028(7) and 2.043(7) Å) are comparable with those found in [PdCl{(S,S)-(iPr)eddip}] complex (1.995(5)–2.047(6) Å) [22] and in Pd(II) complexes with ethylenediamine ligands (2.03–2.09 Å) [23, 24]. On the other hand, the Pd–N bond lengths are shorter than those found in palladium complexes with edta tetraalkyl ester ligands (2.098(4)–2.106(7) Å) [8, 25–27]. The Pd–O bond length in **2** (1.990(6) Å) is shorter than that in [PdCl{(S,S)-(iPr)eddip}] (2.019(5) Å) but within the range of values for five- and six-membered chelates containing Pd–O bonds (1.999(6)–2.105(3) Å) [28, 29]. Also, the Pd–Cl bond length (2.308(2) Å) is shorter than in [PdCl{(S,S)-(iPr)eddip}] (2.325(1) Å) and comparable with those found in [PdCl₂(R₄edta)] and [PdCl₂(edta)]·*x*H₂O complexes (R = Me, Et; *x* = 5, 6; 2.287(2)–2.298(2) and 2.30(1) Å, respectively) [8, 26, 27].

Intramolecular N1–H···O2 (N1···O2 = 2.838(9) Å) and intermolecular N1–H···O3 (N1···O3 = 2.997(8) Å) hydrogen bonds were observed in the structure of [PdCl{(S,S)-(iPr)eddip}], while in the structure of **2**, two intermolecular hydrogen bonds are found (N1–H1···O2 = 3.002(9) Å and N2–H2···C11 = 3.263(7) Å). Apart from this, some non-classical intramolecular C–H···A (C1···O3 = 3.07(1) Å, C6···O2 = 2.99(2) Å, C9···C11 = 3.36(1) Å, C14···O3 = 2.78(3) Å) and intermolecular C–H···O interactions (C2···O1 = 3.26(1) Å) were located [30].

Quantum chemical calculations

In order to investigate the selectivity of formation of only one of the four possible isomers of **2**, quantum chemical

Fig. 4 Theoretically determined structures (DFT calculations) of $[\text{PdCl}_2\{(S,S)\text{-}(\text{Et})\text{eddv}\}]$ (**2c**) (energies are relative to the most stable isomer $(R,R)\text{-2c}$)



calculations were employed. DFT calculations were conducted for the isomers resulting from the coordination of $[(S,S)\text{-}(\text{Et})\text{eddv}]^-$ to the chloropalladium(II) moiety. The structures were fully optimized without any symmetry constraints and were found to represent equilibrium structures. Optimized structures of the $[\text{PdCl}\{(S,S)\text{-}(\text{Et})\text{eddv}\}]$ complex (**2c**) were represented in Fig. 4.

From the quantum chemical calculations, it is obvious that three of the four isomers of **2c** have more strain, and they are higher in energy than $(R,R)\text{-2c}$ by 4.4–59.8 kcal/mol (Fig. 4). Therefore, this indicates that the $(R,R)\text{-2c}$ isomer is thermodynamically more stable than the other isomers and that the energy differences correlate well with the results from X-ray crystallography and NMR spectroscopic investigations. As can be seen from comparison of calculated and experimental bond lengths and angles shown in Table 1, the calculated values for $(R,R)\text{-2c}$ are well matched with the results obtained from X-ray structural analysis.

Conclusion

The present investigation shows that $[(S,S)\text{-H}_2(\text{Et})_2\text{-eddv}]\text{Cl}_2$ ligand precursor reacts with $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$ yielding a palladium(II) complex with partly hydrolyzed ester $[\text{PdCl}\{(S,S)\text{-}(\text{Et})\text{eddv}\}]$ (**2**). The reaction is diastereoselective, and only one out of the four possible diastereoisomers was formed, $(R,R)\text{-2}$ (^1H and ^{13}C NMR

spectroscopy, X-ray structural analysis). Quantum chemical calculations for **2** supported formation of $(R,R)\text{-N,N'}$ diastereoisomer for **2**.

Acknowledgments The authors are grateful to the Ministry of Science and Environmental Protection of the Republic of Serbia for financial support (Grant No. 172016).

References

- Kaluderović GN, Đinović VM, Juranić ZD, Stanojković TP, Sabo TJ (2005) *J Inorg Biochem* 99:488
- Kaluderović GN, Schmidt H, Schwiager S, Wagner Ch, Paschke R, Dietrich A, Mueller T, Steinborn D (2008) *Inorg Chim Acta* 361:1395
- Krajčinović BB, Kaluderović GN, Steinborn D, Schmidt H, Wagner Ch, Žižak Ž, Juranić ZD, Trifunović SR, Sabo TJ (2008) *J Inorg Biochem* 102:892
- Kaluderović GN, Miljković D, Momčilović M, Đinović VM, Mostarica-Stojković M, Sabo TJ, Trajković V (2005) *Int J Cancer* 116:479
- Mijatović S, Maksimović-Ivanić D, Radovica J, Miljković D, Kaluderović GN, Sabo TJ, Trajković V (2005) *Cell Mol Life Sci* 62:1275
- Ruiz J, Lorenzo J, Sanglas L, Cutillas N, Vicente C, Villa MD, Avilés FX, López G, Moreno V, Pérez J, Bautista D (2006) *Inorg Chem* 45:6347
- Jamieson ER, Lippard SJ (1999) *Chem Rev* 99:2467
- Kaluderović GN, Schmidt H, Wagner Ch, Merzweiler K, Steinborn D (2007) *Collect Czech Chem Commun* 72:560
- Kaluderović GN, Heinemann FW, Knežević NŽ, Trifunović SR, Sabo TJ (2004) *J Chem Crystall* 34:185
- Brudzińska I, Mikata Y, Obata M, Ohtsuki Ch, Yano Sh (2004) *Bioorg Med Chem Lett* 14:2533

11. Khan BT, Bhatt J, Najmuddin K, Shamsuddin S, Annapoorna KJ (1991) *J Inorg Biochem* 44:55
12. Navarro-Ranninger C, Pérez JM, Zamora F, González VM, Masaguer JR, Alonso C (1993) *J Inorg Biochem* 52:37
13. Vujić JM, Cvijović M, Kaluđerović GN, Milovanović M, Zmej-kovski BB, Volarević V, Arsenijević N, Sabo TJ, Trifunović SR (2010) *Eur J Med Chem* 45:3601
14. Sabo TJ, Kaluđerović GN, Grgurić-Šipka SR, Heinemann FW, Trifunović SR (2004) *Inorg Chem Commun* 7:241
15. SADABS 2.06, Bruker AXS Inc. (2002) Madison WI, USA
16. SHELXTL NT 6.12, Bruker-AXS Inc. (2002) Madison, WI, USA
17. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Montgomery JA, Vreven JrT, Kudin KN, Burant JC, Millam JM, Iyengar SS, Tomasi J, Barone V, Mennucci B, Cossi M, Scalmani G, Rega N, Petersson GA, Nakatsuji H, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Klene M, Li X, Knox JE, Hratchian HP, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Ayala PY, Morokuma K, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Zakrzewski VG, Dapprich S, Daniels AD, Strain MC, Farkas O, Malick DK, Rabuck AD, Raghava-chari K, Foresman JB, Ortiz JV, Cui Q, Baboul AG, Clifford S, Cioslowski J, Stefanov BB, Liu G, Liashenko A, Piskorz P, Komaromi I, Martin RL, Fox DJ, Keith T, Al-Laham MA, Peng CY, Nanayakkara A, Challacombe M, Gill PMW, Johnson B, Chen W, Wong MW, Gonzalez C (2004) GAUSSIAN 03 Revision C.02 Gaussian JA Pople Inc Wallingford CT
18. Adamo C, Barone V (1997) *Chem Phys Lett* 274:242
19. Dunning TH Jr, Hay PJ (1976) *Modern theoretical chemistry*, vol 3, 3rd edn. Plenum, New York, p 1
20. Andrae D, Häußermann U, Dolg M, Stoll H, Preuß H (1990) *Theor Chem Acc* 77:123
21. De Iuliis MZ, Watson IDG, Yudin AK, Morris RH (2009) *Can J Chem* 87:54
22. Krajčinović BB, Kaluđerović GN, Steinborn D, Schmidt H, Wagner C, Merzweiler K, Trifunović SR, Sabo TJ (2009) *J Serb Chem Soc* 74:389
23. Baggio S, Amzel LM, Becka LN (1970) *Acta Cryst B* 26:1698
24. Wiesner JR, Lingafelter EC (1966) *Inorg Chem* 5:1770
25. Kaplun M, Sandström M, Boström D, Shchukarev A, Peresson P (2005) *Inorganica Chim Acta* 358:527
26. Robinson DJ, Kennard CHL (1970) *J Chem Soc A* 1008
27. Luo X-M, Chen X-H, Shanmuga Sundara Raj S, Fun H-K, Zhu L-G (1999) *Acta Crystallogr C* 55:1220
28. Singh AK, Sooriyakumar J, Husebye S, Tornroos KW (2000) *J Organomet Chem* 612:46
29. Billodeaux DR, Fronczek FR, Yoneda A, Newkome GR (1998) *Acta Cryst C* 54:1439
30. Steiner TH (1996) *Cryst Rev* 6:1



Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with some alkyl derivatives of thiosalicylic acids: Crystal structure of the bis(*S*-benzyl-thiosalicylate)–palladium(II) complex, [Pd(*S*-bz-thiosal)₂]

Gordana P. Radić^a, Verica V. Glođović^a, Ivana D. Radojević^b, Olgica D. Stefanović^b, Ljiljana R. Čomić^b, Zoran R. Ratković^a, Arto Valkonen^c, Kari Rissanen^c, Srećko R. Trifunović^{a,*}

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

^b Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

^c Nanoscience Center, Department of Chemistry, University of Jyväskylä, P.O. Box 35, 40014, Finland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 May 2011

Accepted 24 August 2011

Available online 21 September 2011

Keywords:

Palladium(II) complexes

Crystal structure

IR, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy

Antimicrobial activity

ABSTRACT

S-Alkyl (R = benzyl, methyl, ethyl, propyl and butyl) derivatives of thiosalicylic acid and the corresponding palladium(II) complexes were prepared and their structures were proposed on the basis of infrared, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. The *cis* geometrical configurations of the isolated complexes were proposed on the basis of an X-ray structural study of the bis(*S*-benzyl-thiosalicylate)–palladium(II), [Pd(*S*-bz-thiosal)₂] complex.

Antimicrobial activity of the tested compounds was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum microbicidal concentration (MMC) in relation to 26 species of microorganisms. The tested ligands, with a few exceptions, show low antimicrobial activity. The palladium(II) complexes, [Pd(*S*-R-thiosal)₂], have statistically significant higher activity than the corresponding ligands. The complexes [Pd(*S*-*et*-thiosal)₂] and [Pd(*S*-*pro*-thiosal)₂] displayed the strongest activity amongst the all tested compounds. The palladium(II) complexes show selective and moderate antibacterial activity and significant antifungal activity. The most sensitive were *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Thiosalicylic acid and its derivatives have many various applications: as reagents for metal determination [1,2], modifiers for graphite paste electrodes [3], as photoinitiators for free radical polymerization [4] and in cosmetics in hair growth treatment [5]. They are useful in numerous disease treatments, in particular inflammatory, allergic and respiratory diseases [6] as well as Ras-tumor growth inhibitors [7]. Ketones derived from thiosalicylic acids have application as bile acid transport inhibitors [8].

The synthesis and evaluation of the biological activity of new metal-based compounds are fields of growing interest. Numerous complexes based on the palladium(II) ion have been synthesized and their different biological activities have been documented [9–11]. The impact of different palladium complexes on the growth and metabolism of various groups of microorganisms has been studied. Garoufis et al. [12] reviewed numerous scientific papers on anti-viral, antibacterial and antifungal activity of palladium(II) complexes with different types of ligands (sulfur and nitrogen donor ligands, Schiff base ligands and drugs as ligands). There are

other papers in the literature showing different intensities of palladium complex activity on various species of bacteria and fungi [13–20].

S-Alkyl (alkyl = benzyl, methyl, ethyl, propyl and butyl) derivatives of thiosalicylic acid have already been prepared and characterized using IR and elemental microanalysis [21–24], and the *S*-methyl derivate has also been characterized using NMR spectroscopy [22,23].

Thiosalicylic acid has been used for the synthesis of palladium(II) complexes [25–28], but corresponding *S*-alkyl derivatives have not. Our investigations are focused on the synthesis of the corresponding Pd(II) complexes of *S*-alkyl derivatives as well as the *in vitro* antimicrobial activity of the ligands and the complexes. The structures of the isolated complexes are proposed on the basis of their infrared, ¹H and ¹³C NMR spectra. The structures as well as the *cis* geometrical configurations of the isolated complexes are proposed on the basis of an X-ray structural study of the *cis*-*S*-*cis*-O bis(*S*-benzyl-thiosalicylate)–palladium(II) [Pd(*S*-bz-thiosal)₂] complex. Our investigations are focused on the impact of the newly synthesized Pd(II) complexes on probiotics, since they are used as supplements and they play a significant role in the protection and maintenance of the balance of intestinal microflora during antibiotic therapy.

* Corresponding author.

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

2. Experimental

2.1. Chemistry

2.1.1. Reagents and instruments

All chemicals were obtained commercially and used without further purification. For the infrared spectra, a Perkin–Elmer Spectrum One FT-IR spectrometer was employed. Elemental microanalyses for C, H and S were performed by standard methods on a Vario III CHNS Elemental Analyzer, Elemental Analysensysteme GmbH.

2.1.2. General procedure for the synthesis of *S*-alkyl thiosalicylic acids (**L1**)–(**L5**)

The thioacid ligands **L1**–**L5** were prepared by alkylation of thiosalicylic acid by means of the corresponding alkyl halogenides in alkaline water–ethanol solution.

Thiosalicylic acid (1 mmol) was added to a 100 cm³ round bottom flask containing 50 cm³ of 3a 0% solution of ethanol in water and stirred. A solution of NaOH (2 mmol in 5 cm³ of water) was added to the acid suspension, whereupon the solution became clear. The corresponding alkyl halogenide (2 mmol) was dissolved in 5 cm³ of ethanol and transferred to the stirred solution. The resulting mixture was kept overnight at 60 °C. The reaction mixture was transferred into a beaker and ethanol was evaporated off on a water bath. Diluted hydrochloric acid (2 mol/dm³) was added to the resulting water solution and *S*-alkyl thiosalicylic acid was precipitated as a white powder. The liberated acid was filtered off and washed with plenty of distilled water. The product was dried under vacuum overnight. Yield: 85–95%.

S-Benzyl-thiosalicylic acid (**L1**): M.p. 179–180 °C, white powder. IR (KBr, cm⁻¹): 3414, 3061, 2920, 2648, 2559, 1674, 1584, 1562, 1463, 1412, 1317, 1272, 1255, 1154, 1062, 1046, 897, 743, 711, 652, 551. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 4.17 (s, 2H, CH₂), 7.21–8.14 (m, 9H, Ar and bz). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 35.9 (CH₂), 124.1, 125.9, 126.7, 127.3, 127.9, 128.3, 128.6, 129.3, 131.0, 132.4, 136.8, 141.3 (Ar and bz), 167.5 (COOH).

S-Methyl-thiosalicylic acid (**L2**): M.p. 165–166 °C, white powder. IR (KBr, cm⁻¹): 3446, 3068, 2916, 2652, 2560, 1674, 1586, 1561, 1466, 1412, 1308, 1291, 1270, 1255, 1151, 1062, 1048, 892, 743, 699, 652, 556. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 2.48 (s, 3H, CH₃), 7.16–8.18 (m, 4H, Ar). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 15.6 (CH₃), 123.5, 124.4, 125.4, 132.5, 133.6, 144.4 (Ar), 171.6 (COOH).

S-Ethyl-thiosalicylic acid (**L3**): M.p. 133–134 °C, white powder. IR (KBr, cm⁻¹): 3435, 3066, 2972, 2652, 2562, 1682, 1588, 1563, 1466, 1414, 1315, 1275, 1252, 1152, 1063, 1049, 884, 740, 704, 690, 651, 550. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 1.42 (t, 3H, CH₃), 2.97 (q, 2H, CH₂), 7.16–8.17 (m, 4H, Ar). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 13.1 (CH₃), 26.2 (CH₂), 124.0, 125.9, 126.4, 132.6, 133.2, 142.9 (Ar), 171.4 (COOH).

S-Propyl-thiosalicylic acid (**L4**): M.p. 104 °C, white powder. IR (KBr, cm⁻¹): 3414, 3056, 2979, 2641, 2555, 1678, 1588, 1562, 1462, 1405, 1310, 1271, 1257, 1150, 1062, 1053, 811, 740, 704, 691, 653, 554. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 1.1 (t, 3H, CH₃), 1.74 (m, 2H, CH₂), 2.92 (t, 2H, CH₂), 7.15–8.15 (m, 4H, Ar). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 13.8 (CH₃), 21.6 (CH₂), 34.1 (CH₂), 123.8, 125.6, 126.2, 132.5, 133.1, 143.1 (Ar), 171.6 (COOH).

S-Butyl-thiosalicylic acid (**L5**): M.p. 82–83 °C, white powder. IR (KBr, cm⁻¹): 3420, 2955, 2869, 2641, 2556, 1674, 1586, 1560, 1462, 1408, 1320, 1270, 1250, 1153, 1060, 1048, 924, 810, 738, 704, 651, 553. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0.96 (t, 3H, CH₃), 1.46 (m, 2H, CH₂), 1.78 (m, 2H, CH₂), 2.94 (t, 2H, CH₂), 7.15–8.16 (m, 4H, Ar). NMR (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 13.7 (CH₃), 22.3 (CH₂), 30.2 (CH₂), 31.9 (CH₂), 123.8, 125.7, 126.3, 132.5, 133.1, 143.1 (Ar), 171.4 (COOH).

2.1.3. Preparation of the bis(*S*-benzyl-thiosalicylate)–palladium(II) complex, [Pd(*S*-bz-thiosal)₂] (**C1**)

K₂[PdCl₄] (0.100 g, 0.3065 mmol) was dissolved in 10 cm³ of water on a steam bath and (*S*-benzyl)-2-thiosalicylic acid (0.1497 g, 0.613 mmol) was added into the solution. The resulting mixture was stirred for 2 h and during this time an aqueous solution of LiOH (0.0256 g, 0.613 mmol in 10 cm³ of water) was introduced. The complex [Pd(*S*-bz-thiosal)₂] (**C1**) as a yellow precipitate was filtered, washed with water and air-dried. Yield: 0.11 g (58.70%). *Anal. Calc.* for C₂₈H₂₂O₄S₂Pd (*M*_r = 592.98): C, 56.71; H, 3.74; S, 10.82. Found: C, 56.43; H, 3.85; S, 10.75%. IR (KBr, cm⁻¹): 3420, 3057, 1634, 1616, 1562, 1327, 1146, 753, 708, 698. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 4.05 (s, 4H, CH₂), 7.08–8.10 (m, 9H, Ar and bz). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 25.9 (CH₂), 124.1, 125.6, 125.7, 126.2, 126.3, 126.8, 127.3, 127.8, 129.5, 133.2, 136.2, 139.7 (Ar and bz), 171.5 (COO⁻).

2.1.4. Preparation of the bis(*S*-methyl-thiosalicylate)–palladium(II) complex, [Pd(*S*-met-thiosal)₂] (**C2**)

The complex [Pd(*S*-met-thiosal)₂] (**C2**) was prepared as described in Section 2.1.3 using (*S*-methyl)-2-thiosalicylic acid (0.103 g, 0.613 mmol) instead of (*S*-benzyl)-2-thiosalicylic acid. Yield: 0.08 g (59.80%). *Anal. Calc.* for C₁₆H₁₄O₄S₂Pd (*M*_r = 440.672): C, 43.61; H, 3.20; S, 14.52. Found: C, 43.41; H, 3.39; S, 14.21%. IR (KBr, cm⁻¹): 3419, 1619, 1597, 1399, 1385, 1332, 1306, 1142, 960, 865, 741, 693, 654. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 2.35 (s, 6H, CH₃), 7.19–8.08 (m, 8H, Ar). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 14.6 (CH₃), 123.6, 125.1, 125.2, 129.0, 132.7, 135.7, (Ar), 171.8 (COO⁻).

2.1.5. Preparation of the bis(*S*-ethyl-2-thiosalicylate)–palladium(II) complex, [Pd(*S*-et-thiosal)₂] (**C3**)

The complex [Pd(*S*-et-thiosal)₂] (**C3**) was prepared as described in Section 2.1.3 using (*S*-ethyl)-2-thiosalicylic acid (0.1117 g, 0.613 mmol) instead of (*S*-benzyl)-2-thiosalicylic acid. Yield: 0.0832 g (57.90%). *Anal. Calc.* for C₁₈H₁₈O₄S₂Pd (*M*_r = 468.856): C, 46.11; H, 3.87; S, 13.68. Found: C, 45.97; H, 3.93; S, 13.54%. IR (KBr, cm⁻¹): 1436, 1587, 1518, 1393, 752. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 1.27 (t, 6H, CH₃), 2.83 (q, 4H, CH₂), 7.11–8.08 (m, 8H, Ar). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 14.4 (CH₃), 13.8 (CH₂), 124.8, 125.3, 126.1, 128.7, 133.2, 135.9 (Ar), 172.0 (COO⁻).

2.1.6. Preparation of the bis(*S*-propyl-2-thiosalicylate)–palladium(II) complex, [Pd(*S*-pro-thiosal)₂] (**C4**)

The complex [Pd(*S*-pro-thiosal)₂] (**C4**) was prepared as described in Section 2.1.3 using (*S*-propyl)-2-thiosalicylic acid (0.1203 g, 0.613 mmol) instead of (*S*-benzyl)-2-thiosalicylic acid. Yield: 0.0889 g (58.40%). *Anal. Calc.* for C₂₀H₂₂O₄S₂Pd (*M*_r = 496.908): C, 48.34; H, 4.46; S, 12.91. Found: C, 48.52; H, 4.11; S, 12.73%. IR (KBr, cm⁻¹): 1421, 1589, 1541, 1520, 1397, 752. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 0.98 (t, 6H, CH₃), 1.76 (m, 4H, CH₂), 2.84 (t, 4H, CH₂), 7.20–8.25 (m, 8H, Ar). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 13.2 (CH₃), 22.0 (CH₂), 27.6 (CH₂), 125.1, 126.6, 126.7, 130.5, 134.2, 137.2 (Ar), 172.5 (COO⁻).

2.1.7. Preparation of the bis(*S*-butyl-2-thiosalicylate)–palladium(II) complex, [Pd(*S*-bu-thiosal)₂] (**C5**)

The complex [Pd(*S*-bu-thiosal)₂] (**C5**) was prepared as described in Section 2.1.3 using (*S*-butyl)-2-thiosalicylic acid, (0.1289 g, 0.613 mmol) instead of (*S*-benzyl)-2-thiosalicylic acid. Yield: 0.0941 g (58.43%). *Anal. Calc.* for C₂₂H₂₆O₄S₂Pd (*M*_r = 524.960): C, 50.33; H, 4.99; S, 12.22. Found: C, 50.52; H, 4.51; S, 12.56%. IR (KBr, cm⁻¹): 3420, 1634, 1616, 1561, 1327, 1146, 753, 698. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 0.95 (t, 6H, CH₃), 1.33 (m, 4H, CH₂), 1.62 (m, 4H, CH₂), 2.79 (t, 4H, CH₂), 7.24–8.19 (m, 8H, Ar).

Table 1
Crystal data and structure refinement for the [Pd(S-bz-thiosal)₂] complex (**C1**).

Identification code	CCDC 824331
Empirical formula	C ₂₈ H ₂₂ O ₄ S ₂ Pd
Formula weight	592.98
T (K)	123(2)
λ (Å)	0.71073
Crystal system	monoclinic
Space group	P2 ₁ /c
<i>Unit cell dimensions</i>	
a (Å)	12.0280(5)
b (Å)	21.0330(8)
c (Å)	9.5049(4)
α (°)	90
β (°)	92.578(2)
γ (°)	90
V (Å ³)	2402.16(17)
Z	4
D _{calc} (g/cm ³)	1.640
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.981
F(000)	1200
Crystal size (mm ³)	0.16 × 0.04 × 0.02
Theta range for data collection	2.96–25.02°
Index ranges	–13 ≤ h ≤ 14, –23 ≤ k ≤ 25, –11 ≤ l ≤ 11
Reflections collected	13559
Independent reflections	4212 [R _{int} = 0.1276]
Completeness to θ = 25.02°	99.3%
Absorption correction	multi-scan
Maximum and minimum transmission	0.9807 and 0.8589
Refinement method	full-matrix least-squares on F ²
Data/restraints/parameters	4212/78/316
Goodness-of-fit (GOF) on F ²	0.981
Final R indices [I > 2σ(I)]	R ₁ = 0.0624, wR ₂ = 0.1034
R indices (all data)	R ₁ = 0.1215, wR ₂ = 0.1179
Largest difference in peak and hole (e Å ⁻³)	0.587 and –0.637

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 13.4 (CH₃), 20.5 (CH₂), 21.6 (CH₂), 33.7 (CH₂), 123.8, 124.4, 126.3, 130.2, 131.9, 135.9 (Ar), 171.9 (COO⁻).

2.2. Crystal structure determination

Crystals of the [Pd(S-bz-thiosal)₂] complex (**C1**) suitable for X-ray determination were obtained by slow crystallization from a MSO-water system. The structural data were collected by a Bruker-Nonius Kappa CCD diffractometer equipped with an APEXII detector using graphite monochromatised Mo Kα radiation. The COLLECT [29] data collection software was used and obtained data were processed with DENZO-SMN [30]. The structures were solved by direct methods, using SIR-2004 [31], and refined on F², using SHELXL-97 [32]. The reflections were corrected for Lorenz-polarization effects and multi-scan absorption correction was applied [33]. The hydrogen atoms were inserted at their calculated positions with isotropic temperature factors [U_{iso}(H) factors of 1.2 times U_{eq}(C)] and refined as riding atoms. The figure was drawn with ORTEP-3 [34]. Other experimental X-ray data are shown in Table 1.

2.3. In vitro antimicrobial assay

2.3.1. Test substances

The tested compounds were dissolved in DMSO and then diluted into nutrient liquid medium to achieve a concentration of 10%. An antibiotic, doxycycline (Galenika A.D., Belgrade), was dissolved in nutrient liquid medium, a Mueller–Hinton broth (Torlak, Belgrade), while an antimycotic, fluconazole (Pfizer Inc., USA), was dissolved in Sabouraud dextrose broth (Torlak, Belgrade).

2.3.2. Test microorganisms

The antimicrobial activity of the ligands **L1–L5** and the corresponding palladium(II) complexes **C1–C5** was tested against 26 microorganisms. The experiment involved 14 strains of pathogenic bacteria, including five standard strains (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633) and nine clinical isolates (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhimurium*). Also, four species of probiotic bacteria (*Lactobacillus plantarum* PMFKG-P31, *Bacillus subtilis* IP 5832 PMFKG-P32, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* PMFKG-P33, *Lactobacillus rhamnosus* PMFKG-P35), five species of mould (*Aspergillus niger* ATCC 16404, *Aspergillus fumigatus* PMFKG-F23, *Aspergillus flavus* PMFKG-F24, *Aspergillus restrictus* PMFKG-F25, *A. niger* PMFKG-F26) and three yeast species (*Candida albicans* (clinical isolate), *Rhodotorula* sp. PMFKG-F27, *Saccharomyces boulardii* PMFKG-P34) were tested. All clinical isolates were a generous gift from the Institute of Public Health, Kragujevac. The other microorganisms were provided from a collection held by the Microbiology Laboratory Faculty of Science, University of Kragujevac.

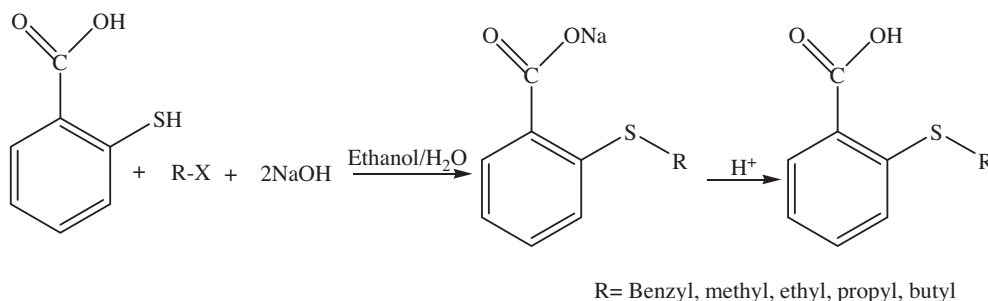
2.3.3. Suspension preparation

Bacterial and yeast suspensions were prepared by the direct colony method. The colonies were taken directly from the plate and were suspended in 5 cm³ of sterile 0.85% saline. The turbidity of the initial suspension was adjusted by comparing it with 0.5 McFarland's standard (0.5 cm³ 1.17% w/v BaCl₂ × 2H₂O + 99.5 cm³ 1% w/v H₂SO₄) [35]. When adjusted to the turbidity of the 0.5 McFarland's standard, the bacteria suspension contains about 10⁸ colony forming units (CFU)/cm³ and a suspension of yeast contains 10⁶ CFU/cm³. Ten-fold dilutions of the initial suspension were additionally prepared into sterile 0.85% saline. The suspensions of fungal spores were prepared by gentle stripping of spore from slopes with growing *aspergilli*. The resulting suspensions were 1:1000 diluted in sterile 0.85% saline.

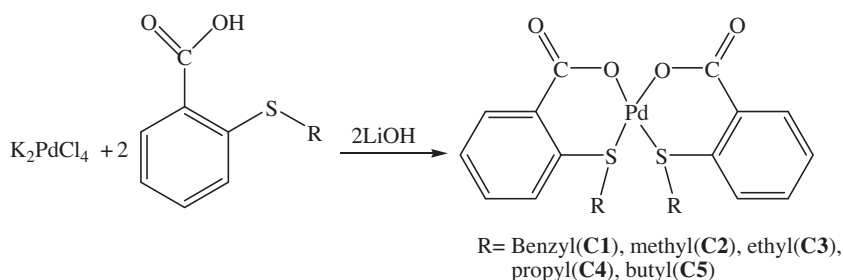
2.3.4. Microdilution method

Antimicrobial activity was tested by determining the minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum microbicidal concentration (MMC) using the microdilution plate method with resazurin [36]. The 96-well plates were prepared by dispensing 100 μL of nutrient broth, Mueller–Hinton broth for bacteria and Sabouraud dextrose broth for fungi and yeasts, into each well. A 100 μL aliquot from the stock solution of the tested compound (with a concentration of 2000 μg/cm³) was added into the first row of the plate. Then, twofold, serial dilutions were performed by using a multichannel pipette. The obtained concentration range was from 1000 to 7.81 μg/cm³. A 10 μL aliquot of diluted bacterial yeast suspension and suspension of spores were added to each well to give a final concentration of 5 × 10⁵ CFU/cm³ for bacteria and 5 × 10³ CFU/cm³ for fungi and yeast. Finally, 10 μL resazurin solution was added to each well inoculated with bacteria and yeast. Resazurin is an oxidation–reduction indicator used for the evaluation of microbial growth. It is a blue non-fluorescent dye that becomes pink and fluorescent when reduced to resorufin by oxidoreductases within viable cells [37]. The inoculated plates were incubated at 37 °C for 24 h for bacteria, 28 °C for 48 h for the yeast and 28 °C for 72 h for fungi. The MIC was defined as the lowest concentration of the tested substance that prevented the resazurin color change from blue to pink. For fungi, the MIC values of the tested substances were determined as the lowest concentration that visibly inhibited mycelia growth.

Doxycycline and fluconazole were used as a positive control. A solvent control test was performed to study the effect of 10% DMSO on the growth of microorganisms. It was observed that 10% DMSO



Scheme 1. The preparation of the benzyl, methyl, ethyl, propyl and butyl esters of 2-thiosalicylic acid.



Scheme 2. The preparation of the [Pd(S-R-thiosal)₂].

did not inhibit the growth of microorganisms. Also, in the experiment, the concentration of DMSO was additionally decreased because of the twofold serial dilution assay (the working concentration was 5% and lower). Each test included growth control and sterility control. All tests were performed in duplicate and the MICs were constant. Minimum bactericidal and fungicidal concentrations were determined by plating 10 μ L of samples from wells where no indicator color change was recorded, on nutrient agar medium. At the end of the incubation period the lowest concentration with no growth (no colony) was defined as the minimum microbicidal concentration.

2.3.5. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using SPSS package. Mean differences were established by the Student's *t*-test. Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA). In all cases *P* values <0.05 were considered statistically significant.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis and chemical characterization

S-Alkyl (R = benzyl, methyl, ethyl, propyl and butyl) derivatives of thiosalicylic acid were prepared by the alkylation of thiosalicylic acid using the corresponding alkyl halogenides in alkaline water-ethanol solution (Scheme 1). The corresponding [Pd(S-R-thiosal)₂] complexes were obtained by the direct reaction of K₂[PdCl₄] with the *S*-alkyl derivative of thiosalicylic acid (molar ratio 1:2) in water solution with satisfactory yields (more than 50%) (Scheme 2).

A bidentate S–O coordination of the ligands **L1**–**L5** to the Pd(II) ion is expected. The lack of S–H stretching absorption bands in the complexes **C1**–**C5** in the range 2600–2550 cm^{-1} [38] (2559 cm^{-1} for **L1**, 2560 cm^{-1} for **L2**, 2562 cm^{-1} for **L3**, 2555 cm^{-1} for **L4** and 2556 cm^{-1} for **L5**) suggests the deprotonation of the S–H groups of the ligands and their coordination to the Pd(II) ion in the complexes. The carboxylate asymmetric stretching bands of ligands (1674 cm^{-1} for **L1** and **L2**, 1682 cm^{-1} for **L3**, 1678 cm^{-1} for **L4**

and 1674 cm^{-1} for **L5**) are located at lower energies than expected (1700–1750 cm^{-1}) [38,39]. This could be explained by the presence of big R–S groups in the *ortho* position. The positions of these bands in corresponding **C1**–**C5** complexes are in the expected region (1600–1650 cm^{-1}) [18] (1633 and 1616 cm^{-1} for **C1**, 1619 cm^{-1} for **C2**, 1587 cm^{-1} for **C3**, 1589 cm^{-1} for **C4** and 1633 and 1615 cm^{-1} for **C5**), confirming their deprotonation and coordination in the complexes. The presence of two bands for **C1** and **C5** suggests small energy differences. These differences could be explained due to the presence of large benzyl and butyl groups and their steric impact to the phenyl part of the thiosalicylic acid.

Chemical shifts arising from carbon and hydrogen atoms of this type of thioether and the corresponding palladium(II) complexes are found at the expected, and almost the same positions. Some differences in the chemical shifts of the carbon atoms of the carboxylic groups of the *S*-benzyl, *S*-methyl, *S*-ethyl, *S*-propyl and *S*-

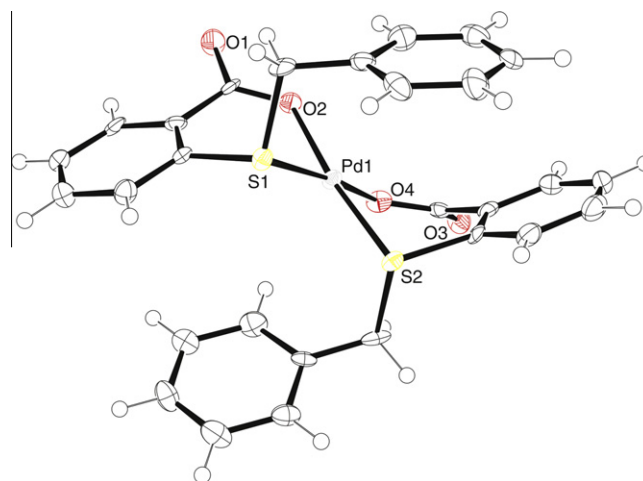


Fig. 1. Molecular structure of the [Pd(S-benzyl)₂] complex (**C1**) (heteroatoms are shown with an octant shaded mode).

Table 2
Selected bond lengths (Å) and angles (°) for the [Pd(S-benzyl)₂] complex (**C1**).

Bond lengths		(Å)	Bond angles		(°)	
Pd(1)–O(2)		2.024(4)	O(2)–Pd(1)–O(4)		88.4(2)	
Pd(1)–O(4)		2.034(4)	O(2)–Pd(1)–S(1)		89.84(14)	
Pd(1)–S(1)		2.246(2)	O(4)–Pd(1)–S(1)		172.52(15)	
Pd(1)–S(2)		2.254(2)	O(2)–Pd(1)–S(2)		172.77(14)	
S(1)–C(3)		1.778(7)	O(4)–Pd(1)–S(2)		89.70(14)	
S(1)–C(8)		1.829(7)	S(1)–Pd(1)–S(2)		92.94(7)	
S(2)–C(17)		1.787(7)	C(3)–S(1)–C(8)		105.9(3)	
S(2)–C(22)		1.830(7)	C(3)–S(1)–Pd(1)		100.0(2)	
O(2)–C(1)		1.278(8)	C(8)–S(1)–Pd(1)		104.4(2)	
O(4)–C(15)		1.279(8)	C(17)–S(2)–C(22)		105.9(3)	
O(1)–C(1)		1.229(8)	C(17)–S(2)–Pd(1)		99.1(2)	
O(3)–C(15)		1.235(8)	C(22)–S(2)–Pd(1)		105.7(2)	
C(16)–C(15)		1.516(10)	C(1)–O(2)–Pd(1)		128.5(4)	
C(2)–C(1)		1.518(9)	C(15)–O(4)–Pd(1)		127.5(5)	
C(22)–C(23)		1.493(9)				
C(9)–C(8)		1.506(10)				
Short contacts		H...A (Å)	D...A (Å)	(°)	Dihedral angles	(°)
C6–H6...O4 ^a			3.318(9)	125	Pd(1)–S(2)–C(22)–C(23)	–69.1(5)
C11–H11...O2 ^b			3.414(9)	155	Pd(1)–S(1)–C(8)–C(9)	–52.0(5)
C14–H14...O3 ^c			3.293(9)	156	Pd(1)–S(1)–C(3)–C(2)	–42.3(6)
C20–H20...O1 ^b			3.305(9)	127	Pd(1)–S(2)–C(17)–C(16)	–40.5(6)
C22–H22B...O3 ^d			3.380(9)	134	C(3)–C(2)–C(1)–O(2)	29.2(11)
C24–H24...O3 ^d			3.471(9)	144	C(17)–C(16)–C(15)–O(4)	34.2(10)
C25–H25...O1 ^e			3.388(9)	168		
C27–H27...O1 ^a			3.223(10)	127		
C4–H4...π ^{d,g}	2.71		3.653(10)	174		
C18–H18...π ^{d,g}	2.71		3.617(10)	159		
C22–H22A...π ^{f,h}	2.87		3.778(10)	153		
π...π ^{d,h}			3.308(10)			

Symmetry operators:

^a $-x, -y + 1, -z$.

^b $-x + 1, -y + 1, -z$.

^c $x, y, z + 1$.

^d $x, -y + 1/2, z + 1/2$.

^e $-x, y - 1/2, -z + 1/2$.

^f $x, -y + 1/2, z - 1/2$.

^g Distance to closest C atom.

^h Distance from C to closest C atom.

butyl derivatives of thiosalicylic acid (167.5, 171.6, 171.4, 171.6, 171.4 ppm) and the corresponding palladium(II) complexes (171.5, 171.8, 172.0, 172.5, 171.9 ppm), respectively, can be observed. These differences could be explained by the coordination of the carboxylic group to the palladium(II) ion.

It can be concluded from IR and NMR spectra of the ligands and the corresponding complexes that the ligands are bidentately coordinated to the palladium(II) ion, but nothing can be concluded about geometry of complexes.

3.2. Description of the crystal structure

The [Pd(S-bz-thiosal)₂] complex (**C1**) crystallizes in the $P2_1/c$ space group of the monoclinic crystal system. The molecular structure of the **C1** complex is shown in Fig. 1 Selected geometric parameters are listed in Table 2. The crystal structure analysis shows the bidentate and a long *cis*-*S*-*cis*-O coordination (known for Pd-complexes) [40] of the *S*-benzyl-thiosalicylic acid ligand **L1** to the Pd(II) ion (Fig. 1.) and the expected square-planar geometry. All the bonds are in the expected region. But a small deformation of the geometry around Pd(II) [angles O(2)–Pd(1)–O(4) 88.37(19)° and S(1)–Pd(1)–S(2) 92.94(7)°] is expected and can be explained as a consequence of the presence of large S atoms in *cis* positions.

The two six-membered rings involving the Pd atom are in skew-chair conformations in **C1** (Fig. 1) and are practically equal, as expected due to restrictions of the coordination geometry around Pd and the stiff thiosalicylic moieties. This is the reason for the orien-

tation of benzyl groups, almost over the phenyl residues originating from another *S*-benzyl-thiosalicylic ligand. The non-parallel positions of the phenyl and benzyl groups, and therefore non-symmetric structure of the [Pd(S-bz-thiosal)₂] complex, can also be

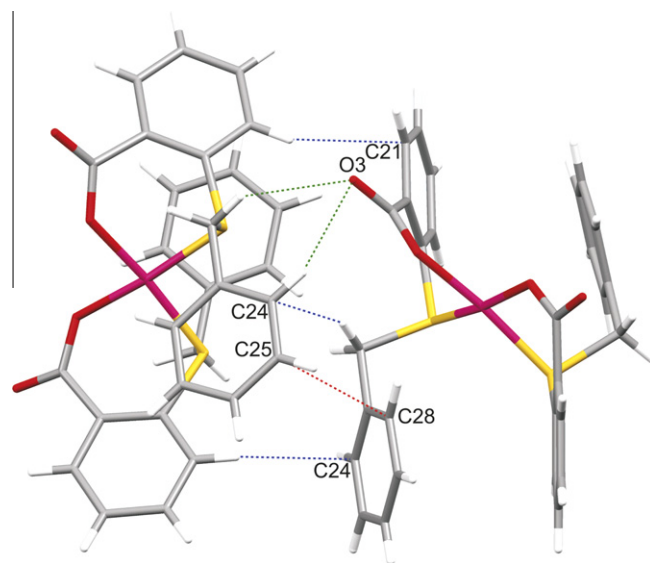


Fig. 2. A pair of **C1** complexes formed by intermolecular interactions: C–H...O (green, accepted by O3), π ... π (red, closest C25...C28) and C–H... π (blue, closest accepted by C24 or C21). (Colour online.)

Table 3
In vitro antimicrobial activity of the tested ligands **L1–L5** and the corresponding palladium(II) complexes **C1–C5**.

Species	L1		C1		L2		C2		L3		C3		L4		C4		L5		C5		Doxycycline/ fluconazole	
	MIC ^a	MMC ^b	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	500	500	500	1000	500	500	1000	1000	1000	1000	500	500	500	1000	250	500	1000	1000	500	1000	31.25	62.5
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	500	500	500	500	500	500	500	500	1000	>1000	250	500	500	500	250	250	1000	>1000	250	500	1.953	15.63
<i>Lactobacillus plantarum</i>	500	1000	250	500	500	500	500	500	500	>1000	250	500	250	>1000	250	500	1000	>1000	500	500	0.448	7.81
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	>1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	500	1000	1000	1000	500	500	1000	>1000	500	>1000	>1000	>1000	1000	1000	7.81	31.25
<i>Sarcina lutea</i>	500	1000	250	500	1000	1000	500	500	500	>1000	250	250	500	>1000	250	250	1000	>1000	250	500	<0.448	3.75
<i>Enterococcus faecalis</i>	1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	500	500	>1000	>1000	500	500	1000	>1000	500	500	>1000	>1000	1000	1000	7.81	62.5
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	1000	1000	500	500	1000	1000	500	1000	500	1000	250	500	500	1000	250	500	1000	1000	500	1000	7.81	62.5
<i>Bacillus subtilis</i>	500	500	250	500	125	500	500	500	1000	>1000	250	250	500	1000	250	250	1000	>1000	250	500	0.112	1.953
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	500	500	250	500	1000	1000	500	500	>1000	>1000	250	250	1000	>1000	250	250	1000	>1000	250	500	1.953	31.25
<i>Staphylococcus aureus</i>	250	500	250	500	500	>1000	500	500	1000	>1000	250	250	250	1000	250	250	1000	>1000	125	500	0.448	7.81
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	500	1000	500	1000	1000	1000	500	1000	1000	1000	500	500	500	1000	500	500	>1000	>1000	500	500	0.224	3.75
<i>Escherichia coli</i>	>1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	500	500	1000	>1000	500	500	1000	>1000	500	500	>1000	>1000	1000	1000	7.81	15.63
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	500	500	>1000	>1000	500	500	1000	>1000	500	500	>1000	>1000	1000	1000	15.625	31.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1000	>1000	1000	1000	500	>1000	500	1000	1000	>1000	500	500	500	>1000	500	1000	1000	>1000	1000	1000	250	>250
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	500	>1000	500	1000	500	>1000	250	500	500	>1000	250	500	500	>1000	500	1000	500	>1000	500	1000	62.5	125
<i>Proteus mirabilis</i>	1000	>1000	500	1000	1000	>1000	500	1000	1000	>1000	500	500	1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	500	1000	250	>250
<i>Salmonella enterica</i>	1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	500	500	1000	>1000	500	500	1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	1000	1000	15.625	31.25
<i>Salmonella typhimurium</i>	1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	500	1000	1000	1000	500	500	1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	1000	1000	15.625	125
<i>Candida albicans</i>	>1000	>1000	500	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	500	1000	1000	1000	500	1000	1000	1000	500	1000	62.5	1000
<i>Rhodotorula</i> sp.	>1000	>1000	500	1000	500	1000	500	1000	500	1000	250	500	1000	1000	250	500	500	1000	500	1000	62.5	1000
<i>Saccharomyces boulardii</i>	1000	>1000	500	1000	1000	>1000	1000	1000	1000	1000	500	1000	1000	1000	500	1000	500	1000	500	1000	31.25	1000
<i>Aspergillus niger</i>	>1000	>1000	500	1000	500	500	500	1000	500	1000	500	1000	500	1000	250	500	1000	>1000	250	500	500	1000
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	>1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	500	1000	500	1000	500	500	1000	1000	500	1000	62.5	62.5
<i>Aspergillus restrictus</i>	500	>1000	125	250	500	1000	500	1000	500	1000	125	250	500	1000	31.3	125	250	250	31.3	250	500	2000
<i>Aspergillus fumigatus</i>	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	250	<7.8	15.68	15.68	15.68	<7.8	<7.8	15.68	125	<7.8	<7.8	62.5	62.5	31.3	31.25	500	1000
<i>Aspergillus flavus</i>	31.25	250	<7.8	<7.8	1000	1000	15.7	15.68	125	125	62.5	500	125	500	62.5	62.5	125	1000	125	250	1000	1000

^a MIC values ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) – means inhibitory activity.

^b MMC values ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) – means microbicidal activity.

explained by a skew-chair conformation of the six-membered rings and, also, by the larger orientational freedom of the benzyl groups bonded to the S(1) and S(2) atoms. The spatial orientations of the benzyl groups are not similar, as can be seen from the values of the Pd(1)–S(1)–C(8)–C(9) and Pd(1)–S(2)–C(22)–C(23) dihedral angles (Table 2). Although the aromatic rings of the phenyl and benzyl groups seem to be over each other, the distance between them is too long for any reasonable intramolecular $\pi \cdots \pi$ interactions to occur. The deprotonated carboxyl groups are also twisted out of the adjacent aromatic plane, as can be seen from the C(3)–C(2)–C(1)–O(2) and C(17)–C(16)–C(15)–O(4) dihedral angles from Fig. 1.

The spatial orientation of the benzyl groups in the crystal structure is, of course, much more significantly defined by intermolecular interactions during the crystallization process, in which the attractive and repulsive contacts compete with each other and a stable balance between them must be achieved. The lack of strong hydrogen bond donors gives space for much weaker C–H \cdots O interactions to dominate as attractive ones in the crystallization process of **C1**. Eight such interactions are found from the structure (Table 2). Three potential C–H \cdots π -type interactions were also found. Two complexes seem to form a pair involving two C–H \cdots O, all three C–H \cdots π and one additional $\pi \cdots \pi$ contact in the x , $-y + \frac{1}{2}$, $z + \frac{1}{2}$ direction (Fig. 2).

Based on S,O-coordination of all the ligands and the crystal structure of the [Pd(S-bz-thiosal)₂] complex, it can be assumed that the other complexes occur in the form of a *cis*-S-*cis*-O geometric isomer.

3.3. Microbiology

The results of *in vitro* testing of antimicrobial activities for the five new palladium complexes are shown in Table 3. The solvent (10% DMSO) did not inhibit the growth of the tested microorganisms.

The intensity of the antimicrobial action varied depending on the species of microorganism and on the type of tested compound. In general, the activity of the complexes was higher than the corresponding ligands ($p < 0.05$). MICs and MMCs values for ligands were in range 15.68 to $>1000 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, and for complexes <7.8 to $1000 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. The best effect was observed for **L3** and **L4** for the ligands, and **C3** and **C4** for the complexes ($p < 0.05$).

The palladium(II) complexes showed significant antifungal activity. The most sensitive was *A. fumigatus*, *A. flavus* and *A. restrictus*. The activity of the complexes was better than the positive control fluconazole ($p < 0.05$). The obtained concentrations of palladium(II) complexes which inhibit the growth of moulds were from <7.8 to $500 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Antimicrobial testing of newly synthesized complexes of palladium(II), done by Vasić et al., led to similar results [41]. The standard and clinical strain of *A. niger* did not show sensitivity similar to that mentioned, where the MIC went from 250 to $1000 \mu\text{g}/\text{cm}^3$.

The tested compounds did not affect the growth of yeasts or their activities were very low. The MIC and MMC values for yeasts were from 500 to $>1000 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, except for the complexes **C3** and **C4** against *Rhodotorula* sp., where the MIC was $250 \mu\text{g}/\text{cm}^3$.

All the tested compounds demonstrated weak and moderate antibacterial activity. The Gram-positive bacteria were more sensitive than the Gram-negative bacteria, especially for the activity of the complexes. The most sensitive was *S. aureus* with a MIC value of $125 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ for the complex **C5**. The MICs for Gram-negative bacteria were 500 and $1000 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. The tested complexes **C2** and **C3** exhibited somewhat stronger antibacterial activity towards *P. aeruginosa* ATCC 27853 (MIC = $250 \mu\text{g}/\text{cm}^3$).

The probiotics showed sensitivity similar to the sensitivity of the other bacteria. The MICs were from 250 to $>1000 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ and the MMCs were from 500 to $>1000 \mu\text{g}/\text{cm}^3$.

4. Conclusion

The results of antimicrobial activity showed that the tested ligands and the corresponding palladium(II) complexes showed different degrees of antimicrobial activity in relation to the tested species. The tested ligands, with few exceptions, showed low antimicrobial activity. The palladium(II) complexes showed selective and moderate activity. A difference in the antimicrobial activity was observed between the ligands and the corresponding palladium(II) complexes, with higher activities being displayed for the palladium(II) complexes. Interesting results were obtained for *Aspergillus* species, which are common in the environment and which cause the infection known as aspergillosis. The tested complexes reacted better than the positive control. The molecular structure in the crystalline state was obtained for complex **C1** and showed an unsymmetrical *cis* configuration around the Pd atom. The crystal structure was found to be stabilized by C–H \cdots O, C–H \cdots π -type and $\pi \cdots \pi$ interactions.

Acknowledgements

The authors are grateful for financial support from the Ministry of Education and Science of Republic of Serbia (Projects Nos. OI172016 and 41010) and the Academy of Finland (Project No. 122350).

Appendix A. Supplementary data

CCDC 824331 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>, or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223 336 033; or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk.

References

- [1] A. Kumar Chhakkar, L. Rai Kakkar, Fresenius J. Anal. Chem. 347 (1993) 483.
- [2] G.R.E.C. Gregory, P.G. Jeffery, Analyst 92 (1967) 293.
- [3] M.J. Gismera, J.R. Procopio, M. Teresa-Sevilla, L. Hernandez, Electroanalysis 15 (2003) 126.
- [4] M. Aydin, N. Arsu, Y. Yagci, Macromol. Rapid Commun. 24 (2003) 718.
- [5] D. Shander, G. Ahluwalia, D. Grosso, US Patent 5411991.
- [6] H. Jacobelli, US Patent 20050267095.
- [7] J. Halaschek-Wiener, Y. Kloog, V. Wacheck, B. Jansen, J. Invest. Dermat. 120 (2003) 109.
- [8] I. Sadao, S. Fujio, M. Eiichi, K. Keita, Kokai Tokkyo Koho (2000) 127.
- [9] B.T. Khan, J. Bhatt, K. Najmoddin, S. Shamsuddin, K. Annapoorna, J. Inorg. Biochem. 44 (1991) 55.
- [10] C. Navarro-Eanninger, J.M. Peréz, F. Zamora, V.M. Gonzáles, J.M. Masaguer, C. Alonso, J. Inorg. Biochem. 52 (1993) 37.
- [11] I. Brudzinska, Y. Mikata, M. Obata, C. Ohtsuki, S. Yano, Bioorg. Med. Chem. Lett. 14 (2004) 2533.
- [12] A. Garoufis, S.K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, Coord. Chem. Rev. 253 (2009) 1384.
- [13] W. Guerra, E. de Andrade Azevedo, A.R. de Souza Monteiro, M. Bucciarellia-Rodriguez, E. Chartone-Souza, A.M. Amaral Nascimento, A.P. Soares Fontes, L. Le Moyec, E.C. Pereira-Maia, J. Inorg. Biochem. 99 (2005) 2348.
- [14] L.M.M. Vieira, M.V. de Almeida, M.C.S. Lourenço, F.A.F.M. Bezerra, A.P.S. Fontes, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 4107.
- [15] D. Kovala-Demertzi, M.A. Demertzi, J.R. Miller, C. Papadopoulou, C. Dodorou, G. Filousis, J. Inorg. Biochem. 86 (2001) 555.
- [16] R.R. Coombs, M.K. Ringer, J.M. Blacquiére, J.C. Smith, J.S. Neilsen, Y.-S. Uh, J.B. Gilbert, L.J. Leger, H. Zhang, A.M. Irving, S.L. Wheaton, C.M. Vogels, S.A. Westcott, Transition Met. Chem. 30 (2005) 411.
- [17] M. Ali, M. Aminul, R. Butcher, C. Karen, Transition Met. Chem. 31 (2006) 79.
- [18] I. Kizilcikli, Y.D. Kurt, B. Akkurt, A.Y. Genel, S. Birteköz, G. Ötük, B. Ülküseven, Folia Microbiol 52 (2007) 15.
- [19] N.M. Aghatabay, M. Somer, M. Senel, B. Dulger, F. Guçin, Eur. J. Med. Chem. 42 (2007) 1069.
- [20] M.K. Biyala, K. Sharma, M. Swami, N. Fahmi, R. Vir Singh, Transition Met. Chem. 33 (2008) 377.
- [21] J.D. Smith, J. Org. Chem. 76 (6) (2011) 1513.
- [22] H.V. Huynh, Organometallics 29 (6) (2010) 1479.
- [23] J. Nakayama, T. Fujita, M. Hoshino, Chem. Lett. 11 (1982) 1777.
- [24] J.J. Donleavy, J. English Jr., J. Am. Chem. Soc. 62 (1940) 220.
- [25] I.M. Al-Daher, B.M. Al-Saadi, J. Iraq. Chem. Soc. 10 (1) (1985) 84.

- [26] Z. Korićanac, B. Stanković, Arch. Pharm. 28 (1–2) (1978) 87.
- [27] C. Nair, H.L. Nigam, Indian J. Chem. 12 (7) (1974) 769.
- [28] I. Dema, V. Voicu, Acad. Rep. Populare Romine Studii cercetari chim. 23 (1960) 173.
- [29] COLLECT, Bruker AXS, Delft, The Netherlands, 2008.
- [30] Z. Otwinowski, W. Minor, in: C.W. Carter Jr., R.M. Sweet (Eds.), Methods Enzymol., vol. 276: Macromolecular crystallography, part A, Academic Press, New York, 1997, pp. 307–326.
- [31] M.C. Burla, M. Camalli, B. Carrozzini, G.L. Cascarano, C. Giacovazzo, G. Polidori, R. Spagna, J. Appl. Crystallogr. 38 (2005) 381.
- [32] G.M. Sheldrick, Acta Crystallogr., Sect. A 64 (2008) 112.
- [33] G.M. Sheldrick, S_{AD}ABS, University of Göttingen, Germany, 1996.
- [34] L.J. Farrugia, J. Appl. Crystallogr. 30 (1997) 565.
- [35] J.M. Andrews, J. Antimicrob. Chemother. 56 (2005) 60.
- [36] S.D. Sarker, L. Nahar, Y. Kumarasamy, Methods 42 (2007) 321.
- [37] E. Banfi, G. Scialino, C. Monti-Bragadin, J. Antimicrob. Chemother. 52 (2003) 796.
- [38] R.M. Silverstein, C.G. Bassler, T.C. Morrill, Spectrometric Identification of Organic Compounds, third ed., Wiley International Edition, 1974. p. 113.
- [39] K. Nakamoto, Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Wiley, New York, 1963. p. 206.
- [40] D.A. Langs, C.R. Hare, R.G. Little, Chem. Commun. (London) (1967) 1080.
- [41] G.P. Vasić, V.V. Glođović, I.D. Radojević, O.D. Stefanović, L.R. Čomić, V.M. Đinović, S.R. Trifunović, Inorg. Chim. Acta 363 (2010) 3606.

CHAPTER: From Synthesis to Antibacterial Activity of Some New Palladium(II) and Platinum(IV) Complexes
AUTHORS: Srecko Trifunovic
BOOK EDITOR: Varaprasad Bobbarala
STATUS: ACCEPTED

CHAPTER PROPOSAL REVIEW REPORT

June 01, 2011

GENERAL

Chapter title:

It suits the manuscript's content

ORIGINALITY

How significant is the purpose of the study?

Very significant. Will affect the field

METHODS USED

How do you evaluate the primary methods used in research?

Clearly described and correct

KEY RESULTS

Did the key results address the specific questions asked?

Absolutely

LANGUAGE

What is the quality of the language of the text?

Good

EDITOR'S COMMENT

Accepted

Sincerely yours,

Aleksandar Lazinica, CEO

Lazinica Aleksandar

INTECH
d.o.o. Rijeka

Chapter Number

From Synthesis to Antibacterial Activity of Some New Palladium(II) and Platinum(IV) Complexes

Ivana D. Radojević¹, Verica V. Glođović²,
Gordana P. Radić², Jelena M. Vujić³,
Olgica D. Stefanović¹, Ljiljana R. Čomić¹ and Srećko R. Trifunović²

¹*Department of Biology and Ecology,
Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac,*

²*Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac,*

³*Faculty of Agronomy, University of Kragujevac, Čačak,
Republic of Serbia*

1. Introduction

Simultaneously with the rapid development of a wide range of antibacterial agents since the 1940s, bacteria have proved extremely adept at developing resistance to each new employed agent. The rapidly increasing incidence of bacterial resistance to antimicrobial agents has become a serious problem worldwide. Resistance mechanisms have been identified and described for all known antibiotics currently available for clinical use (Fluit et al., 2000).

The synthesis and evaluation of the biological activity of the new metal-based compounds is the field of growing interest. Numerous complexes based on palladium(II) and platinum(IV) have been synthesized and their different biological activities have been documented (Agarwal, 2007; Mishra et al., 2007a; Mishra & Kaushik, 2007). The impact of different palladium and platinum complexes on the growth and metabolism of various groups of microorganisms has been studied. Garoufis et al. (2009) reviewed numerous scientific papers on anti-viral, antibacterial and antifungal activity of palladium(II) complexes with different types of ligands (sulfur and nitrogen donor ligands, Schiff base ligands and drugs as ligands). There are other papers in the literature showing different intensity of palladium(II) and platinum(IV) complexes activity on various species of bacteria and fungi (Kovala-Demertzi et al., 2001; Brudzinska et al., 2004; Coombs et al., 2005; Guerra et al., 2005; Ali et al., 2006; Manav et al., 2006; Aghatabay et al., 2007; Kizilcikli et al., 2007; Mishra et al., 2007b; Biyala et al., 2008; Al-Hazmi et al., 2008; Vieira et al., 2009).

The aim of this paper is to describe synthesis of some new palladium(II) and platinum(IV) complexes and in vitro research of their antibacterial activities. The second objective is to evaluate the impact these compounds have on probiotic bacteria. Probiotics are used as supplements and they play significant role in protecting and maintaining the balance of intestinal microflora in antibiotic therapy.

1 2. Experimental

2 2.1 Chemistry

3 The palladium(II) and platinum(IV) complexes were obtained by direct reaction of the
4 corresponding starting compounds (K_2PdCl_4 and K_2PtCl_6) and newly synthesized
5 tetradentate or bidentate ligands. The next compounds were synthesized:

- 6 - *O,O'*-dipropyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate (**L1**)
7 - dichlorido(*O,O'*-dipropyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate)-palladium(II)
8 (**C1**)
9 - *O,O'*-dibutyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate (**L2**)
10 - dichlorido(*O,O'*-dibutyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate)-palladium(II)
11 (**C2**)
12 - *O,O'*-dipentyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate (**L3**)
13 - dichlorido(*O,O'*-dipentyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate)-palladium(II)
14 (**C3**)
15 - *O,O'*-ethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl)-butanoate (**L4**)
16 - chlorido((*S,S*)-ethylenediamine-*N*-(*O*-ethyl-2-(3-methyl)-butanoate)-*N'*-2-(3-methyl)-
17 butanoato)-palladium(II) (**C4**)
18 - tetrachlorido(*O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl)butanoate)-
19 platinum(IV) (**C4a**)
20 - *O,O'*-dipropyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl)-butanoate (**L5**)
21 - chlorido((*S,S*)-ethylenediamine-*N*-(*O*-propyl-2-(3-methyl)-butanoate)-*N'*-2-(3-methyl)-
22 butanoato)-palladium(II) (**C5**)
23 - *O,O'*-dibutyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl)-butanoate (**L6**)
24 - chlorido((*S,S*)-ethylenediamine-*N*-(*O*-butyl-2-(3-methyl)-butanoate)-*N'*-2-(3-methyl)-
25 butanoato)-palladium(II) (**C6**)
26 - *O,O'*-dipentyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl)-butanoate(**L7**)
27 - chlorido((*S,S*)-ethylenediamine-*N*-(*O*-pentyl-2-(3-methyl)-butanoate)-*N'*-2-(3-methyl)-
28 butanoato)-palladium(II) (**C7**)
29 - *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoate (**L8**)
30 - dichlorido(*O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoate)-
31 palladium(II) (**C8**)
32 - *O,O'*-dipropyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoate (**L9**)
33 - dichlorido(*O,O'*-dipropyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoate)-
34 palladium(II) (**C9**)
35 - *O,O'*-dibutyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoate (**L10**)
36 - dichlorido(*O,O'*-dibutyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoate)-
37 palladium(II) (**C10**)
38 - *O,O'*-dipentyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoate(**L11**) -
39 dichlorido(*O,O'*-dipentyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoate)-
40 palladium(II) (**C11**)
41 - *S*-benzyl-thiosalicylic acid (**L12**)
42 - *bis*-(*S*-benzyl-thiosalicylate)-palladium(II) (**C12**)
43 - *S*-methyl-thiosalicylic acid (**L13**)

- 1 - *bis*-(*S*-methyl-thiosalicylate)-palladium(II) (C13)
 2 - *S*-ethyl-thiosalicylic acid (L14)
 3 - *bis*-(*S*-ethyl-2-thiosalicylate)-palladium(II) complex (C14)
 4 - *S*-propyl-thiosalicylic acid (L15)
 5 - *bis*-(*S*-propyl-2-thiosalicylate)-palladium(II) (C15)
 6 - *S*-butyl-thiosalicylic acid (L16)
 7 - *bis*-(*S*-butyl-2-thiosalicylate)-palladium(II) (C16)
 8 - *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid (L17)
 9 - dichlorido(*meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate)-palladium(II)
 10 (L17a)
 11 - *s-cis*-dichlorido(*meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate)-
 12 platinum(IV) (L17b)
 13 - *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate (L18)
 14 - tetrachlorido(*O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate)-
 15 platinum(IV)(C18)
 16 - *O,O'*-diethyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-*S,S*-(2,2'-benzyl)acetate (L19)
 17 - tetrachlorido(*O,O'*-diethyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-*S,S*-(2,2'-benzyl)acetate)-
 18 platinum(IV) (C19)
 19 - *O,O'*-dipropyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-*S,S*-(2,2'-benzyl)acetate (L20)
 20 - tetrachlorido(*O,O'*-dipropyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-*S,S*-(2,2'-benzyl)acetate)-
 21 platinum(IV) (C20)
 22 - *O,O'*-dibutyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-*S,S*-(2,2'-benzyl)acetate (L21)
 23 - tetrachlorido(*O,O'*-dibutyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-*S,S*-(2,2'-benzyl)acetate)-
 24 platinum(IV) (C21)

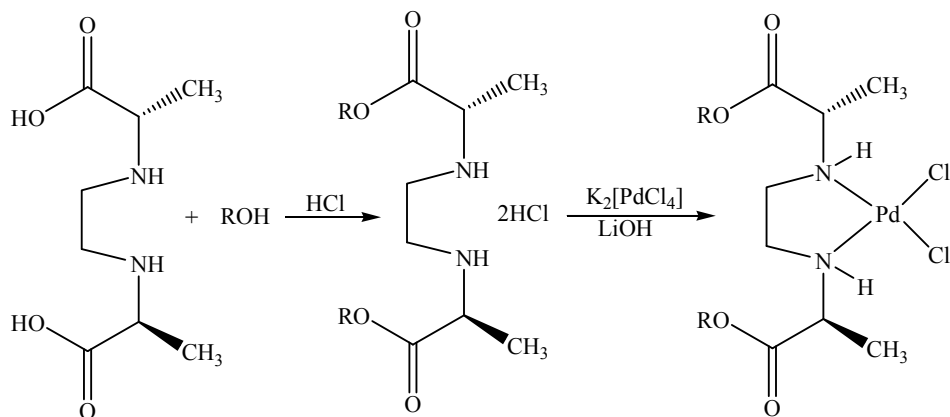
25 **2.1.1 The synthesis of the ligands - L1, L2, L3 and corresponding palladium(II)**
 26 **complexes – C1, C2, C3**

27 In 50 mL of dry alcohol (1-propanol, 1-butanol or 1-pentanol), saturated with gas HCl, 1.53 g
 28 (7.5 mmol) of H₂-*S,S*-eddp was added and the mixture was refluxed for 12 h. The mixture
 29 was filtered and left in the refrigerator over night. The obtained white powder was filtered
 30 and air-dried.

31 Complexes were obtained by mixing K₂[PdCl₄] (0.200 g, 0.613 mmol) and equimolar amount
 32 of the dpr-*S,S*-eddp·2HCl·3H₂O (L1) (0.2546 g, 0.613 mmol), dbu-*S,S*-eddp·2HCl·3H₂O (L2)
 33 (0.2718 g, 0.613 mmol) or dpe-*S,S*-eddp·2HCl·2H₂O (L3) (0.2780 g, 0.613 mmol) esters.
 34 During 2 h of stirring 10 cm³ of water solution of LiOH (0.0294 g, 1.226 mmol) was added in
 35 small portions to the reaction mixture. Within this period, pale yellow precipitates of the
 36 complexes C1-C3 were obtained, filtered off, washed with cold water, ethanol and ether and
 37 air dried (Vasić et al., 2010) (Fig. 1.).

38 **2.1.2 The synthesis of the ligands - L4, L5, L6, L7 and corresponding palladium(II)**
 39 **complexes – C4, C5, C6, C7**

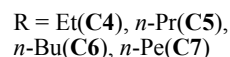
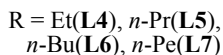
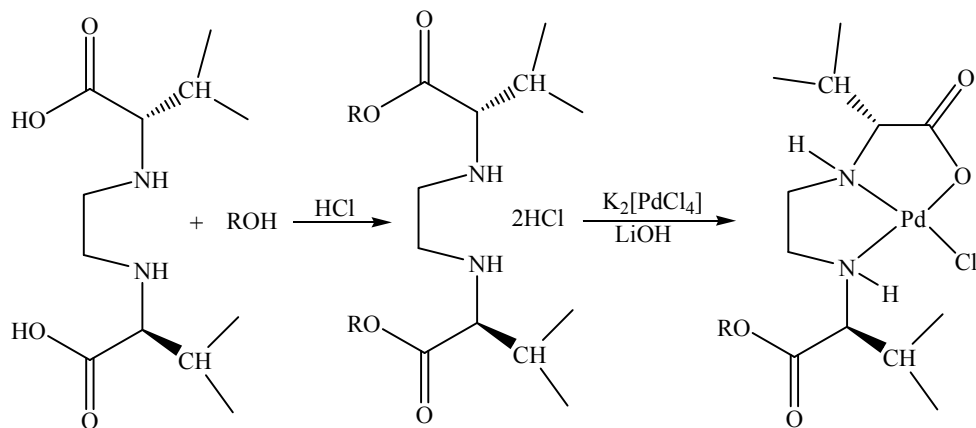
40 In 50 mL of dry alcohol (ethanol, 1-propanol, 1-butanol or 1-pentanol), saturated with gas
 41 HCl, 2.50 g (7.5 mmol) of (H₂-*S,S*)-eddv was added and the mixture was refluxed for 12 h.
 42 The mixture was filtered off and the filtrate was left for a few days in a refrigerator at 4°C.
 43 The esters were recrystallized from hot alcohol used for each reaction.



1
2 Fig. 1. The preparation of some alkyl esters of H₂-S,S-eddp and corresponding palladium(II)
3 complexes

4 Complexes were obtained by mixing K₂[PdCl₄] (0.200 g, 0.613 mmol) and equimolar amount
5 of the **L4** (0.241 g, 0.613 mmol), **L5** (0.256 g, 0.613 mmol), **L6** (0.273 g, 0.613 mmol) or **L7**
6 (0.290 g, 0.613 mmol) esters. During 2 h of stirring 10 cm³ of water solution of LiOH
7 (0.0294 g, 1.226 mmol) was added in small portions to the reaction mixture. Within this
8 period, pale yellow precipitates of the complexes **C4-C7** were obtained, filtered off, washed
9 with cold water, ethanol and ether and air dried (Fig.2.). The crystal structure of **C4** was
10 confirmed by X-ray analysis (Radić et al., 2010b; 2011a).

11



12
13 Fig. 2. The preparation of some alkyl esters of H₂-S,S-eddv and corresponding palladium(II)
14 complexes

2.1.3 The synthesis of the ligands - L8, L9, L10, L11 and corresponding palladium(II) complexes – C8, C9, C10 and C11

Thionyl chloride (4 cm³, 55 mmol) was introduced into a flask containing 50 cm³ of corresponding ice cooled alcohol (ethyl, *n*-propyl, *n*-butyl or *n*-pentyl; anhydrous conditions) for 1 h. After addition of 2 g (5.54 mmol) [(*S,S*)-H₄eddl]Cl₂ the reaction mixture was refluxed for 16 h, filtered off and the filtrate was left for a few days in a refrigerator at 4°C. The esters were recrystallized from the hot alcohol used for each reaction.

Complexes were obtained by mixing K₂[PdCl₄] (0.2 g, 0.61 mmol) and equimolar amount of the L8 H₂O (0.267 g, 0.61 mmol), L9 H₂O (0.277 g, 0.61 mmol), L10 H₂O (0.301 g, 0.61 mmol) or L11 H₂O (0.318 g, 0.61 mmol) esters. During 2 h of stirring 10 cm³ of water solution of LiOH (0.0293 g, 1.22 mmol) was added in small portions to the reaction mixture. Within this period, pale yellow precipitates of the complexes C8-C11 were obtained, filtered off, washed with cold water, ethanol and ether and air dried (Vujić et al., 2010) (Fig.3.). The crystal structure of C11 was confirmed by X-ray analysis (Vujić, et al., 2011).

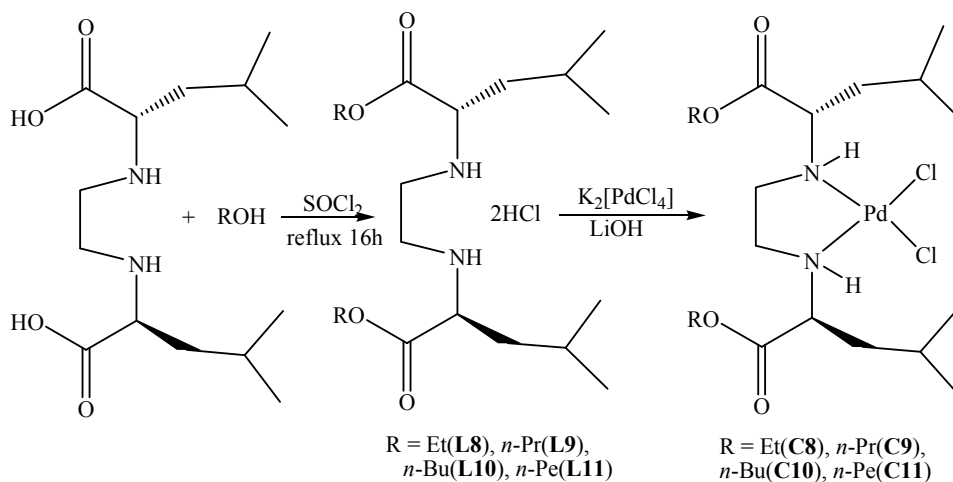


Fig. 3. The preparation of some alkyl esters of H₂-*S,S*-eddl and corresponding palladium(II) complexes

2.1.4 The synthesis of the ligands - L12, L13, L14, L15, L16 and corresponding palladium(II) complexes – C12, C13, C14, C15, C16

The thioacid ligands (L12)-(L16) were prepared by alkylation of thiosalicylic acid by means of corresponding alkyl halogenides in alkaline water-ethanol solution.

Thiosalicylic acid (1 mmol) was added to a 100 cm³ round bottom flask containing 50 cm³ of 30% solution of ethanol in water and stirred. A solution of NaOH (2 mmol in 5 cm³ of water) was added to acid suspension. The solution became clear. The corresponding alkyl halogenide (2 mmol) was dissolved in 5 cm³ of ethanol and transferred to the stirred solution. The resulting mixture was kept overnight at 60°C. The reaction mixture was

transferred into a beaker and ethanol was evaporated off on a water bath. Diluted hydrochloric acid (2 mol/dm³) was added to the resulting water solution and S-alkyl thiosalicylic acid was precipitated as a white powder. The liberated acid was filtered off and washed with plenty of distilled water. The product was dried under vacuum overnight.

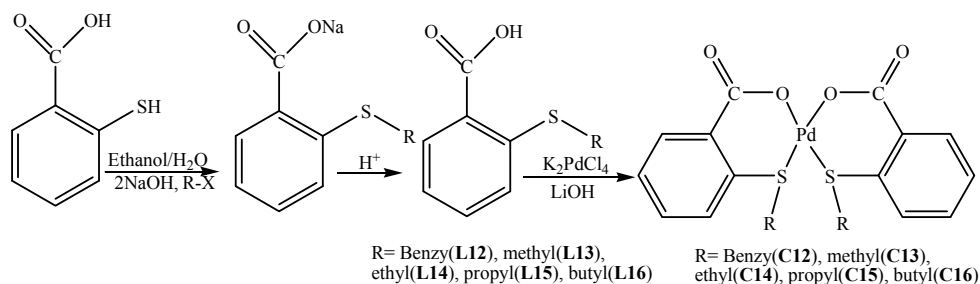


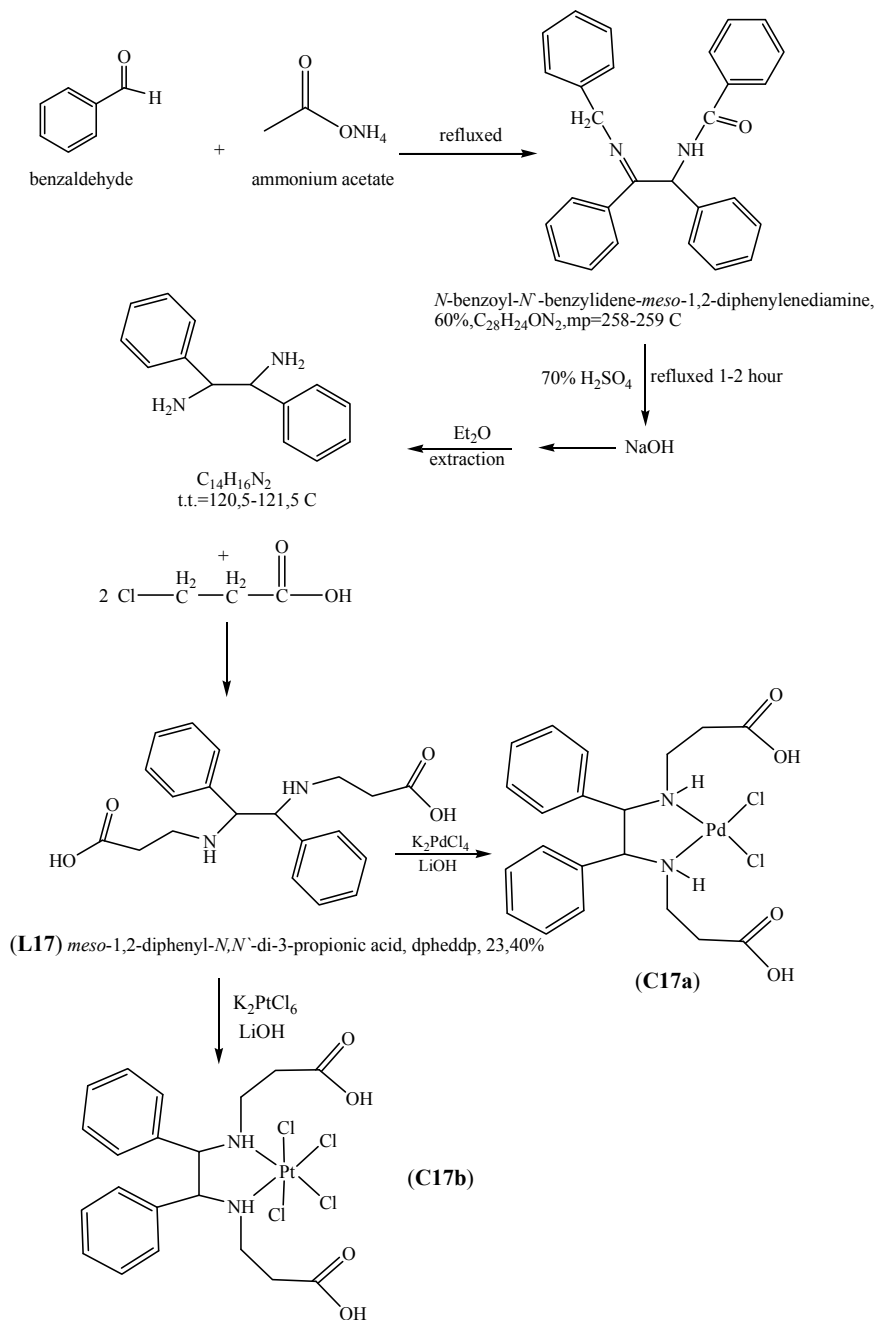
Fig. 4. The preparation of alkyl esters of 2-thiosalicylic acid and corresponding palladium(II) complexes

K₂[PdCl₄] (0.100 g, 0.3065 mmol) was dissolved in 10 cm³ of water on a steam bath and (S-benzyl)-2-thiosalicylic acid (0.1497 g, 0.613 mmol), (S-methyl)-2-thiosalicylic acid (0.103 g, 0.613 mmol), (S-ethyl)-2-thiosalicylic acid (0.1117 g, 0.613 mmol), (S-propyl)-2-thiosalicylic acid (0.1203 g, 0.613 mmol) or (S-butyl)-2-thiosalicylic acid, (0.1289 g, 0.613 mmol) was added into the solution. The resulting mixture was stirred for 2h and during this time an aqueous solution of LiOH (0.0256 g, 0.613 mmol in 10 cm³ of water) was introduced. The complexes (C12- C16) as a yellow precipitate were filtered, washed with water and air-dried (Radić et al., 2011) (Fig.4.). The crystal structure of C12 was confirmed by X-ray analysis (Dimitrijević et al., 2011).

2.1.5 The synthesis of the ligand L17 and corresponding palladium(II) complex C17 and corresponding platinum(IV) complex C17a

Benzaldehyde (30 g) was refluxed with ammonium acetate (60 g) for 3 hours. The reaction mixture was cooled and the product was filtered and washed with ethanol. Recrystallization from 1-butanol gave *N*-benzoyl-*N'*-benzylidene-*meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine. Hydrolysis of that compound with 70% sulphuric acid under reflux for 1h gave *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine as the basic product of hydrolysis.

3-Chloro-propanoic acid (4.34 g, 0.04 mol) was dissolved in 5 cm³ of water on ice bath and carefully neutralized with cold water solution of 5 cm³ NaOH (1.6 g, 0.04 mol). 1,2-Diphenyl-ethylenediamine (4.24 g, 0.02 mol) was added to this solution. The mixture was being stirred for 4 hours at 90°C, and during this period 5 cm³ NaOH water solution (1.6 g, 0.04 mol) was introduced. After that, 5.6 cm³ 6 mol/dm³ HCl was added and resulting solution was evaporated to the volume of 7 cm³; 6 cm³ *conc.* HCl, 6 cm³ of ethanol and 6 cm³ of ether were added to the mixture. The white precipitate of H₂-1,2-dpheddpp 2HCl · 1.5H₂O (L17) was separated by filtration and refined with solution water : ethanol = 1 : 2. The crystal structure of L17 was confirmed by X-ray analysis (Radić et al., 2010a).



1
2
3
Fig. 5. Reaction pathways in synthesis of *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propionic acid and corresponding palladium(II) and platinum(IV) complexes.

1 Potassium-hexachloridoplatinate(IV) (0.2 g, 0.411 mmol) was dissolved in 10 cm³ of water
 2 on a steam bath and 1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid (0.1876 g,
 3 0.411 mmol) was added. The reaction mixture was heated for 12 hours and during this
 4 period 10 cm³ of LiOH water solution (0.0394 g, 1.65 mmol) was added in small portions and
 5 the solution was filtered and evaporated to small volume. The orange precipitate of *s-cis*-
 6 [PtCl₂(1,2-dpheddp)] **C17b**) was separated by filtration, washed with cold water and air-
 7 dried (Fig. 5).

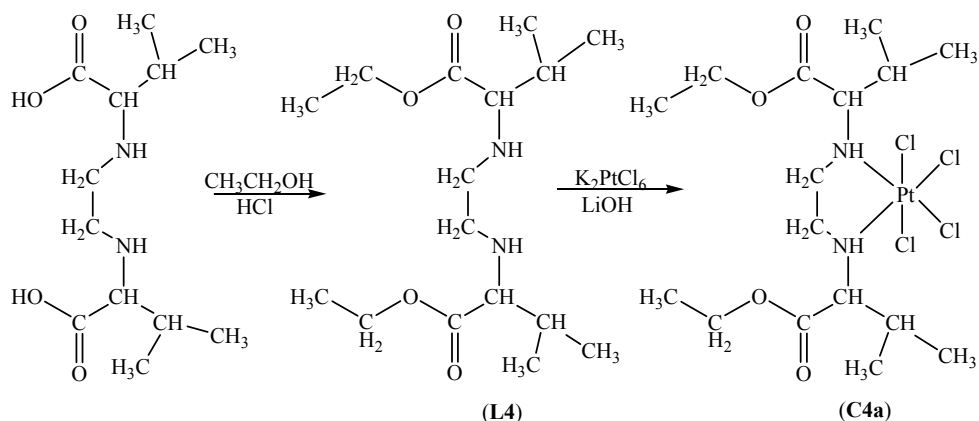
8 2.1.6 The synthesis of the ligands **L4**, **L18** and corresponding platinum(IV) complexes 9 **C4a**, **C18**

10 K₂[PtCl₆] (0.100 g, 0.205 mmol) and det-(*S,S*)-eddv (0.080 g, 0.205 mmol) were dissolved in
 11 25 cm³ of water. The reaction mixture was heated on a steam bath for 3 h during which
 12 water solution of LiOH·H₂O (0.017 g, 0.41 mmol in 10 cm³ of water) was introduced. The
 13 complex, [PtCl₄(det-(*S,S*)-eddv)] (**C4a**), as a yellow precipitate was separated by filtration,
 14 washed with water and air-dried (Fig. 6).

15 In 50 cm³ of dry ethanol, saturated with gas HCl, 1.53 g (7.5 mmol) of H₂-*S,S*-eddp was
 16 added and the mixture was refluxed for 12 h. The mixture was filtered and left in the
 17 refrigerator over night. The obtained white powder of *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-
 18 ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate dihydrochloride, det-*S,S*-eddp 2HCl (**L18**) was
 19 filtered and air dried.

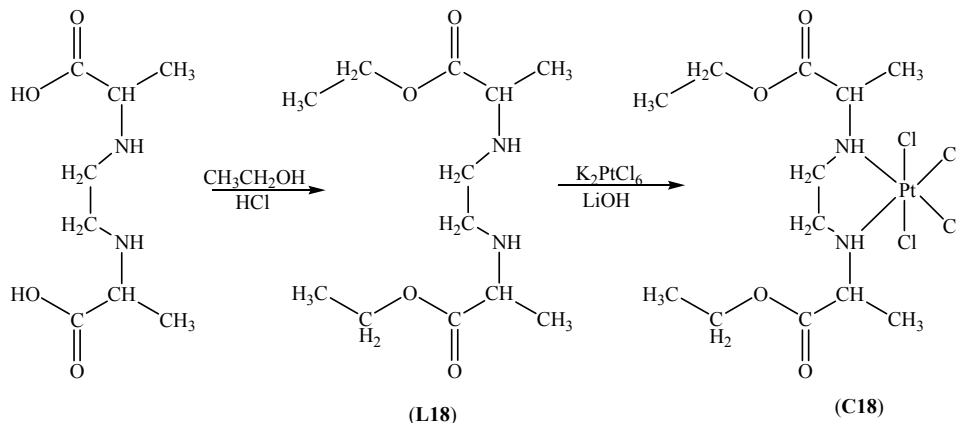
20 K₂[PtCl₆] (0.100 g, 0.205 mmol) and det-(*S,S*)-eddp (0.068 g, 0.205 mmol) were dissolved in
 21 25 cm³ of water. The reaction mixture was heated on a steam bath for 3 h during which
 22 water solution of LiOH·H₂O (0.017 g, 0.41 mmol in 10 cm³ of water) was introduced. The
 23 complex, [PtCl₄(det-(*S,S*)-eddp)] (**C18**), as a yellow precipitate was separated by filtration,
 24 washed with water and air-dried (Stanković et al., 2011b) (Fig. 7). The crystal structure of
 25 **C18** was confirmed by X-ray analysis (Stanković et al., 2011b).

26



27

28 Fig. 6. Synthesis of the ester det-(*S,S*)-eddv 2HCl and platinum(IV) complex

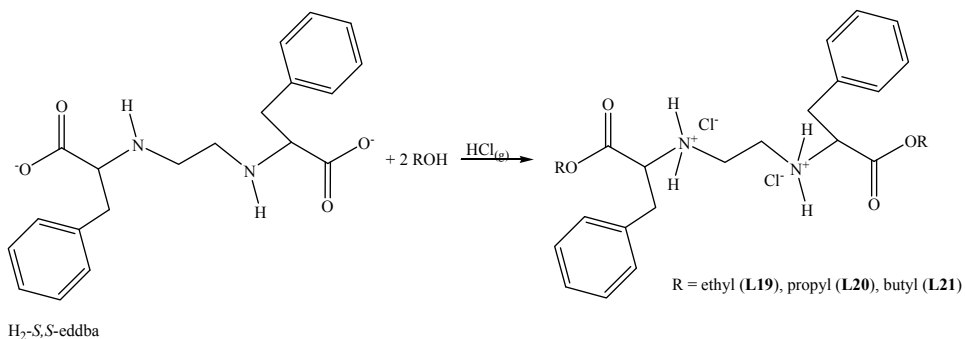


1
2 Fig. 7. Synthesis of the ester det-(*S,S*)-eddp 2HCl and platinum(IV) complex

3 **2.1.7 The synthesis of the ligands L19, L20, L21 and corresponding platinum(IV)**
4 **complexes C19, C20, C21**

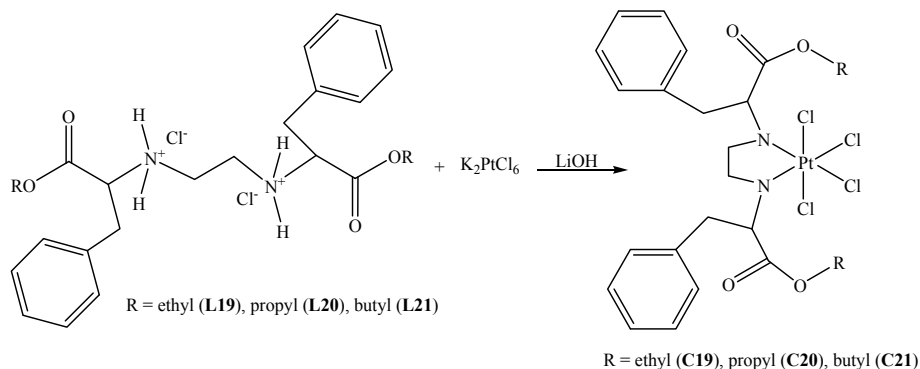
5 In 50 cm³ of dry alcohol (ethanol, 1-propanol, 1-butanol) saturated with gaseous HCl, 1.50 g
6 (3.65 mmol) of ethylenediamine-*N,N'*-di-*S,S*-(2,2'-dibenzyl)acetate acid trihydrate
7 (*H*₂-*S,S*-eddba·3H₂O) was added and the mixture was refluxed for 12 h. The mixture was
8 filtered and left in the refrigerator over night. The obtained white powder was filtered and
9 air-dried.

10 K₂[PtCl₆] (0.100 g, 0.206 mmol) and 0.206 mmol of R₂-*S,S*-eddba 2HCl (0.100 g of de-*S,S*-
11 -eddba 2HCl (**L19**), 0.106 g of dp-*S,S*-eddba 2HCl (**L20**), 0.112 g of db-*S,S*-eddba 2HCl
12 (**L21**)) were dissolved in 15 cm³ of water. The reaction mixture was heated at 40 °C for 12 h
13 and during this period 3.92 cm³ of aqueous 0.105 mol/dm³ LiOH·H₂O (0.412 mmol) were
14 added in small portions. The complexes (**C19-C21**) as a yellow-orange precipitates were
15 collected by filtration, washed with water, corresponding alcohol and ether and air-dried
16 (Fig. 8.). The crystal structure of **L20** was confirmed by X-ray analysis (Dimitrijević et al.,
17 2010).



18
19

a)



b)

Fig. 8. The synthesis of: a) esters (R_2 -*S,S*-eddba $\cdot 2\text{HCl}$); b) complexes $[\text{PtCl}_4(\text{R}_2\text{-S,S-eddba})]$

2.2 In vitro antimicrobial assay

2.2.1 Test substances

The tested compounds were dissolved in DMSO and then diluted into nutrient liquid medium to achieve a concentration of 10%. Antibiotic, doxycycline (Galenika A.D., Belgrade), was dissolved in nutrient liquid medium, a Mueller–Hinton broth (Torlak, Beograd).

2.2.2 Test microorganisms

Antimicrobial activity of twenty-one palladium(II) and platinum(IV) complexes and their ligands was tested against 9 species of bacteria: 6 strains of pathogenic bacteria (including 4 standard strains: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Sarcina lutea* ATCC 9341 and 2 clinical isolates: *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*) and 3 species of probiotic bacteria (*Bacillus subtilis* IP 5832 PMFKG-P32, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* PMFKG-P33 and *Lactobacillus rhamnosus* PMFKG-P35). All clinical isolates were a generous gift from the Institute of Public Health, Kragujevac. The other microorganisms were provided from a collection held by the Microbiology Laboratory Faculty of Science, University of Kragujevac.

2.2.3 Suspension preparation

Bacterial suspensions were prepared by the direct colony method. The colonies were taken directly from the plate and were suspended in 5 mL of sterile 0.85% saline. The turbidity of initial suspension was adjusted by comparing with 0.5 McFarland's standard (0.5 ml 1.17% w/v $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + 99.5 \text{ ml } 1\% \text{ w/v } \text{H}_2\text{SO}_4$) (Andrews, 2005). When adjusted to the turbidity of the 0.5 McFarland's standard, bacteria suspension contains about 10^8 colony forming unites (CFU)/mL. Ten-fold dilutions of initial suspension were additionally prepared into sterile 0.85% saline.

2.2.4 Microdilution method

Antimicrobial activity was tested by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) by using microdilution plate method

1 with resazurin (Sarker et al., 2007). The 96-well plates were prepared by dispensing 100 μL
2 of nutrient broth into each well. A 100 μL from the stock solution of tested compound
3 (concentration 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added into the first row of the plate. Then, twofold, serial
4 dilutions were performed by using a multichannel pipette. The obtained concentration
5 range was from 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A 10 μL of diluted bacterial suspension was
6 added to each well to give a final concentration of 5×10^5 CFU/mL. Finally, 10 μL resazurin
7 solution was added to each well inoculated with bacteria. Resazurin is an oxidation-
8 reduction indicator used for the evaluation of microbial growth. It is a blue non-fluorescent
9 dye that becomes pink and fluorescent when reduced to resorufin by oxidoreductases
10 within viable cells (Banfi et al., 2003). The inoculated plates were incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h.
11 MIC was defined as the lowest concentration of the tested substance that prevented
12 resazurin color change from blue to pink. Doxycycline was used as a positive control.
13 Solvent control test was performed to study an effect of 10% DMSO on the growth of
14 microorganism. It was observed that 10% DMSO did not inhibit the growth of
15 microorganism. Also, in the experiment, the concentration of DMSO was additionally
16 decreased because of the twofold serial dilution assay (the working concentration was 5%
17 and lower). Each test included growth control and sterility control. All tests were performed
18 in duplicate and MICs were constant. Minimum bactericidal concentration was determined
19 by plating 10 μL of samples from wells, where no indicator color change was recorded, on
20 nutrient agar medium. At the end of the incubation period the lowest concentration with no
21 growth (no colony) was defined as minimum bactericidal concentration.

22 3. Results and discussion

23 The results of *in vitro* testing of antibacterial activities of the ligands and corresponding
24 palladium(II) and platinum(IV) complex are shown in Table 1-10. For comparison, MIC and
25 MBC values of doxycycline are listed in Table 11. The solvent (10% DMSO) did not inhibit
26 the growth of the tested microorganisms.

27 The intensity of antimicrobial action varied depending on the species of microorganism and
28 on the type and concentration of tested compounds. The difference between antimicrobial
29 activity of the ligands and corresponding palladium(II) and platinum(IV) complexes is
30 noticed and, in general, the most active were palladium(II) complexes.

31 The results of antibacterial testing for the ligands (**L1**, **L2**, **L3**) and corresponding
32 palladium(II) complexes (**C1**, **C2**, **C3**) are shown in Table 1. The results for 3 strains of
33 pathogenic bacteria and 2 species of probiotic bacteria were reported in the paper Vasić et
34 al., (2010). Results for *S. enterica*, *Staphyl. aureus* ATCC 25923, *S. lutea* ATCC 9341 and *L.*
35 *rhamnosus* were first presented in this paper. These ligands and complexes, being compared
36 to positive control, showed low to moderate antibacterial activity. MIC and MBC values
37 were in range from <7.81 to >1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, depending on the species of bacteria. Gram-
38 positive bacteria showed higher sensitivity. The most sensitive was *S. lutea* ATCC 9341,
39 where MIC was for **C1** and **C2** <7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The best activity at Gram-negative bacteria
40 was shown by **C2** to *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *E. coli* (MIC was 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The
41 probiotics showed sensitivity similar to the sensitivity of the other bacteria to the tested
42 compounds. Exception is *B. animalis subsp. lactis* where **L2**, **C2** and **L3** inhibited its growth at
43 these concentrations: 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 15,63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and <7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

The results of testing the ligands (**L4**, **L5**, **L6**, **L7**) and their palladium(II) complexes (**C4**, **C5**, **C6**, **C7**) are shown in Table 2 and Table 3. The results of testing for **L4** were reported in the paper by Stanković et al., (2011a; 2011c). The tested ligands, with few exceptions, show very low antimicrobial activity, while palladium(II) complexes show selective and moderate activity. Interestingly, **L6**, **L7** and **C6**, **C7** exhibit strong antibacterial activity towards *E. coli*, *Staphyl. aureus* ATCC 25923 and *S. lutea* ATCC 9341, MIC ranged <7.81 µg/mL to 31.25µg/mL. Probiotic bacteria showed high resistance to the effects of tested substances. The most sensitive was *B. subtilis* IP 5832 to **C5** and **C4** (MIC was 7.81µg/mL and 15.63 µg/mL).

The results of testing the ligands (**L8**, **L9**, **L10**, **L11**) and palladium(II) complexes (**C8**, **C9**, **C10**, **C11**) are shown in Table 4 and Table 5. The ligands and complexes, being compared to positive control, with few exceptions, showed low antibacterial activity. MIC and MBC values were in range from <7.8 to >1000 µg/mL, depending on the species of bacteria. **L9**, **L10** and **L11** showed excellent results to *S. lutea* ATCC 9341 (MIC and MBC <7.81 µg/mL) and **L10** and **L11** to *S. lutea* ATCC 9341, *Staphyl. aureus* ATCC 25923 and *L. rhamnosus* (MIC <7.81 µg/mL). In this case the ligands acted better than corresponding complexes and it is an exception. The complexes have weak antimicrobial activity and some better influence was seen on *B. subtilis* IP 5832 were MIC was in range from 39.06 to 312.5 µg/mL.

The results of testing the ligands (**L12**, **L13**, **L14**, **L15**, **L16**) and corresponding palladium (II) complexes (**C12**, **C13**, **C14**, **C15**, **C16**) are shown in Table 6 and Table 7. The results for these testing were accepted for publication in the paper by Radić et al., (2011b). All tested compounds demonstrated selective and moderate antibacterial activity. Tested ligands, with a few exceptions, show very low antimicrobial activity. The activity of corresponding complexes was higher than with the ligands. MICs values for ligands were in range from 250 µg/mL to >1000 µg/mL, and for complexes from 62.5 µg/mL to 1000 µg/mL. The Gram-positive bacteria were more sensitive than the Gram-negative bacteria especially by the activity of the complexes. The best effect was observed in **C16** to *S. lutea* ATCC 9341 were MIC and MBC 62.5 µg/mL. MICs for Gram-negative bacteria were at 500 µg/mL and 1000 µg/mL. The tested complexes (**C13**) and (**C14**) exhibited somewhat stronger antibacterial activity towards *P. aeruginosa* ATCC 27853 (MIC = 250 µg/mL). The probiotics showed sensitivity similar to the sensitivity of the other bacteria (Radić et al., 2011b).

Species	L1		C1		L2		C2		L3		C3	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Escherichia coli</i> ¹	125	>500	62,5	125	31,3	>500	31,25	> 250	250	>500	125	> 500
<i>Salmonella enterica</i>	>1000	>1000	125	125	nt	nt	250	500	1000	>1000	250	500
<i>Pseud. aeruginosa</i> ATCC 27853 ¹	>500	>500	125	250	>500	>500	31,25	125	250	>500	125	125
<i>Enter. faecalis</i> ATCC 29212 ¹	>500	>500	125	250	125	>500	62,5	250	>500	>500	62,5	250
<i>Staphyl. aureus</i> ATCC 25923	>1000	>1000	62,5	125	nt	nt	62,5	125	250	1000	62,5	125
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	1000	1000	<7,8	<7,8	nt	nt	<7,8	15,6	31,25	125	31,25	31,25
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	nt	nt	62,5	500	nt	nt	62,5	250	nt	nt	62,5	125
<i>Bifidobact. animalis subsp. lactis</i> ¹	125	>500	62,5	125	7,81	>500	15,6	125	<7,81	< 31,25	125	> 500
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832 ¹	125	>500	62,5	125	62,5	>500	15,6	125	62,5	>500	62,5	> 500

MIC, minimum inhibitory concentration (µg/mL),

MBC, minimum bactericidal concentration (µg/mL), nt, not tested

Table 1. Antibacterial activity of the ligands (**L1**,**L2**,**L3**) and corresponding complexes (**C1**, **C2**, **C3**).

¹ Vasić et al., (2010)

1

Species	L4 ²		C4		L5		C5	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Escherichia coli</i>	500	1000	125	500	125	1000	125	500
<i>Salmonella enterica</i>	1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000	1000	1000
<i>Pseud. aeruginosa</i> ATCC 27853	1000	1000	500	1000	>1000	>1000	500	1000
<i>Enter. faecalis</i> ATCC 29212	500	500	500	1000	>1000	>1000	500	>1000
<i>Staphyl. aureus</i> ATCC 25923	500	500	250	500	250	500	125	500
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	31.25	125	250	250	1000	1000	250	250
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1000	1000	500	1000	nt	nt	500	1000
<i>Bifidobact. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	250	500	125	1000	500	>1000	250	>1000
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	125	500	15.63	>1000	62.5	>1000	7.81	1000

2

MIC, minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$),

3

MBC, minimum bactericidal concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$), nt, not tested

4

Table 2. Antibacterial activity of the ligands (L4, L5) and corresponding complexes (C4, C5).

5

Species	L6		C6		L7		C7	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Escherichia coli</i>	15.63	500	31.25	500	15.63	125	<7.81	125
<i>Salmonella enterica</i>	1000	1000	250	500	1000	1000	1000	1000
<i>Pseud. aeruginosa</i> ATCC 27853	>1000	>1000	500	1000	500	>1000	500	1000
<i>Enter. faecalis</i> ATCC 29212	1000	>1000	500	1000	1000	>1000	500	1000
<i>Staphyl. aureus</i> ATCC 25923	31.25	125	125	125	31.25	125	500	500
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	31.25	31.25	31.25	31.25	<7.81	<7.81	250	250
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	31.25	250	62.50	125	62.50	250	500	1000
<i>Bifidobact. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	62.50	1000	62.50	1000	62.50	500	125	>1000
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	250	>1000	500	1000	1000	>1000	500	>1000

6

MIC, minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$),

7

MBC, minimum bactericidal concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

8

Table 3. Antibacterial activity of the ligands (L6, L7) and corresponding complexes (C6, C7).

9

Species	L8		C8		L9		C9	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Escherichia coli</i>	625	>1000	625	>1000	312.5	>1000	>1000	>1000
<i>Salmonella enterica</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Pseud. aeruginosa</i> ATCC 27853	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Enter. faecalis</i> ATCC 29212	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	625	>1000
<i>Staphyl. aureus</i> ATCC 25923	250	500	500	1000	31.25	125	250	500
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	250	250	500	500	<7.8	<7.8	250	250
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1000	1000	500	1000	15.63	125	500	1000
<i>Bifidobact. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	78	>1000	78	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	78.13	>1000	39.06	625	625	>1000	78	>1000

10

MIC, minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$),

11

MBC, minimum bactericidal concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

12

Table 4. Antibacterial activity of the ligands (L8, L9) and corresponding complexes (C8, C9).

² Stanković et al., (2011a, 2011c)

1

Species	L10		C10		L11		C11	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Escherichia coli</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	625	>1000	312.5	>1000
<i>Salmonella enterica</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Pseud. aeruginosa</i> ATCC 27853	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	312.5	>1000
<i>Enter. faecalis</i> ATCC 29212	156.3	>1000	625	>1000	>1000	>1000	156.3	>1000
<i>Staphyl. aureus</i> ATCC 25923	<7.8	125	31.25	125	<7.8	125	500	500
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	<7.8	<7.8	31.25	31.25	<7.8	<7.8	250	250
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<7.8	<7.8	31.25	62.5	<7.8	<7.8	500	1000
<i>Bifidobact. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	625	>1000
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	>1000	>1000	78	>1000	>1000	>1000	312.5	>1000

2

MIC, minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$),

3

MBC, minimum bactericidal concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

4

Table 5. Antibacterial activity of the ligands (L10, L11) and corresponding complexes (C10,C11).

5

Species	L12		C12		L13		C13		L14		C14	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Escherichia coli</i>	>1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	500	500	1000	>1000	500	500
<i>Salmonella enterica</i>	1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	500	500	1000	>1000	500	500
<i>Pseud. aeruginosa</i> ATCC 27853	500	>1000	500	1000	500	>1000	250	500	500	>1000	250	500
<i>Enter. faecalis</i> ATCC 29212	1000	1000	500	500	1000	1000	500	1000	500	1000	250	500
<i>Staphyl. aureus</i> ATCC 25923	500	1000	500	1000	1000	1000	500	1000	1000	1000	500	500
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	250	500	250	250	1000	1000	250	250	500	500	250	500
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	>1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	500	1000	1000	1000	500	500
<i>Bifidobact. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	500	500	500	1000	500	500	1000	1000	1000	1000	500	500
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	500	500	500	500	500	500	500	500	1000	>1000	250	500

6

MIC, minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$),

7

MBC, minimum bactericidal concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

8

Table 6. ³ Antibacterial activity of the ligands (L12, L13, L14) and corresponding complexes (C12, C13, C14).

9

10

Species	L15		C15		L16		C16	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Escherichia coli</i>	1000	>1000	500	500	>1000	>1000	1000	1000
<i>Salmonella enterica</i>	1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	1000	1000
<i>Pseud. aeruginosa</i> ATCC 27853	500	>1000	500	1000	500	>1000	500	1000
<i>Enter. faecalis</i> ATCC 29212	500	1000	250	500	1000	1000	500	1000
<i>Staphyl. aureus</i> ATCC 25923	500	1000	500	500	>1000	>1000	500	500
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	250	250	500	500	1000	1000	62.5	62.5
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1000	>1000	500	>1000	>1000	>1000	1000	1000
<i>Bifidobact. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	500	1000	250	500	1000	1000	500	1000
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	500	500	250	250	1000	>1000	250	500

11

MIC, minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$),

12

MBC, minimum bactericidal concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

13

Table 7. ⁴ Antibacterial activity of the ligands (L15, L16) and corresponding complexes (C15,C16).³ Radić et al., (2011b)⁴ Radić et al., (2011b)

1 The results of *in vitro* testing of antibacterial activities of the ligand (**L17**) and corresponding
2 palladium(II) (**C17a**) and platinum(IV) (**C17b**) complexes are shown in Table 8.

3

Species	L17		C17a		C17b	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Escherichia coli</i>	>1000	>1000	250	500	>1000	>1000
<i>Salmonella enterica</i>	>1000	>1000	250	500	>1000	>1000
<i>Pseud. aeruginosa</i> ATCC 27853	250	>1000	15.63	500	125	500
<i>Enter. faecalis</i> ATCC 29212	500	>1000	31.25	500	250	500
<i>Staphyl. aureus</i> ATCC 25923	500	>1000	31.25	500	250	500
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	500	>1000	62.5	500	125	500
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	125	>1000	62.5	>1000	31.25	>1000
<i>Bifidobact. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	>1000	>1000	31.25	125	250	500
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	500	>1000	250	500	250	500

4 MIC, minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$),

5 MBC, minimum microbiocidal concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

6 Table 8. ⁵Antibacterial activity of the ligand (**L17**) and corresponding palladium(II) (**C17a**)
7 and platinum(IV) (**C17b**) complexes.

8 The best activity manifested palladium(II) complex **C17a** with also the best seen result on
9 *P. aeruginosa* ATCC 27853 (MIC 15.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The same one at Gram-positive bacteria had
10 MIC 31.25 – 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Platinum (IV) complex **C17b** has weaker activity and the best
11 result manifested on *L. rhamnosus* where MIC was 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Radojević et al., 2011).

12

Species	L4		C4a		L18		C18	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Escherichia coli</i>	500	1000	1000	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Salmonella enterica</i>	1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000
<i>Pseud. aeruginosa</i> ATCC 27853	1000	1000	1000	>1000	1000	>1000	1000	>1000
<i>Enter. faecalis</i> ATCC 29212	500	500	1000	1000	500	1000	1000	1000
<i>Staphyl. aureus</i> ATCC 25923	500	500	500	1000	500	500	1000	1000
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	31.25	125	31.25	62.5	62.5	125	31.25	62.5
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<i>Bifidobact. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	250	500	500	1000	500	500	1000	>1000
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	125	500	500	1000	500	500	500	1000

13 MIC, minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$),

14 MBC, minimum microbiocidal concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

15 Table 9. ⁶Antibacterial of the ligands (**L4**, **L18**) and corresponding complexes (**C4a**, **C18**).

16 Antibacterial activity of the tested platinum(IV) (**C4a**, **C18**) complexes and corresponding
17 ligands (**L4**, **L18**) are shown in Table 9. Results for these testing was reported in the papers
18 Stanković et al., (2011a,c). The ligands and corresponding platinum(IV) complexes
19 demonstrated low antimicrobial activity. There was no difference in activities between the

⁵ Radojević et al., (2011)

⁶ Stanković et al., (2011a; 2011c)

ligands and corresponding complexes. The ligands and corresponding platinum(IV) complexes showed significant antibacterial activity against *S. lutea* ATTC 9341. MICs values were in range from 31.25 µg/mL to 62.5 µg/mL, and MBCs values were from 62.5 µg/mL to 125 µg/mL. The tested compounds did not affect the growth of Gram-negative bacteria or their activities were very low (MIC ranged from 500 µg/mL to >1000 µg/mL, MBC from 1000 µg/mL to >1000 µg/mL). Also, probiotic bacteria showed high resistance to the effects of tested substances. MICs were from 125 µg/mL to 1000 µg/mL, and MBCs were from 500 µg/mL to >1000 µg/mL (Stanković et al., 2011a,c).

The results of *in vitro* testing of antibacterial activities of the ligands (**L19**, **L20**, **L21**) and corresponding platinum(IV) (**C19**, **C20**, **C21**) complex are shown in Table 10.

Species	L19		C19		L20		C20		L21		C21	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Escherichia coli</i>	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000	1000	1000
<i>Salmonella enterica</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000	1000	1000
<i>Pseud. aeruginosa</i> ATCC 27853	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000
<i>Enter. faecalis</i> ATCC 29212	1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	250	500	1000	1000	125	500
<i>Staphyl. aureus</i> ATCC 25923	1000	>1000	500	1000	1000	>1000	250	250	1000	>1000	125	250
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	1000	>1000	7.81	15.625	1000	>1000	15.625	31.25	1000	>1000	31.25	62.5
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Bifidobact. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	125	250	1000	1000	<31.25	125	500	500	<31.25	250	125	500
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	125	250	250	1000	250	250	250	250	250	250	125	250

MIC, minimum inhibitory concentration (µg/mL),

MBC, minimum microbiocidal concentration (µg/mL)

Table 10. Antibacterial activity of the ligands (**L19**, **L20**, **L21**) and corresponding complexes (**C19**, **C20**, **C21**).

The difference in action between ligands and corresponding complexes can be seen at Gram-positive bacteria. Ligands have significant antimicrobial effect on probiotic bacteria (**L20**, **L21**), and complexes on Gram-positive bacteria (**C19**, **C20**, **C21**). **C21** has better antimicrobial effect than two other complexes. The lowest antimicrobial action of compounds was on Gram-negative bacteria, where tested concentrations of ligands almost didn't have the influence, while corresponding complexes had some better action, but still weak and limited. *L. rhamnosus* also showed similar resistance to the action of tested compounds (none of the tested concentrations had the influence on its growth), while the other probiotic bacteria were more sensitive, especially to the action of ligands, where MIC goes from <31.25 µg/mL to 250 µg/mL. At complexes MIC is in the range from 125 µg/mL to 1000 µg/mL.

The gram-positive bacteria were more sensitive than the gram-negative bacteria. The platinum(IV) complexes showed high antibacterial activity against Gram-positive bacteria. MIC values were in range from 7.81 µg/mL to 1000 µg/mL, and MBC values were from 15.63 µg/mL to 1000 µg/mL depending on the species of bacteria. The most sensitive was *S. lutea* ATCC 9341 (MIC values are 7.81 µg/mL, 15.625 µg/mL and 31.25 µg/mL for different complexes).

1

Species	Doxycycline	
	MIC	MBC
<i>Escherichia coli</i>	7.81	15.625
<i>Salmonella enterica</i>	15.625	31.25
<i>Pseud. aeruginosa</i> ATCC 27853	62.5	125
<i>Enter. faecalis</i> ATCC 29212	7.81	62.5
<i>Staphyl. aureus</i> ATCC 25923	0.224	3.75
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	< 0.448	7.81
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	7.81	31.25
<i>Bifidobact. animalis subsp. lactis</i>	31.25	62.5
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	1.953	15.625

2 MIC, minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$),3 MBC, minimum microbiocidal concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

4 Table 11. Antibacterial activity of the positive control - doxycycline

5 In general, the ligands demonstrated low and selective antimicrobial activity (with few
6 exceptions) and the complexes showed selective and moderate antibacterial activity. MIC
7 values were in range from $<7.81\mu\text{g}/\text{mL}$ to $>1000\mu\text{g}/\text{mL}$ and MBC values from
8 $15.625\mu\text{g}/\text{mL}$ to $>1000\mu\text{g}/\text{mL}$ depending on the species of bacteria. The Gram-positive
9 bacteria were more sensitive than the Gram-negative bacteria. The most sensitive species is
10 *S. lutea* ATCC 9341. Tested probiotics, with a few exceptions, indicate high resistance toward
11 tested compounds. *L. rhamnosus* shows the highest resistance among them. The tested
12 complexes **C1**, **C2**, **C3** and **C17a** exhibit strong activity towards *E. coli*, *P. aeruginosa* ATCC
13 27853 and *E. faecalis* ATCC 29212. The **L6**, **L7** and **C6**, **C7** exhibit strong antibacterial activity
14 towards *E. coli*. The tested compounds did not affect *S. enterica* or their activities were low.
15 Some activity showed palladium(II) complexes (**C1**, **C2**, **C3**, **C6** and **C17a**). At the ligands
16 the most effective antimicrobial activity show **L6**, **L7**, **L9**, **L10** and **L11** while the most active
17 complexes are **C1**, **C2**, **C3**, **C6** and **C17a**. For eleven ligands (**L1** - **L11**) and corresponding
18 palladium(II) complexes (**C1** - **C11**) antifungal activity is investigated. Palladium(II)
19 complexes showed good antifungal activity opposite to ligands. This study are in keeping
20 with our research to a great extent (Radojević et al., 2010).

21 **4. Conclusion**

22 The intensity of antimicrobial action varied depending on the species of microorganism and
23 on the type of tested compounds. The tested ligands, with few exceptions, show low
24 antimicrobial activity. The difference between antimicrobial activity of the ligands and
25 corresponding palladium(II) and platinum(IV) complexes is noticed and, in general, the
26 most active were palladium(II) complexes. The Gram-positive bacteria were more sensitive
27 than the Gram-negative bacteria. The most sensitive species is *Sarcina lutea* ATCC 9341 and
28 the most resistant is *Salmonella enterica* where the tested compounds did not affect or their
29 activities were low. Tested probiotics, with a few exceptions, also indicate high resistance
30 toward tested compounds.

5. Acknowledgement

The authors are grateful for financial support to the Ministry of Education and Science of Republic of Serbia (projects No. OI172016 and III41010).

6. References

- Agarwal, S.K. (2007). Synthesis & Characterization of Some Mixed Ligand Complexes of Pd(II), Rh(III) and Pt(IV) with Carboxylic Hydrazones as Primary and Dithiooxamide as Co-ligand. *Asian Journal of Chemistry*, Vol.19, No.4, pp. 2581-2585, ISSN: 0970-7077
- Aghatabay, N. M.; Somer, M.; Senel, M.; Dulger, B. & Gucin, F. (2007). Raman, FT-IR, NMR spectroscopic data and antimicrobial activity of bis[μ_2 -(benzimidazol-2-yl)-2-ethanethiolato-*N,S,S*-chloro-palladium(II)] dimer, [μ_2 -CH₂CH₂NHNCC₆H₄)PdCl]₂ C₂H₅OH complex. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Vol.42, No.8, (August 2007), pp. 1069-1075, ISSN: 0223-5234
- Ali, A.M., Mirza, A.H., Butcher, R.J. & Crouse, K.A. (2006). The preparation, characterization and biological activity of palladium(II) and platinum(II) complexes of tridentate NNS ligands derived from *S*-methyl- and *S*-benzyldithiocarbazates and the X-ray crystal structure of the [Pd(mpasme)Cl] complex. *Transition Metal Chemistry*, Vol.31, No.1, (February 2006), pp. 79-87, Print ISSN: 0340-4285, Online ISSN: 1572-901X
- Al-Hazmi, G.A., El-Metwally, N.M., El-Gammal, O.A. & El-Asmy, A.A. (2008). Synthesis, spectral characterization and eukaryotic DNA degradation of thiosemicarbazones and their platinum(IV) complexes. *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Vol.69, No.1, (January 2008), pp. 56-61, ISSN: 1386-1425
- Andrews, J.M. (2005). BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 4). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol.56, No.1, (July 2005), pp. 60-76, Print ISSN 0305-7453, Online ISSN 1460-2091
- Banfi E., Scialino G. & Monti-Bragadin C. (2003). Development of a microdilution method to evaluate Mycobacterium tuberculosis drug susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol.52, No.5, (November 2003), pp. 796-800, Print ISSN 0305-7453, Online ISSN 1460-2091
- Biyala, M.K., Sharma, K., Swami, M., Fahmi, N. & Vir Singh, R. (2008). Spectral and biocidal studies of palladium(II) and platinum(II) complexes with monobasic bidentate Schiff bases. *Transition Metal Chemistry*, Vol.33, No.3, (April 2008), pp. 377 - 381, Print ISSN: 0340-4285, Online ISSN: 1572-901X
- Brudzinska, I., Mikata, Y., Obata, M., Ohtsuki, C. & Yano, S. (2004). Synthesis, structural characterization, and antitumor activity of palladium(II) complexes containing a sugar unit. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol.14, No.10, (17 May), pp. 2533-2536, ISSN: 0960-894X
- Coombs, R.R., Ringer, M.K., Blacquièrè, J.M., Smith, J.C., Neilsen, J.S., Uh, Y., Gilbert, J.B., Leger, L.J., Zhang, H., Irving A.M., Wheaton, S.L., Vogels, C.M., Westcott, S.A., Decken, A. & Baerlocher, F.J. (2005). Palladium(II) Schiff base complexes derived

- 1 from sulfanilamides and aminobenzothiazoles. *Transition Metal Chemistry*,
2 Vol.30, No.4, (May 2005), pp. 411-418, Print ISSN: 0340-4285, Online ISSN: 1572-
3 901X
- 4 Dimitrijević, D.P., Vujić, J.M., Garcia-Granda, S., Menendez-Taboada, L. & Trifunović S.R.
5 (2010). Synthesis and crystal structure of O,O'-dipropyl-ethylenediamine-N,N'-di-
6 (S,S)-(2,2'-dibenzyl)-acetate dihydrochloride. *Proceedings of XVII Conference of the*
7 *Serbian Crystallographic Society*, pp. 48, ISBN: 978-86- 6009-004-3, Ivanjica, Serbia,
8 June 3-5, 2010.
- 9 Dimitrijević, D.P., Radić G.P., Glođović, V.V., Radojević I.D., Stefanović O.D. , Čomić Lj.,
10 Ratković Z.R., Valkonen A., Rissanen, K. & Trifunović, S. R. (2011). Crystal
11 structure of bis-(S-benzyl-thiosalicylate)-palladium(II) complex, [Pd(S-bz-eddp)₂].
12 *Proceedings of XVIII Conference of the Serbian Crystallographic Society*, pp. 44, ISBN:
13 978-86-7031-194-7, Fruška Gora, Serbia, June 2-4, 2011.
- 14 Kizilcikli, I., Kurt, Y.D., Akkurt, B., Genel, A.Y., Birteksöz, S., Ötük, G. & Ülküseven, B.
15 (2007). Antimicrobial Activity of a Series of Thiosemicarbazones and Their ZnII and
16 PdII Complexes. *Folia Microbiologica*, Vol.52, No.1, (January 2007), pp. 15-25, Print
17 ISSN: 0015-5632, Online ISSN: 1874-9356
- 18 Kovala-Demertzi, D., Demertzis, M.A., Miller, J.R., Papadopoulou, C., Dodorou, C. &
19 Filousis, G. (2001). Platinum(II) complexes with 2-acetyl pyridine
20 thiosemicarbazone: Synthesis, crystal structure, spectral properties, antimicrobial
21 and antitumour activity, *Journal of Inorganic Biochemistry*, Vol.86, No.2-3,
22 (September 2001), pp. 555-563, ISSN: 0162-0134
- 23 Garoufis, A., Hadjikakou, S.K. & Hadjiliadis, N. (2009). Palladium coordination compounds
24 as anti-viral, anti-fungal, anti-microbial and anti-tumor agents. *Coordination*
25 *Chemistry Reviews*, Vol.253, No.9-10, (May 2009), pp. 1384-1397, ISSN: 0010-8545
- 26 Guerra W., de Andrade Azevedo E., de Souza Monteiro A. R., Bucciarelli-Rodriguez M.,
27 Chartone-Souza E., Nascimento A. M. A., Fontes A. P. S., Le Moyec L., Pereira-Maia
28 E. C. (2005). Synthesis, characterization, and antibacterial activity of three
29 palladium(II) complexes of tetracyclines. *Journal of Inorganic Biochemistry*, Vol.99,
30 No.12, (December 2005), pp. 2348-2354, ISSN: 0162-0134
- 31 Fluit, A.C., Jones, M.E., Schmitz, F.J., Acar, J., Gupta, R., Verhoef, J., & the SENTRY
32 Participants Group. (2000). Antimicrobial susceptibility and frequency of
33 occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY Antimicrobial
34 Surveillance Program, 1997 and 1998. *Clinical Infectious Diseases*, Vol.30, No.3,
35 (March 2000), pp. 454-460, ISSN: 1058-4838
- 36 Manav, N., Mishra, A.K. & Kaushik, N. K. (2006). In vitro antitumour and antibacterial
37 studies of some Pt(IV) dithiocarbamate complexes. *Spectrochimica Acta*, Part A:
38 *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Vol.65, No.1, (September 2006), pp. 32-35,
39 ISSN: 1386-1425
- 40 Mishra, A.K. & Kaushik, N.K. (2007). Synthesis, characterization, cytotoxicity, antibacterial
41 and antifungal evaluation of some new platinum (IV) and palladium (II) complexes
42 of thiodiamines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Vol.42, No.10, (October
43 2007), pp. 1239-1246, ISSN: 0223-5234

- 1 Mishra A.K., Mishra, S.B., Manav, N. & Kaushik, N.K. (2007a). Platinum(IV) and
2 palladium(II) thiosemicarbazide and thiodiamine complexes: A spectral and
3 antibacterial study. *Journal of Coordination Chemistry*. Vol.60, No.18, (September
4 2007) pp. 1923-1932, Print ISSN: 0095-8972, Online ISSN: 1029-0389
- 5 Mishra, A.K., Mishra, S.B., Manav, N., Kumar, R., Sharad, R., Chandra, R., Saluja, D. &
6 Kaushik, N.K. (2007b). Platinum (IV) thiohydrazide, thiodiamine and
7 thiohydrazone complexes: A spectral, antibacterial and cytotoxic study.
8 *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Vol.66, No.4-5,
9 (April 2007), pp. 1042-1047, ISSN: 1386-1425
- 10 Radić, G.P., Glođović, V.V., Garsia-Granda, S., Menéndez-Taboada, L., Ratković, Z.&
11 Trifunović S.R. (2010a). Crystal structure of 1,2-diphenyl-ethylenediamine- N,N'-di-
12 3- propanoic acid dihydrochloride. *Proceedings of XVII Conference of the Serbian*
13 *Crystallographic Society*, pp. 36, ISBN: 978-86- 6009-004-3, Ivanjica, Serbia, June 3-5,
14 2010.
- 15 Radić, G.P., Glođović, V.V., Heinemann, F.W. & Trifunović, S.R. (2010b). Synthesis and
16 crystal structure of palladium(II) complex with O,O'-diethyl- (S,S)-
17 ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-methyl) butanoate. *Proceedings of XVII Conference of*
18 *the Serbian Crystallographic Society*, pp. 60, ISBN: 978-86-6009-004-3, Ivanjica, Serbia,
19 June 3-5, 2010.
- 20 Radić, G.P., Glođović, V.V., Kaluđerović, G.N., Heinemann, F.W. & Trifunović,
21 S. R. (2011a). Palladium(II) complexes with R₂edda derived ligands. Part V.
22 Reaction of O,O'-Diethyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-methyl)butanoate
23 with K₂[PdCl₄]. *Transition Metal Chemistry*, Vol.36, No.4 , (May 2011), pp. 331-
24 336, ISSN: 0340-4285
- 25 Radić, G.P., Glođović, V.V., Radojević, I.D., Stefanović, O.D., Čomić, Lj.R., Ratković, Z.R.,
26 Valkonen, A., Rissanen, K. & Trifunović, S.R. (2011b). Synthesis, characterization
27 and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with some alkyl derivates
28 of thiosalicylic acids. Crystal structure of bis(S-benzyl-thiosalicylate)-
29 palladium(II) complex, [Pd(S-bz-thiosal)₂]. *Polyhedron*, Accepted, In Press, n.d.
30 ISSN: 0277-5387
- 31 Radojević, I., Čomić, Lj., Stefanović, O., Glodjović, V., Vasić, V., Vujić, J. & Trifunović, S.
32 (2010). Antimicrobial activity ligands and their corresponding palladium(II)
33 complexes against *Aspergillus* species. *Proceedings of ICAR 2010, International*
34 *Conference on Antimicrobial Research*, pp. 475-476, Available from:
35 <http://www.formatex.org/icar2010/index.html>, Valladolid, Spain, November 3-5,
36 2010.
- 37 Radojević, I., Stefanović, O., Radić, G., Glođović, V., Čomić, Lj. & Trifunović, S. (2011). *In*
38 *vitro* antimicrobial activity of novel platinum(iv) and palladium(ii) complexes with
39 1,2-diphenyl-ethylenediamine-n,n'-di-3-propanoic acid. *Proceedings of Preclinical*
40 *testing of active substances and cancer research, with International Symposium on Anti-*
41 *Cancer Agents, Cardiotoxicity and Neurotoxicity*, pp. 10-11, ISBN: 978-86-7760-064-8,
42 Kragujevac, Serbia, March 16-18, 2011.

- 1 Sarker, S.D., Nahar, L. & Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay
2 incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in
3 vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, Vol.42, No.4, (August
4 2007), pp. 321-324,. ISSN: 1046-2023
- 5 Stanković, M., Radić, G., Glođović, V., Radojević, I., Stefanović, O., Čomić, Lj. & Trifunović,
6 S. (2011a). Antimicrobial activity of ethyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-
7 propanoic and (S,S)- ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-methyl)-butanoic acids and
8 corresponding platinum(IV) complexes. *Proceedings of Preclinical testing of active
9 substances and cancer research, with International Symposium on Anti-Cancer Agents,
10 Cardiotoxicity and Neurotoxicity*, pp. 9-10, ISBN: 978-86-7760-064-8, Kragujevac,
11 Serbia, March 16-18, 2011.
- 12 Stanković, M.Z., Radić, G.P., Glođović, V.V., Klisurić, O.R. & Trifunović, S.R. (2011b).
13 Synthesis and crystal structure of tetrachloride-(O,O'-diethyl-(S,S)-ethylenediamine-
14 N,N'-di-2-propanoato)-platinum(IV). *Proceedings of XVIII Conference of the Serbian
15 Crystallographic Society*, pp. 42, ISBN: 978-86-7031-194-7, Fruška Gora, Serbia, June
16 2-4, 2011.
- 17 Stanković, M.Z., Radić, G.P., Glođović, V.V., Radojević, I.D., Stefanović, O.D., Čomić, L.R.,
18 Klisurić, O.R., Djinović, V.M. & Trifunović, S.R., (2011c). Stereospecific ligands and
19 their complexes IX: Synthesis, characterization and antimicrobial activity of ethyl
20 esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoic and (S,S)-ethylenediamine-
21 N,N'-di-2-(3-methyl)-butanoic acids and corresponding platinum(IV) complexes:
22 Crystal structure of tetrachloride-(O,O'-diethyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-
23 propanoato)-platinum(IV), [PtCl₄(det-S,S-eddp)]. *Polyhedron*, In Press, doi:
24 10.1016/j.poly.2011.05.034, ISSN: 0277-5387
- 25 Vasić, G., Glođović, V., Radojević, I., Stefanović, O., Čomić, Lj. & Trifunović, S. (2010).
26 Stereospecific ligands and their complexes. V. Synthesis, characterization and
27 antimicrobial activity of palladium (II) complexes with some alkyl esters of
28 ethylenediamine-N,N'-di-S,S-2-propionic acid. *Inorganica Chimica Acta*, Vol.363,
29 No.13, (October 2010), pp. 3606-3610, ISSN: 0020-1693
- 30 Vieira, L.M.M., de Almeida, M.V., Lourenço, M.C.S., Bezerra, F.A.F.M. & Fontes, A.P.S.
31 (2009). Synthesis and antitubercular activity of palladium and platinum complexes
32 with fluoroquinolones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Vol.44, No.10,
33 (October 2009), pp. 4107- 4111, ISSN: 0223-5234
- 34 Vujić, J.M., Cvijović, M., Kaluđerović, G.N., Milovanović, M., Zmejkovski B.B., Volarević
35 V., Arsenijević N., Sabo, T.J. & Trifunović, S.R. (2010). Palladium(II) complexes
36 with R₂edda derived ligands. Part IV. O,O'-dialkyl esters of (S,S)-
37 ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride and their
38 palladium(II) complexes: Synthesis, characterization and *in vitro* antitumoral
39 activity against chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *European Journal of
40 Medicinal Chemistry*, Vol.45, No.9, (September 2010), pp. 3601-3606, ISSN: 0223-
41 5234
42

- 1 Vujić, J.M., Garcia-Granda, S., Menendez-Taboada, L. & Trifunović, S.R. (2011). Crystal
2 structure of palladium(II) complex with *O,O'*- dipentil-etilenediamine- *N,N'*-di-
3 (*S,S*)-2(4-methy)-pentanoate ligand. *Proceedings of XVIII Conference of the Serbian*
4 *Crystallographic Society*, pp. 40, ISBN: 978-86-7031-194-7, Fruška Gora, Serbia, June
5 2-4, 2011.

23 corresponding platinum(IV) complex, *s-cis*-dichlorido-(*meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-
24 -*N,N'*-di-3-propanoate)-platinum(IV) ([PtCl₂(1,2-dpheddp)]) was synthesized by heating
25 potassium-hexachloridoplatinate(IV) and H₂-1,2-dpheddp·2HCl·H₂O on steam bath for 12 hours
26 with neutralization by means of lithium-hydroxide. The palladium(II)
27 complex, *cis*-dichlorido-(*meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate)-
28 -palladium(II) ([PdCl₂(1,2-dpheddp)]) was obtained in the similar way using potassium-
29 -tetrachloridopalladate(II), H₂-1,2-dpheddp·2HCl·H₂O and lithium-hydroxide. The compounds
30 were characterized by elemental analysis and infrared spectroscopy. The spectroscopically
31 predicted structure of the synthesized tetradentate ligand was confirmed by X-ray analysis of the
32 H₂-1,2-dpheddp·2HCl·H₂O.

33 Antimicrobial activity of the ligand and corresponding palladium(II) and platinum(IV)
34 complexes is investigated against 25 species of microorganisms. Testing is performed by
35 microdilution method and minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum microbicidal
36 concentration (MMC) have been determined. The difference between antimicrobial activity of
37 the ligand and corresponding platinum(IV) and palladium(II) complex is noticed and, in general,
38 palladium(II) complex was the most active.

39

40 *Keywords:* *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid; platinum(IV) complex; palladium(II)
41 complex; infrared spectroscopy; crystal structure; antimicrobial activity

42

43 **1. Introduction**

44 A geometrical isomerism in metal complexes of linear flexible tetradentate ligands
45 having the donor atom array ONNO such as edda (edda = ethylenediamine-
46 -*N,N'*-diacetato ion) or eddp (eddp = ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate ion) has been an

47 interesting field studied by numerous authors [1-14]. Such ligands occupy four octahedral sites
48 around the central ion and the other two sites may be occupied by other ligands. In that case
49 three geometrical isomers are possible, as shown in Figure 1.

50 In most synthetic routes [1-14] edda takes a *symmetric* coordination position
51 (*s-cis*) rather than *unsymmetric* one (*uns-cis*) [3]. It has been suggested that the observed chelate
52 strain of chelate rings in *uns-cis*-edda complexes may be a contributing factor in determining the
53 configuration of the edda ligand [6]. 1,3-pdda ligand (1,3-pdda = 1,3-
54 -propylenediamine-*N,N'*-diacetate ion) and eddp (eddp = ethylenediamine-*N,N'*-di-3-
55 -propanoate ion), with a longer diamine and carboxylate chelate rings than edda, prefer
56 *unsymmetric* coordination [1,15,16], suggesting that the size of the chelate rings in linear
57 tetradentate edda and similar ligands have a profound effect on the distribution of the
58 geometrical isomers of the complexes.

59 The synthesis and evaluation of the biological activity of the new metal-based compounds
60 is the field of growing interest. Numerous complexes based on palladium(II) and platinum(IV)-
61 -ion have been synthesized and their different biological activities have been documented
62 [17–19]. The impact of different palladium and platinum complexes on the growth and
63 metabolism of various groups of microorganisms has been studied. Garoufis et al. [20] reviewed
64 numerous scientific papers on anti-viral, antibacterial and antifungal activity of palladium(II)
65 complexes with different types of ligands (sulfur and nitrogen donor ligands, Schiff base ligands
66 and drugs as ligands). There are other papers in the literature showing different intensity of
67 palladium(II) and platinum(IV) complexes activity on various species of bacteria and fungi
68 [21–34].

69 The aim of this paper is to synthesize new palladium(II) and platinum(IV) complexes and
70 *in vitro* research their antibacterial and antifungal activities.

71 We wanted to extend the investigation of platinum complexes with derivatives
72 ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate. The initial idea of this work was to prepare a new linear
73 edda-like ligand, *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid
74 (H_2 -1,2-dpheddp) and corresponding platinum(IV) and palladium(II) complexes. In all our
75 attempts we prepared only *s-cis* geometrical isomer of Pt(IV) with low solubility in water and
76 common organic solvents.

77

78 **2. Experimental**

79

80 *2.1. Materials and measurements*

81 The reagents were obtained commercially and used without further purification. Infrared
82 spectra were recorded on Perkin-Elmer FT-IR spectrophotometer, Spectrum One, using the KBr
83 pellet technique. Elemental analyses were done on a Vario III CHNOS Elemental Analyzer,
84 Elementar Analysensysteme GmbH.

85

86 *2.2. Syntheses*

87

88 *2.2.1. Preparation of meso-1,2-diphenyl-ethylenediamine, 1,2-dphen*

89 The *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine was prepared according to the procedure
90 described earlier [35]. Benzaldehyde (30.00 g) was refluxed with ammonium-acetate (60.00 g)
91 for 3 hours. The reaction mixture was cooled and the product was filtered and washed with

92 ethanol. Recrystallization from 1-butanol gave *N*-benzoyl-*N'*-benzylidene-
93 -*meso*-1,2-diphenyl-ethylendiamine. Hydrolysis of that compound with 70% sulphuric acid
94 under reflux for 1h gave *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine as the basic product of hydrolysis.

95

96 2.2.2. Preparation of *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid
97 dihydrochloride monohydrate, $H_2-1,2-dpheddp \cdot 2HCl \cdot H_2O$

98 3-Chloro-propanoic acid (4.34 g, 0.04 mol) was dissolved in 5.0 mL of water on ice bath
99 and carefully neutralized with cold water solution of 5.0 mL NaOH
100 (1.60 g, 0.04 mol). *Meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine (4.24 g, 0.02 mol) was added to this
101 solution. The mixture was being stirred for 4 hours at 90°C, and during this period 5.0 mL NaOH
102 water solution (1.60 g, 0.04 mol) was introduced. After that, 5.6 mL 6 mol/L HCl was added and
103 resulting solution was evaporated to the volume of 7.0 mL; 6.0 mL *conc.* HCl, 6.0 mL of ethanol
104 and 6.0 mL of ether were added to the mixture. The white precipitate of *meso*-1,2-diphenyl-
105 -ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid dihydrochloride-monohydrate,
106 $H_2-1,2-dpheddp \cdot 2HCl \cdot H_2O$ was separated by filtration and refined with solution
107 water : ethanol = 1 : 2. Yield: 4.00 g (44.69 %). *Anal.* Calcd. for
108 $H_2-1,2-dpheddp \cdot 2HCl \cdot H_2O = C_{20}H_{28}Cl_2N_2O_5$ (Mr = 447.344): C, 53.69; H, 6.31; N, 6.26. Found:
109 C, 53.88; H, 6.70; N, 6.08.

110

111 2.2.3. Preparation of *s-cis*-dichlorido-(*meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-
112 -propanoate)-platinum(IV), *s-cis*-[PtCl₂(1,2-*dpheddp*)]

113 Potassium-hexachloridoplatinate(IV) (0.2000 g, 0.411 mmol) was dissolved in
114 10.0 mL water on a steam bath and *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic
115 acid dihydrochloride monohydrate (0.1839 g, 0.411 mmol) was added. The reaction mixture was

116 heated for 12 hours and during this period 10.0 mL of LiOH water solution (0.0394 g,
117 1.65 mmol) was added in small portions and the solution was filtered and evaporated to small
118 volume. The orange precipitate of *s-cis*-[PtCl₂(1,2-dpheddp)] was separated by filtration, washed
119 with cold water and air-dried. Yield: 0.095 g. (37.25%). *Anal.* Calc. for
120 *s-cis*-[PtCl₂(1,2-dpheddp)] = C₂₀H₂₆Cl₂N₂O₄Pt (Mr = 620.396): C, 38.72; H, 3.57; N, 4.52.
121 Found: C, 38.38; H, 3.81; N, 4.60.

122

123 2.2.4. Preparation of *cis*-dichlorido-(*meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3- 124 -propanoate)-palladium(II), [PdCl₂(1,2-dpheddp)]

125 K₂[PdCl₄] (0.200 g, 0.613 mmol) was dissolved in 10.0 mL of water on a steam bath and
126 *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid dihydrochloride monohydrate,
127 H₂-1,2-dpheddp·2HCl·H₂O, (0.2742 g, 0.613 mmol) was added. The mixture was stirred for 2h
128 and during this period water solution of LiOH (0.059 g,
129 2.452 mmol in 10.0 mL of water) was introduced. The complex *cis*-[PdCl₂(1,2-dpheddp)], as
130 yellow precipitate, was filtered, washed with cold water and air-dried. Yield: 0.25 g (76.43%).
131 *Anal.* Calc. for *cis*-[PdCl₂(1,2-dpheddp)] = C₂₀H₂₄Cl₂N₂O₄Pd (Mr = 533.732) (%): C, 45.00; H,
132 4.53; N, 5.25. Found: C, 45.64; H, 4.87; N, 5.31.

133

134 2.3. Crystal structure determination

135 The single-crystals of H₂-1,2-dpheddp·2HCl·H₂O suitable for X-ray structure analysis
136 were obtained by recrystallization of powdered substance from a small amount of water-ethanol
137 mixture (1:2). The diffraction data were collected at room temperature on Oxford Diffraction
138 Xcalibur Gemini S diffractometer equipped with CuK α radiation (λ = 1.54184 Å) (Table 1). The

139 data were processed with CrysAlis software [36] and corrected for absorption by analytical
140 numeric method [37]. Crystal structure was solved by direct methods, using Sir2002 [38] and
141 refined using SHELXL [39]. The carboxyl O2–H group was found to be disordered over two
142 sites whose occupancies were held at 50% during refinement. H atoms were placed at
143 geometrically calculated positions with the D–H distances fixed to 0.93, 0.97, 0.90 and 0.82 Å
144 from C(sp^2), C(sp^3), N and O atoms respectively. The corresponding isotropic displacement
145 parameters of the hydrogen atoms were equal to 1.2 U_{eq} of the parent C and N and 1.5 U_{eq} of the
146 parent O atoms. The details of the X-ray structural analysis are given in Table 1. Hydrogen
147 bonds are listed in Table 2. The complete list of bond lengths and angles between non-hydrogen
148 atoms as well as additional figures can be found in the supplementary material, Table S1.
149 Geometrical calculations were made with PARST97 [40] and molecular graphics with ORTEP-3
150 [41].

151

152 *2.4. In vitro antimicrobial assay*

153

154 *2.4.1. Test substances*

155 The tested compounds were dissolved in DMSO and then diluted into nutrient liquid
156 medium to achieve a concentration of 10%. An antibiotic, doxycycline (Galenika A.D.,
157 Belgrade), was dissolved in nutrient liquid medium, a Mueller-Hinton broth (Torlak, Beograd),
158 while an antimycotic, fluconazole (Pfizer Inc.,USA) was dissolved in Sabouraud dextrose broth
159 (Torlak, Belgrade).

160

161

162

163 2.4.2. Test microorganisms

164 Antimicrobial activity of the ligand and corresponding palladium(II) and platinum(IV)
165 complexes was tested against 25 microorganisms. The experiment involved 15 strains of
166 pathogenic bacteria, including 7 standard strains (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus*
167 *faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC
168 25923; *Sarcina lutea* ATCC 9341; *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Bacillus pumilus* NCTC 8241)
169 and 8 clinical isolates (*Escherichia coli*; *Enterococcus faecalis*; *Pseudomonas aeruginosa*;
170 *Staphylococcus aureus*; *Sarcina lutea*; *Bacillus subtilis*; *Proteus mirabilis*; *Salmonella enterica*).
171 Also, four species of pathogenic fungi (*Aspergillus fumigatus* PMFKG-F23; *Aspergillus flavus*
172 PMFKG-F24; *Aspergillus restrictus* PMFKG-F25; *Aspergillus niger* PMFKG-F26); two yeast
173 species (*Candida albicans* (clinical isolate) and *Rhodotorula sp.* PMFKG-F27) and four species
174 of probiotics (*Lactobacillus plantarium* PMFKG-P31, *Bacillus subtilis* IP 5832 PMFKG-P32,
175 *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* PMFKG-P33; *Saccharomyces boulardii* PMFKG-P34)
176 were tested. All clinical isolates were a generous gift from the Institute of Public Health,
177 Kragujevac. The other microorganisms were provided from a collection held by the
178 Microbiology Laboratory Faculty of Science, University of Kragujevac.

179

180 2.4.3. Suspension preparation

181 Bacterial suspensions and yeast suspension were prepared by the direct colony method.
182 The colonies were taken directly from the plate and were suspended in 5 mL of sterile 0.85%
183 saline. The turbidity of initial suspension was adjusted by comparing with 0.5 McFarland's
184 standard (0.5 mL 1.17% w/v $\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ + 99.5 mL 1% w/v H_2SO_4) [42]. When adjusted to the

185 turbidity of the 0.5 McFarland's standard, bacteria suspension contains about 10^8 colony forming
186 unites (CFU)/mL and suspension of yeast contains 10^6 CFU/mL. Ten-fold dilutions of initial
187 suspension were additionally prepared into sterile 0.85% saline. The suspensions of fungal
188 spores were prepared by gentle stripping of spore from slopes with growing aspergilli. The
189 resulting suspensions were 1:1000 diluted in sterile 0.85% saline.

190

191 *2.4.4. Microdilution method*

192 Antimicrobial activity was tested by determining the minimum inhibitory concentrations
193 (MIC) and minimum microbicidal concentration (MMC) by using microdilution plate method
194 with resazurin [43]. The 96-well plates were prepared by dispensing 100 μ L of nutrient broth,
195 Mueller-Hinton broth for bacteria and Sabouraud dextrose broth for fungi and yeasts, into each
196 well. A 100 μ L from the stock solution of tested compound (concentration of 2000 μ g/mL) was
197 added into the first row of the plate. Then, twofold, serial dilutions were performed by using a
198 multichannel pipette. The obtained concentration range was from 1000 to 7.81 μ g/mL. A 10 μ L
199 of diluted bacterial, yeast suspension and suspension of spores was added to each well to give a
200 final concentration of 5×10^5 CFU/mL for bacteria and 5×10^3 CFU/mL for fungi and yeast.
201 Finally, 10 μ L resazurin solution was added to each well inoculated with bacteria and yeast.
202 Resazurin is an oxidation-reduction indicator used for the evaluation of microbial growth. It is a
203 blue non-fluorescent dye that becomes pink and fluorescent when reduced to resorufin by
204 oxidoreductases within viable cells. The inoculated plates were incubated at 37 °C for 24 h for
205 bacteria, 28 °C for 48 h for the yeast and 28 °C for 72 h for fungi. MIC was defined as the lowest
206 concentration of tested substance that prevented resazurin color change from blue to pink. For

207 fungi, MIC values of the tested substance were determined as the lowest concentration that
208 visibly inhibited mycelia growth.

209 Doxycycline and fluconazole were used as a positive control. Solvent control test was
210 performed to study an effect of 10% DMSO on the growth of microorganism. It was observed
211 that 10% DMSO did not inhibit the growth of microorganism. Also, in the experiment, the
212 concentration of DMSO was additionally decreased because of the twofold serial dilution assay
213 (the working concentration was 5% and lower). Each test included growth control and sterility
214 control. All tests were performed in duplicate and MICs were constant. Minimum bactericidal
215 and fungicidal concentration was determined by plating 10 μ L of samples from wells, where no
216 indicator color change was recorded, on nutrient agar medium. At the end of the incubation
217 period the lowest concentration with no growth (no colony) was defined as minimum
218 microbicidal concentration.

219

220 **3. Results and discussion**

221

222 The *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamin-*N,N'*-di-3-propanoate ligand was obtained in
223 reaction between *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine and 3-chloro-propanoic acid (Fig. 2.).
224 Three geometrical isomers of 1,2-dpheddp-Pt(IV) complex with two identical monodentate
225 ligands are theoretically possible, *s-cis*, *uns-cis* and *trans* (Fig. 1.). In reaction between $K_2[PtCl_6]$
226 with H_2 -1,2-dpheddp ligand only one isomer of neutral octahedral
227 1,2-dpheddp-Pt(IV) complex, *s-cis*-dichlorido-(*meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-
228 -propanoate)-platinum(IV), *s-cis*-[PtCl₂(1,2-dpheddp)], with tetradentate coordination of the
229 H_2 -1,2-dpheddp ligand was obtained (Fig. 3.). The complex is slightly soluble in water and,

230 unfortunately, almost insoluble in organic solvents. In reaction between $K_2[PdCl_4]$ with
231 H_2 -1,2-dpheddp ligand only one isomer of neutral square-planar 1,2-dpheddp-Pd(II)
232 complex, *cis*-dichlorido-(*meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate)-
233 -palladium(II), *cis*-[PdCl₂(1,2-dpheddp)], with bidentate coordination of the H_2 -1,2-dpheddp
234 ligand was obtained (Fig. 4.).

235

236 3.1. Infrared Spectra

237 As it was demonstrated for metal aminocarboxylic acid complexes [44,45], the
238 asymmetric stretching frequency of the carboxylate groups of the five-membered [44] rings lies
239 at higher energy than the corresponding frequency of the six-membered chelate rings [45]. Later,
240 this was supported by Neal and Rose [46] and Douglas *et al* [47,48] who found that edta-type
241 hexadentate complexes with mixed and equivalent (two five- and six-membered) carboxylate
242 arms, such as *trans*(O₅)-[M(*S,S*-edds)]⁻ (M = Co(III) or Cr(III); *S,S*-edds = *S,S*-ethylenediamine-
243 -*N,N'*-disuccinic ion) [46-48] and *trans*(O₅)-[M(eddadp)]⁻ (eddadp = ethylenediamine-*N,N'*-
244 -diacetato-*N,N'*-di-3-propionato ion) [47,48] exhibited two very strong and well-separated bands
245 in the asymmetric stretching carboxylate frequency region. The bands were assigned to the
246 carbonyl stretching vibrations of the five-membered rings at higher energy and six-membered
247 rings at lower energy.

248 The isolated platinum(IV) and palladium(II) complexes do not show any well resolved
249 doublets in the asymmetric C=O stretching region (at 1618 cm⁻¹ and 1610 cm⁻¹ for platinum(IV)
250 and at 1643 cm⁻¹ and 1580 cm⁻¹ for palladium(II) complex; Table 3), and mentioned doublets lie
251 at lower energy than the corresponding bands of five-membered chelate rings [47,49]. The lack
252 of absorption between 1700-1750 cm⁻¹ indicates that the both carboxyl groups of the
253 H_2 -1,2-dpheddp ligand are coordinated to the central platinum(IV) ion. The prepared ligand,

254 *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid, has absorption bands in the same
255 asymmetric C=O stretching region between 1700-1750 cm⁻¹ (1754 cm⁻¹ and 1732 cm⁻¹, Table 3)
256 suggesting some small differences in energies of COO⁻ groups.

257

258 3.2. Description of the structure

259 X-ray diffraction analysis of 1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-
260 -propanoic acid confirmed expected *meso* orientation of the phenyl residues and dihydrochloride
261 form of the molecule. The crystal structure of this compound is composed of two independent
262 molecules with partly different conformations and molecules of crystal water, Fig. 5. Since the
263 both acid molecules are centrosymmetrical, the asymmetric unit contains two halves, one from
264 each of the independent molecules labelled as A and B. In molecule A the carboxyl O2-H group
265 was found to be equally disordered over two sites. The two molecules have relatively similar
266 bond distances and angles, however, having in mind a weak quality of X-ray diffraction data
267 caused by small size of single-crystals, the presence of the solvent water molecule as well as the
268 mentioned disorder in A, the direct comparison should be taken with care.

269 The values of C2-C3-N1-C4 torsion angle in A and the equivalent C12-C13-N2-C14
270 torsion angle in B are equal to 180.0(6) and 172.3(6)° respectively, indicating somewhat
271 different, but essentially planar forms of these parts of the aliphatic chains. The difference
272 between the molecules becomes more significant if we compare the orientation of their carboxyl
273 groups. In molecule A the carboxyl group is approximately coplanar to the rest of the aliphatic
274 chain with the C1-C2-C3-N1 torsion angle of 175.3(7)°. In molecule B the directionality of this
275 group is significantly changed and the corresponding C11-C12-C13-N2 torsion angle is equal to
276 55.3(10)° (Fig. S1). Such a conformation of molecule B allows the formation of intramolecular
277 N-H...O hydrogen bond, which lacks in molecule A (Fig. S2).

278 The difference in conformation of two molecules could be explained by the fact that their
279 carboxyl groups form quite diverse hydrogen bonding. While the acceptor O1 from the molecule
280 A engages only in one interaction (C13–H13b···O1), the corresponding O3 acceptor in molecule
281 B, forms three interactions, where two represent the strongest hydrogen bonds of the crystal
282 structure, N2–H2b···O3 and N1–H1a···O3 (Table 2). Furthermore, the O2–H group in molecule
283 A is disordered over two positions as the crystal packing allows its simultaneous interaction with
284 two different H acceptors (O5 and Cl2) and formation of two relatively strong hydrogen bonds
285 (Table 2). In contrast to this, the equivalent O4–H group in molecule B does not form any
286 significant interaction except the relatively weak N1–H...O4 hydrogen bond.

287 Apart from the carboxyl groups, the crystal structure contains additional hydrogen
288 bonding sites such as Cl anions, molecule of crystal water and N–H groups which together build
289 a rather complex 3D hydrogen bonding network. However as a dominant structural motif in this
290 crystal packing one can identify the chain formed by direct interaction of molecules A and B *via*
291 the strongest hydrogen bond, N1–H1a···O3. The neighbouring molecules A and B within this
292 chain are additionally interconnected by several O–H...Cl and N–H...Cl hydrogen bonds, with a
293 short H...Cl distances ranging from 2.20 to 2.33 Å (Fig. S3).

294

295 3.3. Microbiology

296 The results of *in vitro* testing of antibacterial and antifungal activities of the ligand and
297 corresponding palladium(II) and platinum(IV) complex are shown in Table 4. For comparison,
298 MIC and MMC values of doxycycline and fluconazole are also listed in Table 4. The tested
299 ligand, palladium(II) and platinum(IV) complex showed different degrees of antimicrobial
300 activity in relation to the tested species. The intensity of antimicrobial action varied depending

301 on the species of microorganism and on the type of tested compounds. In general, the activity of
302 complexes, especially of palladium(II) complex, was higher than the ligand. Also, platinum(IV)
303 and palladium(II) complexes demonstrated more potent inhibitory effects on the growth of
304 bacteria than fungi.

305 The palladium(II) complex showed significant antibacterial activity. MIC values were in
306 range from 15.63 $\mu\text{g/mL}$ to 500 $\mu\text{g/mL}$, and MMC values were from 125 $\mu\text{g/mL}$ to 1000 $\mu\text{g/mL}$
307 depending on the species of bacteria. The Gram-positive bacteria were more sensitive than the
308 Gram-negative bacteria with MIC values at 31.25 $\mu\text{g/mL}$,
309 62.5 $\mu\text{g/mL}$. Interestingly, the tested complex exhibits strong antibacterial activity towards
310 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (MIC=15.63 $\mu\text{g/mL}$). The palladium(II) complex
311 showed low antifungal activity, except for *Aspergillus niger* (MIC = 31.25 $\mu\text{g/mL}$).

312 The ligand and corresponding platinum(IV) demonstrated low to moderate antimicrobial
313 activity. MICs were from 125 $\mu\text{g/mL}$ >1000 $\mu\text{g/mL}$ while MMCs were from 500 $\mu\text{g/mL}$ to
314 >1000 $\mu\text{g/mL}$. The tested concentrations of the compounds did not affect the growth of clinical
315 isolates of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*,
316 *Salmonella enterica*, *Candida albicans* and *Aspergillus flavus*.

317

318 **4. Conclusion**

319

320 In this paper we reported syntheses and crystal structure of tetradentate
321 H_2 -1,2-dpheddp ligand. On the basis of the elemental analyses, infrared spectroscopy the
322 *s-cis* geometry of the dichlorido-(*meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-
323 -propanoate)-platinum(IV), *s-cis*-[PtCl₂(1,2-dpheddp)] prepared by the direct reaction of

324 $K_2[PtCl_6]$ and $H_2-1,2-dpheddp$ in water solution, was proposed. The syntheses
325 of *cis*-dichlorido-(*meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate)-palladium(II),
326 *cis*-[PdCl₂(1,2-dpheddp)] were also reported. Antimicrobial activity of ligand and corresponding
327 palladium(II) and platinum(IV) complexes was investigated against 25 species of
328 microorganisms. The difference between antimicrobial activity of the ligand and corresponding
329 platinum(IV) and palladium(II) complex was noticed and, in general, the most active was
330 palladium(II) complex. Also, the complexes demonstrated more potent inhibitory effects on the
331 growth of bacteria than fungi.

332

333 **Acknowledgment**

334 This work was supported by Ministry of Education and Science of Republic of Serbia,
335 Projects No 172016, No 173032 and 172035.

336

337 **Appendix A. Supplementary data**

338 CCDC 852978 contains the supplementary crystallographic data for crystal structure
339 $H_2-1,2-dpheddp \cdot 2HCl \cdot H_2O$. These data can be obtained free of charge via
340 <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>, or from the Cambridge Crystallographic Data
341 Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223-336-033; or
342 e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk.

343

344 **References**

345 [1] a) G.R. Brubaker, D.P. Schaefer, J.H. Worrell, *Coord. Chem. Rev.* 7 (1971) 161;

346 b) D.J. Radanović, *Coord. Chem. Rev.* 54 (1984) 159;

- 347 c) T.J. Sabo, S.R. Grgurić, S.R. Trifunović, *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem.*,
348 (Review) 32 (2002) 1661.
- 349 [2] V.M. Đinović, T.J. Sabo, *J. Serb. Chem. Soc.* 67 (2002) 367.
- 350 [3] J.I. Legg, D.W. Cooke, *Inorg. Chem.* 4 (1965) 1576.
- 351 [4] N. Sakagami, T. Yasui, H. Kawaguchi, T. Ama, S. Kaizaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 67
352 (1994) 680.
- 353 [5] J.I. Legg, D.W. Cooke, B.E. Douglas, *Inorg. Chem.* 6 (1967) 700.
- 354 [6] V.M. Đinović, S.R. Grgurić, Xu Xing-You, T.J. Sabo, *J. Coord. Chem.* 53 (2001) 355.
- 355 [7] S.R. Grgurić, S.R. Trifunović, T.J. Sabo, *J. Serb. Chem. Soc.* 63 (1998) 669.
- 356 [8] Ž.Lj. Tešić, T.J. Sabo, S.R. Trifunović, D.M. Milojković, *J. Chromatogr. A* 874
357 (1999) 297.
- 358 [9] N. Petranović, D. Minić, T.J. Sabo, D.J. Đoković, *J. Therm. Anal. Co.* 59 (2000) 807.
- 359 [10] S.R. Grgurić, T.J. Sabo, *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem.* 29 (1999) 1567.
- 360 [11] G.N. Kaluđerović, T.J. Sabo, *Polyhedron* 21 (2002) 2277.
- 361 [12] V.M. Đinović, G.A. Bogdanović, S. Novaković, T.J. Sabo, *Synth. React. Inorg.*
362 *Met.- Org. Chem.* 32 (2002) 1085.
- 363 [13] G.N. Kaluđerović, G.A. Bogdanović, T.J. Sabo, *J. Coord. Chem.* 55 (2002) 817.
- 364 [14] P.J. Garnett, D.W. Watts, *Inorg. Chim. Acta* 8 (1974) 293.
- 365 [15] M. Okabayashi, K. Igi, J. Hidaka, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 52 (1979) 753.
- 366 [16] T.J. Sabo, S.R. Grgurić, D.D. Minić, S.R. Trifunović, *J. Coord. Chem.* 44 (1998) 47.
- 367 [17] S.K. Agarwal, *Asian J. Chem.* 19(4) (2007) 2581.
- 368 [18] A.K. Mishra, S.B. Mishra, N. Manav, N.K. Kaushik, *J. of Coord. Chem.* 60 (2007) (17-19).
- 369 [19] A.K. Mishra, N.K. Kaushik, *Eur. J. Med. Chem.* 42(10) (2007) 1239.

- 370 [20] A. Garoufis, S.K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, *Coord. Chem. Rev.* 253 (2009) 1384.
- 371 [21] A.K. Mishra, S.B. Mishra, N. Manav, R. Kumar, R. Chandra, D. Saluja, N.K.
372 Kaushik, *Spectrochim. Acta A* 66A(4-5) (2007) 1042.
- 373 [22] G.A. I-Hazmi, N.M. El-Metwally, O.A. El-Gammal, A.A. El-Asmy, *Spectrochim. Acta A*
374 69A(1) (2008) 56.
- 375 [23] N. Manav, A.K. Mishra, Kaushik, N.K. *Spectrochim. Acta A* 65A(1) (2006) 32.
- 376 [24] B.T. Khan, J. Bhatt, K. Najmoddin, S. Shamsuddin, K. Annapoorna, *J. Inorg. Biochem.* 44
377 (1991) 55.
- 378 [25] C. Navarro-Eanninger, J.M. Perez, F. Zamora, V.M. Gonzales, J.M. Masaguer, C. Alonso,
379 *J. Inorg. Biochem.* 52 (1993) 37.
- 380 [26] I. Brudzinska, Y. Mikata, M. Obata, C. Ohtsuki, S. Yano, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*
381 14 (2004) 2533.
- 382 [27] W. Guerra, E. de Andrade Azevedo, A.R. de Souza Monteiro, M. Bucciarelli-
383 -Rodriguez, E. Chartone-Souza, A.M. Amaral Nascimento, A.P. Soares Fontes, L.
384 Le Moyec, E.C. Pereira-Maia, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 2348.
- 385 [28] L.M.M. Vieira, M.V. de Almeida, M.C.S. Lourenco, F.A.F.M. Bezerra, A.P.S.
386 Fontes, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 4107.
- 387 [29] D. Kovala-Demertzi, M.A. Demertzis, J.R. Miller, C. Papadopoulou, C. Dodorou, G.
388 Filousis, *J. Inorg. Biochem.* 86 (2001) 555.
- 389 [30] R.R. Coombs, M.K. Ringer, J.M. Blacquiere, J.C. Smith, J.S. Neilsen, Y.-S. Uh, J.B.
390 Gilbert, L.J. Leger, H. Zhang, A.M. Irving, S.L. Wheaton, C.M. Vogels, S.A.
391 Westcott, A. Decken, F.J. Baerlocher, *Trans. Met. Chem.* 30 (2005) 411.
- 392 [31] M.A. Ali, A.H. Mirza, R.J. Butcher, K.A. Crouse, *Trans. Met. Chem.* 31 (2006) 79.

- 393 [32] I. Kizilcikli, Y.D. Kurt, B. Akkurt, A.Y. Genel, S. Birteksoz, G. Otuk, B. Ulkuseven,
394 Folia Microbiol. 52 (2007) 15.
- 395 [33] N.M. Aghatabay, M. Somer, M. Senel, B. Dulger, F. Gucin, Eur. J. Med. Chem. 42
396 (2007) 1069.
- 397 [34] M.K. Biyala, K. Sharma, M. Swami, N. Fahmi, R. Vir Singh, Trans. Met. Chem. 33
398 (2008) 377.
- 399 [35] Tripett S. J. Chem. Soc. (1957) 4407.
- 400 [36] Oxford Diffraction, CrysAlis CCD and CrysAlis RED Versions 1.171.32.24. Oxford
401 Diffraction Ltd., Abington, England, 2008.
- 402 [37] R.C. Clark and J.S. Reid, Acta Cryst. A51 (1995) 887.
- 403 [38] SIR2002 - M.C. Burla, M. Camalli, B. Carrozzini, G.L. Cascarano, C. Giacovazzo, G. Polidori
404 and R. Spagna. J. Appl. Cryst. 36 (2003) 1103.
- 405 [39] G.M. Sheldrick, Acta Cryst. A64 (2008) 112.
- 406 [40] M. Nardelli. Comput. Chem. 7 (1983) 95.
- 407 [41] L.J. Farrugia. J. Appl. Cryst. 30 (1997) 565.
- 408 [42] J.M. Andrews, J. Antimicrob. Chemother. 56 (2005) 60.
- 409 [43] S.D. Sarker, L. Nahar, Y. Kumarasamy, Methods 42 (2007) 321.
- 410 [44] K. Nakamoto, Y. Morimoto, A.E. Martell, J. Am. Chem. Soc. 83 (1961) 4528.
- 411 [45] M.B. Čelap, S.R. Niketić, T.J. Janjić, V.N. Nikolić, Inorg. Chem. 6 (1967) 2063.
- 412 [46] J.A. Neal, N.J. Rose, Inorg. Chem. 7 (1968) 2405; 12 (1973) 1226.
- 413 [47] D.J. Radanović, B.E. Douglas, J. Coord. Chem. 4 (1975) 191.
- 414 [48] K.D. Gailey, D.J. Radanović, M.I. Đuran, B.E. Douglas, J. Coord. Chem. 8 (1978) 161.
- 415 [49] M.B. Čelap, A.R. Niketić, T.J. Janjić, V.N. Nikolić, Inorg. Chem. 6 (1967) 2063.

- 416 [50] T.G. Appleton, J.R. Hall, M.A. Williams, *Inorg. Chim. Acta* 61 (1982) 51.
 417 [51] V.M. Đinović, G.A. Bogdanović, S. Novaković, T.J. Sabo, *J. Coord. Chem.* 8 (2004) 535.
 418 [52] V.M. Đinović, L. Mančić, G. Bogdanović, P. Vulić, G. Del Rosario, T.J. Sabo, O.B.
 419 Milošević, *J. Mater. Res.* 20 (2005) 102.

420

421 Figure 1. Possible geometrical isomers of $[\text{PtX}_2(\text{eddp})]$ complex (X = monodentate ligand):
 422 *s-cis* (I), *uns-cis* (II) and *trans* (III).

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

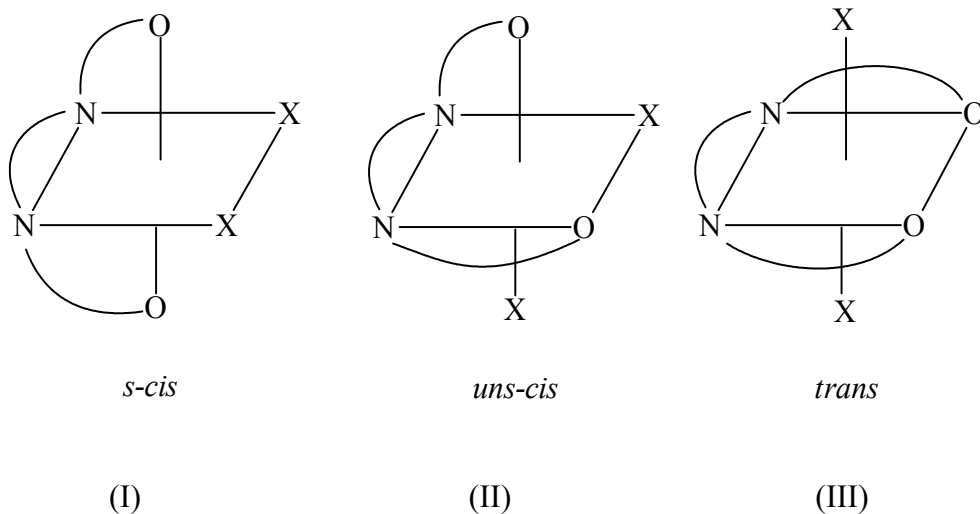
450

451

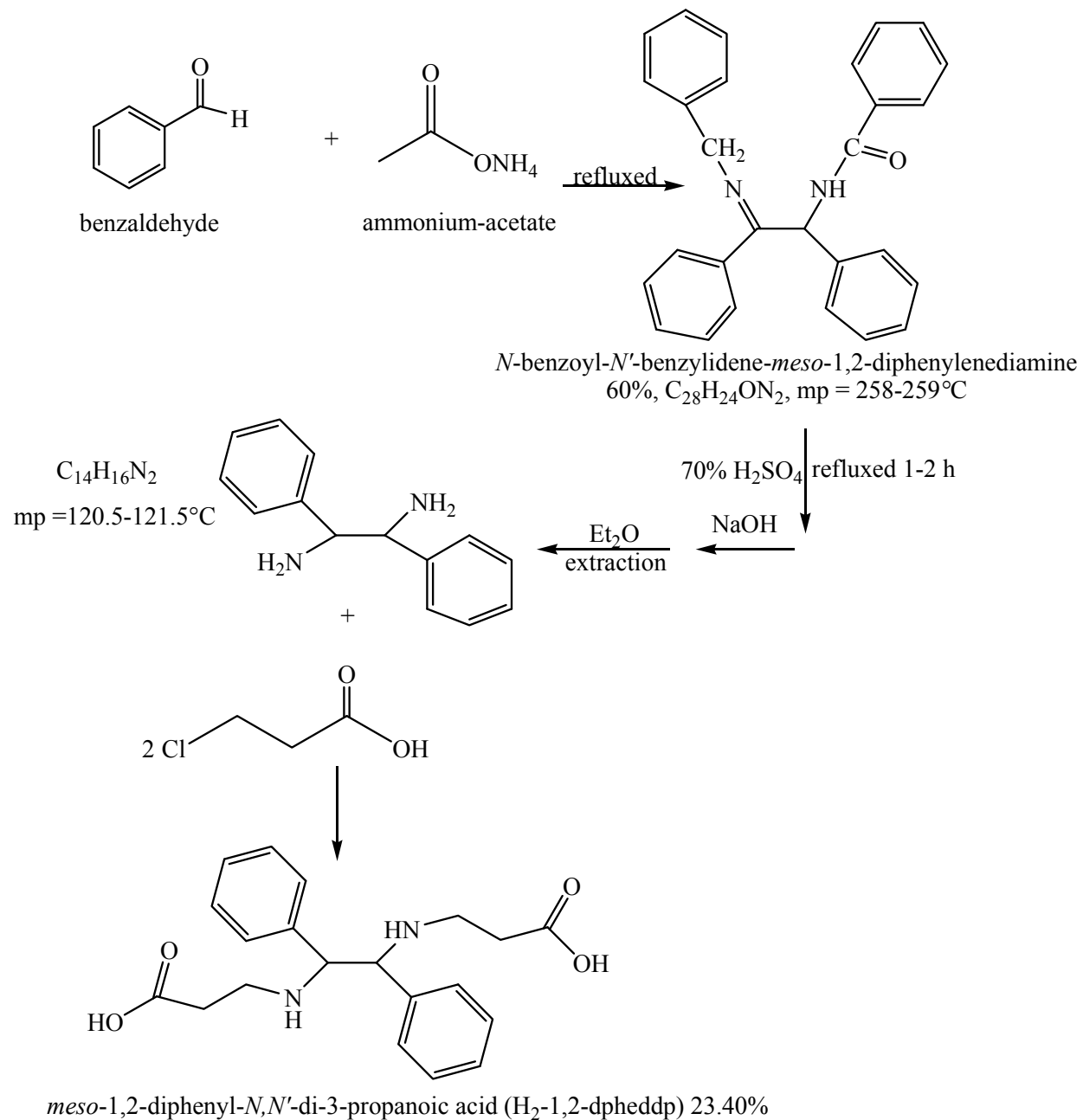
452

453

454



455 Figure 2. Reaction pathways in synthesis of *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-
 456 -3-propanoic acid.

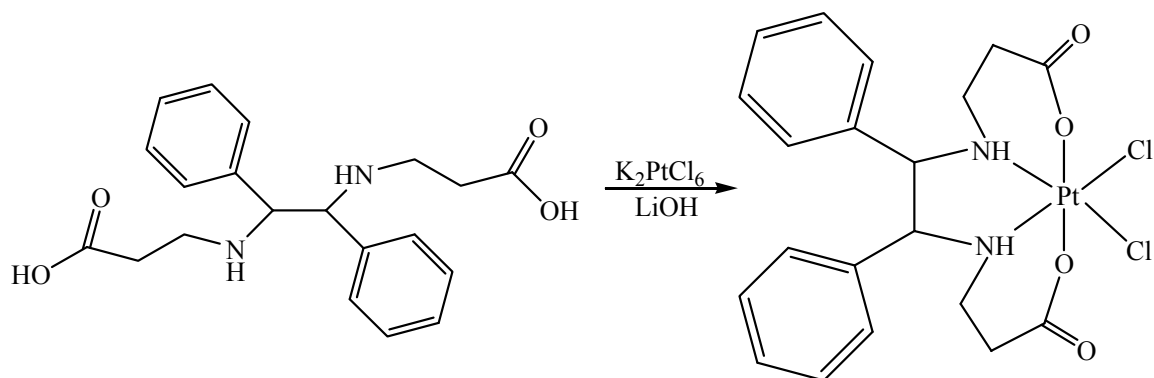


457
 458
 459
 460
 461
 462
 463
 464
 465

466 Figure 3. Reaction pathway in synthesis of new platinum(IV) complex.

467

468

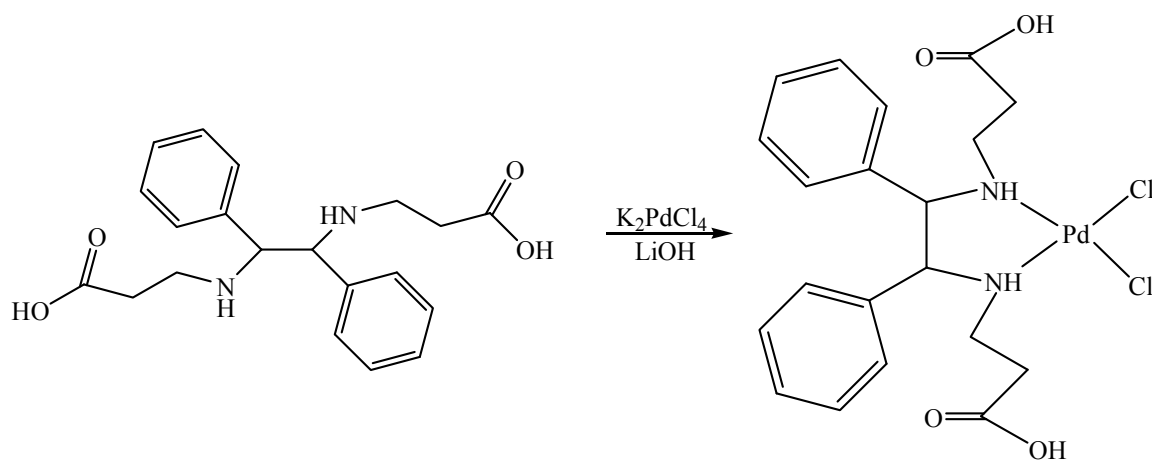


469

470

471 Figure 4. Reaction pathway in synthesis of new palladium(II) complex.

472



473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

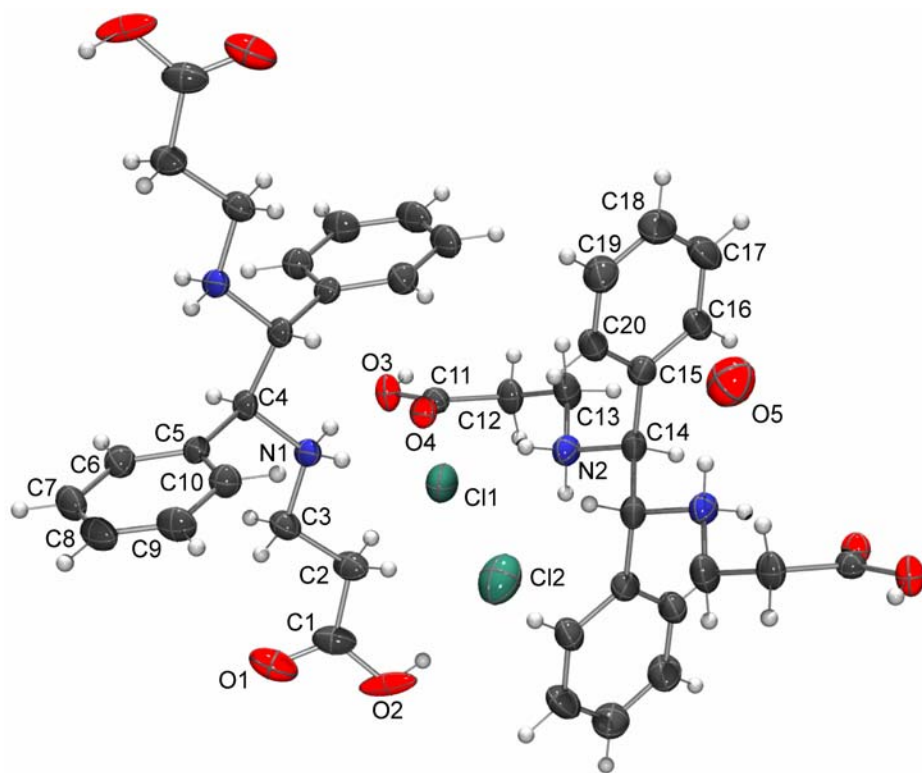
485

486

487

488

489 Figure 5. Crystal structure of *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid with
490 atom numbering scheme. As molecules are centrosymmetric, only atoms belonging to
491 asymmetric unit are labeled. Selected bond lengths (Å), Molecule A (left): O1–C1 1.207(12);
492 C1–C2 1.482(12); C2–C3 1.506(11); N1–C3 1.472(9); N1–C4 1.498(8); C4–C5 1.499(10);
493 C5–C6 1.368(10). Molecule B (right): O3–C11 1.234(8); O4–C11 1.270(8); C11–C12
494 1.498(10); C12–C13 1.510(10); N2–C13 1.494(11); N2–C14 1.507(9); C15–C16 1.380(11).
495



496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511

512 Table 1. Crystal data, data collection and structure refinement details for
 513 H₂-1,2-dpheddp·2HCl·H₂O.

Empirical formula	C ₂₀ H ₂₈ Cl ₂ N ₂ O ₅
Formula weight	445.33
Temperature (K)	293(2)
Wavelength (Å)	1.54184
Crystal system	Triclinic
Space group	<i>P</i> 1–
<i>a</i> (Å)	8.6989(18)
<i>b</i> (Å)	10.086(2)
<i>c</i> (Å)	13.461(3)
α (°)	104.143(17)
β (°)	105.795(17)
γ (°)	100.754(18)
<i>V</i> (Å ³)	1060.7(4)
<i>Z</i>	2
μ (mm ⁻¹)	3.047
<i>F</i> (000)	476
Crystal size	0.12 x 0.07 x 0.04
Reflections collected	16321
Unique reflections	4006
<i>R</i> _{int}	0.1762
<i>R</i> ₁ , <i>wR</i> ₂ [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	0.1071, 0.2637

514

515

516 Table 2. Geometrical parameters (Å, °) of selected hydrogen bonds.

<i>D</i> – <i>H</i> ⋯ <i>A</i> (Å)	<i>D</i> – <i>H</i>	<i>H</i> ⋯ <i>A</i>	<i>D</i> ⋯ <i>A</i>	<i>D</i> – <i>H</i> ⋯ <i>A</i>
N2–H2b⋯O3 ⁱ	0.90	2.16	2.750(8)	122
N1–H1a⋯O3 ⁱ	0.90	2.00	2.786(8)	145
C2–H22a⋯O3 ⁱ	0.97	2.52	3.176(10)	125
N1–H1a⋯O4 ⁱⁱ	0.90	2.56	3.111(9)	120
C13–H13b⋯O1 ⁱⁱⁱ	0.97	2.46	3.076(11)	121
C13–H13a⋯O5 ⁱ	0.97	2.45	3.415(16)	174
O2a–H2c⋯O5 ^{iv}	0.82	2.06	2.72(3)	137
O2b–H2d⋯Cl2 ⁱ	0.82	2.24	3.05(5)	168
N1–H1b⋯Cl2 ⁱ	0.90	2.20	3.089(7)	169
N2–H2a⋯Cl2 ⁱ	0.90	2.33	3.137(8)	148
C20–H20⋯Cl1 ⁱ	0.93	2.73	3.651(10)	169
C2–H22a⋯Cl2 ⁱ	0.97	2.75	3.324(9)	118

517 ^aSymmetry codes: (i) *x*,*y*,*z*; (ii) $-x+1, -y+2, -z+2$; (iii) *x*,*y*+1,*z*; (iv) *x*,*y*-1,*z*.

518

519

520

521

522
523
524

Table 3. The most important IR bands (cm^{-1}) of some compounds with linear O-N-N-O ligands.

Compound	$\nu_{\text{as}}(\text{COOH})$	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$	Ref.
<i>trans</i> -[Pt(H ₂ edta)Cl ₂]	1775; 1764	1691; 1678	50
<i>uns-cis</i> -[Pt(H ₂ edta)Cl ₂]	1758; 1742	1692; 1685	50
<i>s-cis</i> -[Pt(H ₂ edta)Cl ₂]	1753; 1741	1725; 1716	50
<i>trans</i> -[Pt(eddp)Cl ₂]·H ₂ O	-	1637; 1630	13
<i>trans</i> -[Pt(1,3-pdda)Cl ₂]·H ₂ O	-	1696; 1660	51
<i>trans</i> -[Pt(pdda)Br ₂]·H ₂ O	-	1684; 1648	52
<i>s-cis</i> -[Pt(1,2-dpheddp)Cl ₂]	-	1618; 1610	this work
H ₂ -1,2-dpheddp	1754; 1732	-	this work
<i>cis</i> -[Pd(1,2-dpheddp)Cl ₂]		1643; 1580	this work

525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546

547 Table 4. Antibacterial and antifungal activity of the tested ligand and corresponding
 548 palladium(II) and platinum(IV) complexes.

Species	L1		palladium(II) complex		platinum(IV) complex		Doxycycline	Fluconazol
	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC/MMC	MIC/MMC
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>1000	>1000	500	1000	500	1000	7.81/15.625	/
<i>Pseud. aeruginosa</i> ATCC 27853	250	>1000	15.63	500	125	500	62.5/125	/
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	500	>1000	31.25	500	250	500	0.224/3.75	/
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	500	>1000	62.5	500	125	500	< 0.448/7.81	/
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	500	>1000	62.5	500	250	500	1.953/31.25	/
<i>Enter. faecalis</i> ATCC 29212	500	>1000	31.25	500	250	500	7.81/62.5	/
<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241	>1000	>1000	62.5	500	250	500	0.112/7.81	/
<i>Escherichia coli</i>	>1000	>1000	250	500	>1000	>1000	7.81/15.625	/
<i>Pseud. aeruginosa</i>	500	>1000	500	1000	500	1000	250/>250	/
<i>Staphylococcus aureus</i>	>1000	>1000	250	500	>1000	>1000	0.448/7.81	/
<i>Sarcina lutea</i>	500	>1000	62.5	500	250	500	< 0.448/3.75	/
<i>Bacillus subtilis</i>	500	>1000	31.25	500	250	>1000	0.112/1.953	/
<i>Enter. faecalis</i>	>1000	>1000	250	500	>1000	>1000	7.81/62.5	/
<i>Proteus mirabilis</i>	>1000	>1000	500	500	>1000	>1000	250/>250	/
<i>Salmonella enterica</i>	>1000	>1000	250	500	>1000	>1000	15.625/31.25	/
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>	>1000	>1000	31.25	125	250	500	31.25/62.5	/
<i>Lactobacillus plantarum</i>	500	>1000	125	500	250	500	0.448/7.81	/
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	500	>1000	250	500	250	500	1.953/15.625	/
<i>Saccharomyces boulardii</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	/	31.25/1000
<i>Candida albicans</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	/	62.5/1000
<i>Rhodotorula sp.</i>	1000	1000	500	1000	1000	1000	/	62.5/1000
<i>Aspergillus niger</i>	125	>1000	31.25	1000	125	>1000	/	500/1000
<i>Aspergillus restrictus</i>	250	250	500	500	1000	1000	/	500/2000
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1000	1000	1000	1000	500	1000	/	500/1000
<i>Aspergillus flavus</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	/	1000/1000

549 MIC, minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/mL}$)

550 MMC, minimum microbiocidal concentration ($\mu\text{g/mL}$)

551 /, not tested.

552

Elsevier Editorial System(tm) for Inorganica Chimica Acta
Manuscript Draft

Manuscript Number: ICA-D-11-00882R1

Title: Stereospecific ligands and their complexes. XI. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with some alkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-methyl)-butanoic acid

Article Type: Regular Paper

Keywords: palladium(II) complexes; (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-methyl)-butanoic acid; in vitro antimicrobial activity.

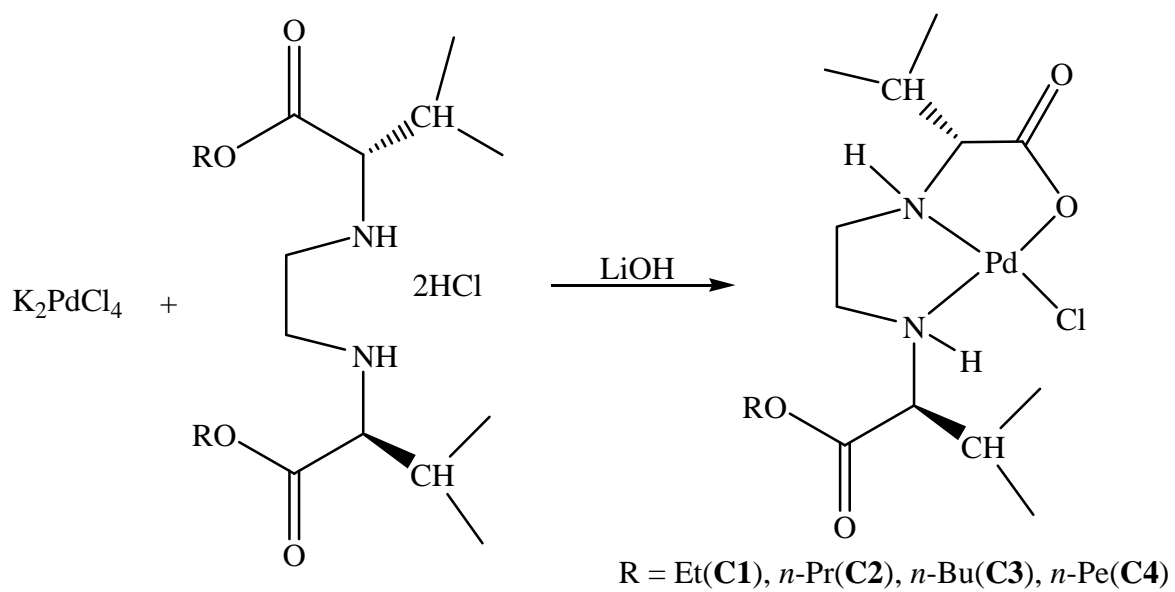
Corresponding Author: professor Srecko R Trifunovic, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Faculty of Science

First Author: Srecko R Trifunovic, Ph.D

Order of Authors: Srecko R Trifunovic, Ph.D; Gordana P Radic; Verica V Glodjovic; Ivana D Radojevic; Olgica D Stefanovic; Ljiljana R Comic; Vesna M Djinovic

The complexes have been obtained by direct reaction of potassium-tetrachloridopalladate(II) with corresponding esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl)-butanoic acid.



The complexes have been obtained by direct reaction of potassium-tetrachloridopalladate(II) with corresponding esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl)-butanoic acid.

*Highlights

Three new ligands and their palladium(II) complexes were synthesized. Characterized by microanalysis, MS, infrared, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. Antimicrobial activity was tested in relation to 15 species of microorganisms.

1 **Stereospecific ligands and their complexes. XI.**
2 **Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II)**
3 **complexes with some alkyl esters of**
4 **(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl)-butanoic acid[#]**

5
6 Gordana P. Radić^a, Verica V. Glođović^a, Ivana D. Radojević^b, Olga D. Stefanović^b,
7 Ljiljana R. Čomić^b, Vesna M. Đinović^c and Srećko R. Trifunović^{a*}

8
9 ^a*Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac,*
10 *R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia*

11 ^b*Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac,*
12 *R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia*

13 ^c*Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 16, 11000 Belgrade, Republic of Serbia*

14

15 **Abstract**

16 Three new ligand precursors and their palladium(II) complexes of general formula
17 [PdCl{(*S,S*)-(R)eddv}] (R = *n*-propyl, *n*-butyl and *n*-pentyl; *S,S*-eddv = (*S,S*)-
18 -ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl)-butanoate) have been synthesized and
19 characterized by microanalysis, infrared, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy and mass
20 spectrometry. *In vitro* antimicrobial activity for these ligands and complexes is
21 investigated. Testing is performed by microdilution method and minimum inhibitory
22 concentration (MIC) and minimum microbicidal concentration (MMC) have been
23 determined. Testing is conducted against 15 microorganisms (five strains of pathogenic
24 bacteria, three species of probiotic bacteria, two yeast species and five pathogenic fungi).
25 Tested ligands, with a few exceptions, show very low antimicrobial activity.
26 Palladium(II) complexes show selective and moderate activity. The difference in
27 antimicrobial activity between ligands and corresponding palladium(II) complexes is
28 noticed and it is always higher with palladium(II) complexes.

[#] Part X: J. Vujić, G.N. Kaluđerović, B.B. Zmejovski, M. Milovanović, V. Volarević, N. Arsenijević and S.R. Trifunović (submitted)

*Corresponding author: srecko@kg.ac.rs;

29 *Keywords:* palladium(II) complexes; (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl)-butanoic acid; *in vitro*
30 antimicrobial activity;

31

32

33 **1. Introduction**

34

35 In parallel with the rapid development of a wide range of antibacterial agents
36 since the 1940s, bacteria have proved extremely adept at developing resistance to each
37 new employed agent. The rapidly increasing incidence of bacterial resistance to
38 antimicrobial agents has become a serious problem worldwide. Resistance mechanisms
39 have been identified and described for all the known antibiotics currently available for
40 clinical use [1].

41 In some previous papers synthesis and characterization of the palladium(II)
42 complexes with R_2 -*S,S*-eddp ligands (*S,S*-eddp = (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-
43 -propanoate, R = *n*-Pr [2], *n*-Bu [2], *n*-Pe [2], *i*-Pr [3a], *i*-Bu [3b], *c*-Pe [4], Cy [4]) were
44 published. It was concluded from NMR spectra that the mixture of diastereoisomers of
45 the [PdCl₂(R₂-eddp)] complexes was obtained. The antitumoral investigations of some of
46 these ligands and complexes were performed [4].

47 This study is focused on the synthesis, characterization and antimicrobial activity
48 of four novel R₂edda-type ligand precursors: *O,O'*-diethyl- (**L1**) [5], *O,O'*-dipropyl-
49 (**L2**), *O,O'*-dibutyl- (**L3**), *O,O'*-dipentyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl)-
50 -butanoate dihydrochloride (**L4**) and their corresponding palladium(II) complexes:
51 chlorido((*S,S*)-ethylenediamine-*N*-(*O*-ethyl-2-(3-methyl)-butanoate)-*N'*-2-(3-methyl)
52 butanoato-palladium(II) [5], (**C1**), chlorido((*S,S*)-ethylenediamine-*N*-(*O*-propyl-2-(3-
53 -methyl)-butanoate)-*N'*-2-(3-methyl)butanoato-palladium(II) (**C2**), chlorido((*S,S*)-
54 -ethylenediamine-*N*-(*O*-butyl-2-(3-methyl)-butanoate)-*N'*-2-(3-methyl)butanoato-
55 -palladium(II) (**C3**), chlorido((*S,S*)-ethylenediamine-*N*-(*O*-pentyl-2-(3-methyl)-
56 -butanoate)-*N'*-2-(3-methyl)butanoato-palladium(II) (**C4**).

57 The synthesis and evaluation of biological activity of the new metal-based
58 compounds has been the field of growing interest. Numerous complexes based on
59 palladium(II)-ion have been synthesized and their different biological activities have been

60 documented [6-8]. The impact of different palladium complexes on the growth and
61 metabolism of various groups of microorganisms has been studied. Garoufis et al. [9]
62 reviewed numerous scientific papers on antiviral, antibacterial and antifungal activity of
63 palladium(II) complexes with different types of ligands (sulfur and nitrogen donor
64 ligands, Schiff base ligands and drugs as ligands). Guerra et al. [10] synthesized three
65 palladium complexes with antibiotics of the tetracycline family and they tested their
66 effects on tetracycline sensitive and resistant bacterial strains. The palladium complex
67 with tetracycline was 16 times stronger than the tetracycline itself against resistant strain.
68 Vieira et al. [11] prepared new palladium(II) and platinum(II) complexes with
69 fluoroquinolones which showed activity to *Mycobacterium tuberculosis*. There are other
70 papers in the literature showing different intensity of palladium complexes activity on
71 various species of bacteria and fungi [12-17].

72 The aim of this paper is to synthesize new palladium complexes and to research *in*
73 *vitro* their antibacterial and antifungal activities. The second aim is to investigate the
74 impact of newly synthesized palladium complexes on probiotics, since they are used as
75 supplements and they play significant role in protection and maintenance of balance in
76 intestinal microflora during the use of the antibiotic therapy.

77

78 **2. Experimental**

79

80 *2.1. Chemistry*

81 *2.1.1. Reagents and instruments*

82 (*S,S*)-Ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl)-butanoic acid, (H_2 -(*S,S*)-eddv) was
83 prepared using similar methods described in literature [18]. $K_2[PdCl_4]$ was purchased
84 from Merck and used without further purification. Alcohols were dried by standard
85 methods. Infrared spectra were recorded by Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR
86 spectrometer using the KBr pellet technique ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) and mass spectra were
87 recorded by Agilent 5973B. 1H and ^{13}C NMR spectra were recorded by Varian Gemini-
88 2000 (200 MHz) spectrometer in D_2O (ligand precursors) and $CDCl_3$ (palladium(II)
89 complexes) using tetramethylsilane as internal standard and in $DMSO-d_6$ (ligands and

90 complexes). Elemental microanalyses for C, H and N were performed by standard
91 methods by Vario EL III C, H, N Elemental Analyzer.

92

93 2.1.2. Preparation of *O,O'*-dialkyl esters of the (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-
94 -(3-methyl)-butanoic acid dihydrochloride, *R*₂-*S,S*-eddv·2HCl

95 In 50 mL of dry alcohol (ethanol, 1-propanol, 1-butanol or 1-pentanol), saturated
96 with gas HCl, 2.50 g (7.5 mmol) of (H₂-(*S,S*)-eddv) was added and the mixture was
97 refluxed for 12 h. The mixture was filtered off and the filtrate was left for a few days in
98 the refrigerator. The esters were recrystallized from hot alcohol used for each reaction.

99 *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl)-butanoate
100 dihydrochloride det-*S,S*-eddv·2HCl (**L1**) was previously synthesized [5].

101 *O,O'*-dipropyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl)-butanoate
102 dihydrochloride dpr-*S,S*-eddv·2HCl (**L2**) Yield: 1.72 g (55%). *Anal.* Calc. for
103 C₁₈H₃₈Cl₂N₂O₄ (*M*_r = 417.404) (%): C, 51.79; H, 9.18; N, 6.71. Found (%): C, 51.92;
104 H, 9.06; N, 6.73. ¹H NMR (200 MHz, D₂O, δ ppm): 0.91 (t, 6H, C⁹H₃), 1.21 (m, 12H,
105 C^{5,6}H₃), 1.74 (m, 4H, C⁸H₂), 2.37 (m, 4H, C¹H₂), 3.52 (m, 2H, C⁴H), 4.11 (d, 2H, C²H),
106 4.27 (q, 4H, C⁷H₂). ¹³C NMR (50 MHz, D₂O, δ ppm): 12.63 (C⁸H₃), 19.47 (C⁵H₃), 20.15
107 (C⁶H₃), 24.22 (C⁸H₂), 32.48 (C⁴H), 46.48 (C¹H₂), 69.35 (C²H), 72.21 (C⁷H₂), 171.6
108 (C³OOPr). ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 0.86 (t, 6H, C⁹H₃), 1.18 (m, 12H,
109 C^{5,6}H₃), 1.58 (m, 4H, C⁸H₂), 2.26 (m, 4H, C¹H₂), 3.46 (m, 2H, C⁴H), 4.07 (d, 2H, C²H),
110 4.37 (q, 4H, C⁷H₂), 4.63 (2H, NH). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 12.48 (C⁸H₃),
111 18.96 (C⁵H₃), 20.17 (C⁶H₃), 24.89 (C⁸H₂), 33.03 (C⁴H), 46.41 (C¹H₂), 68.97 (C²H), 72.06
112 (C⁷H₂), 170.9 (C³OOPr).

113

114 *O,O'*-dibutyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl)-butanoate
115 dihydrochloride dbu-*S,S*-eddv·2HCl (**L3**) Yield: 1.74 g (52%). *Anal.* Calc. for
116 C₂₀H₄₂Cl₂N₂O₄ (*M*_r = 445.456) (%): C, 53.92; H, 9.50; N, 6.29. Found (%): C, 53.48; H,
117 9.54; N, 6.48. ¹H NMR (200 MHz, D₂O, δ ppm): 0.91 (t, 6H, C¹⁰H₃), 1.13 (m, 12H,
118 C^{5,6}H₃), 1.37 (m, 4H, C⁹H₂), 1.70 (m, 4H, C⁸H₂), 2.41 (m, 4H, C¹H₂), 3.56 (m, 2H, C⁴H),
119 3.87 (d, 2H, C²H), 4.34 (q, 4H, C⁷H₂). ¹³C NMR (50 MHz, D₂O, δ ppm): 15.80 (C¹⁰H₃),
120 19.43 (C⁵H₃), 19.76 (C⁶H₃), 21.51 (C⁹H₂), 32.60 (C⁴H), 36.38 (C⁸H₂), 46.19 (C¹H₂),

121 64.50 (C²H), 70.49 (C⁷H₂), 171.56 (C³OOR). ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm):
122 0.87 (t, 6H, C¹⁰H₃), 1.17 (m, 12H, C^{5,6}H₃), 1.39 (m, 4H, C⁹H₂), 1.66 (m, 4H, C⁸H₂), 2.28
123 (m, 4H, C¹H₂), 3.48 (m, 2H, C⁴H), 3.79 (d, 2H, C²H), 4.26 (q, 4H, C⁷H₂), 4.58 (2H, NH).
124 ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 14.99 (C¹⁰H₃), 19.37 (C⁵H₃), 19.58 (C⁶H₃), 21.43
125 (C⁹H₂), 32.54 (C⁴H), 36.26 (C⁸H₂), 46.03 (C¹H₂), 64.57 (C²H), 70.48 (C⁷H₂),
126 171.51(C³OOR).

127 *O,O'*-dipentyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl)-butanoate
128 dihydrochloride dpe-*S,S*-eddv·2HCl (**L4**) Yield: 1.82 g (51%). *Anal.* Calc. for
129 C₂₂H₄₆Cl₂N₂O₄ (*M*_r = 473.508) (%): C, 55.80; H, 9.79; N, 5.92. Found (%): C, 55.68; H,
130 9.76; N, 6.02. ¹H NMR (200 MHz, D₂O, δ ppm): 0.90 (t, 6H, C¹¹H₃), 1.10 (m, 12H,
131 C^{5,6}H₃), 1.37 (m, 8H, C^{9,10}H₂), 1.72 (m, 4H, C⁸H₂), 2.40 (m, 4H, C¹H₂), 3.62 (m, 2H,
132 C⁴H), 4.09 (d, 2H, C²H), 4.39 (q, 4H, C⁷H₂). ¹³C NMR (50 MHz, D₂O, δ ppm): 16.13
133 (C¹¹H₃), 19.48 (C⁵H₃), 20.69 (C⁶H₃), 24.52 (C¹⁰H₂), 30.31 (C⁹H₂), 32.66 (C⁸H₂), 33.92
134 (C⁴H), 46.29 (C¹H₂), 64.83 (C²H), 70.74 (C⁷H₂), 171.84 (C³OOR). ¹H NMR (200 MHz,
135 DMSO-*d*₆, δ ppm): 0.90 (t, 6H, C¹¹H₃), 1.12 (m, 12H, C^{5,6}H₃), 1.36 (m, 8H, C^{9,10}H₂),
136 1.68 (m, 4H, C⁸H₂), 2.33 (m, 4H, C¹H₂), 3.64 (m, 2H, C⁴H), 4.02 (d, 2H, C²H), 4.21 (q,
137 4H, C⁷H₂), 4.76 (2H, NH). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 16.06 (C¹¹H₃), 19.43
138 (C⁵H₃), 20.32 (C⁶H₃), 24.45 (C¹⁰H₂), 30.29 (C⁹H₂), 32.69 (C⁸H₂), 33.88 (C⁴H), 46.07
139 (C¹H₂), 64.12 (C²H), 70.76 (C⁷H₂), 171.34 (C³OOR).

140

141 2.1.3. Synthesis of the palladium(II) complexes, **C1-C4**

142 The complexes were obtained by mixing K₂[PdCl₄] (0.200 g, 0.613 mmol) in
143 10 cm³ of water and equimolar amount of the **L1** (0.241 g, 0.613 mmol), **L2** (0.256 g,
144 0.613 mmol), **L3** (0.273 g, 0.613 mmol) or **L4** (0.290 g, 0.613 mmol) esters. During 2 h
145 of stirring, 10 cm³ of water solution of LiOH (0.0294 g, 1.226 mmol) was added in small
146 portions to the reaction mixture. Within this period, pale yellow precipitates of the
147 complexes **C1-C4** were obtained, filtered off, washed with cold water, ethanol and ether
148 and air dried.

149 Chlorido((*S,S*)-ethylenediamine-*N*-(*O*-ethyl-2-(3-methyl)-butanoate)-*N'*-2-(3-
150 -methyl)butanoato-palladium(II) [PdCl{(*S,S*)-(Et)eddv}] (**C1**) was previously synthesized
151 [5].

152 Chlorido((*S,S*)-ethylenediamine-*N*-(*O*-propyl-2-(3-methyl)-butanoate)-*N'*-2-(3-
153 -methyl)butanoato-palladium(II) [PdCl{(*S,S*)-(Pr)eddv}] (**C2**) Yield: 0.232 g (72%).
154 *Anal.* Calc. for ($M_r = 443.272$): C, 40.64; H, 6.59; N, 6.32. Found: C, 41.00; H, 6.57; N,
155 6.43. MS, *m/z*: 442.09. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 0.94 (t, 3H, C^{15}H_3), 1.11 (d,
156 6H, $\text{C}^{6,7}\text{H}_3$), 1.21 (d, 6H, $\text{C}^{10,11}\text{H}_3$), 1.61 (m, 2H, C^{14}H_2), 1.94 (m, 4H, $\text{C}^{1,2}\text{H}_2$), 2.24 (m,
157 1H, C^5H), 2.48 (m, 1H, C^9H), 3.71 (d, 1H, C^3H), 4.10 (d, 1H, C^8H), 4.28 (t, 2H, C^{13}H_2).
158 ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 10.68 (C^{15}H_3), 19.25 (C^6H_3), 19.34 (C^7H_3), 21.15
159 (C^{10}H_3), 22.15 (C^{11}H_3), 30.58 (C^{14}H_2), 46.83 (C^5H), 49.70 (C^9H), 50.56 (C^1H_2), 56.61
160 (C^2H_2), 65.29 (C^8H), 68.75 (C^3H), 72.99 (C^{13}H_2), 171.73 (C^{12}), 178.74 (C^4). ^1H NMR
161 (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm): 0.92 (t, 3H, C^{15}H_3), 1.03 (d, 6H, $\text{C}^{6,7}\text{H}_3$), 1.23 (d, 6H,
162 $\text{C}^{10,11}\text{H}_3$), 1.58 (m, 2H, C^{14}H_2), 1.89 (m, 4H, $\text{C}^{1,2}\text{H}_2$), 2.13 (m, 1H, C^5H), 2.45 (m, 1H,
163 C^9H), 3.59 (d, 1H, C^3H), 4.02 (d, 1H, C^8H), 4.29 (t, 2H, C^{13}H_2), 5.83 (2H, NH). ^{13}C
164 NMR (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm): 11.12 (C^{15}H_3), 18.87 (C^6H_3), 19.36 (C^7H_3), 21.07
165 (C^{10}H_3), 22.17 (C^{11}H_3), 30.53 (C^{14}H_2), 46.74 (C^5H), 49.72 (C^9H), 50.55 (C^1H_2), 56.16
166 (C^2H_2), 65.39 (C^8H), 68.74(C^3H), 72.87 (C^{13}H_2), 171.56 (C^{12}), 178.28 (C^4).

167

168 Chlorido((*S,S*)-ethylenediamine-*N*-(*O*-butyl-2-(3-methyl)-butanoate)-*N'*-2-(3-
169 -methyl)butanoato-palladium(II) [PdCl{(*S,S*)-(Bu)eddv}] (**C3**) Yield: 0.198 g (71%).
170 *Anal.* Calc. for ($M_r = 457.298$): C, 42.02; H, 6.83; N, 6.13. Found: C, 42.23; H, 7.10; N,
171 5.99. MS, *m/z*: 458.10. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 0.91 (t, 3H, C^{16}H_3), 0.99 (d,
172 6H, $\text{C}^{6,7}\text{H}_3$), 1.17 (d, 6H, $\text{C}^{10,11}\text{H}_3$), 1.35 (m, 2H, C^{15}H_2), 1.59 (m, 2H, C^{14}H_2), 2.19 (m,
173 4H, $\text{C}^{1,2}\text{H}_2$), 2.56 (m, 1H, C^5H), 2.84 (m, 1H, C^9H), 3.50 (d, 1H, C^3H), 4.08 (d, 1H, C^8H),
174 4.29 (t, 2H, C^{13}H_2). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 13.64 (C^{16}H_3), 17.99 (C^6H_3),
175 18.17 (C^7H_3), 19.24 (C^{10}H_3), 19.44 (C^{11}H_3), 21.58 (C^{15}H_2), 28.34 (C^5H), 29.68 (C^9H),
176 30.55 (C^{14}H_2), 38.68 (C^1H_2), 41.52 (C^2H_2), 59.40 (C^8H), 61.40 (C^3H), 67.21 (C^{13}H_2),
177 170.81 (C^{12}), 177.84 (C^4). ^1H NMR (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm): 0.88 (t, 3H, C^{16}H_3),
178 0.93 (d, 6H, $\text{C}^{6,7}\text{H}_3$), 0.98 (d, 6H, $\text{C}^{10,11}\text{H}_3$), 1.23 (m, 2H, C^{15}H_2), 1.46 (m, 2H, C^{14}H_2),
179 2.06 (m, 4H, $\text{C}^{1,2}\text{H}_2$), 2.51 (m, 1H, C^5H), 2.79 (m, 1H, C^9H), 3.39 (d, 1H, C^3H), 3.56 (d,
180 1H, C^8H), 4.12 (t, 2H, C^{13}H_2), 5.85 (2H, NH). ^{13}C NMR (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm):
181 13.53 (C^{16}H_3), 17.85 (C^6H_3), 18.79 (C^7H_3), 19.70 (C^{10}H_3), 19.87 (C^{11}H_3), 21.79 (C^{15}H_2),

182 21.99 (C⁵H), 27.83 (C⁹H), 30.44 (C¹⁴H₂), 49.93 (C¹H₂), 53.96 (C²H₂), 64.36 (C⁸H), 64.64
183 (C³H), 71.23 (C¹³H₂), 171.37 (C¹²), 179.20 (C⁴).

184 Chlorido((*S,S*)-ethylenediamine-*N*-(*O*-pentyl-2-(3-methyl)-butanoate)-*N'*-2-(3-
185 -methyl)butanoato-palladium(II) [PdCl{(*S,S*)-(Pe)eddv}] (**C4**) Yield: 0.217 g (75%).
186 *Anal.* Calc. for (*M*_r = 471.324): C, 43.32; H, 7.06; N, 5.94. Found: C, 43.43; H, 6.98; N,
187 5.89. MS, *m/z*: 470.12. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0.93 (t, 3H, C¹⁷H₃), 0.99 (d,
188 6H, C^{6,7}H₃), 1.11 (d, 6H, C^{10,11}H₃), 1.32 (m, 2H, C¹⁵H₂), 1.45 (m, 2H, C¹⁶H₂), 1.60 (m,
189 2H, C¹⁴H₂), 2.09 (m, 4H, C^{1,2}H₂), 2.46 (m, 1H, C⁵H), 2.79 (m, 1H, C⁹H), 3.51 (d, 1H,
190 C³H), 3.63 (d, 1H, C⁸H), 4.07 (t, 2H, C¹³H₂). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 17.92
191 (C¹⁷H₃), 18.43 (C⁶H₃), 19.98 (C⁷H₃), 21.87 (C¹⁰H₃), 22.09 (C¹¹H₃), 27.79 (C¹⁶H₂), 27.94
192 (C¹⁵H₂), 30.14 (C¹⁴H₂), 36.72 (C⁵H), 37.28 (C⁹H), 41.55 (C¹H₂), 49.90 (C²H₂), 54.07
193 (C⁸H), 64.50 (C³H), 71.20 (C¹³H₂), 171.62 (C¹²), 179.46 (C⁴). ¹H NMR (200 MHz,
194 DMSO-*d*₆, δ ppm): 0.91 (t, 3H, C¹⁷H₃), 1.02 (d, 6H, C^{6,7}H₃), 1.13 (d, 6H, C^{10,11}H₃), 1.41
195 (m, 2H, C¹⁵H₂), 1.58 (m, 2H, C¹⁶H₂), 1.74 (m, 2H, C¹⁴H₂), 2.18 (m, 4H, C^{1,2}H₂), 2.58 (m,
196 1H, C⁵H), 2.92 (m, 1H, C⁹H), 3.50 (d, 1H, C³H), 3.69 (d, 1H, C⁸H), 4.33 (t, 2H, C¹³H₂),
197 6.05 (2H, NH). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 18.60 (C¹⁷H₃), 19.08 (C⁶H₃),
198 19.92 (C⁷H₃), 21.94 (C¹⁰H₃), 22.87 (C¹¹H₃), 28.81 (C¹⁶H₂), 29.35 (C¹⁵H₂), 32.34 (C¹⁴H₂),
199 38.74 (C⁵H), 39.93 (C⁹H), 45.56 (C¹H₂), 51.18 (C²H₂), 55.46 (C⁸H), 67.53 (C³H), 74.74
200 (C¹³H₂), 171.38 (C¹²), 178.92 (C⁴).

201

202

203 2.2 *In vitro* antimicrobial assay

204 2.2.1. Test substances

205 The tested compounds were dissolved in DMSO and then diluted into nutrient
206 liquid medium to achieve a concentration of 10%. An antibiotic doxycycline (Galenika
207 A.D., Belgrade) was dissolved in nutrient liquid medium, a Mueller–Hinton broth
208 (Torlak, Beograd), while an antimycotic fluconazole (Pfizer Inc., USA) was dissolved in
209 Sabouraud dextrose broth (Torlak, Belgrade).

210

211 2.2.2. Test microorganisms

212 Antimicrobial activity of four ligands and corresponding palladium(II) complexes
213 was tested for 15 microorganisms including five strains of pathogenic bacteria (standard
214 and clinical strains): *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212,
215 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* (clinical isolate) and *E. coli*
216 (clinical isolate); three species of probiotics: *Lactobacillus plantarum* PMFKG-P31,
217 *Bacillus subtilis* IP 5832 PMFKG-P32 and *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*
218 PMFKG-P33; two yeast species *Candida albicans* (clinical isolate) and *Saccharomyces*
219 *boulandii* PMFKG-P34 and five pathogenic fungi *Aspergillus fumigatus* PMFKG-F23,
220 *Aspergillus flavus* PMFKG-F24, *Aspergillus restrictus* PMFKG-25, *Aspergillus niger*
221 PMFKG-26 and standard strain *Aspergillus niger* ATCC 16404. All clinical isolates were
222 a generous gift from the Institute of Public Health, Kragujevac. The other
223 microorganisms were provided from the collection held by the Microbiology Laboratory
224 Faculty of Science, University of Kragujevac.

225

226 2.2.3. Suspension preparation

227 Bacterial suspensions and yeast suspension were prepared by the direct colony
228 method. The colonies were taken directly from the plate and were suspended in 5 mL of
229 sterile 0.85% saline. The turbidity of initial suspension was adjusted by comparing with
230 0.5 McFarland's standard (0.5 mL 1.17% w/v BaCl₂×2H₂O + 99.5 mL 1% w/v H₂SO₄)
231 [19]. When adjusted to the turbidity of 0.5 McFarland's standard, bacteria suspension
232 contains about 10⁸ colony forming unites (CFU)/mL and suspension of yeast contains
233 10⁶ CFU/mL. Ten-fold dilutions of initial suspension were additionally prepared into
234 sterile 0.85% saline. The suspensions of fungal spores were prepared by gentle stripping
235 of spore from slopes with growing aspergilli. The resulting suspensions were 1:1000
236 diluted in sterile 0.85% saline.

237

238 2.2.4. Microdilution method

239 Antimicrobial activity was tested by determining the minimum inhibitory
240 concentration (MIC) and minimum microbicidal concentration (MMC) by using
241 microdilution plate method with resazurin [20]. The 96-well plates were prepared by
242 dispensing 100 µL of nutrient broth, Mueller-Hinton broth for bacteria and Sabouraud

243 dextrose broth for fungi and yeasts, into each well. A 100 μ L from the stock solution of
244 tested compound (concentration of 2000 μ g/mL) was added into the first row of the plate.
245 Then, twofold serial dilutions were performed by using a multichannel pipette. The
246 obtained concentration range was from 1000 to 7.813 μ g/mL. A 10 μ L of diluted
247 bacterial, yeast suspension and suspension of spores was added to each well to give a
248 final concentration of 5×10^5 CFU/mL for bacteria and 5×10^3 CFU/mL for fungi and
249 yeast. Finally, 10 μ L resazurin solution was added to each well inoculated with bacteria
250 and yeast. Resazurin is an oxidation-reduction indicator used for the evaluation of
251 microbial growth. It is a blue non-fluorescent dye that becomes pink and fluorescent
252 when reduced to resorufin by oxidoreductases within viable cells [21]. The inoculated
253 plates were incubated at 37°C for 24 h for bacteria, 28°C for 48 h for the yeast and 28°C
254 for 72 h for fungi. MIC was defined as the lowest concentration of the tested substance
255 that prevented resazurin color change from blue to pink. For fungi, MIC values of the
256 tested substance were determined as the lowest concentration that visibly inhibited
257 mycelia growth.

258 Doxycycline and fluconazole were used as a positive control. Solvent control test
259 was performed to study an effect of 10% DMSO on the growth of microorganism. It was
260 observed that 10% DMSO did not inhibit the growth of microorganism. Also, in the
261 experiment, the concentration of DMSO was additionally decreased because of the
262 twofold serial dilution assay (the working concentration was 5% and lower). Each test
263 included growth control and sterility control. All tests were performed in duplicate and
264 MICs were constant.

265 Minimum bactericidal and fungicidal concentration was determined by plating
266 10 μ L of samples from wells, where no indicator color change was recorded, on nutrient
267 agar medium. At the end of the incubation period the lowest concentration with no
268 growth (no colony) was defined as minimum microbicidal concentration.

269

270 2.2.5. *Statistical analysis*

271

272 All statistical analyses were performed using SPSS package (SPSS for Windows,
273 ver. 17, 2008) (Chicago, IL, USA). Mean differences were established by Student's *t*-test.

274 The data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA). In all cases p
275 values <0.05 were considered statistically significant.

276

277 **3. Results and discussion**

278

279 *3.1. Synthesis and characterization*

280

281 Esters (**L1-L4**) and neutral palladium(II) complexes (**C1-C4**) were prepared by
282 using appropriate modifications of known methods (Scheme 1) [2,4,5,22-28]. These
283 esters are not soluble in chloroform, but rather in water, methanol, dimethyl sulfoxide and
284 hot alcohols used in individual esterification reactions. The complexes were synthesized
285 by combining aqueous solutions of $K_2[PdCl_4]$ and the corresponding esters. Although we
286 expected bidentate coordination of synthesized diesters of *S,S*-eddv as with corresponding
287 esters of *S,S*-eddp [2], the results of elemental microanalysis, MS, IR, NMR (1H and ^{13}C)
288 spectra suggest that partial diester hydrolysis and then tridentate coordination to the
289 palladium(II)-ion occurred which was confirmed by X-ray structure analysis for complex
290 $[PdCl\{(S,S)-(et)eddv\}]$ [5]. This fact can be explained by moving chemical balance in
291 the direction of hydrolysis by precipitation of insoluble palladium(II) complexes. This did
292 not happen in the case of *S,S*-eddp-Pd(II) complexes since the complexes in question are
293 enough water soluble. Based on the structure of the ligands (Scheme 1) bidentate
294 coordination for the palladium(II) ion was expected. From the spectra, it can be
295 concluded that the synthesis of the complex occurred during the partial hydrolysis of the
296 ligand and it was tridentate coordinated to the central metal ion. The resulting complexes
297 are soluble in chloroform and dimethyl sulfoxide, but not in water. The results of
298 microanalysis and MS spectra confirmed the predicted content of the isolated ligands and
299 complexes. Also, the data from mass spectra of the **C1-C4** match the proposed molecular
300 formulae of the complexes.

301 The most important bands in the infrared spectra of the isolated dialkyl esters and
302 corresponding palladium(II) complexes are given in Table 1.

303 Absorption bands for secondary amino groups were found for **C1-C4** at 3178,
304 3181, 3180, 3180 cm^{-1} , respectively, indicating coordination *via* nitrogen atoms (for

305 ligand precursors only bands for secondary ammonium groups can be observed; **L1-L4**:
306 $\nu(\text{R}_2\text{NH}_2^+)$ at 3415, 3437, 3428, 3439 cm^{-1}). There is one absorption band at $\sim 1730 \text{ cm}^{-1}$
307 in the spectra of all ligands characteristic for ester group. There are two absorption bands
308 for $\nu(\text{C}=\text{O})$ in spectra for all complexes, which indicates two different C=O groups, being
309 in correspondence to the hydrolysis of one of the alkyl groups, and coordination of the
310 residual oxygen atom. All other specific bands were found at similar positions for
311 corresponding ligand precursors and complexes.

312 The expected signals were found in ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra. The signals
313 of CH_2 protons of the ethylenediamine bridge showed coordination induced shifts in
314 spectra of complexes (up to 0.9 ppm) giving a clear indication of nitrogen coordination.
315 The signals for all methyl protons for all compounds were found within the range of 0.90-
316 -1.21 ppm. *N,N'*-ligand coordination is confirmed by NH chemical shift (4.5 ppm for
317 ligands and 5.8 ppm for complexes)

318 In ^{13}C NMR spectra of complexes carbon atoms resonances were found as
319 expected. There are two signals around 170 ppm for all complexes, signal at a lower
320 chemical shift belongs to the ester carbon atom and signal at a higher chemical shift
321 belongs to the carbon atom of the carboxyl group that participates in coordination with its
322 oxygen atom.

323

324 3.2. Microbiology

325

326 The results of *in vitro* testing antibacterial and antifungal activities of the four new
327 palladium complexes and their ligands are shown in Table 2. For comparison, MIC and
328 MMC values of doxycycline and fluconazole are also listed in Table 2. The solvent (10%
329 DMSO) did not inhibit the growth of the tested microorganisms.

330 The intensity of antimicrobial action varied depending on the species of
331 microorganism and on the type and concentration of the substances. In general, the tested
332 ligands, with few exceptions, show very low antimicrobial activity, while palladium(II)
333 complexes show selective and moderate activity. The difference in antimicrobial activity
334 between ligands and corresponding palladium(II) complexes is noticed and is always
335 higher with palladium(II) complexes. Statistically significant difference in antimicrobial

336 action between the ligands and their appropriate complexes is at the level of MIC
337 expressed at all ($p < 0.05$). The tested substances do not show statistically significant
338 difference in activity against investigated groups of microorganisms.

339 The obtained results of the coordination compounds show enhanced activity
340 compared to the ligand, with indicates that the coordinated metal has an influence on the
341 antimicrobial effects. However, the higher activity of the complexes, as compared to the
342 free ligands, can be understood in terms of the chelation theory. This theory explains that
343 a decrease in the polarizability of the metal could enhance the lipophilicity of the
344 complexes [29].

345 All tested compounds demonstrated selective to moderate antibacterial activity in
346 relation to the tested standard and clinical strains of bacteria. Being compared to positive
347 control, these substances showed low antibacterial activity. Interestingly, **L3**, **L4** and **C3**,
348 **C4** exhibit strong antibacterial activity towards *Escherichia coli* (clinical isolate), MIC
349 ranged $<7.813 \mu\text{g/mL}$ to $31.25 \mu\text{g/mL}$.

350 Also, probiotic bacteria showed high resistance to the effects of tested substances.
351 MICs were from $125 \mu\text{g/mL}$ to $>1000 \mu\text{g/mL}$, and MMCs were from $500 \mu\text{g/mL}$ to
352 $>1000 \mu\text{g/mL}$. The most sensitive was *Lactobacillus plantarum* to **C3** and **C4** (MIC was
353 $<7.813 \mu\text{g/mL}$).

354 Tested ligands and the corresponding palladium(II) complexes showed low
355 antifungal activity. MICs were from $125 \mu\text{g/mL}$ to $>1000 \mu\text{g/mL}$ while MMCs were from
356 $500 \mu\text{g/mL}$ to $>1000 \mu\text{g/mL}$. The tested compounds did not affect the growth of yeasts or
357 their activities were very low (MIC/MMC values were $1000 \mu\text{g/mL}$ and $>1000 \mu\text{g/mL}$).

358

359 **Conclusion**

360

361 Ligand precursors (**L1-L4**) and corresponding palladium(II) complexes (**C1-C4**)
362 were synthesized and characterized by IR, MS, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopies and
363 elemental analysis. The results of antimicrobial activity showed that tested ligands and
364 the corresponding palladium(II) complexes demonstrated different degree of
365 antimicrobial activity in relation to the tested species. The difference in antimicrobial
366 activity between ligands and corresponding palladium(II) complexes is noticed and it is

367 always higher with palladium(II) complexes. *Escherichia coli* (clinical isolate) was
368 particularly sensitive to the **L3**, **L4**, **C3** and **C4**, especially to the **C4**, so this complex
369 could be used as potential pharmaceutical agent. Our research showed that the change of
370 ligand structure and corresponding palladium(II) complexes had a significant impact on
371 their biological activity. We are going to track biological activity of the palladium(II)
372 complexes as a consequence of ligand structure change.

373

374

375

376 **Acknowledgements**

377

378 The authors are grateful to the Ministry of Education and Science of the Republic
379 of Serbia for financial support (Projects No. OI172016 and OI173032).

380

381

382 **References**

383

384 [1] A.C. Fluit, M.E. Jones, F.J. Schmitz, J. Acar, R. Gupta, J. Verhoef, Clin. Infect. Dis.
385 30 (2000) 454.

386 [2] G.P. Vasić, V.V. Glođović, I.D. Radojević, O.D. Stefanović, Lj.R. Čomić, V.M.
387 Đinović, S.R. Trifunović, Inorg. Chim. Acta 363 (2010) 3606.

388 [3] a) B.B. Krajčinović, G.N. Kaluđerović, D. Steinborn, Ch. Wagner, K.
389 Merzweiler, S.R. Trifunović, T.J. Sabo, J. Serb. Chem. Soc. 74 (2009) 389.

390 b) B.B. Zmejkovski, G.N. Kaluđerović, S. Gómez-Ruiz, T.J. Sabo, J. Serb.
391 Chem. Soc. 74 (2009) 1249.

392 [4] B.B. Krajčinović, G.N. Kaluđerović, D. Steinborn, H. Schmidt, Ch. Wagner,
393 Ž. Žižak, Z.D. Juranić, S.R. Trifunović, T.J. Sabo, J. Inorg. Biochem. 102 (2008)
394 892.

395 [4] G.P. Radić, V.V. Glođović, G.N. Kaluđerović, F.W. Heinemann and S.R.
396 Trifunović, Trans. Met. Chem. 36 (2011) 331–336.

- 397 [6] B.T. Khan, J. Bhatt, K. Najmoddin, S. Shamsuddin, K. Annapoorna, J. Inorg.
398 Biochem. 44 (1991) 55.
- 399 [7] C. Navarro-Eanninger, J.M. Pérez, F. Zamora, V.M. Gonzáles, J.M. Masaguer, C.
400 Alonso, J. Inorg. Biochem. 52 (1993) 37.
- 401 [8] I. Brudzinska, Y. Mikata, M. Obata, C. Ohtsuki, S. Yano, Bioorg. Med. Chem. Lett.
402 14 (2004) 2533.
- 403 [9] A. Garoufis, S.K. Hadjidakou, N. Hadjiliadis, Coord. Chem. Rev. 253 (2009) 1384.
- 404 [10] W. Guerraa, E. de Andrade Azevedoa, A.R. de Souza Monteirob, M. Bucciarellia-
405 -Rodriguezb, E. Chartone-Souzab, A.M. Amaral Nascimentob, A.P. Soares Fontesc,
406 L. Le Moyecd, E.C. Pereira-Maiaa, J. Inorg. Biochem. 99 (2005) 2348.
- 407 [11] L.M.M. Vieira, M.V. de Almeida, M.C.S. Lourenço, F.A.F.M. Bezerra, A.P.S.
408 Fontes, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 4107.
- 409 [12] D. Kovala-Demertzi, M.A. Demertzis, J.R. Miller, C. Papadopoulou, C. Dodorou, G.
410 Filousis, J. Inorg. Biochem. 86 (2001) 555
- 411 [13] R.R. Coombs, M.K. Ringer, J.M. Blacquiere, J.C. Smith, J.S. Neilsen, Y.-S. Uh,
412 J.B. Gilbert, L.J. Leger, H. Zhang, A.M. Irving, S.L. Wheaton, C.M. Vogels S.A.
413 Westcott, Trans. Met. Chem. 30 (2005) 411.
- 414 [14] M. Ali, M. Aminul, R. Butcher C. Karen, Trans. Met. Chem. 31 (2006) 79.
- 415 [15] I. Kizilcikli, Y.D. Kurt, B. Akkurt, A.Y. Genel, S. Birteksöz, G. Ötük, B. Ülküseven,
416 Folia Microbio. 52 (2007) 15.
- 417 [16] N.M. Aghatabay, M. Somer, M. Senel, B. Dulger, F. Gucin, Eur. J. Med. Chem. 42
418 (2007) 1069.
- 419 [17] M.K. Biyala, K. Sharma, M. Swami, N. Fahmi, R. Vir Singh, Trans. Met. Chem. 33
420 (2008) 377.
- 421 [18] L.N. Schoenberg, D.W. Cooke, C.F. Liu, Inorg. Chem. 7 (1968) 2386.
- 422 [19] J.M. Andrews, J. Antimicrob. Chemother. 56 (2005) 60.
- 423 [20] S.D. Sarker, L. Nahar, Y. Kumarasamy, Methods 42 (2007) 321.
- 424 [21] E. Banfi, G. Scialino, C. Monti-Bragadin, J. Antimicrob. Chemother. 52 (2003) 796.
- 425 [22] J.M. Vujić, M. Cvijović, G. N. Kaluđerović, M. Milovanović, B. B. Zmejkovski, V.
426 Volarević, N. Arsenijević, T.J. Sabo, S.R. Trifunović, Eur. J. Med. Chem. 45 (2010)
427 3601.

- 428 [23] B.B. Zmejkovski, G.N. Kaluđerović, S. Gómez-Ruiz, Ž. Žižak, D. Steinborn, H.
429 Schmidt, R. Paschke, Z.D. Juranić, T.J. Sabo, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 3452.
- 430 [24] G.N. Kaluđerović, H. Schmidt, S. Schwieger, Ch. Wagner, R. Paschke, A.
431 Dietrich, T. Mueller, D. Steinborn, Inorg. Chim. Acta 361 (2008) 1395.
- 432 [25] T.J. Sabo, G.N. Kaluđerović, S.R. Grgurić-Šipka, F.W. Heinemann, S.R.
433 Trifunović, Inorg. Chem. Commun. 7 (2004) 241.
- 434 [26] G.N. Kaluđerović, V.M. Đinović, Z.D. Juranić, T.P. Stanojković, T.J. Sabo, J.
435 Inorg. Biochem. 99 (2005) 488.
- 436 [27] G.N. Kaluđerović, D. Miljković, M. Momčilović, V.M. Đinović, M. Mostarica-
437 -Stojković, T.J. Sabo, V. Trajković, Int. J. Cancer 116 (2005) 479.
- 438 [28] S. Mijatović, D. Maksimović-Ivanić, J. Radović, D. Miljković, G.N. Kaluđerović,
439 T.J. Sabo, V. Trajković, Cell. Mol. Life Sci. 62 (2005) 1275.
- 440 [29] R.S. Srivastava, Inorg. Chim. Acta 56 (1981) 65.

441
442
443
444
445
446
447
448
449

Professor Umberto Belluco
Department of Chemical Processes,
Università degli Studi di Padova, Via Marzolo 9,
I-35100 Padua, Italy

March 14th, 2012
Kragujevac, Republic of Serbia

Dear professor Belluco,

We have done our best to improve the paper

“Stereospecific ligands and their complexes. XI. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with some alkyl esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl) butanoic acid”

by the authors

Gordana P. Radić, Verica V. Glođović, Ivana D. Radojević, Olgica D. Stefanović, Ljiljana R. Čomić, Vesna M. Đinović and Srećko R. Trifunović

according to the suggestion of the reviewers.

The following are our answers to the suggestions of the reviewers.

Reviewer #1:

In the abstract, there is no need for a new paragraph on line 20 (page 1).

The whole abstract is in one paragraph.

Please define eddp on page 2, line 35.

Eddp was defined (line 41).

In some previous papers synthesis and characterization of the palladium(II) complexes with R_2 -*S,S*-eddp ligands (*S,S*-eddp = (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate, R = *n*-Pr [2], *n*-Bu [2], *n*-Pe [2], *i*-Pr [3a], *i*-Bu [3b], *c*-Pe [4], Cy [4]) were published.

Antiviral on page 2 line 55, should not have a hyphen to be consistent with the other 'anti' studies.

Garoufis et al. [9] reviewed numerous scientific papers on antiviral, antibacterial and antifungal activity of palladium(II) complexes with different types of ligands (sulfur and nitrogen donor ligands, Schiff base ligands and drugs as ligands).

Experiments, the yields have too many significant figures, for instance 54.97% should be just 55%. Also, Page 3, line 75, the first word should have the e of ethylenediamine capitalised.

The yields of the all substances were given in the form of numbers without decimals.

(*S,S*)-Ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl)-butanoic acid, (H₂-(*S,S*)-eddv) was prepared using similar methods described in literature [18].

Page 8, line 237 Scheme is misspelled.

Esters (**L1-L4**) and neutral palladium(II) complexes (**C1-C4**) were prepared by using appropriate modifications of known methods (Scheme 1) [2,4,5,22-28].

Ethylenediamine is misspelled on page 9, line 255.

The signals of CH₂ protons of the ethylenediamine bridge showed coordination induced shifts in spectra of complexes (up to 0.9 ppm) giving a clear indication of nitrogen coordination.

Please add ppm when discussing chemical shifts on page 9.

The expected signals were found in ¹H NMR and ¹³C NMR spectra. The signals of CH₂ protons of the ethylenediamine bridge showed coordination induced shifts in spectra of complexes (up to 0.9 ppm) giving a clear indication of nitrogen coordination. The signals for all methyl protons for all compounds were found within the range of 0.90-1.21 ppm.

Please remove the last line on page 263 as this is not necessary.

The last line was removed.

The sentence on page 10, line 278 does not make any sense, please correct.

The tested substances do not show statistically significant difference in activity against investigated groups of microorganisms.

In the conclusions the reader is left to wonder what the impact of this work has on the scientific community and where this study will lead. Perhaps a line or two discussing future work would be helpful.

Our research showed that the change of ligand structure and corresponding palladium(II) complexes had a significant impact on their biological activity. We are going to track biological activity of the palladium(II) complexes as a consequence of ligand structure change.

Schemes 1 and 2 should be combined into one scheme.

Schemes 1 and 2 were combined into Scheme 1.

Reviewer #2:

To avoid this hypothesis ESI mass spectra of the complexes should be collected.

Mass spectra of the complexes were collected.

The results of microanalysis and MS spectra confirmed the predicted content of the isolated ligands and complexes. Also, the data from mass spectra of the **C1-C4** match the proposed molecular formulae of the complexes.

On row 254 the authors say that the coordination through the N atoms of the ligand happened because there is a shift up to 0.9 ppm of the methylene protons; this comparison cannot be made because the spectra of the ligands are collected in D₂O and those of the complexes in CDCl₃, the same solvent should be used to make this comparison. I suggest to analyze the spectra also in deuterated DMSO for the reason reported above and for two other important reasons:

- 1) see NH signals (the chemical shift of NH is important to understand the coordination mode)**
- 2) the antimicrobial studies are performed in this solvent (maybe the structure in this coordinating solvent is destroyed).**

N,N'-ligand coordination is confirmed by NH chemical shift (4.5 ppm for ligands and 5.8 ppm for complexes). NMR spectra (^1H and ^{13}C) of all synthesized compounds were recorded in $\text{DMSO-}d_6$ too.

Many typographical errors are present in the papers and only few of them are reported below (one careful check must be needed).

We accepted Your suggestions.

Row 6: Vadic instead Radic

Radić is correct.

Row 81: missed one parenthesis after complexes.

We accepted Your suggestions.

Row 118: in which solvent is performed the reaction?

The reactions are performed in water solution.

Row 237: Scheme and not Sheme

We accepted Your suggestions.

Row 240: corresponding and not cooresponding

We accepted Your suggestions.

Rows 45, 46, 48, 125, 128, 137, 147 chlorido and not chorido.

We accepted Your suggestions.

Reviewer #3:

Check the spelling and English grammar throughout the text.

We accepted Your suggestions.

The first paragraph of the introduction should state that the authors refer to previous work in order to make it clear that they are not starting to discuss the present work.

We accepted Your suggestions.

In parallel with the rapid development of a wide range of antibacterial agents since the 1940s, bacteria have proved extremely adept at developing resistance to each new employed agent. The rapidly increasing incidence of bacterial resistance to antimicrobial agents has become a serious problem worldwide. Resistance mechanisms have been identified and described for all the known antibiotics currently available for clinical use [1].

In some previous papers synthesis and characterization of the palladium(II) complexes with R_2 -*S,S*-eddp ligands (*S,S*-eddp = (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate, R = *n*-Pr [2], *n*-Bu [2], *n*-Pe [2], *i*-Pr [3a], *i*-Bu [3b], *c*-Pe [4], Cy [4]) were published. It was concluded from NMR spectra that the mixture of diastereoisomers of the [PdCl₂(R₂-eddip)] complexes was obtained. The antitumoral investigations of some of these ligands and complexes were performed [4].

As stated in section 2.1.3, two equivalents of LiOH were used.

Two equivalents of LiOH were used for neutralization of protonated amino groups.

Can the authors explain why only one ester was hydrolyzed?

Although we expected bidentate coordination of synthesized diesters of *S,S*-eddv as with corresponding esters of *S,S*-eddp [2], the results of elemental microanalysis, MS, IR, NMR (¹H and ¹³C) spectra suggest that partial diester hydrolysis and then tridentate coordination to the palladium(II)-ion occurred which was confirmed by X-ray structure analysis for complex

[PdCl{(S,S)-(et)eddv}] [5]. This fact can be explained by moving chemical balance in the direction of hydrolysis by precipitation of insoluble palladium(II) complexes. This did not happen in the case of S,S-eddp-Pd(II) complexes since the complexes in question are enough water soluble.

Page 10, line 126 - the formula of the complex reported in reference 4 is wrong. It presents 2 chlorides.

The formula of the complex reported in reference 4 is wrong. The correct formula is [PdCl{(S,S)-(Et)eddv}].

Page 15. The authors explain the higher activity of the complexes, compared to the ligands, based on the "chelation theory". Unfortunately, the reference is not accessible. Is there another reference they could give?

We replaced reference

[28] S.O. Podunavac-Kuzmanović, V.M. Leovac, N.U. Perišić-Janjić, J. Rogan, G. Balaš, J. Serb. Chem. Soc. 64 (1999) 381.

with

[28] R.S. Srivastava, Inorg. Chim. Acta 56 (1981) 65.

With best wishes and regards,
Yours sincerely,

Prof. Srecko R. Trifunovic

e-mail: srecko@kg.ac.rs

address:
Prof. Srecko Trifunovic
Department of Chemistry, Faculty of Science,
University of Kragujevac,
Radoja Domanovica 12, 34000 Kragujevac
Republic of Serbia

Table 1

The most important IR absorption bands of ligands and [PdCl{(S,S)-(R)-eddv}] complexes (cm⁻¹)

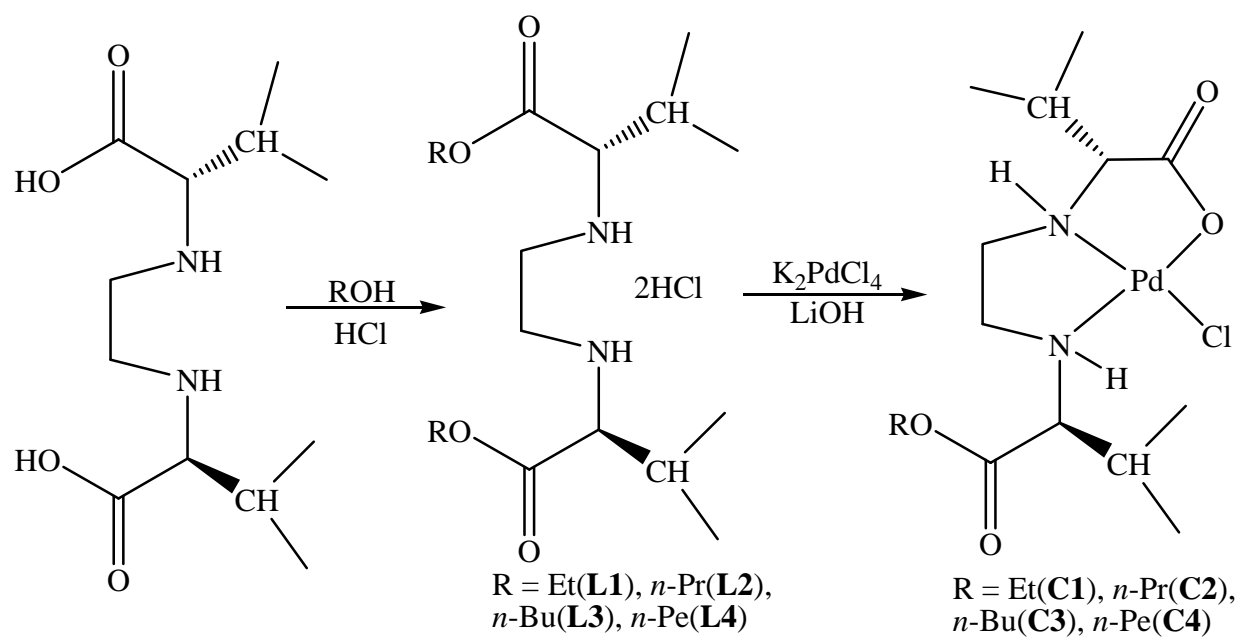
Compound	$\nu(\text{C}=\text{O})$	$\nu(\text{C}-\text{O})$	$\nu(\text{CH}_3)$	$\nu(\text{R}-\text{NH}_2^+)$	$\nu(\text{R}-\text{NH})$	Ref.
det- <i>S,S</i> -eddv·2HCl (L1)	1733	1228	2977	3415	-	5
dpr- <i>S,S</i> -eddv·2HCl (L2)	1734	1202	2973	3437	-	
dbu- <i>S,S</i> -eddv·2HCl (L3)	1737	1215	2967	3428	-	
dpe- <i>S,S</i> -eddv·2HCl (L4)	1736	1230	2964	3439		
[PdCl{(S,S)-(Et)-eddv}](C1)	1735, 1640	1267	2970	-	3178	5
[PdCl{(S,S)-(Pr)-eddv}](C2)	1731, 1652	1267	2970	-	3181	
[PdCl{(S,S)-(Bu)-eddv}](C3)	1716, 1640	1267	2966	-	3180	
[PdCl{(S,S)-(Pe)-eddv}](C4)	1716, 1642	1267	2969	-	3180	

Table 2.

Antibacterial and antifungal activity of tested ligands and corresponding palladium(II) complexes

Species	L1		C1		L2		C2		L3		C3		L4		C4		Doxycycline / Fluconazole	
	MIC*	MMC**	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000	500	1000	7.81	15.63
<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 27853	1000	1000	500	1000	>1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	500	1000	500	>1000	500	1000	62.5	125
<i>Enter. faecalis</i> ATCC 29212	500	500	500	1000	>1000	>1000	500	>1000	1000	>1000	500	1000	1000	>1000	500	1000	7.81	62.5
<i>Escherichia coli</i>	500	1000	125	500	125	1000	125	500	15.63	500	31.25	500	15.63	125	<7.813	125	7.81	15.63
<i>Proteus mirabilis</i>	1000	1000	500	1000	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000	500	1000	250	> 250
<i>Bifidobac.an. subsp. lactis</i>	250	500	125	1000	500	>1000	250	>1000	62.5	1000	62.5	1000	62.5	500	125	>1000	31.3	62.5
<i>Lactobacillus plantarum</i>	250	>1000	250	>1000	500	>1000	250	>1000	62.5	250	<7.813	125	62.5	250	<7.813	62.5	0.45	7.81
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	125	500	15.63	>1000	62.5	>1000	7.813	1000	250	>1000	500	1000	1000	>1000	500	<1000	1.95	15.63
<i>Saccharomyces boulardii</i>	1000	1000	1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	31.3	1000
<i>Candida albicans</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	62.5	1000
<i>Aspergillus niger</i>	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000	500	>1000	>1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	1000	1000	500	1000
<i>A. niger</i> ATCC 16404	>1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	250	500	>1000	>1000	500	1000	62.5	62.5
<i>Aspergillus flavus</i>	1000	>1000	500	500	1000	>1000	500	500	>1000	>1000	250	500	>1000	>1000	1000	1000	1000	1000
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1000	>1000	250	500	>1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	500	500	>1000	>1000	125	500	500	1000
<i>Aspergillus restrictus</i>	1000	>1000	500	500	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000	500	500	500	1000	250	500	500	2000

* MIC values ($\mu\text{g/mL}$) – means inhibitory activity** MMC values ($\mu\text{g/mL}$) – means microbicidal activity



Scheme 1. The preparation of the ethyl, propyl, butyl and pentyl esters of H_2 -*S,S*-eddv and corresponding palladium(II) complexes

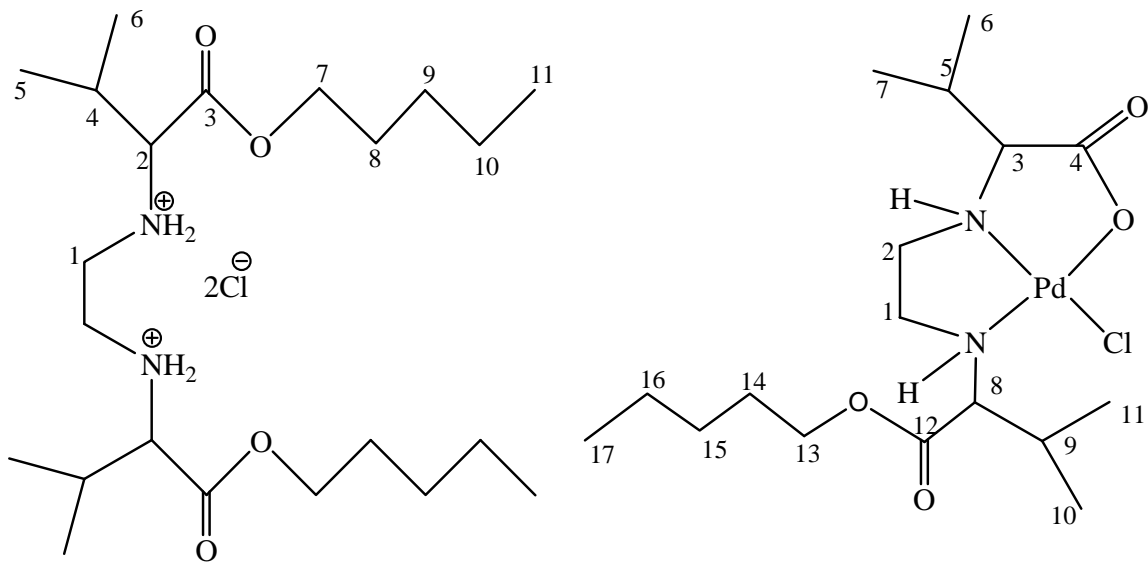


Fig. 1. Numbering of compounds used for NMR data

Synthesis, characterization, cytotoxicity of novel platinum(IV) and palladium(II) complexes with 1,2-diphenyl-ethylenediamine- -*N,N'*-di-3-propanoic acid

Gordana P. Radić^a, Verica V. Glođović^a, Zoran Ratković^a, Marija Milovanović^b, Vladislav Volarević^b, Nebojša Arsenijević^b, Laura Menéndez-Taboada^c, Santiago Garcia-Granda^c, Srećko R. Trifunović^{a1}

^a Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia

^b Centre for Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia

^c Physical and Analytical Chemistry Department, University of Oviedo, 33006 Oviedo, Spain

Abstract

In the reaction of *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine (1,2-dphen) with neutralized 3-chlor-propanoic acid, the new linear tetradentate edda-like ligand (edda = ethylenediamine-*N,N'*-diacetic ion) *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid dihydrochloride-dihydrate (H₂-1,2-dpheddp·2HCl·1.5H₂O) was prepared. The corresponding platinum(IV) complex, *s-cis*-dichlorido-(*meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate)-platinum(IV), [Pt(1,2-dpheddp)Cl₂]·H₂O, was synthesized by heating potassium-hexachloridoplatinate(IV) and H₂-1,2-dpheddp·2HCl·1.5H₂O on steam bath for 12 hours with neutralization by means of lithium-hydroxide. The compounds were characterized by elemental analysis, infrared, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy.

¹ Corresponding author. Tel. : +381 34300263; fax: +381 34335040
E-mail address: srecko@kg.ac.rs. (S.R. Trifunović)

Keywords: meso-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid; platinum(IV) complex; infrared spectroscopy; NMR spectroscopy.

1. Introduction

A geometrical isomerism in metal complexes of linear flexible tetradentate ligands having the donor atom array ONNO such as edda (edda = ethylenediamine-*N,N'*-diacetato ion) or eddp (eddp = ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate ion) has been an interesting field studied by a numerous of authors [1-14]. Such ligands occupy four of the octahedral sites around the central ion and the other two sites may be occupied by other ligands, in which three geometrical isomers are possible, as shown in Fig. 1.

In most synthetic routes [1-14] edda takes a *symmetric* coordination position (*s-cis*) rather than *unsymmetric* one (*uns-cis*) [3]. It has been suggested that the observed chelate strain of chelate rings in *uns-cis*-edda complexes may be a contributing factor in determining the configuration of the edda ligand [6]. 1,3-Pdda ligand (1,3-pdda = 1,3-propylenediamine-*N,N'*-diacetate ion) and eddp (eddp = ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate ion), with a longer diamine and carboxylate chelate rings than edda, prefer *unsymmetric* coordination [1,15,16], suggesting that the size of the chelate rings in linear tetradentate edda and similar ligands have a profound effect on the distribution of the geometrical isomers of the complexes.

Since the seventies, when *cisplatin* with antitumor activity was discovered by Rosenberg and co-workers [17,18], thousands of platinum complexes have been synthesized in order to

obtain new Pt(IV) compound with improved properties in comparison to the parent drug *cisplatin* [19-21]. Platinum(IV) compounds are more inert than platinum(II) species and this property may allow oral usage. Jolley *et. al.* reported the synthesis and cytotoxicity of several platinum(II) and platinum(IV) complexes containing ethylenediamine derivatives, including the complex with the ethylenediamine-*N,N'*-diacetato ligand. The later complex can be considered as a variant of JM-216, having the carboxylato groups tethered to the amine ligands. The authors found the complexes of the type [Pt(edda)Cl₂] were less active than JM-216 [22] (JM-216 is pharmaceutical abbreviation for the *trans,cis-cis*-diacetato-dichlorido-amminocyclohexylammino-platinum(IV) complex, *trans,cis-cis*-[Pt(CH₃COO)₂Cl₂(NH₃)(c-C₆H₁₁NH₂)])

Natile and co-workers [23] investigated how the substitution edda with eddp (eddp = ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate ion) influenced to their biological activity and concluded that eddp-Pt(IV) had smaller activity than corresponding edda-Pt(IV) complex. They supposed this fact as due to the different complex geometry, *s-cis* in the case of edda and *trans* in the case of eddp.

We wanted to extend the investigation of platinum complexes with derivatives ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate. The initial idea of this work was to prepare a new linear edda-like ligand, *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid (H₂-1,2-dpheddp) and corresponding Pt(IV) complexes in *s-cis* and/or *trans* geometries. In all our attempts we prepared only *s-cis* geometrical isomer, with a low solubility in water and common organic solvents.

Here we report synthesis the *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid and corresponding *s-cis*-dichlorido-(*meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-propionato)-platinum(IV) complex using the same method as Liu [24]. The ligand has been

characterized by elemental analysis, infrared, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. The geometric configuration of the isolated complex is assigned on the basis of their infrared, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy.

2. Experimental

2.1. Materials and measurements

The reagents were obtained commercially and used without further purification.

Infrared spectra were recorded on Perkin-Elmer FT-IR spectrophotometer, Spectrum One, using the KBr pellet technique. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Varian Gemini-200 NMR spectrometer using TMS as an internal reference, using D_2O solutions for *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid and *s-cis*-dichlorido-(*meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate)platinum(IV) complex, *s-cis*-[Pt(1,2-dpheddp)Cl₂], and CDCl_3 solution for *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine (1,2-dphen) at 22°C, using 10 mM solutions. Elemental analyses were done on a Vario III CHNOS Elemental Analyzer, Elementar Analysensysteme GmbH.

2.2. Syntheses

2.2.1. Preparation of meso-1,2-diphenyl-ethylenediamine, 1,2-dphen

The meso-1,2-diphenyl-ethylenediamine was prepared according to the procedure described earlier [25]. Benzaldehyde (30 g) was refluxed with ammonium acetate (60 g) for 3 hours. The reaction mixture was cooled and the product was filtered and washed with ethanol. Recrystallization from 1-butanol gave *N*-benzoyl-*N'*-benzylidene-meso-1,2-diphenyl-ethylenediamine. Hydrolysis of that compound with 70% sulphuric acid under reflux for 1h gave meso-1,2-diphenyl-ethylenediamine as the basic product of hydrolysis.

2.2.2. Preparation of meso-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid dihydrochloride-monohydrate, H₂-1,2-dpheddp·2HCl·1H₂O

3-Chloro-propanoic acid (4.34 g, 0.04 mol) was dissolved in 5 cm³ of water on ice bath and carefully neutralized with cold water solution of 5 cm³ NaOH (1.6 g, 0.04 mol). 1,2-Diphenyl-ethylenediamine (4.24 g, 0.02 mol) was added to this solution. The mixture was being stirred for 4 hours at 90°C, and during this period 5 cm³ NaOH water solution (1.6 g, 0.04 mol) was introduced. After that, 5.6 cm³ 6 mol/dm³ HCl was added and resulting solution was evaporated to the volume of 7 cm³; 6 cm³ conc. HCl, 6 cm³ of ethanol and 6 cm³ of ether were added to the mixture. The white precipitate of meso-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid dihydrochloride-monohydrate, H₂-1,2-dpheddp·2HCl·1H₂O was separated by filtration and refined with solution water : ethanol = 1:2. Yield: 4.00 g (43.83 %). *Anal.* Calcd. for H₂-1,2-dpheddp·2HCl·1H₂O = C₂₀H₂₈Cl₂N₂O₅ (Mr = 456.352): C, 52.63; H, 6.40; N, 6.14. Found: C, 52.88; H, 6.70; N, 6.08.

2.2.3. Preparation of *s-cis*-dichlorido-(*meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate)-platinum(IV), *s-cis*-[Pt(1,2-dpheddp)Cl₂]

Potassium-hexachloridoplatinate(IV) (0.2 g, 0.411 mmol) was dissolved in 10 cm³ water on a steam bath and 1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid (0.1876 g, 0.411 mmol) was added. The reaction mixture was heated for 12 hours and during this period 10 cm³ of LiOH water solution (0.0394 g, 1.65 mmol) was added in small portions and the solution was filtered and evaporated to small volume. The orange precipitate of *s-cis*-[Pt(1,2-dpheddp)Cl₂] was separated by filtration, washed with cold water and air-dried. Yield: 0.095 g. (37,2 %). *Anal.* Calc. for *s-cis*-[Pt(1,2-dpheddp)Cl₂] = C₂₀H₂₆Cl₂N₂O₄Pt (Mr = 620,40): C, 38.72; H, 3.57; N, 4.52. Found: C, 38.38; H, 3.81; N, 4.61.

2.3. *In vitro* cytotoxicity studies

2.3.1. Preparation of drug solutions

Platinum complexes were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) at a concentration of 20 mM and filtered through a 0.22 mm Millipore filter. These stock solutions were diluted in culture medium immediately before use. MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide was dissolved (5 mg/ml) in a phosphate buffer saline having a pH of 7.2, and filtered through the 0.22 mm Millipore filter before use. All reagents were purchased from Sigma Chemicals

2.3.2. Cell lines

The mouse breast tumor cell line 4T1 and mouse malignant melanoma cell line B16F1 were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). The cells were maintained

in in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 IU/ml penicillin G and 100 mg/ml streptomycin.

2.3.3. Assessment of Cytotoxicity

Cytotoxic effects of Pt and Pd complexes and cisplatin on 4T1 and B16F1 cell lines were determined using MTT colorimetric technique [26]. The cells were diluted with medium to 5×10^4 cells/ml and aliquots (5×10^3 cells/100 μ l) were placed in individual wells in 96-multiplates. About 24h later, after the cell adherence, each well received 100 μ l of either Pt, Pd, cisplatin which had been serially diluted 2-fold in medium to concentrations ranging from 500 μ M to 3.9 μ M. Cells were incubated at 37°C in a 5% CO₂ incubator for 72h. After incubation supernatant was removed, fresh medium and MTT (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide) solution (5 mg/ml in phosphate buffered saline) were added to each well and the plates were incubated for additional 4 h. Upon incubation the cell-free supernatants were suctioned off, and DMSO (150 μ l) and glycin buffer were added to dissolve the crystals. The plates were shaken for 10 min. The optical density of each well was determined at 595 nm using microplate multimode detector Zenyth 3100. The percentage of cytotoxicity was calculated using the formula: % cytotoxicity = $100 - ((TS - BG0) - E) / (TS - BG0) \times 100$, where „BG0” is for background of medium alone, „TS” is for total viability/spontaneous death of untreated target cells, and „E” is for experimental well.

3. Results and discussion

The *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamin-*N,N'*-di-3-propanoate ligand was obtained in reaction between 1,2-diphenyl-ethylenediamine and 3-chloro-propanoic acid (Fig. 2). Three

geometrical isomers of 1,2-dpheddp-Pt(IV) complex with two identical monodentate ligands are theoretically possible, *s-cis*, *uns-cis* and *trans* (Fig. 1.). In reaction between $K_2[PtCl_6]$ with H_2 -1,2-dpheddp ligand only one isomer of neutral octahedral 1,2-dpheddp-Pt(IV) complex, *s-cis*-dichlorido-(*meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate)platinum(IV), *s-cis*-[Pt(1,2-dpheddp)Cl₂], with tetradentate coordination of the 1,2-dpheddp ligand was obtained. The complex is slightly soluble in water and, unfortunately, almost insoluble in organic solvents.

3.1. Infrared Spectra

As it was demonstrated for metal aminocarboxylic acid complexes [27,28], the asymmetric stretching frequency of the carboxylate groups of the five-membered [27] rings lies at higher energy than the corresponding frequency of the six-membered chelate rings [28]. Later, this was supported by Neal and Rose [28] and Douglas *et al* [30,31] who found that edta-type hexadentate complexes with mixed and equivalent (two five- and six-membered) carboxylate arms, such as *trans*(O₅)-[M(*S,S*-edds)]⁻ (M = Co(III) or Cr(III); *S,S*-edds = *S,S*-ethylenediamine-*N,N'*-disuccinic ion) [29-31] and *trans*(O₅)-[M(eddda)]⁻ (eddadp = ethylenediamine-*N,N'*-diacetato-*N,N'*-di-3-propionato ion) [30,31] exhibited two very strong and well-separated bands in the asymmetric stretching carboxylate frequency region. The bands were assigned to the carbonyl stretching vibrations of the five-membered rings at higher energy and six-membered rings at lower energy.

The isolated Pt(IV) and Pd(II) complexes do not show any well resolved doublets in the asymmetric CO stretching region (at 1618 cm⁻¹ and 1610 cm⁻¹ for Pt(IV) and at 1643 cm⁻¹ and 1580 cm⁻¹ for Pd(II) complex; Table 1, and mentioned doublets lie at lower energy than the corresponding bands of five-membered chelate rings [30,32]. The lack of absorption between 1700-1750 cm⁻¹ indicates that the both carboxyl groups of the 1,2-dpheddp ligand are

coordinated to the central platinum(IV) ion. The prepared ligand, *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid, has absorption bands in the same asymmetric CO stretching region between 1700-1750 cm^{-1} (1754 cm^{-1} and 1732 cm^{-1} , Table 1) suggesting some small differences in energies of COO^- groups.

3.2. ^1H and ^{13}C NMR Spectra

The resonance frequency assignments are summarized in Table 4.

The NMR spectra of the synthesized *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine (1,2-dphen) are recorded in CDCl_3 and for its *N*-derivative, *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid (H_2 -1,2-dpheddp) in D_2O . In spite of low solubility in water and other common organic solvents of the *s-cis*-dichlorido-(*meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate)platinum(IV) complex, *s-cis*-[Pt(1,2-dpheddp) Cl_2], we successfully recorded its ^1H and ^{13}C NMR spectra in D_2O .

The ^1H and ^{13}C NMR spectra in heavy water solution of the prepared [Pt(1,2-dpheddp) Cl_2] complex reveals *s-cis* geometry (Fig. 1.).

The ^1H and ^{13}C NMR spectral peaks of both prepared compounds (a and b), given in Fig. x, are compatible to their molecular structures (Table 2). The resonances of hydrogen and carbon atoms arising from the ethylenediamine chain and phenyl groups in 1,2-dphen and H_2 -1,2-dpheddp were found at similar positions but the signals are slightly shifted to the higher positions in H_2 -1,2-dpheddp compound as a due to the presence of residue of propanoic acid (Table 2). The lack of the NH hydrogen peak in ^1H NMR spectrum of H_2 -1,2-dpheddp could be explained with fast exchange of hydrogen atoms with deuterium atoms from D_2O .

The signals positions of the hydrogen and carbon in NMR spectra of synthesized [Pt(1,2-dpheddp) Cl_2] complex are also expected and confirm the coordination of the 1,2-

-dpheddp ligand to the Pt(IV) central ion. But the two signals from ethylenediamine carbon atoms and, also, the two signals from carbon arising from COO⁻ groups (Table 2) suggest small differences in energies of these atoms. Those differences in energies of mentioned carbon atoms could be explained by the coordination of the 1,2-dpheddp ligand to the Pt(IV) central ion which leads the voluminous phenyl groups in the neighborhood in the contrary to their positions in a free H₂-1,2-dpheddp ligand (Fig. x, compound b). The model analysis suggests the almost parallel orientation of the phenyl groups. Therefore, the diamine ring conformation becomes rigid forcing the carbon atoms to be different in energies.

3.3. *In vitro* cytotoxic activity

In order to investigate *in vitro* cytotoxic potential of platinum and palladium complexes various concentrations of complexes were added to target cells and the cell number was determined after 72h by MTT assay. The complexes showed a dose dependent cytotoxic effect toward both cell lines. (figures). Palladium(II) complex showed higher cytotoxic effect in compare to platinum(IV) complex on both cell lines. Both complexes were less active than cisplatin, exception were the concentrations above 62.5 μM of platinum complex on B16F1 cell line. Taking in consideration standard deviations, IC₅₀ values for the B16F1 cell line were approximately the same (Pt-223.38±25.12, Pd-157.51±14.09, cisplatin-186.63±28.11). Palladium(II) complex showed significantly higher cytotoxic effect on 4T1 cells (IC₅₀-31.94±13.38) in compare to platinum(IV) complex (IC₅₀-144.69±55.3) and cisplatin (IC₅₀-17.34±2.25).

4. Conclusion

On the basis of the elemental analyses, infrared, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy the *s-cis* geometry of the dichlorido-(*meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate)platinum(IV), *trans*-[Pt(1,2-dpheddp)Cl₂] prepared by the direct reaction of K₂[PtCl₆] and H₂-1,2-dpheddp in water solution, was proposed. In this paper we also report syntheses and characterization of tetradentate 1,2-dpheddp ligand. Palladium(II) complex showed higher cytotoxic effect in compare to platinum(IV) complex on both cell lines. Both complexes were less active than cisplatin.

Acknowledgment

This work was supported by Ministry of Science and Environment of Republic Serbia, Project No 172016. We are grateful to Ms Snežana Trifunović for the elemental analyses.

References

- [1] a) G.R. Brubaker, D.P. Schaefer, J.H. Worrell, *Coord. Chem. Rev.* 7 (1971) 161.
b) D.J. Radanović, *Coord. Chem. Rev.* 54 (1984) 159.
c) T.J. Sabo, S.R. Grgurić, S.R. Trifunović, *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem.*, (Review) 32 (2002) 1661.
- [2] V.M. Djinić, T.J. Sabo, *J. Serb. Chem. Soc.* 67 (2002) 367.
- [3] J.I. Legg, D.W. Cooke, *Inorg. Chem.* 4 (1965) 1576.
- [4] N. Sakagami, T. Yasui, H. Kawaguchi, T. Ama, S. Kaizaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 67 (1994) 680.

- [5] J.I. Legg, D.W. Cooke, B.E. Douglas, *Inorg.Chem.* 6 (1967) 700.
- [6] V.M. Djinović, S.R. Grgurić, Xu Xing-You, T.J. Sabo, *J. Coord. Chem.* 53 (2001) 355.
- [7] S.R. Grgurić, S.R. Trifunović, T.J. Sabo, *J. Serb. Chem. Soc.* 63 (1998) 669.
- [8] Ž.Lj. Tešić, T.J. Sabo, S.R. Trifunović, D. M. Milojković, *J. Chromatography A* 874 (1999) 297.
- [9] N. Petranović, D. Minić, T.J. Sabo, D.J. Djoković, *J. Therm. Anal. Co.* 59 (2000) 807.
- [10] S.R. Grgurić, T.J. Sabo, *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem.* 29 (1999) 1567.
- [11.] G.N. Kaludjerović, T.J. Sabo, *Polyhedron* 21 (2002) 2277.
- [12] V.M. Djinović, G.A. Bogdanović, S. Novaković, T.J. Sabo, *Synth. React. Inorg. Met.- Org. Chem.* 32 (2002) 1085.
- [13] G.N. Kaludjerović, G.A. Bogdanović, T. J. Sabo, *J. Coord. Chem.* 55 (2002) 817.
- [14] P.J. Garnett, D.W. Watts, *Inorg. Chim. Acta* 8 (1974) 293.
- [15] M. Okabayashi, K. Igi, J. Hidaka, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 52 (1979) 753.
- [16] T.J. Sabo, S.R. Grgurić, D.D. Minić, S.R. Trifunović, *J. Coord. Chem.* 44 (1998) 47.
- [17] B. Rosenberg, L. Van Camp, J.E. Trosko, V.H. Mansour, *Nature (London)* 222 (1969) 385.
- [18] B. Rosenberg, L. Van Camp, *Cancer Res.* 304 (1970) 1799.
- [19] E. Wong, C.M. Giandomenico, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2451.
- [20] L.R. Kelland, in: B. Lippert (Ed), *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, VHCA/Wiley-VCH, Weinheim pp. (1999) 497.
- [21] G. Natile, M. Coluccia, *Coord. Chem. Rev.* 383 (2001) 216.
- [22] J.N. Jolley, A.I. Yanovsky, L.R. Kelland, K. B. Nolan, *J. Inorg. Biochem.* 83 (2001)

- [23] T.J. Sabo, G.N. Kaludjerović, D. Poleti, Lj. Karanović, A. Boccarelli, F. Cannito, G. Natile, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 1378.
- [24] C. Liu, *Inorg. Chem.* 3 (1964) 680.
- [25] S. Tripett *J. Chem. Soc.* (1957) 4407.
- [26] T. Mosmann Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* **65(1-2)** (1983) 55
- [26] K. Nakamoto, Y. Morimoto, A. E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.* 83 (1961) 4528.
- [27] M.B. Čelap, S.R. Niketić, T.J. Janjić, V.N. Nikolić, *Inorg. Chem.* 6 (1967) 2063.
- [28] J.A. Neal, N.J. Rose, *Inorg. Chem.* 7 (1968) 2405; 12 (1973) 1226.
- [29] D.J. Radanović, B.E. Douglas, *J. Coord. Chem.* 4 (1975) 191.
- [30] K.D. Gailey, D.J. Radanović, M.I. Djuran, B.E. Douglas, *J. Coord. Chem.* 8 (1978) 161.
- [31] M.B. Čelap, A.R. Niketić, T.J. Janjić, V.N. Nikolić, *Inorg. Chem.* 6 (1967) 2063.
- [32] T.G. Appleton, J.R. Hall, M.A. Williams, *Inorg. Chim. Acta* 61 (1982) 51.
- [33] V.M. Djinović, G.A. Bogdanović, S. Novaković, T.J. Sabo, *J. Coord. Chem.* 8 (2004) 535.
- [34] V.M. Djinović, L. Mančić, G. Bogdanović, P. Vulić, G. Del Rosario, T.J. Sabo, O.B. Milošević, *Journal of Materials Research* 20 (2005) 102.

Table 1

The most important IR bands (cm^{-1}) of some Pt(IV) complexes with linear O-N-N-O ligands

Compound	ν_{as} (COOH)	ν_{as} (COO ⁻)	Ref.
<i>trans</i> -[Pt(H ₂ edta)Cl ₂]	1775; 1764	1691; 1678	32
<i>uns-cis</i> -[Pt(H ₂ edta)Cl ₂]	1758; 1742	1692; 1685	32
<i>s-cis</i> -[Pt(H ₂ edta)Cl ₂]	1753; 1741	1725; 1716	32
<i>trans</i> -[Pt(eddp)Cl ₂]·H ₂ O	-	1637; 1630	13
<i>trans</i> -[Pt(1,3-pdda)Cl ₂]·H ₂ O	-	1696; 1660	33
<i>trans</i> -[Pt(pdda)Br ₂]·H ₂ O	-	1684; 1648	34
<i>s-cis</i> -[Pt(1,2-dpheddp)Cl ₂]	-	1618; 1610	this work
H ₂ -1,2-dpheddp	1754; 1732	-	this work

Table 2 Characteristic ¹H and ¹³C NMR shifts of 1,2-dphen, H₂-1,2-dpheddp and *s-cis*-[Pt(1,2-dpheddp)Cl₂]

	Group	1,2-dphen	H ₂ -1,2-dpheddp	<i>s-cis</i> -[Pt(1,2-dpheddp)Cl ₂]
¹ H	NH	1.43 (s)	-	-
	CH	4.02 (s)	4.78 (s)	4.82 (s)
	Ph	7.33 (m)	7.70 (m)	7.3 (m)
	N-CH ₂ -CH ₂	-	2.93 (m)	3.05 (m)
	CH ₂ CH ₂ COOH	-	2.46 (m)	2.70 (m)
	¹³ C	CH	62.8	66.33
Ph		132.97	134.98;133.71;131.98;131.28	128.3;128.3;126.4;137.2
CH ₂ -COOH		-	178.74	172.66; 172.07
N-CH ₂ -CH ₂		-	45.43	18.3; 42.2
CH ₂ CH ₂ COOH		-	32.70	37.1

s-singlet, m-multiplet

Fig. 1. Possible geometrical isomers of $[\text{Pt}(\text{eddp})\text{X}_2]$ complex (X = monodentate ligand): *s-cis* (I), *uns-cis* (II) and *trans* (III)

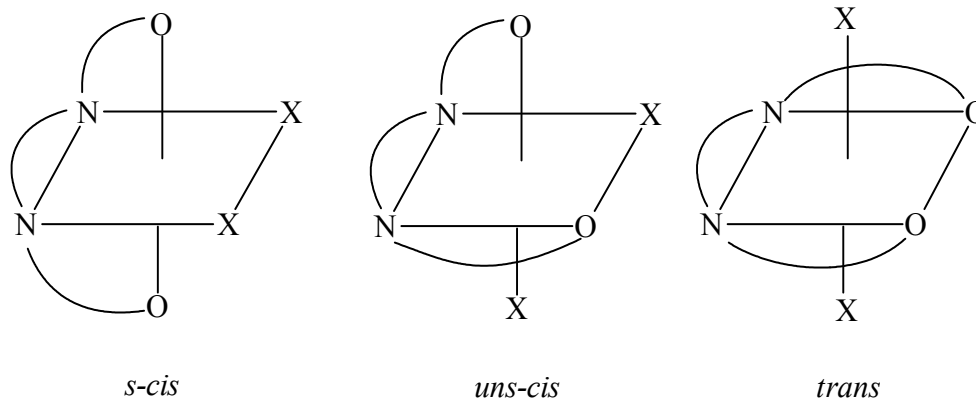


Fig. 2. Reaction pathways in synthesis of *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propionic acid

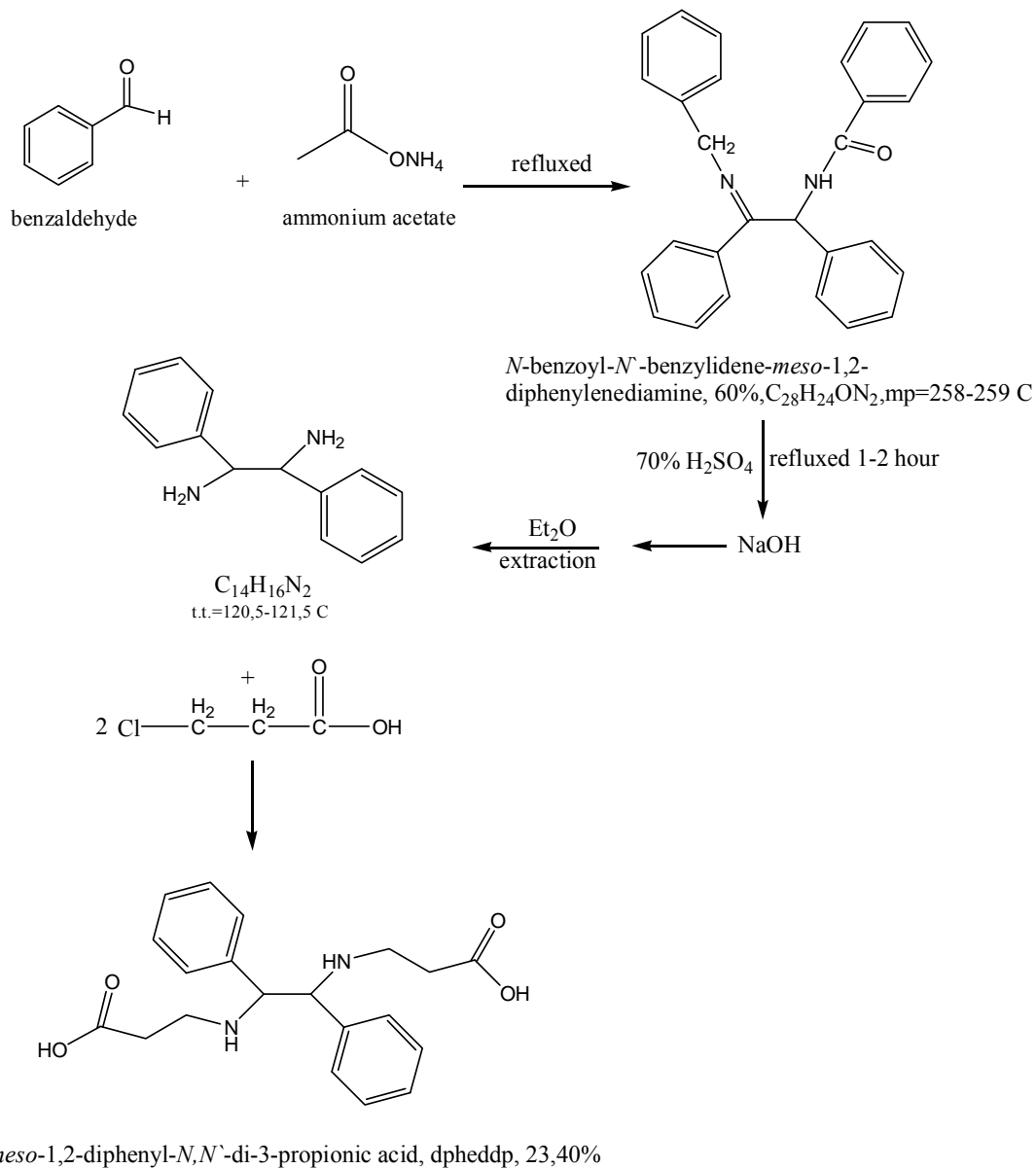


Fig. 3. Cytotoxicity of investigated complexes on mouse breast tumor cell line 4T1 after 72 hours of growth in the presence of tested complexes. Results are means of three experiments.

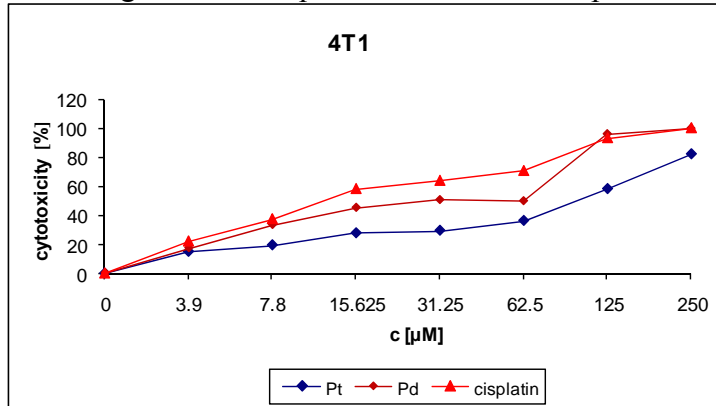


Fig. 4. Cytotoxicity of investigated complexes on mouse malignant melanoma cell line B16F1 after 72 hours of growth in the presence of tested complexes. Results are means of three experiments.

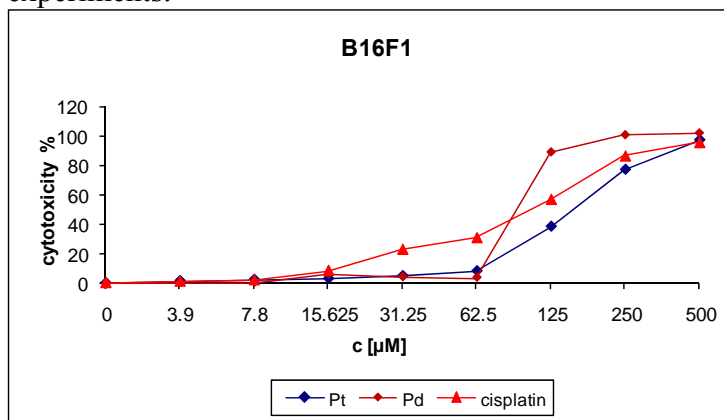


Fig. 5. IC_{50} (μM) for the 72 h of action of investigated compounds on 4T1 cells, determined by MTT assay

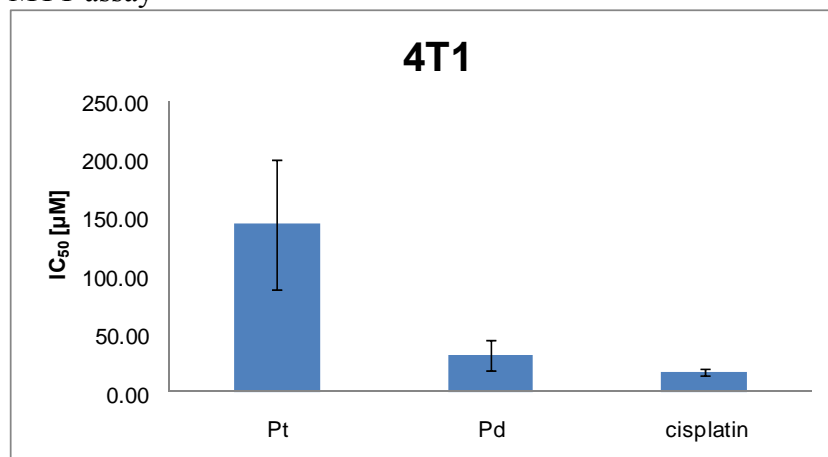


Fig. 6. IC_{50} (μM) for the 72 h of action of investigated compounds on B16F1 cells, determined by MTT assay

