

Sinteza biološki aktivnih cikličkih derivata 5(6)-amino supstituiranih benzimidazola

Beč, Anja

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:979198>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



**SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEU ILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ**

Anja Be

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2016.

**SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEU ILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ**

Anja Be

**SINTEZA BIOLOŠKI AKTIVNIH CIKLI KIH DERIVATA
5(6)-AMINO SUPSTITUIRANIH BENZIMIDAZOLA**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Marijana Hranjec, FKIT

Članovi povjerenstva: izv. prof. dr. sc. Marijana Hranjec, FKIT

dr. sc. Nataša Perin, poslijedoktorandica FKIT-a

dr. sc. Lidija Fura , viši predavač FKIT-a

Zagreb, rujna 2016.

Zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Marijani Hranjec na predloženoj temi, kao i savjetima i pomoći koju mi je pružila tijekom izrade i pisanja ovog rada.

Također se zahvaljujem znanstvenoj novakinji dr. sc. Nataši Perin na savjetima i stručnom vodstvu tijekom izrade eksperimentalnog dijela.

SAŽETAK

U okviru ovog rada provedena je sinteza acikli kog 2-benzimidazolil supstituiranog akrilonitrila **6** te njegovog cikli kog analoga benzimidazo[1,2-*a*]kinolina **7**. Spojevi su pripremljeni klasičnim reakcijama organske sinteze te aminacijom potpomognutom mikrovalnim zračenjem. Benzimidazolil-supstituirani akrilonitril **6** pripremljen iz 2-cijanometil-5(6)-piperidinilbenzimidazola **4** i *o*-klorbenzaldehida **5**, dok je benzimidazo[1,2-*a*]kinolin **7** pripremljen termičkom ciklizacijom akrilonitrila **6** u sulfolanu pri čemu je dobivena smjesa dva regioizomera. Strukture pripremljenih spojeva potvrđene su ¹H i ¹³C NMR spektroskopijom. Spojevi **3-7** okarakterizirani su UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom.

Ključne riječi: benzimidazoli, benzimidazo[1,2-*a*]kinolini, mikrovalna sinteza, ¹H i ¹³C NMR, UV/Vis i fluorimetrijska spektroskopija

SUMMARY

This work presents the synthesis of novel 2-benzimidazolyl-substituted acrylonitrile **6** and its cyclic analog, benzimidazo[1,2-*b*]quinoline **7**. Novel compounds were prepared by using a classical reactions of organic chemistry and microwave assisted amination. Benzimidazolyl-substituted acrylonitrile **6** was prepared in reaction of 2-cyanomethyl-5(6)-piperidinylbenzimidazole **4** with *o*-chlorobenzaldehyde **5**. Benzimidazo[1,2-*b*]quinoline **7** was prepared by thermal cyclization of acrylonitrile **6** in sulfolane as a mixture of two regioisomers. The structures of all compounds were determined by means of ^1H and ^{13}C NMR and UV/Vis and fluorimetric spectroscopy.

Key words: benzimidazoles, benimidazo[1,2-*b*]quinolines, microwave synthesis, ^1H and ^{13}C NMR, UV/Vis and fluorescence spectroscopy.

Ovaj rad izra en je na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost *Synthesis and cytostatic evaluations of novel nitrogen heterocycles library* (5596).

Sadržaj rada

1. UVOD.....	1
2. OP I DIO	3
2.1. Biološka aktivnost i sinteza stirlnih derivata benzimidazola.....	4
2.1. Biološka aktivnost i sinteza akrilonitrilnih derivata benzimidazola.....	14
2.3. Sinteze potpomognute mikrovalovima	19
3. REZULTATI I RASPRAVA	22
3.1. Cilj rada.....	23
3.2.1. <i>UV/Vis spektroskopija</i>	30
3.2.2. <i>Fluorimetrijska spektroskopija</i>	31
4. EKSPERIMENTALNI DIO	33
5. ZAKLJU AK	39
6. LITERATURA.....	41
7. PRILOZI.....	44
8. ŽIVOTOPIS	52

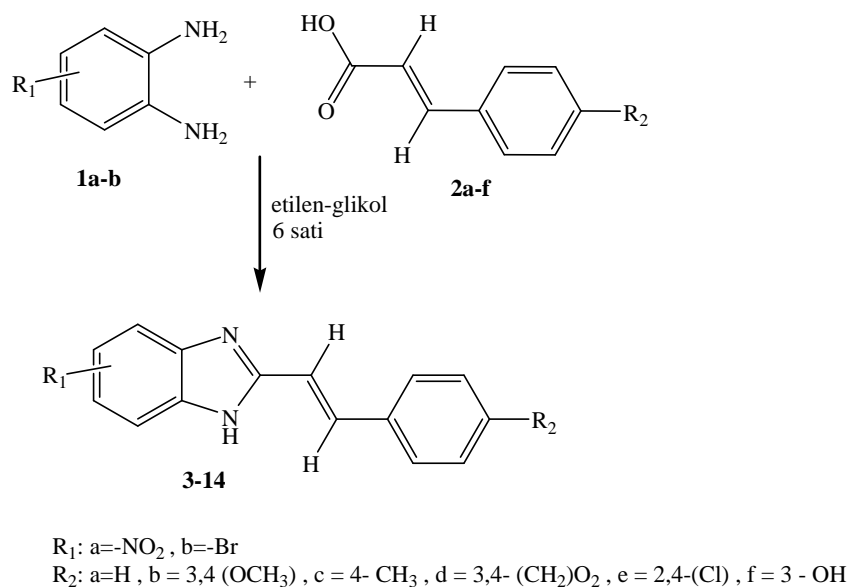
1. UVOD

U zadnjih nekoliko godina izrazito je povećan interes za pripremu potencijalnih biološki aktivnih heteroaromatskih organskih spojeva. Benzimidazoli su važna grupa heterocilkičkih spojeva, koji se sastoje od imidazolskog prstena, poznate farmakoforne grupe kondenzirane na benzensku jezgru. Ovi spojevi predstavljaju glavnu strukturnu okosnicu brojnih sintetskih medicinskih i biokemijskih supstanci zbog svojih kemijskih i farmakoloških značajki što im pruža razna biološka svojstva kao što su antitumorska, antivirusna, antibakterijska, antifungalna, antihistaminska i antiepileptička svojstva. Također, oni pokazuju strukturnu sličnost sa spojevima prirodnog podrijetla kao što su purini te stoga imaju sposobnost interakcije s važnim biomolekulama i proteinima. Ciklički derivati benzimidazola imaju planarnu strukturu koja im omogućuje interkaliranje između parova baza dvostruke uzvojnice DNA. Interkalativni način vezivanja danas je jedan od najvažnijih u djelovanju antitumorskih lijekova. Zbog njihovih spektroskopskih karakteristika koje proizlaze iz činjenice da takve molekule posjeduju planarni i visoko konjugirani kromofor, važnu primjenu ova grupa spojeva pronalazi u optoelektronici, optičkim laserima, organskim luminoforima i fluorescentnim bojama u tradicionalnoj tekstilnoj industriji i polimerima.

2. OP IDIO

2.1. Biološka aktivnost i sinteza stirilnih derivata benzimidazola

Ramya V.Shingalapur¹ i suradnici sintetizirali su nove 5-(nitro/bromo)-stiril-2-benzimidazole reakcijom ciklokondenzacije 5-(nitro/bromo)-*o*-fenilendiamina s *trans*-cimetnom kiselinom u etilen-glikolu prema Shemi 1.



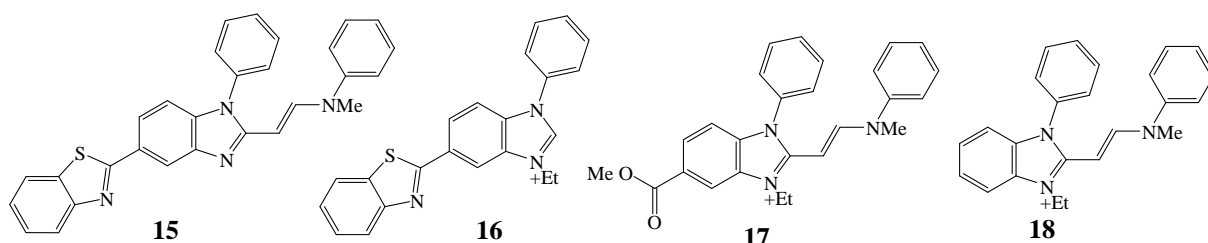
Shema 1.

In vitro metodom ispitana je antituberkulostatska aktivnost na *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇ Rv, antibakterijska aktivnost prema bakterijskim sojevima *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* i *Klebsiella pneumoniae* te antifungalna aktivnost prema sojevima *Candida albicans* i *Aspergillus fumigatus*. Spojevi **7**, **9**, **10**, **11**, **13** pokazuju ja u antituberkuloznu aktivnost, a spojevi **7**, **10**, **12**, **13**, **14** pokazuju u inkovitiju aktivnost pri minimalnoj koncentraciji potrebnoj za inhibiciju rasta mikroorganizama. Strukture navedenih spojeva potvrđene su IR, ¹H, ¹³C i GC-MS spektroskopijom. Prisutnost broma kao supstituenta na aromatskom prstenu znatno povećava aktivnost tih spojeva u odnosu na njihove nitro supstituirane analoge. Moguća poboljšanja u aktivnosti tih spojeva mogu se postići i neznatnom zamjenom supstituenata na osnovnoj benzimidazolskoj jezgri.

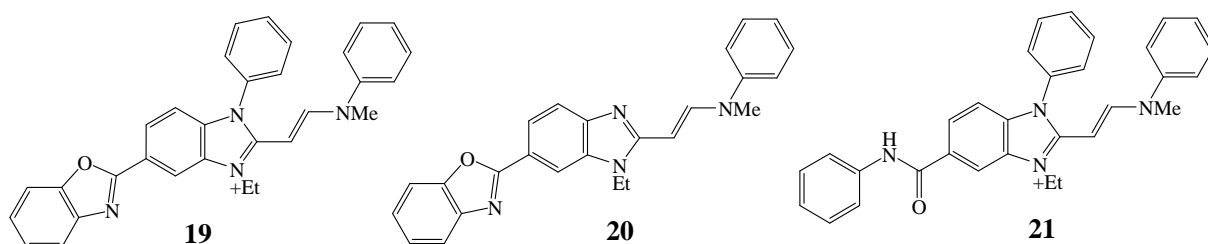
Qi Sun² i suradnici predložili su sintezu biološki aktivnih benzimidazolnih analoga AKT (protein kinaza B) inhibitora-IV koji posjeduje antitumorsku i antivirusnu aktivnost. Spojevi su sintetizirani reakcijom ciklizacije 1,2-arilendiamina s nezasićenim aldehydima uz korištenje ZrCl₄ kao katalizatora. Ispitana je aktivnost prirodnih derivata na stanične linije karcinoma grlišta maternice HeLa, normalne stanice epitela dušnika (NHBE) te djelovanje na

replikaciju parainfluenza virusa 5 u HeLa stanicama i replikaciju unutarstani nih bakterija *Mycobacterium fortuitum* u HeLa stanicama. Zamjena *N*-etil supstituenta na benzimidazolu sa *N*-heksil ili *N*-dodecilnom grupom poveća antivirusnu aktivnost i citotoksičnost prema stanićnim linijama karcinoma, ali nižu toksičnost prema NHBE stanicama te nikakav efekt na *Mycobacterium fortuitum*. Spoj **34** i **35** pokazuju jaču antivirusnu aktivnost prema rekombinantnom parainfluenza virusu 5 izazivaju i ekspresiju enzima luciferaze u HeLa stanicama.

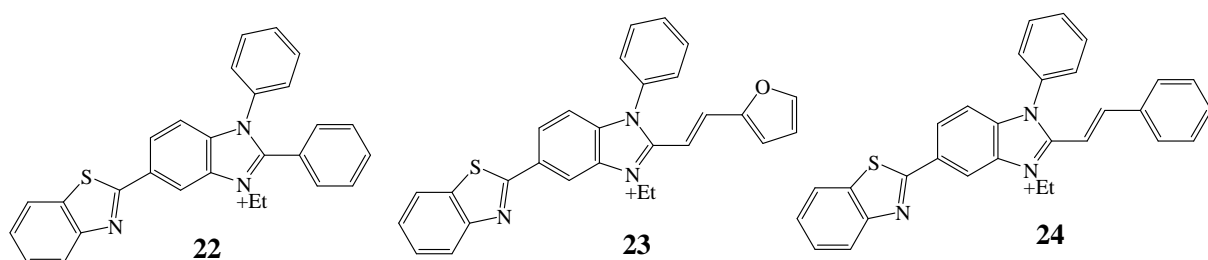
Uklanjanje grupa na C2, N3 i C5 položajima:



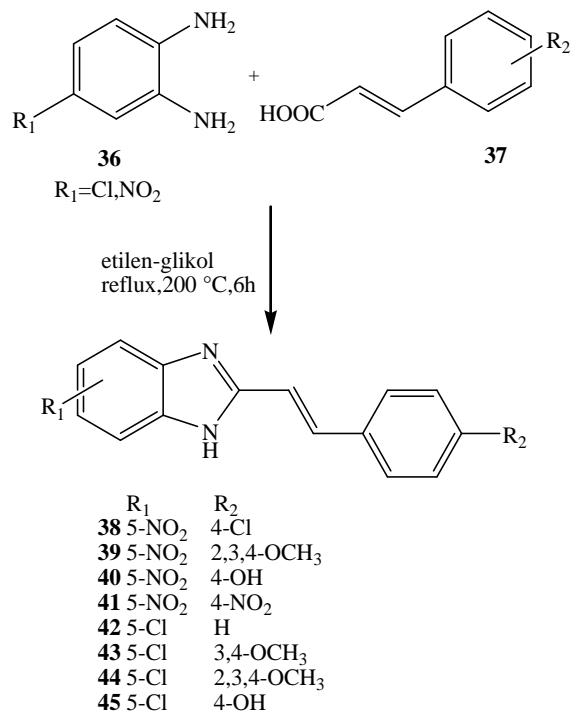
Izmjena na C5 položaju (i uklanjanje na N1 u spoju **20**):



Izmjena na C2 položaju:



U svom istraživanju L. K. Soni i suradnici³ sintetizirali su 5-(nitro/kloro)-2-stiril-benzimidazole prema Shemi 2.

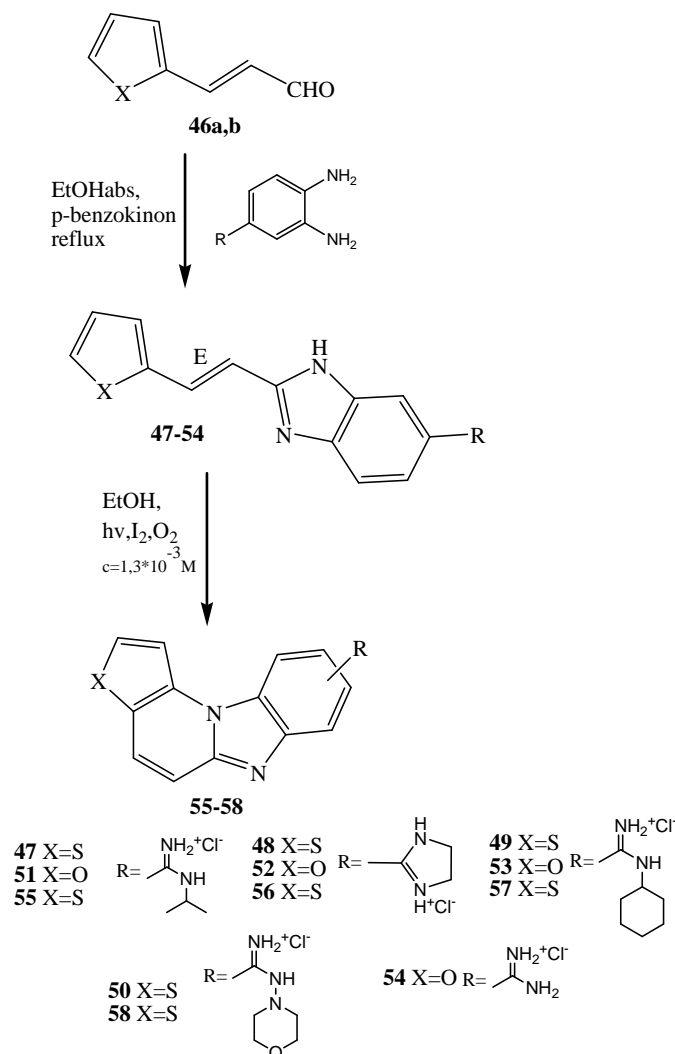


Shema 2.

Ispitana je njihova antibakterijska aktivnost *in vitro* prema bakterijskim sojevima *Staphylococcus aureus* i *E.Coli* te antifungalna aktivnost prema *Candida albicans*. Svi sintetizirani spojevi pokazali su ja e inhibitorno djelovanje na gram negativne bakterije. Spojevi **38**, **39**, **42**, **43** pokazuju ja u inhibiciju pri koncentraciji od 12,5µg/mL. Pri toj koncetraciji spoj **38** pokazuje 82,14%-tnu inhibiciju prema gram pozitivnoj bakteriji *S.aureus* te 80,70%-tnu inhibiciju prema gram negativnoj bakteriji *E.coli*. Pri koncentraciji od 25µg/mL spojevi **38**, **42**, **43**, **44** pokazuju ja u inhibiciju, a spoj **44** pokazuje ak 93,12%-tnu inhibiciju prema *C.albicans*.

M. Hranjec⁴ i suradnici sintetizirali su acikli ke amidino-supstutuirane tienil- i furil-vinilbenzimidazole i njihove cikli ke derivate prema Shemi 3.

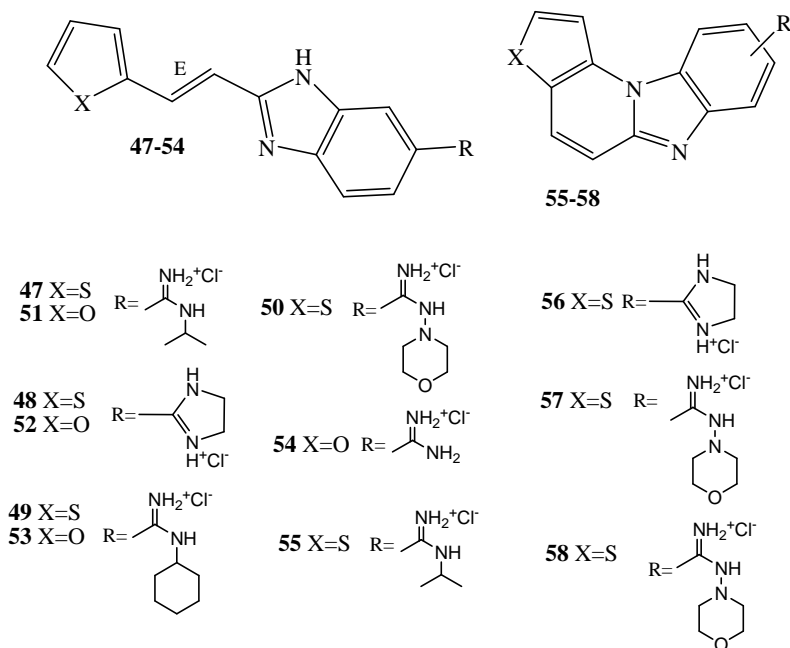
Spojevi **47–54** u obliku hidrokloridnih soli pripravljeni su reakcijom kondenzacije 3-(tiefen-2-il)propenala i 3-(furan-2-il)propenala s amidino-supstutuiranim 1,2-fenilendiaminima i *p*-benzokinonom. Za sintezu je korištena Pinnerova reakcija za sintezu amidina iz cijano-supstutuiranih prekursora u kiselom mediju. Fotokemijskom dehidrociklizacijom acikli kih prekursora u etanolu pripravljeni su odgovaraju i cikli ki derivati, diazaciklopenta[*c*]fluoreni kao smjese dvaju regizomera **47–50**.



Shema 3.

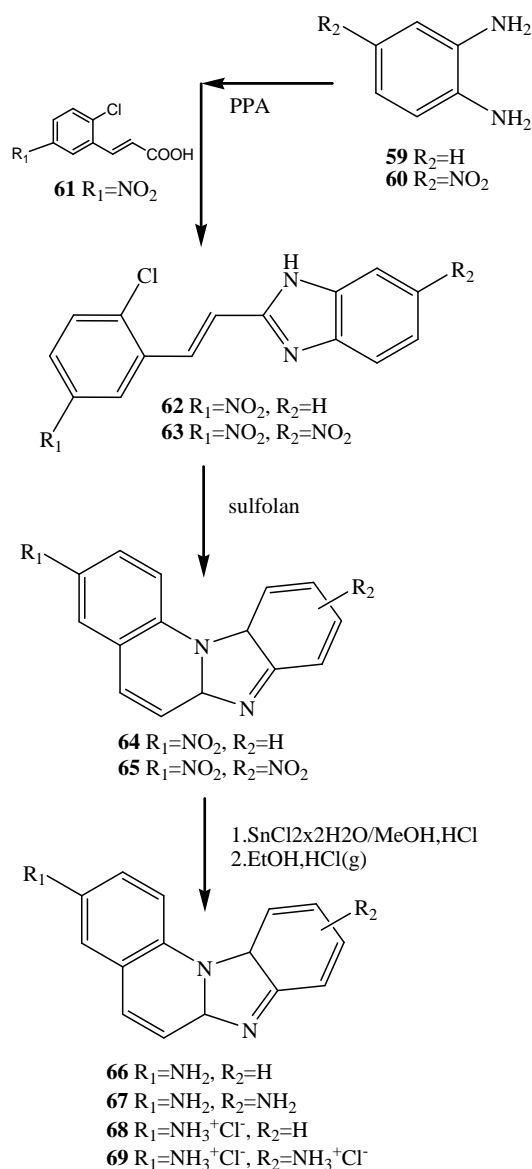
Prire enim spojevima je ispitana antiproliferativna aktivnost na 6 humanih stani nih linija karcinoma posebice stani nih linija karcinoma. Svi ispitani spojevi pokazuju izraženu antitumorsku aktivnost te rastu i inhibitorni efekt, a cikli ki spojevi aktivniji su od acikli kih. Korištenjem spektroskopskih metoda UV/Vis spektroskopije, cirkularnog dikroizma i fluorimetrijske spektroskopije te eksperimenata odre ivanja temperature taljenja, ispitana je interakcija najaktivnijih spojeva s ct-DNK. Na taj na in odre eni su neki od mehanizama biološkog djelovanja najaktivnijih spojeva. Cikli ki derivati **56** i **57** pokazuju pozitivne vrijednosti temperature mekšanja i jaku stabilizaciju DNK te batokromni i hipokromni efekt u UV/Vis spektrima što upu uje na interkalativni na in vezanja u dvostruku uzvojnicu DNK kao glavni mehanizam njihovog biološkog djelovanja. Acikli ki spojevi pokazuju male promjene viskoziteta otopine DNK te umjeren afinitet i slabu termalnu stabilizaciju dvostruke uzvojnice pri emu se oni vežu u mali utor DNK molekule kao "groove-binders-i".

Tako er pokazuju slabu fluorescenciju za razliku od cikli kih analoga. Najaktivniji spoj **56**, usporava stani ni ciklus u G1/M fazi uz stani nu apoptozu u stanicama HeLa i MiaPaCa-2 (karcinom guštera e) što je posljedica interkaliranja u dvostruku uzvojniju DNK. Acikli ki derivati induciraju zastoj S faze, apoptozu i inhibiciju topoizomeraze 1, pri emu su tiofenski derivati aktivniji od onih furanskih.



Slika 2. Struktura spojeva **47–58**

N. Perin⁵ i suradnici proveli su sintezu i biološka ispitivanja novih acikli kih nitro supstituiranih *E*-2-stirilbenzimidazola te cikli kih nitro i amino supstituiranih benzimidazo[1,2-*a*]kinolina sa supstituentima na razli itim položajima kondenziranog tetracikl kog prstena prema Shemi 4. *E*-2-stirilbenzimidazoli sintetizirani su reakcijom ciklokondenzacije iz *o*-fenilendiamina **59–60** u polifosfornoj kiselini (PPA). Acikli ki derivat **62** u reakciji ciklizacije daje smjesu dva regioizomera, a amino supstituirani cikli ki derivati **66–67** pripravljeni su redukcijom sa SnCl₂×2H₂O u smjesi MeOH i HCl-a iz nitro spojeva. Pri re nim spojevima je ispitana antiproliferativna aktivnost na niz stani nih linija karcinoma dok je spoj **69** izabran za ispitivanje interakcije s ct-DNK kako bi se utvrdio mehanizam biološkog djelovanja.



Shema 4.

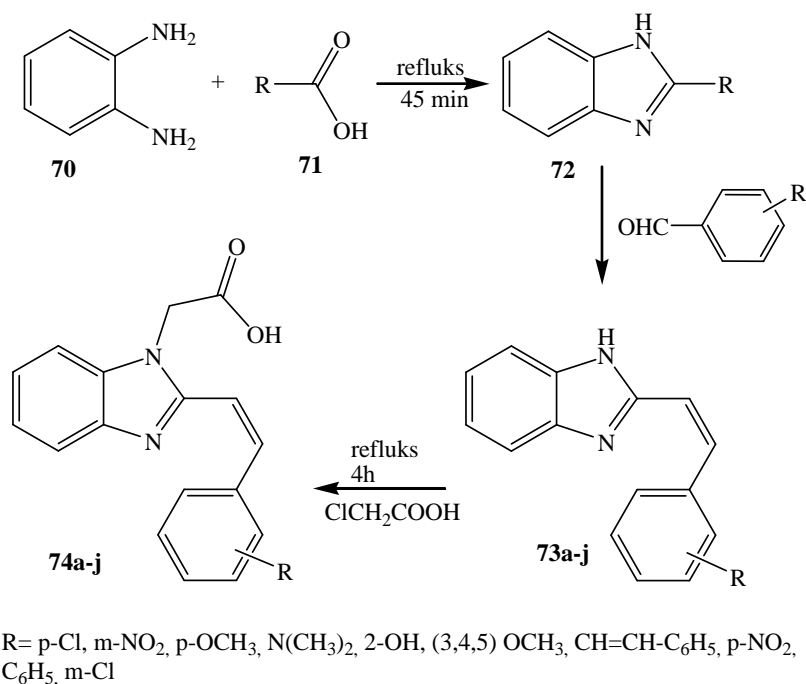
Svi spojevi pokazali su značajno inhibitorno djelovanje na 5 stani nih linija humanih karcinoma u mikromolarnom području koncentracija. Biološka ispitivanja (utjecaj na stani ni ciklus i fluorescencijska mikroskopija) pokazali su da DNK molekula nije primarni cilj njihovog biološkog djelovanja. Viskozimetrijska ispitivanja potvrdila su interkalanje spoja **69** u dvostruku uzvojnici DNK te je utvrđeno da ono uzrokuje produljenje molekule DNK slično standardnom interkalatoru (etidijev bromid, EB). Međutim, eksperimentom termalnog denaturiranja utvrđeno je da spoj **69** ne pokazuje efekt na vrijednost temperature mekšanja DNK što nije uobičajeno za interkalatore. Moguće objašnjenje je djelomično interkalanje zbog amino grupa koje onemogućuju umetanje molekule između parova baza DNK.

Nema značajne razlike u osjetljivosti između stanica, ali spoj **62** pokazuje jaku selektivnost prema HCT 116 stanicama. Diamino supstituiranom derivatu **67**, njegovom dihidrokloridnom analogu **69** i monosupstituiranim analogima ispitan je utjecaj na perturbaciju stanice u ciklusu protozoonom citometrijom. Rezultati potvrđuju da spojevi usporavaju progresiju G1 faze zbog akumulacije stanica u G1 fazi i smanjenja broja stanica u S fazi. Spoju **69** provedena su ispitivanja fluorescencijskom mikroskopijom kako bi se utvrdila unutarstanična distribucija spojeva u stanicama tumora. Prema rezultatima, spoj nije lokaliziran u jezgri, već distribuiran kroz citoplazmu i formira citoplazmatske agregate što ukazuje na njegovu lokalizaciju u lizosomima ili endosomima.

Tupe AP⁶ i suradnici sintetizirali su niz derivata benzimidazola s različitim supstituentima na položaju C-2 i octenom kiselinom (CH₃COOH) na položaju 3 te ispitali njihovu biološku aktivnost (Shema 5). Sinteza je provedena u 3 stupnja:

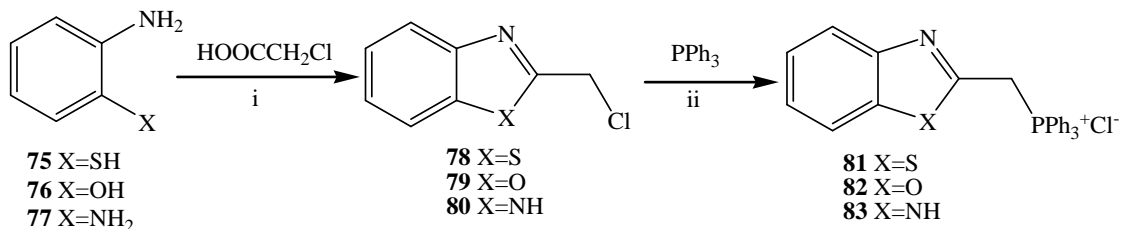
1. Sinteza 2-metil-benzimidazola iz smjese *o*-fenilendiamina dihidroklorida, vode i octene kiseline
2. Sinteza 2-supstituiranih benzimidazola iz 2-metilbenzimidazola i supstituiranih benzaldehida
3. Sinteza benzimidazolnih derivata octene kiseline iz kloroctene kiseline u piridinu i kloroformu.

Strukture novopripremljenih spojeva potvrđene su ¹H, NMR i IR spektroskopijom. 2-supstituirani benzimidazoli pokazali su analgetsku i protuupalnu svojstva *in vitro* metodom inhibicije denaturacije albumina. Svi spojevi podvrgnuti su analgetskom testu u inku pri 50 mg/kg tjelesne težine testom izvijanja kod miševa. Spojevi **74a**, **74b**, **74c** i **74j** pokazuju jaku analgetsku aktivnost s postocima inhibicije denaturacije proteina 78,70%, 62,78%, 67,12% i 67,12%. Spojevi **74a**, **74b**, **74c**, **74h**, **74j** pokazuju jaku protuupalnu aktivnost u usporedbi sa standardom *indometacinom* (IC₅₀=142,17,150,07,147,88,120,72 i 117,58 ppm). Rezultati ovog istraživanja upućuju na mogućnost razvoja i optimiranja ovakvih derivata benzimidazola kao potencijalnih protuupalnih lijekova.



Shema 5.

G. R. Morais⁷ i suradnici sintetizirali su nove stilirne fluorirane benzazolne derivate **87**, **88**, **91** i **94** kao potencijalne amiloidne probe. Kondenzacijom 2-klorometilbenzazola **78**–**80** i *o*-fenilenamina **75**–**77** s kloroocetnom kiselinom pripremljeni su fosfonijevi derivati **81**–**83** prema Shemi 6.

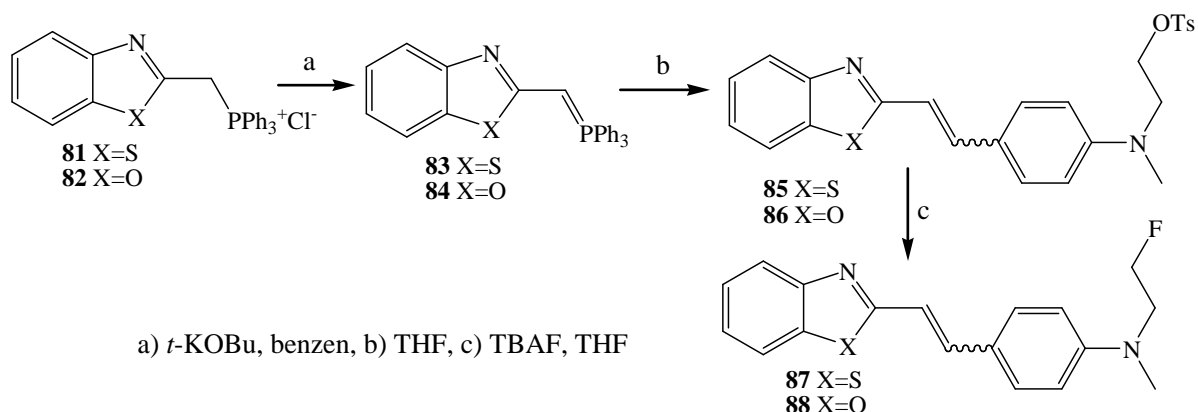


i. CH₃SO₂H/SiO₂ za **78**, PPA za **79** i HCl za **80**; ii. toluen za **81** i **82**, acetonitril za **83**

Shema 6.

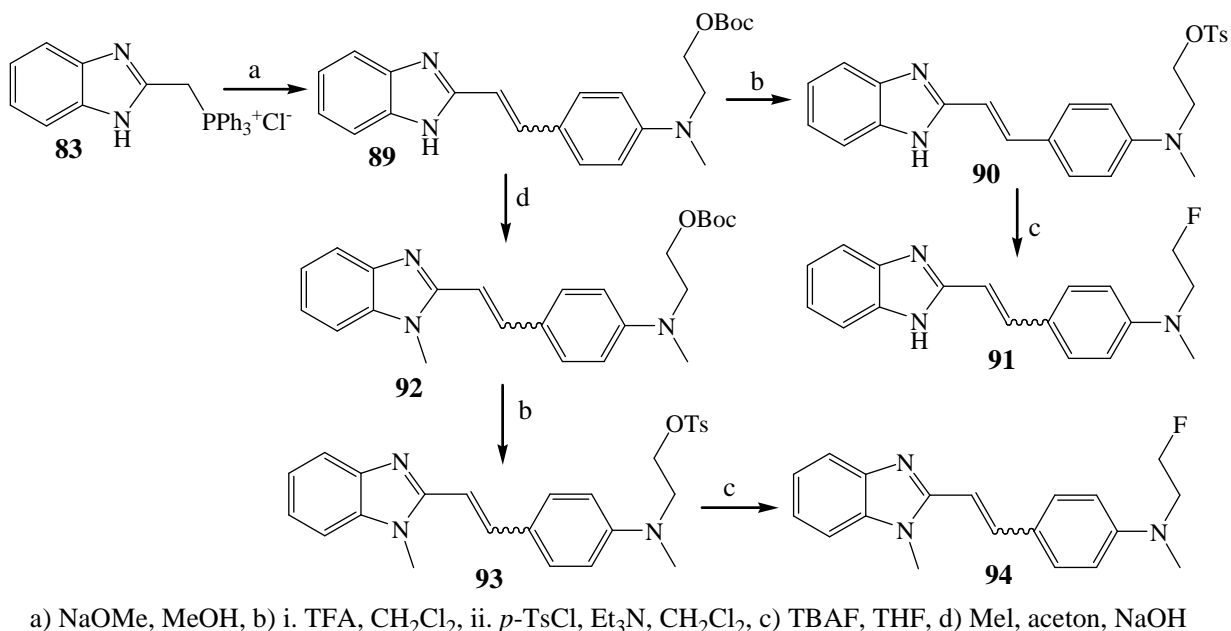
Iz spojeva **81** i **82** dobiveni su fosforani **83** i **84** uz prisutnost kalijeva *tert*-butoksida u benzenu iz kojih su Wittigovom reakcijom pripremljeni stilirni benzotiazol **85** i stilirni benzoksazol **86**. Smjesa ovih izomera dala je konačne spojeve **87** i **88** (Shema 7.). Spoj **91** dobiven je tretiranjem spoja **83** s Boc-zaštićenim benzaldehidom i natrijevim metoksidom u metanolu. Tretiranjem smjese spojeva **89** u metil-jodidu dobiven je spoj **92**, a njegovim *O*-tosiliranjem i uz prisutnost tetrabutilamonijevog fluorida dobiven je spoj **94** (Shema 8.). Konačni spojevi

dobiveni su kao smjesa geometrijskih (konfiguracijskih) izomera pri čemu je *E*-izomer veći iniski produkt.



Shema 7.

Spojevi **87**, **88**, **91** i **94** sklone su fotoizomerizaciji u otopini dok nastavak izomerizacije ovisi o prirodi azolnog prstena. *E*-benzimidazolni stilirni derivati u potpunosti izomeriziraju u *Z*-izomer dok benzotiazolni i benzoksazolni derivati podliježu djelomičnoj izomerizaciji. Iskorištavanjem njihove sposobnosti *Z/E* fotoizomerizacije, spojevi **87**, **88**, **91** i **94** mogu se izolirati te je ispitana njihova mogućnost vezanja na različite tipove amiloidnih vlakana.



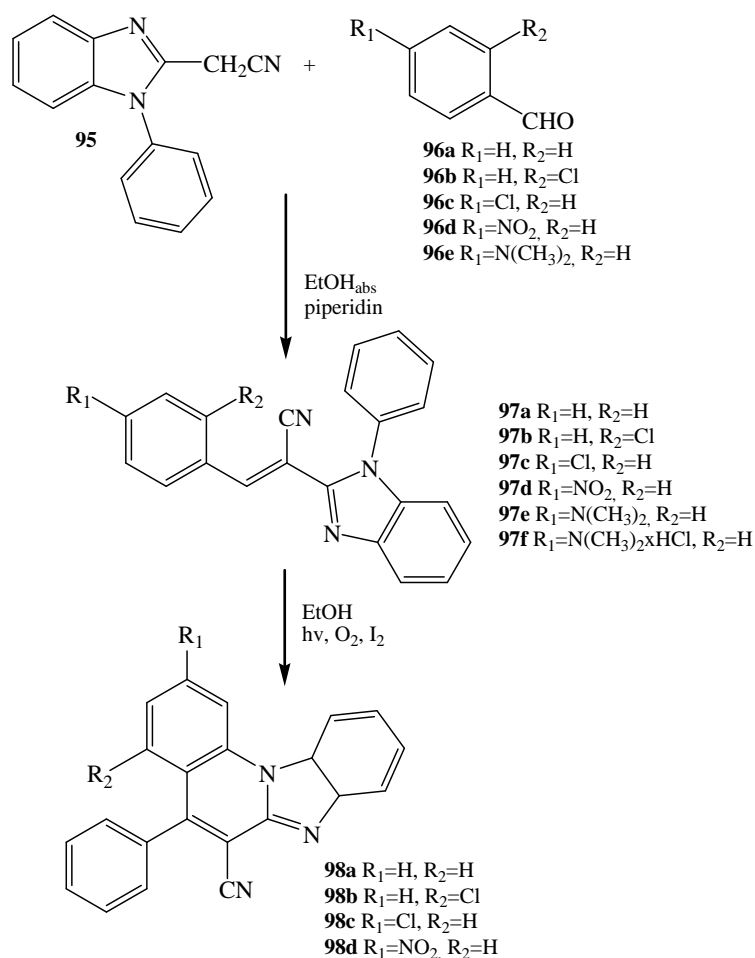
Shema 8.

Ovi spojevi strukturno su slični benzotiazolnoj boji tioflavinu T, pokazuju i interakciju s tipovima vlakana uzrokujući i crveni pomak valnih duljina u spektru te povećanje fluorescencijskog intenziteta.

Rezultati ukazuju na to da spojevi pokazuju slične osobine vezanja na različita vlakna inzulina, α -sinukleina, α -amiloida te prepoznavanja njihove "unakrsne" strukture -plove.

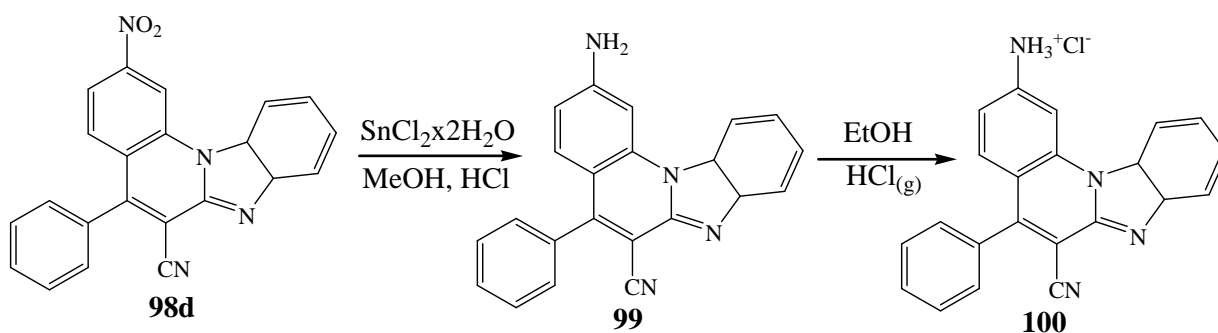
2.1. Biološka aktivnost i sinteza akrilnitrilnih derivata benzimidazola

M. Hranjec⁸ i suradnici sintetizirali su nove acikličke *E*-3-fenil-2-(1-fenilbenzimidazol-2-il)akrilonitrile **97a–97f** i 5-fenil-benzimidazo[1,2-*a*]kinoline **98a–98d** prema shemi 9 i 10. Pripremljeni spojevi okarakterizirani su UV/Vis i fluorescencijskom spektroskopijom u etanolu dok je amino supstituirani 5-fenil-benzimidazo[1,2-*a*]kinolin **99** istražen kao potencijalni kemosenzor u prisutnosti soli metalnih klorida ispitivanjem njegove selektivnosti prema raznim kationima. Aciklički derivati **97a–97f** pripremljeni su ciklokondenzacijom 2-cijanomeil-*N*-fenilbenzimidazola **95** i odgovarajućih aromatskih benzaldehida **96a–96d**. Ciklički benzimidazo[1,2-*a*]kinolini **98a–98d** pripremljeni su reakcijom fotokemijske dehidrociklizacije, a amino-supstituirani spoj **99** redukcijom sa $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ u metanolu i HCl iz nitro-supstituiranog prekursora **98d**.



Shema 9.

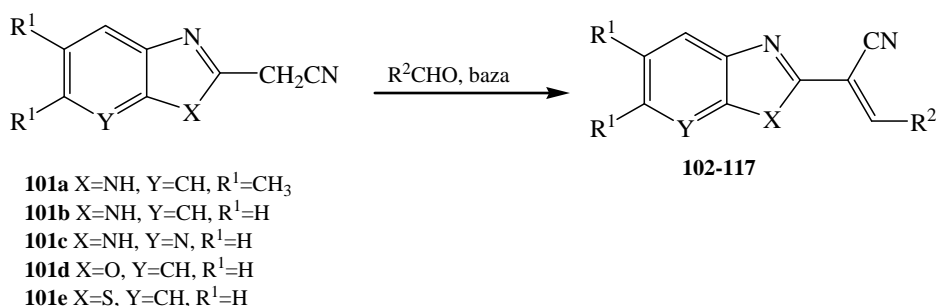
Njegova hidroklorna sol **100** pripremljena je uvojenjem plinovitog HCl-a u etanolnu otopinu.



Shema 10.

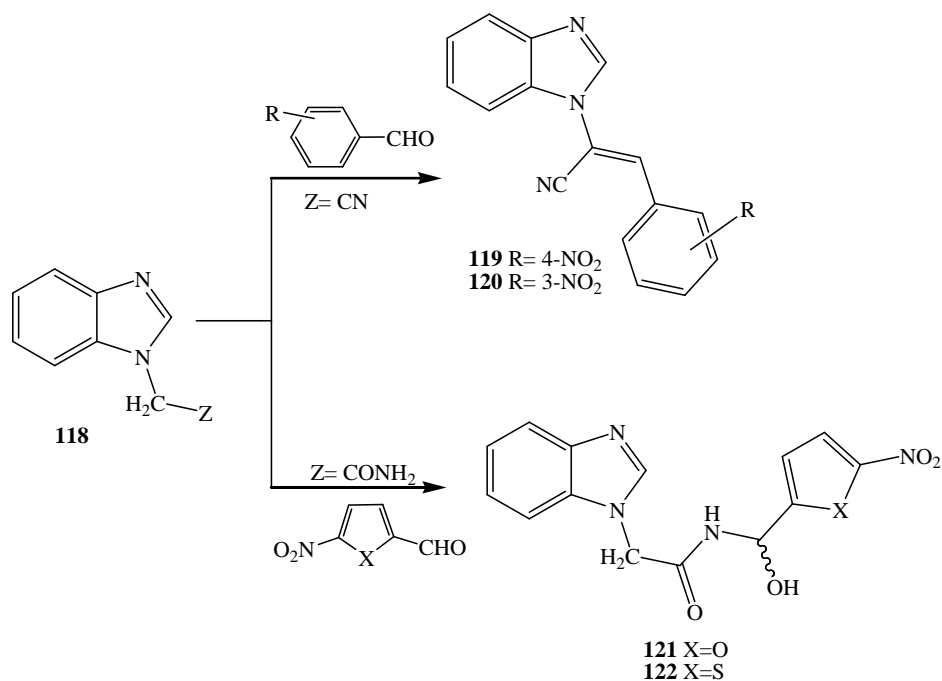
Me u acikli kim derivatima, nitro-supstituirani spoj **97d** pokazuje izraženi batokromni pomak s maksimumom emisije na 561 nm, dok cikliki spoj **98a** pokazuje najizraženiji intenzitet fluorescencije. Prema rezultatima, intenzitet fluorescencije spoja **99** opada u prisutnosti Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Li^+ i Fe^{3+} kationa dok u prisutnosti Zn^{2+} i Ag^+ intenzitet fluorescencije raste. Spoj **99** pokazuje posebnu osjetljivost prema Zn^{2+} kationu što sugerira na mogućnost primjene za detekciju i kvantifikaciju Zn^{2+} u biološkim uzorcima. Iz literaturnih podataka poznato je da je cink jedan od najvažnijih iona prijelaznih metala u ljudskom tijelu, važan za mnoge biološke procese kao što je rad mozga, transkripcija gena, imunološka funkcija i razmnožavanje.

F. Saczewski⁹ i suradnici sintetizirali su nove 2,6-disupstituirane akrilonitrile i derivate (benzimidazol-1-il)acemida (Shema 11. i 12.) i ispitali njihovu antibakterijsku i citotoksičnu aktivnost na 12 staničnih linija humanog karcinoma.



Shema 11.

2-azolil-3-heteroaril-akrilonitrili **102–117** pripremljeni su Knoevenagel-ovom kondenzacijom (azol-2-il)acetonitrila s heteroaromatskim aldehydima. Reakcijom (benzimidazol-1-il)acetonitrila s aromatskim aldehydima kao što su 4-nitro i 3-nitrobenzaldehyd u toluenu i trietilaminu pripremljeni su spojevi **119** i **120**.



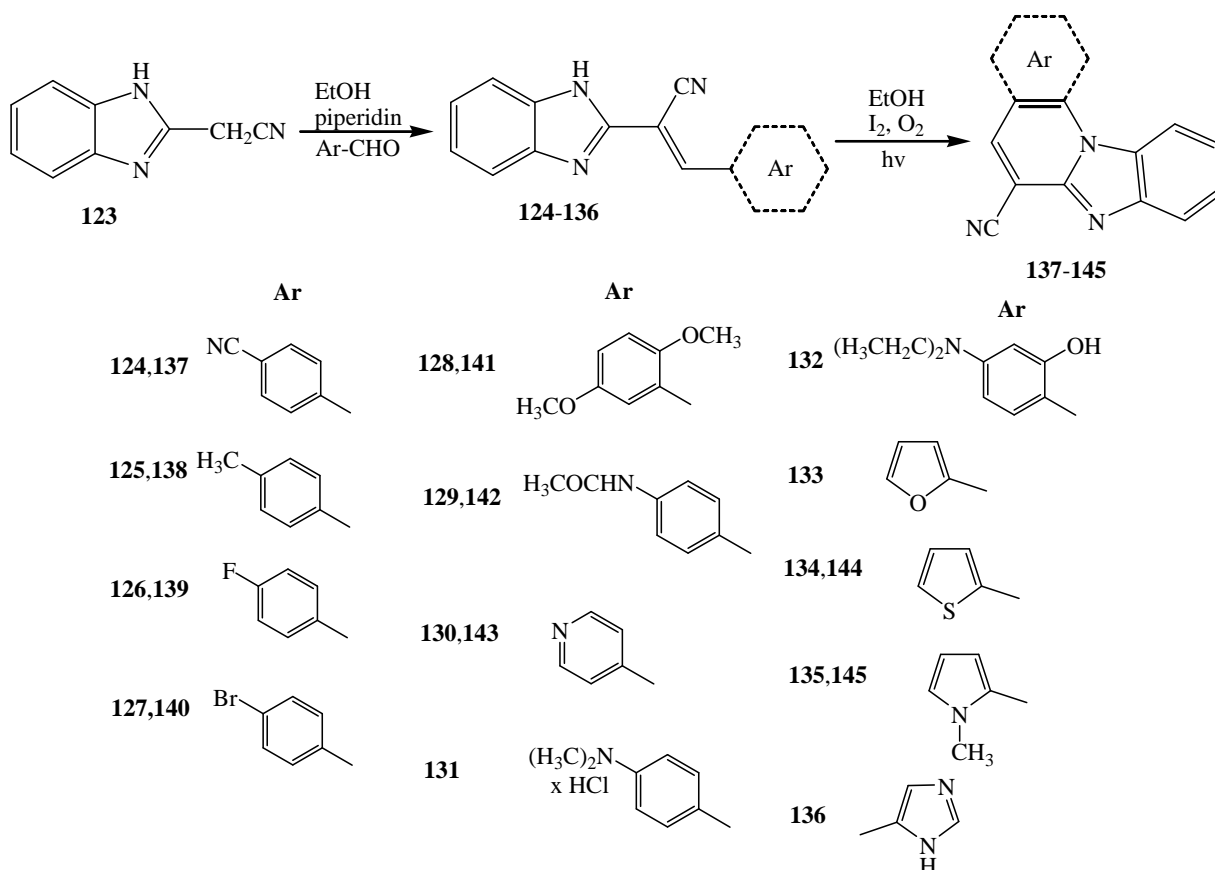
Shema 12.

Utvrđeno je da na temeljnoj strukturi 2-(benzimidazol-2-il)-3-(5-nitrotiofen-2-il)akrilonitrila metilne grupe na petom i šestom položaju benzimidazolnog prstena uzrokuju trostruko povećanje citotoksične aktivnosti. Zamjena nitrotiofenske jezgre s piridinskom smanjuje citotoksičnu aktivnost, kao i zamjena nitro grupe s metoksi grupom. Citotoksična aktivnost je neznatno smanjena zamjenom benzimidazolnog prstena s imidazo[4,5-*b*]piridinskom jezgrom ili benzotiazolnim prstenom dok zamjena benzoksazolom znatno smanjuje aktivnost. (Benzimidazol-1-il)acetamidi pokazali su umjerenu aktivnost. Akrilonitrili imaju poseban utjecaj na stanični ciklus koji dovodi do akumulacije stanica u G2/M i G0/G1 fazi. Ovi rezultati odgovaraju rezultatima ispitivanja antibakterijske aktivnosti. Na citotoksičnu aktivnost može utjecati 1,4-nukleofilna adicija tiola na dvostruku vezu akrilonitrila, redoks aktivnost aromatske nitro grupe ili specifične interakcije sa staničnim receptorima i enzimima.

M. Hranjec¹⁰ i grupa istraživača sintetizirali su 2,3-disupstituirane akrilonitrilne derivate benzimidazola, benzimidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrile i heteroatomske fluorene prema shemi 13. Acikli koji su 2-benzimidazolil supstituirani akrilonitrili **124–136** pripremljeni su kondenzacijom 2-cijanometilbenzimidazola **123** i odgovaraju ih heteroatomskih aldehida u apsolutnom etanolu uz par kapi piperidina.

Benzimidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrili **137–142** i heteroatomski fluoreni **143–145** pripremljeni su fotokemijski, iz aciklikih derivata **124–136**, reakcijom dehidrociklizacije.

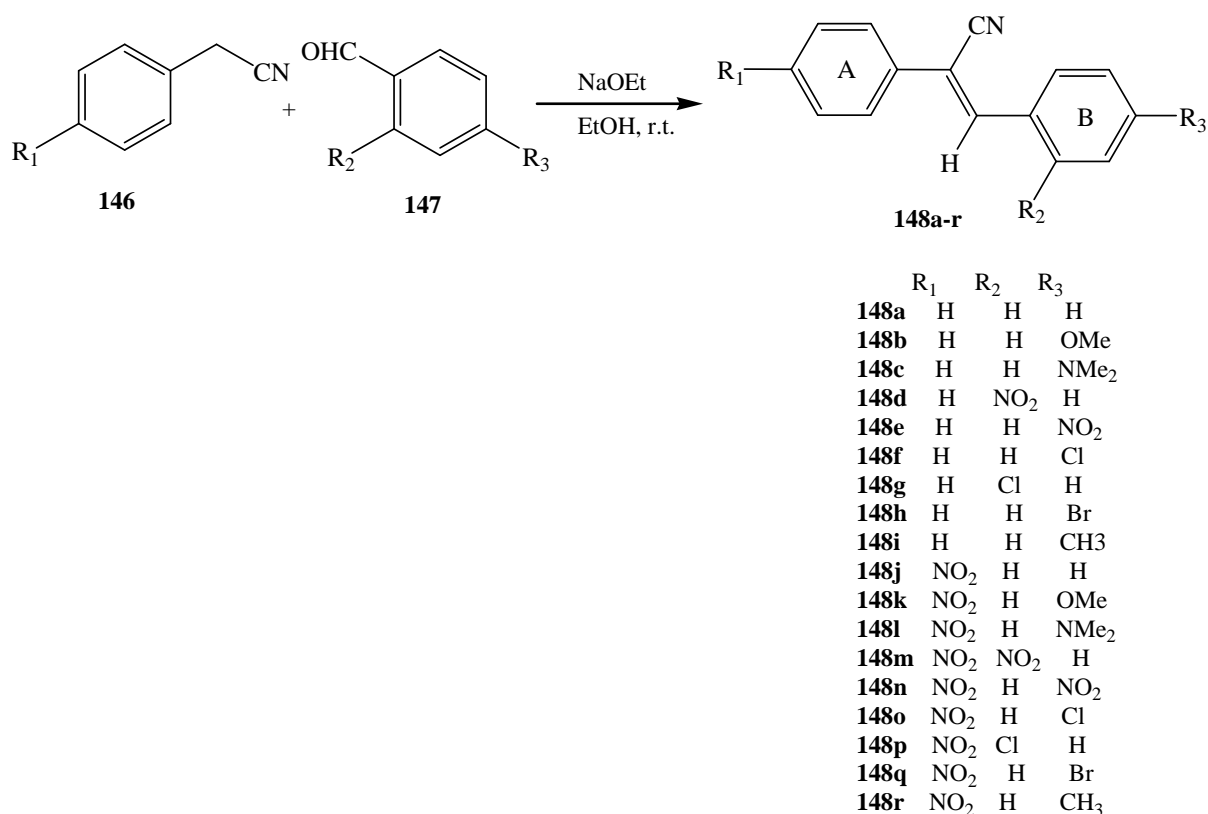
Svi spojevi, osim **136** i **138**, pokazuju antiproliferativnu aktivnost prema stani nim linijama karcinoma, a posebno jaku aktivnost i selektivnost prema liniji stanica HeLa pokazao je spoj **135** i njegov cikli ki analog **145**. Cikli ki i acikli ki derivati benzimidazola ne pokazuju veliku razliku u biološkoj aktivnosti te se pretpostavlja da njihova antitumorska aktivnost proizlazi iz interakcije s DNK molekulom. Cikli ki derivati interkaliraju u dvostruku uzvojnici DNK zahvaljuju i planarnoj strukturi i cijano grupi pomo u koje se formiraju vodikove veze i koja je važna za aktivnost spojeva, ali nije presudna za njihovu selektivnost. Acikli ki derivati se vežu u mali utor DNK.



Shema 13.

M. S. Alam¹¹ i suradnici sintetizirali su analoge (*Z*)-2,3-difenilakrilonitrila **148a–r** prema Shemi 14. i ispitali njihovu citotoksi nu aktivnost prema bakterijskim sojevima *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* te gljivici *Aspergillus niger*. Željeni spojevi **148a–r** sintetizirani su Knoevenagel-ovom kondenzacijom benzil-cijanida ili *p*-nitrobenzil-cijanida sa supstituiranim benzaldehidima u etanolu uz korištenje natrijevog etoksida kao baznog katalizatora. Ve ina novoprire enih spojeva pokazuje supresivan efekt na rast stani nih linija karcinoma.

Spoj **148c** pokazuje najve u citotoksi nu aktivnost prema svim stani nim linijama, a slijede ga spojevi **148f**, **148i** i **148h** sa supstuentima na para-položaju fenilnog prstena A. Spoj **148c** tako er pokazuje 2,5 puta ve u citotoksi nu aktivnost prema HCT15 stanicama. Prisutnost elektron-donorskih grupa (X, OMe, NMe₂, CH₃) na para-položaju fenilnog prstena B doprinosi poboljšanju citotoksi ne aktivnosti u usporedbi s nesupstituiranim akrilonitrilima. Spojevi sa halogenim supstuentima (**148f** i **148h**) na para-položaju prstena B koji imaju elektron-donorska i elektron-odvla e a svojstva zbog rezonantnog efekta pokazuju poboljšanu citotoksi nu aktivnost. Iako je metoksi grupa ja i elektron-donor, spoj **148b** pokazuje manju citotoksi nu aktivnost od klornog analoga **148f**. Spojevi **148k–m**, **148o**, **148q** i **148r** pokazuju znatno smanjenu aktivnost prema stani nim linijama osim spojeva **148n** i **148p**. Svi spojevi inhibiraju rast bakterije *S. typhi* dok spojevi **148k–n** pokazuju ja u aktivnost prema *S. Aureus* nego prema *S. typhi*, od kojih je **148k** najaktivniji. Može se zaklju iti da su (Z)-2,3-difenilakrilonitrili aktivniji prema Gram-negativnim bakterijama.

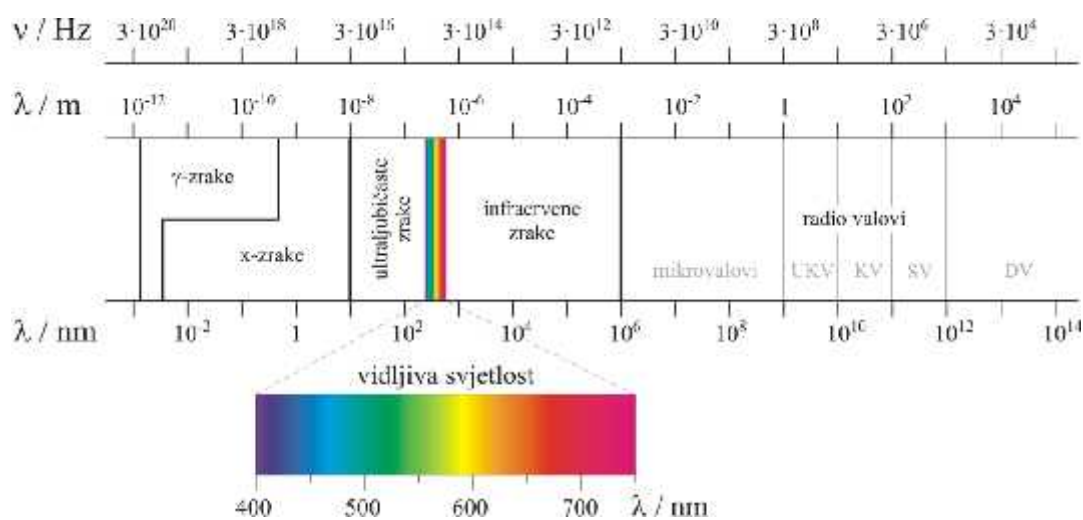


Shema 14.

2.3. Sinteze potpomognute mikrovalovima

Aktivacija mikrovalnim zračenjem kao nekonvencionalnim energetskim izvorom postala je veoma popularna i korisna tehnologija organske kemije. Objavljeno je više od 2000 članaka o primjeni mikrovalnog zračenja u organskoj sintezi od prvog rada kojeg su 1986. Objavili Gedye i Majetich. Reakcije su proveli u kućnoj mikrovalnoj pećnici i zapazili povećanje brzina od 5 do 1200 puta u odnosu na reakcije prevedene uz klasično zagrijavanje. Osnovne prednosti mikrovalne (MW) u odnosu na klasičnu sintezu su skraćeno reakcijsko vrijeme (s nekoliko dana ili sati na nekoliko minuta), bolje iskorištenje te manji udio nusprodukata. Također, moguće je provesti neke reakcije koje se ne odvijaju klasičnim putem.

Mikrovalno zračenje je elektromagnetsko zračenje koje odgovara frekvencijama između 0,3 i 300 GHz i naziva se između IR- zračenja i radiofrekventnih valova (Slika 2.).



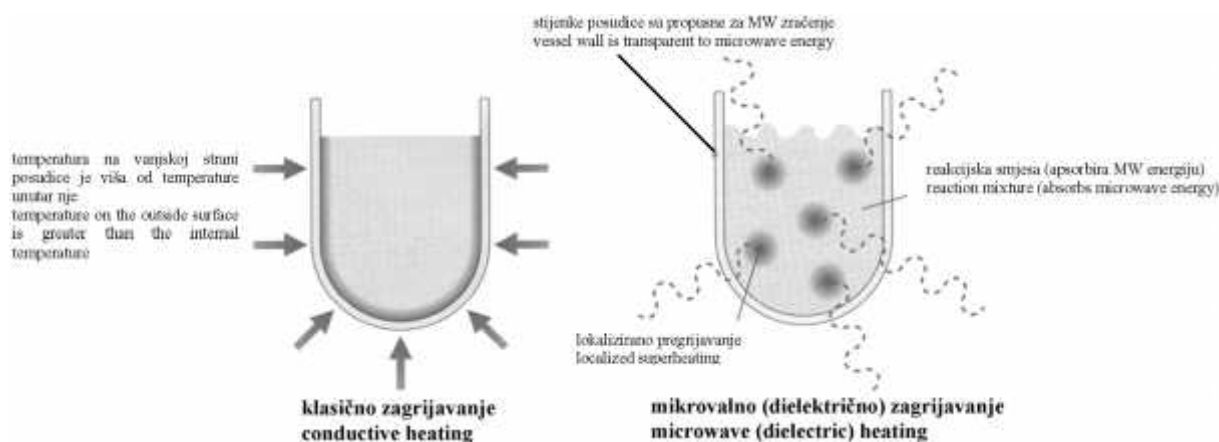
Slika 2. Elektromagnetski spektar¹²

Kućne mikrovalne pećnice i laboratorijski mikrovalni reaktori rade pri frekvenciji od 2,45 GHz (što odgovara valnoj duljini od 12,24 cm) kako bi se izbjegle interakcije s telekomunikacijskim frekvencijama i frekvencijama mobilnih telefona. Energija MW- fotona koja odgovara toj frekvenciji (0,0016 eV) nije dovoljno visoka da potakne kidanje kemijske veze i niža je od energije Brownovog gibanja molekula. Mikrovalno ili dielektrično zagrijavanje temelji se na sposobnosti svojstva materije (tekućina ili vrsta tvar) da apsorbira mikrovalnu energiju i pretvara je u toplinu. Interakcija izmjeničnog električnog polja visokofrekventnog mikrovalnog zračenja i materije odgovorna je za uobičajeno zagrijavanje.

Djelovanje elektromagnetskog polja na električni dipol uzrokuje orijentaciju prema smjeru polja što dovodi do trenja molekula tj. gubitka topline (dielektrični gubici). Kretanje molekula nije uvijek dovoljno brzo što dovodi do rasapa elektromagnetske energije u toplinsku i opisuje se s dva osnovna modela: rotacija dipola i ionska vodljivost. Rotacija dipola je interakcija tijekom koje polarne molekule rotacijom nastoje slijediti smjer izmjeničnog električnog polja, a njezina jakost ovisi o polarnosti molekula i njihovoj sposobnosti da slijede brze izmjene smjera. Ionska vodljivost se javlja ako su prisutni slobodni ioni ili ionske vrste u mediju na koji djeluje MW-zračenje te dolazi do njihovog kretanja djelovanjem izmjeničnog električnog polja. S obzirom na to da se velik broj kemijskih reakcija odvija u otopinama, veliku važnost u mikrovalnoj organskoj sintezi ima sposobnost molekula otapala da apsorbiraju MW-zračenje. Kada su otapala izložena MW-zračenju vrelišta su viša u odnosu na klasično zagrijavanje što se naziva u inak pregrijavanje. Voda je npr. srednje apsorbirajuće otapalo, zagrijava sporije od etanola, etilen-glikola i DMSO-a (dimetilsulfoksida) koji su visoko apsorbirajuća otapala dok dioksan uopće ne apsorbira MW-zračenje.

Tradicionalno, organska sinteza se provodi zagrijavanjem reakcijske posude vanjskim izvorom topline (npr. uljna kupelj) pri čemu se toplina prenosi na stjenke posude te na otapalo i reaktante. Ova metoda je relativno spora i neekonomična jer ovisi o toplinskoj vodljivosti materijala što uzrokuje veće u temperaturu posude u odnosu na reakcijsku smjesu. S druge strane, kod mikrovalnog zagrijavanja reakcijska smjesa izravno apsorbira energiju jer su posude izrađene od materijala propusnih za mikrovalno zračenje kao što su: borsilikatno staklo, kvarc ili teflon (Slika 3.). Baghurst i Mingos su primjenom *Arrheniusovog* zakona [$k=A \exp(-E_a/RT)$] pokazali da reakcija koja se odvija 68 dana postiže 90%-tnu konverziju pri 27°C te pokazuje isti iznos konverzije za 1,61s pri 227°C. Dakle, može se zaključiti da povišenje temperature uzrokuje brže kretanje molekula i veći broj energetski povoljnih sudara zbog termokinetičkog djelovanja koje je posljedica jakog trenja i grijanja smjese. Neki autori tvrde da ubrzanje reakcije pridonose i tzv. netermički mikrovalni učinci koji su posljedica direktne interakcije električnog polja s molekulama u reakcijskoj smjesi koje se orijentiraju u smjeru polja što dovodi do promjene u predeksponencijalnom koeficijentu A ili energije aktivacije. Reakcije bez otapala imaju široku primjenu u mikrovalnoj sintezi i provode se miješanjem reaktanata i reagensa ili njihovom adsorpcijom na anorganski nosač (silikagel, aluminijski oksidi, grafit) pri čemu vrsta nosača u nekim reakcijama djeluje i kao katalizator. Također, kao tehnika mikrovalne sinteze primjenjuje se i mekaničana kataliza (PTC). Reakcije potaknute MW-zračenjem mogu se provesti primjenom otvorenih ili hermetički zatvorenih reakcijskih posuda.

Razvojem i dostupnoš u MW-reaktora koji imaju mogućnost kontinuirane kontrole temperature i tlaka sve se više primjenjuju hermetički zatvorene posudice pod tlakom. Ako je otapalo izloženo MW-zračenju pri atmosferskom tlaku u otvorenoj posudi, temperatura vrelišta otapala obično ne doseže reakcijsku temperaturu koja se može postići. U tu svrhu najčešće se primjenjuju mikrovalno apsorbirajuća otapala s visokim vrelištima kao što su DMSO, 2,1-diklorbenzen ili etilen-glikol, ali njihova primjena znatno otežava postupak izolacije produkta. Prvi pokusi mikrovalne sinteze provedeni su primjenom kućnih mikrovalnih pećnica, no jedan od najvećih nedostataka njihove primjene je promjenljiva snaga zračenja do koje dolazi zbog povremenog isključivanja izvora zračenja (magnetotrona) što ima za posljedicu neravnomjerno zagrijavanje reakcijske smjese (pulsirajuće zračenje). Danas su na tržištu dostupni jednofunkcijski i višefunkcijski mikrovalni reaktori prilagođeni za sintezu i do 1 kg spojeva. Kod višefunkcijskih zračenja se raspodjeljuje u svim smjerovima i time se postiže homogena raspodjela polja. Kod jednofunkcijskih zračenja usmjereno pada na posudu koja je na određenoj udaljenosti od izvora zračenja i posude nisu istovremeno podložne zračenju.¹³

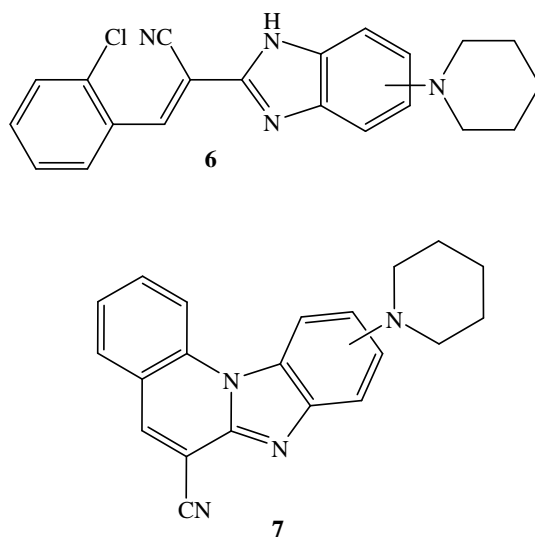


Slika 3. Usporedba klasičnog i mikrovalnog zagrijavanja¹⁴

3. REZULTATI I RASPRAVA

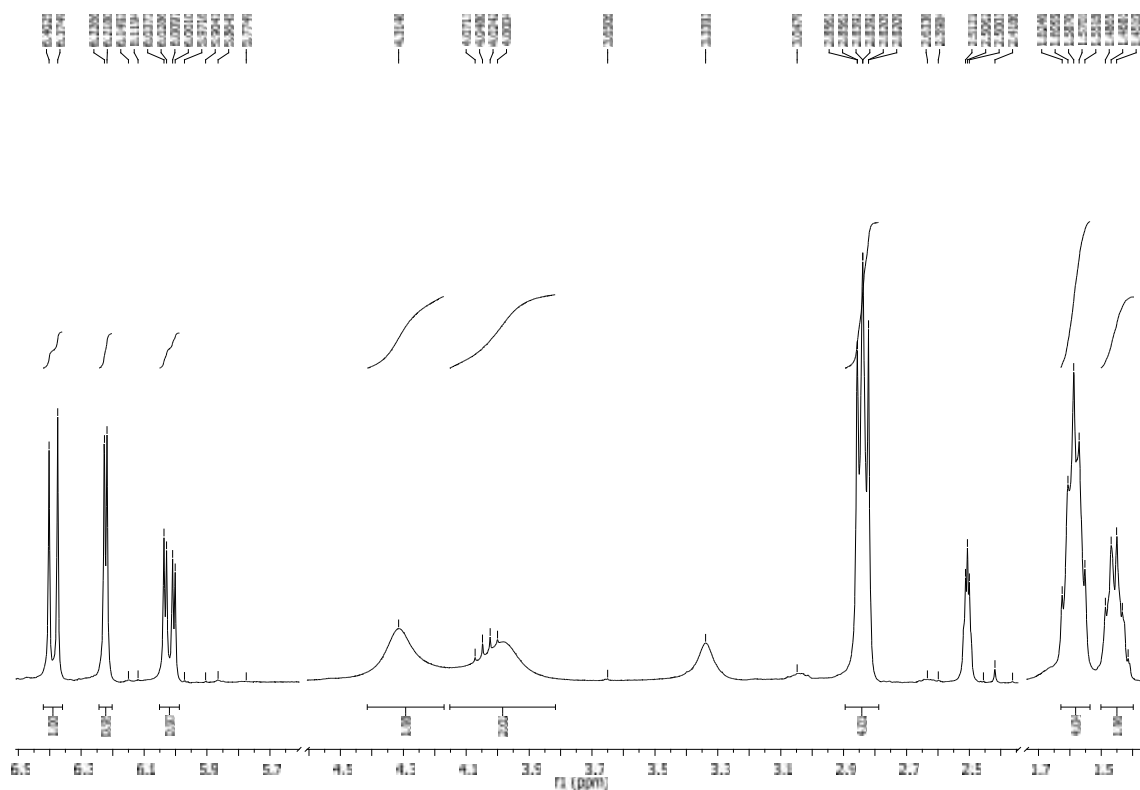
3.1. Cilj rada

Zadatak ovog rada bila je sinteza potencijalno biološki aktivnog acikli kog 2-benzimidazolil supstituiranog akrilonitrila **6** te njegovog cikli kog analoga benzimidazo[1,2-*a*]kinolina **7**. Ciljani spojevi pripremljeni su linearnom sintezom iz 2-nitro-5-(piperidin-1-il)anilina **2** te 4-(piperidin-1-il)-1,2-fenilendiamina **3**. Acikliki derivat benzimidazola **6** pripremljen je kao smjesa dva tautomera **6a** i **6b**, a ciklički derivat **7** kao smjesa dva regioizomera **7a** i **7b**. Strukture novopripremljenih spojeva prikazanih na Slici 4. potvrđene su ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom. Spektroskopska karakterizacija spojeva provedena je UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom matičnih otopina pripremljenih u etanolu.



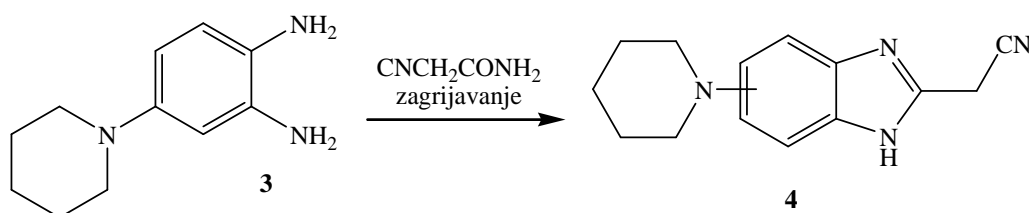
Slika 4. Ciljani spojevi **6** i **7**

U ^1H NMR spektru spoja **3** (Slika 6.) može se uo iti odgovaraju i broj signala aromatskih protona u području 6,38 – 6,01 ppm, signali dušikovih protona dviju amino skupina na 4,31 ppm i 3,95 ppm te signali alifatskih protona piperidinske jezgre u području 2,83 – 1,40 ppm.



Slika 6. ^1H NMR spektar spoja **3**

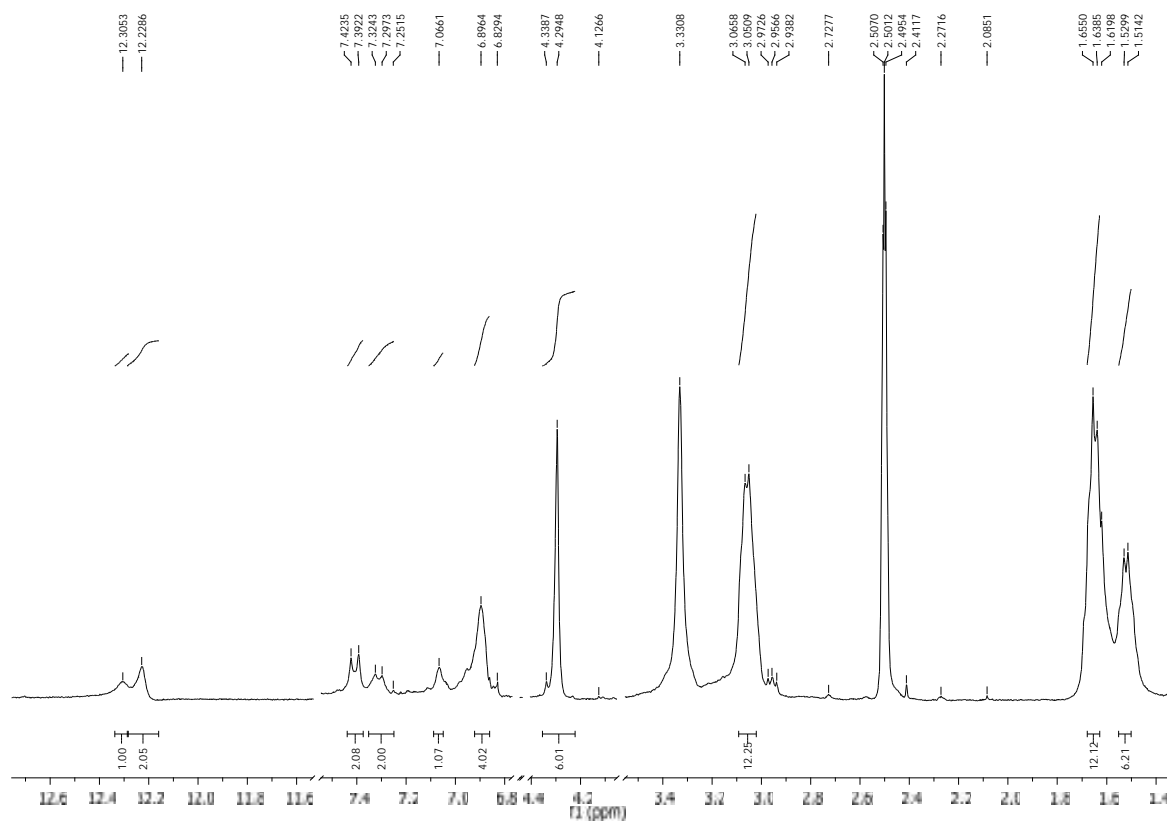
2-cijanometil-5(6)-piperidinilbenzimidazol **4**, kao glavni prekursor za sintezu ciljanih spojeva, dobiven je zagrijavanjem 4-piperidinil-1,2-fenilendiamina **3** i 2-cijanoacetamida u obliku smjese dva tautomera 2-cijanometil-5-piperidinilbenzimidazola **4a** i 2-cijanometil-6-piperidinilbenzimidazola **4b**. Struktura spoja okarakterizirana je NMR spektroskopijom.^{17,18}



Shema 16. Sinteza spoja **4**

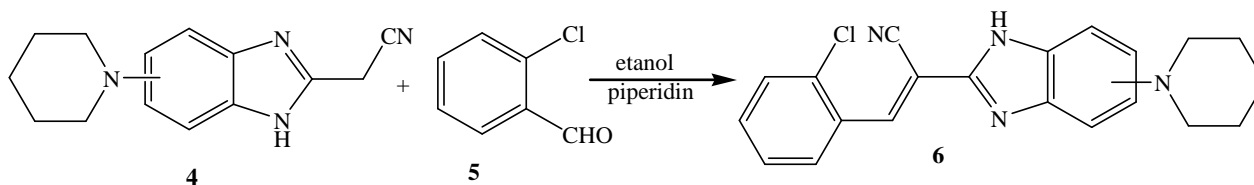
Prema ^1H NMR spektru, prikazanom na Slici 7., tautomeri su dobiveni u omjeru 1 (**4b**): 2 (**4a**), a u spektru je vidljiv dvostruki broj signala svih protona.

Može se uo iti odgovaraju i broj signala aromatskih protona u podru ju 7,42 – 6,86 ppm, dva signala dušikovog protona benzimidazolske skupine na 12,22 ppm i 12,30 ppm te signali alifatskih protona piperidinske jezgre u podru ju 4,29 – 1,51 ppm.



Slika 7. ^1H NMR spektar smjese regioizomera spoja **4**

Spoj *E*-2-[5(6)-piperidinilbenzimidazol-2-il]-3-(2-klorfenil)akrilonitril **6** prire en je reakcijom aldolne kondenzacije iz 2-cijanometil-5(6)-piperidinilbenzimidazola **4** i *o*-klorbenzaldehida u obliku tautomera *E*-2-[5-piperidinilbenzimidazol-2-il]-3-(2-klorfenil)akrilonitrila **6a** i *E*-2-[6-piperidinilbenzimidazol-2-il]-3-(2-klorfenil)akrilonitrila **6b** prema Shemi 17.^{19,20}

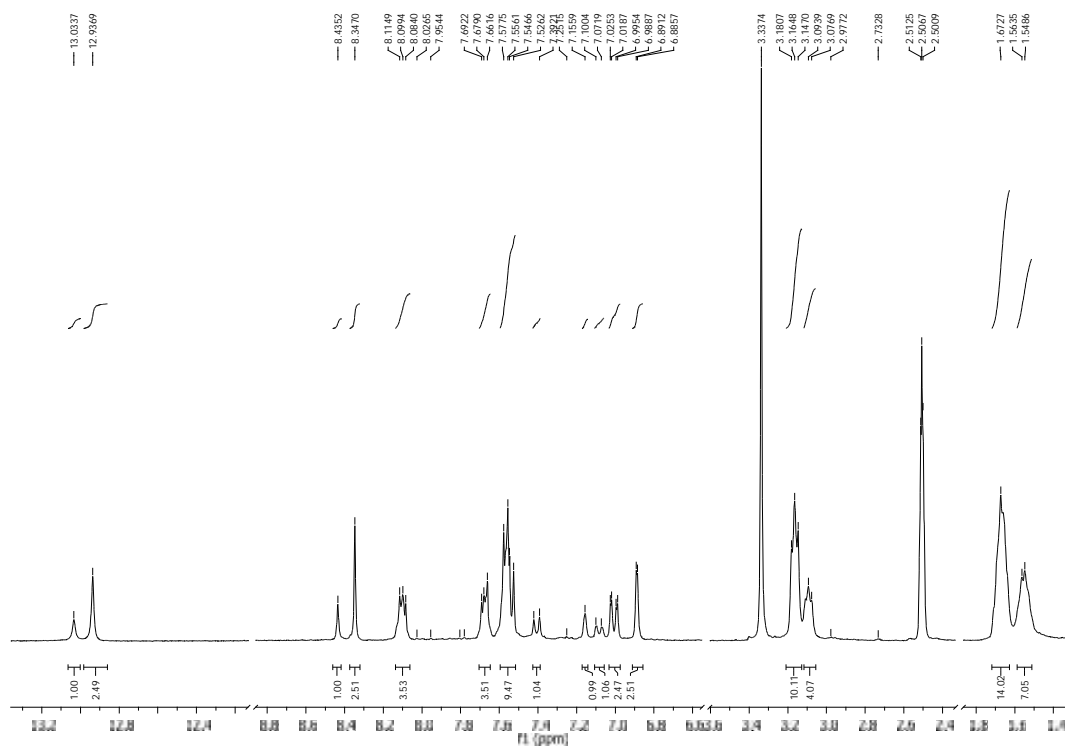


Shema 17. Sinteza spoja **6**

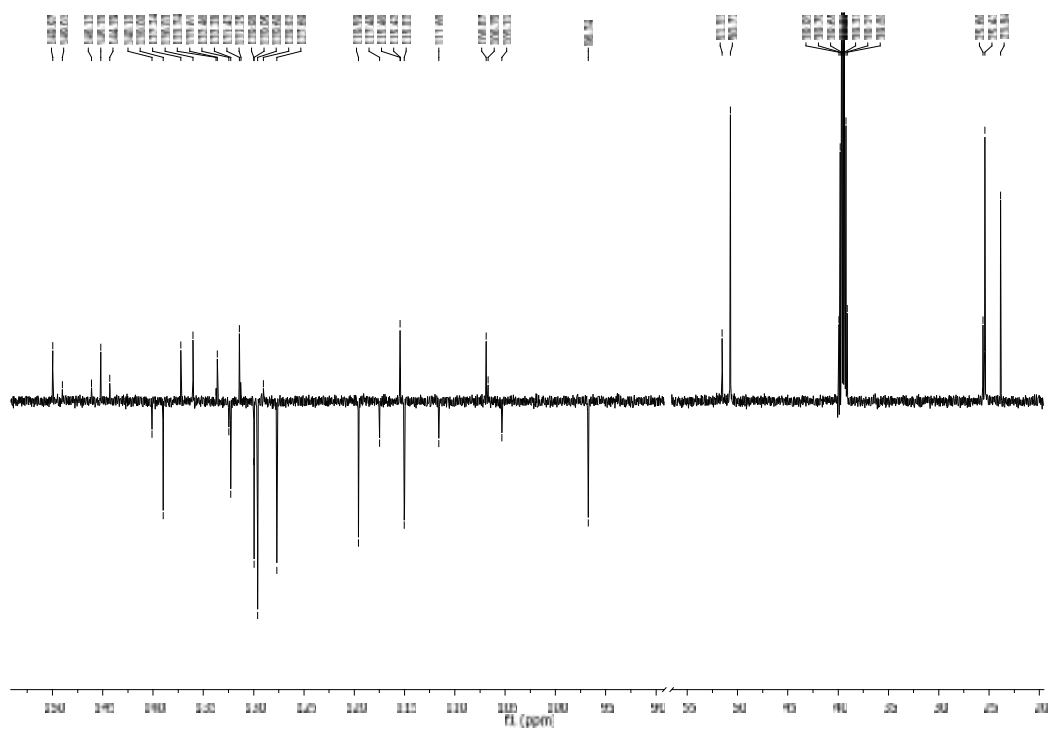
Na Slici 8.a–c prikazani su ^1H i ^{13}C NMR spektri te kromatogram i MS spektar spoja **6**.

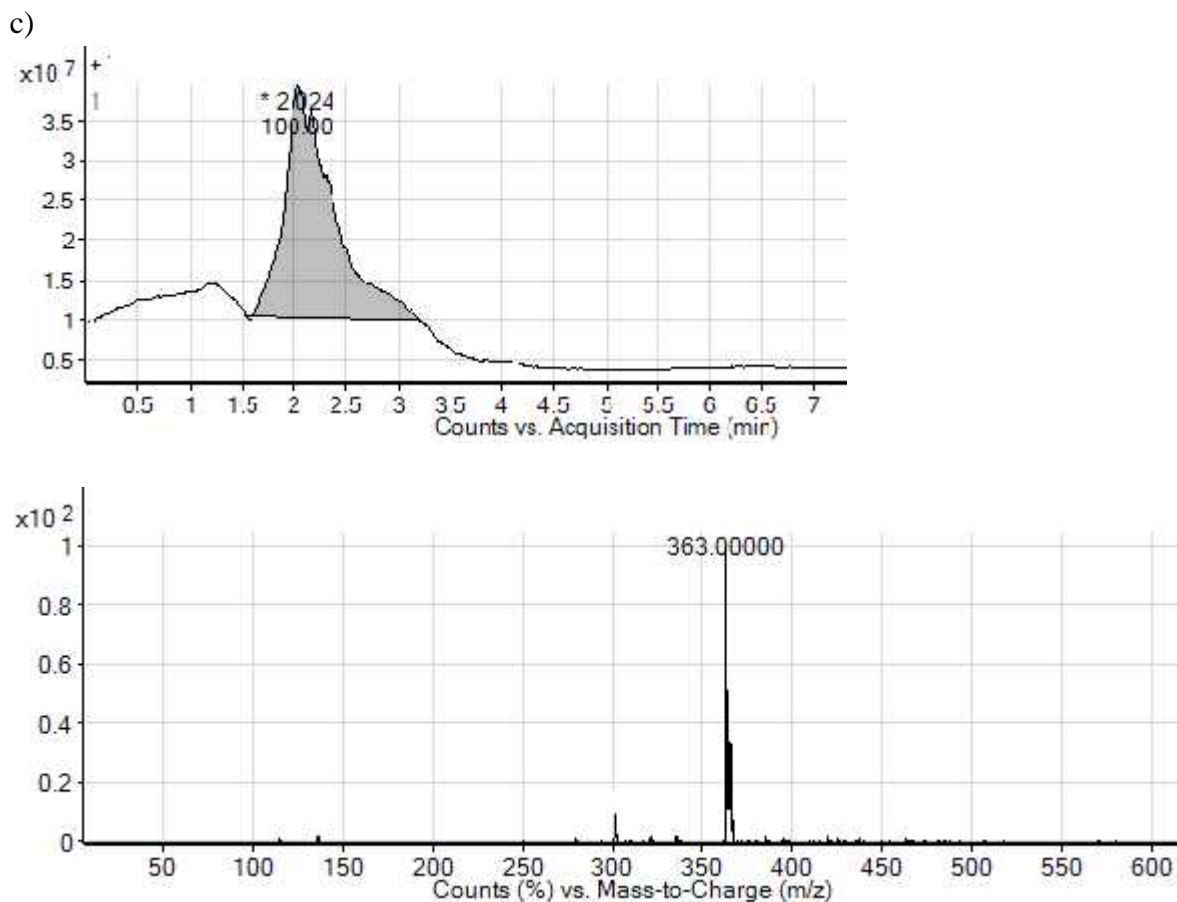
Prema ^1H NMR spektru, prikazanom na Slici 8.a, tautomeri su dobiveni u omjeru 2 (**6b**): 5 (**6a**), te se može uo iti odgovaraju i broj signala aromatskih protona u podru ju 8,43 – 6,89 ppm, signali protona NH skupine benzimidazola na 12,93 ppm i 13,02 ppm te signali alifatskih protona piperidinske jezgre u podru ju 3,16 – 1,49 ppm.

a)



b)





Slika 8. a) ^1H NMR spektar; b) ^{13}C NMR spektar; c) kromatogram i MS spektar spoja **6**

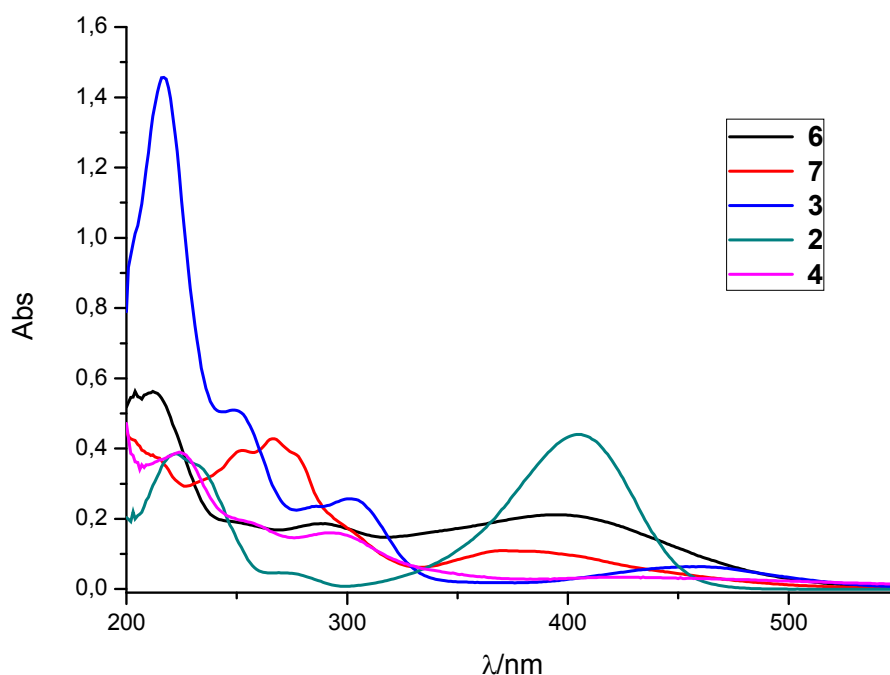
U ^{13}C NMR spektru spoja **6** na Slici 8.b može se uo iti odgovaraju i broj signala koji odgovaraju kvaternim ugljikovim atomima i odgovaraju i broj signala koji odgovaraju ugljikovim atomima CH skupina. U alifatskom dijelu vidljiva su tri signala na 51,53 ppm, 25,60 ppm i 23,84 ppm koji odgovaraju ugljikovim atomima CH_2 skupina. Na Slici 8.c prikazan je MS spektar i kromatogram spoja **6** u kojem se može uo iti odgovaraju i molekularni pik.

6-cijano-9(10)-piperidinilbenzimidazo[1,2-*a*]kinolin **7** dobiven je ciklizacijom acikli kog spoja **6** u sulfolanu, prema Shemi 19., u obliku smjese dva regioizomera, 6-cijano-9-piperidinilbenzimidazo[1,2-*a*]kinolina **7a** i 6-cijano-10-piperidinilbenzimidazo[1,2-*a*]kinolina **7b**.^{21,22} Struktura cikli kog derivata **7** potvr ena je NMR i masenom spektroskopijom, a na Slici 9. a,b prikazani su ^1H NMR i MS spektri.

3.2. Spektroskopska karakterizacija prire enih spojeva

3.2.1. UV/Vis spektroskopija

Prire eni derivati, prekursori **2**, **3** i **4** te benzimidazolil-supstituirani akrilonitril **6** i benzimidazo[1,2-*b*]kinolin **7** pokazuju zanimljive spektroskopske karakteristike koje su ispitane korištenjem UV/Vis spektroskopije. UV/Vis spektri svih okarakteriziranih spojeva snimani su pri istoj koncentraciji spojeva $2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ u etanolu. Na Slici 10. prikazani su usporedni apsorpcijski spektri spojeva **2**, **3**, **4**, **6** i **7** snimani pri danoj koncentraciji u etanolu.²³



Slika 10. Kvantitativni UV/Vis spektar spojeva **2**, **3**, **4**, **6** i **7**

Iz UV/Vis grafova spojeva može se uoiti da najizraženiji hiperkromni pomak intenziteta apsorpcije pokazuje po etni spoj **2**, dok acikli ki derivat akrilonitrila **6**, koji u svojoj strukturi ima cijano grupu, pokazuje hiperkromni i blagi batokromni pomak maksimuma apsorpcije u odnosu na cikli ki spoj **7**, u području valnih duljina oko 350 nm. U području nižih valnih duljina najizraženiji hiperkromni pomak pokazuje spoj **3**, dok spoj **6** pokazuje hipsokromni i hiperkromni pomak u odnosu na spoj **7**. U Tablici 1. prikazani su molarni ekstinkcijski koeficijenti za pripadajuće maksimume apsorpcije.

Tablica 1. Valne duljine maksimuma apsorbancije i pripadaju i ekstincijski koeficijenti

Spoj	λ_{\max} /nm	ϵ / $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$
2	405	21994
	222	19259
3	460	460
	301	3789
	217	25260
4	292	8012
	222	19421
6	390	10583
	288	9318
	211	28122
7	370	5475
	265	21287
	200	22537

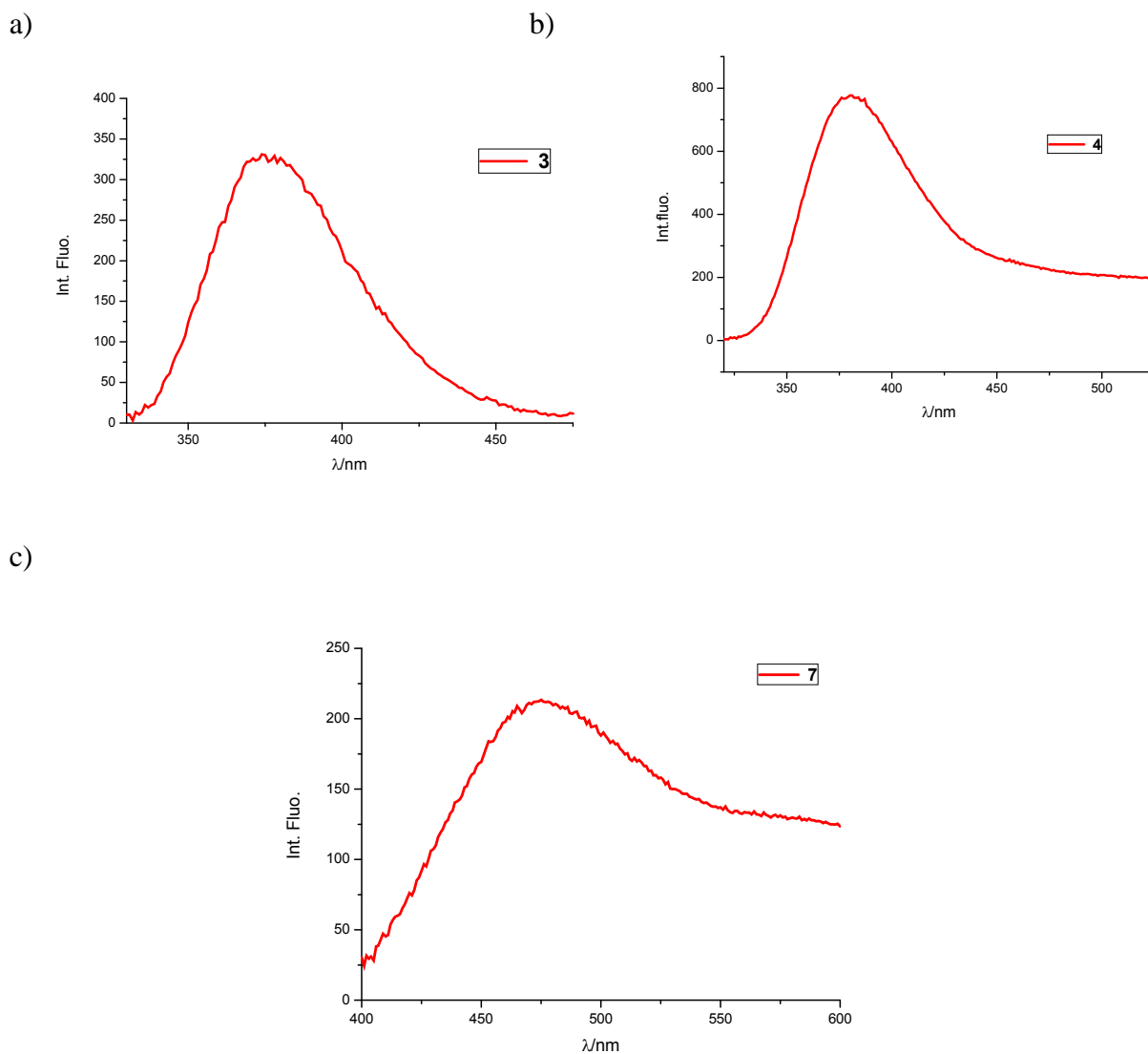
3.2.2. Fluorimetrijska spektroskopija

Fluorimetrijska spektroskopska ispitivanja, mogu e je zbog visoke osjetljivosti metode provesti kod manjih koncentracija. Mjerenja su provedena pri koncentracijama spojeva $c = 1 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3} (**4** i **7**) i 1×10^{-7} (**3**) mol dm^{-3} . Otopine prire enih spojeva pobu ene su svjetloš u valne duljine ekscitacije koja odgovara valnoj duljini maksimuma apsorbancije.²⁴

Na Slici 11.a-c prikazani su emisijski fluorimetrijski spektri spojeva **3**, **4** i **7**. U Tablici 2. dani su podaci o valnoj duljini pobu ivanja, valnoj duljini emisije i intenziteti fluorescencije spojeva **3**, **4** i **7**.

Tablica 2. Intenzitet fluorescencije kod maksimuma emisije

Spoj	exc. / nm	emiss. / nm	Fluo.Int.
3	305	374	328
4	293	380	770
7	369	475	211



Slika 11. Fluorimetrijski emisijski spektri spojeva a) **3**, b) **4** i c) **7**.

Na Slici 11.a–c vidljivo je da najizraženiji intenzitet fluorescencije pokazuje spoj **3** u odnosu na ostale spojeve s maksimumom emisije na 374 nm iji spektar je sniman kod niže koncentracije. Spoj **4** pokazuje hipsokromni pomak maksimuma emisije u odnosu na spoj **7** i blagi batokromni pomak maksimuma emisije u odnosu an spoj **3**. Cikli ki derivat **7** pokazuje hipokromni pomak intenziteta fluorescencije u odnosu na spoj **4**. Spoj **2** i acikli ki derivat **6** pri danim uvjetima ne pokazuju intenzitet fluorescencije.

4. EKSPERIMENTALNI DIO

4.1. Op e napomene

Tališta prire enih spojeva odre ena su na Kofler Mikroheiztisch aparatu i nisu korigirana.

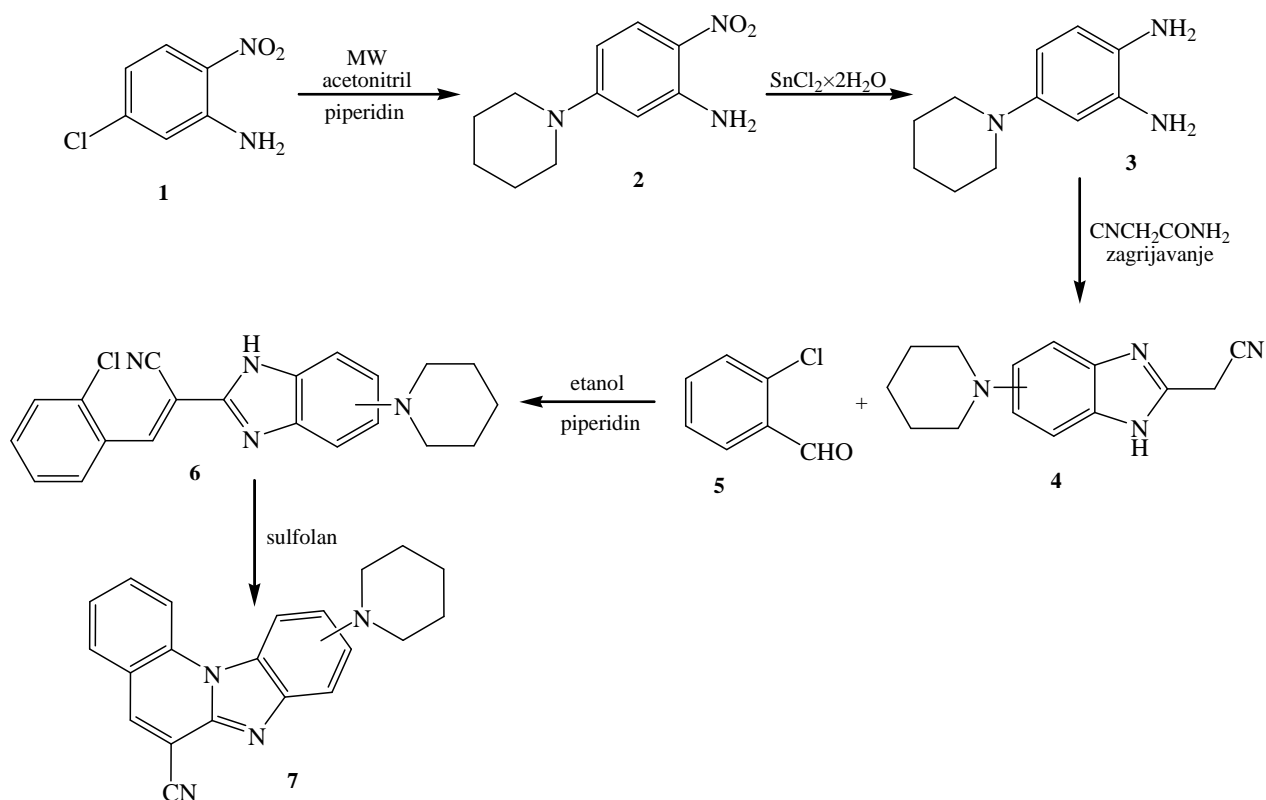
^1H i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na spektrometrima Bruker AV600 i Bruker AV300 na 300 i 600 MHz odnosno 75 i 150 MHz. Svi NMR spektri snimani su u DMSO- d_6 kao otapalu, koriste i tetrametilsilan kao interni standard. Kemijski pomaci () izraženi su u ppm vrijednostima, a konstante sprege (J) u Hz.

UV/Vis spektri snimljeni su na spektrofotometru Varian Cary 50. Korištene su kvarcne kivete promjera 1 cm te volumena 3 cm³. Kao otapalo korišten je etanol.

Reakcije potpomognute mikrovalnim zra enjem provedene su u Milestone Start S mikrovalnoj pe nici opremljenoj pyrex (1 bar) ili kvarcnim posudama (40 bar).

Svi spojevi su rutinski provjeravani tankoslojnom kromatografijom (TLC) koriste i plo e presvu ene silikagelom Merck 60F-254 te detektirani pod UV svjetlom (254 nm). Kromatografska odjeljivanja provedena su na kolonama punjenim silikagelom 0,063-0,2 nm (Kemika, Merck).

4.2. Sinteza derivata benzimidazola 6-7



Shema 20.

4.2.1. Priprava 2-nitro-5-piperidinilanilina 2

Spoj 2 priprema se sintezom potpomognutom mikrovalovima korištenjem MW zračenja snage 800 W i temperature 170 °C, iz 5-klor-2-nitroanilina **1** (0,50 g, 2,9 mmol) u 10 ml acetonitrila i uz suvišak piperidina (1,43 ml, 14,5 mmol). Nakon 3 h MW zračenja nastali produkt se pročišćava istom kolonskom kromatografijom na silikagelu uz CH_2Cl_2 kao eluens. Dobiveno je 0,58 g (90%) narančastog kristalinih produkta. T.t. 105–110 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ /ppm = 7,79 (d, 1H, $J = 9,78$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,22 (šs, 2H, NH_2), 6,36 (dd, 1H, $J_1 = 2,66$ Hz, $J_2 = 9,78$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,19 (d, 1H, $J = 2,61$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 3,58 (t, 4H, $J = 4,86$ Hz, CH_2), 1,65–1,49 (m, 6H, CH_2);

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ /ppm = 154,68, 148,48, 127,26, 122,32, 105,43, 96,75, 47,44 (2C), 24,87 (2C), 23,89.

4.2.2. Priprava 4-piperidinil-1,2-fenilendiamina **3**

2,10 g (9,5 mmol) 2-nitro-5-piperidinilanilina **2** stavi se u okruglu tikvicu te se doda otopina 17,80 g (78,8 mmol) $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ u smjesi 29 ml metanola i 29 ml $\text{HCl}_{\text{konc.}}$. Reakcijska smjesa refluksira pola sata na 100 °C. Smjesa se zatim upari do suha i doda se 70 ml vode te se zaluži sa 20% otopinom NaOH do pH 14. Nastali talog se profiltrira, a filtrat se ekstrahira sa etil-acetatom. Organski sloj suši se iznad bezvodnog MgSO_4 , profiltrira se i upari do suha. Dobiveno je 1,12 g (65%) tamno sme eg kristalini nog produkta. T.t. 70–75 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ ppm = 6,38 (d, 1H, $J = 8,28$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,21 (d, 1H, $J = 2,55$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,01 (dd, 1H, $J_1 = 2,58$ Hz, $J_2 = 8,25$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 4,31 (šs, 2H, NH_2), 3,95 (šs, 2H, NH_2), 2,83 (t, 4H, $J = 5,28$ Hz, CH_2), 1,53–1,63 (m, 4H, CH_2), 1,40–1,50 (m, 2H, CH_2);
 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ ppm = 145,52, 136,26, 128,77, 115,83, 107,00, 105,76, 52,40 (2C), 26,27 (2C), 24,47.

4.2.3. Priprava 2-cijanometil-5(6)-piperidinilbenzimidazola **4a,b**

U okruglu tikvicu stavi se 1,12 (5,9 mmol) 4-piperidinil-1,2-fenilendiamina **3** i 0,50 g (5,9 mmol) 2-cijanoacetamida, dobro promiješa, te se pažljivo grije na 185 °C 20 min. Tijek reakcije se provjerava UV/Vis spektroskopijom. Po završetku reakcije smjesa se prekrystalizira iz 25%-tnog etanola. Dobiveno je 0,093 g (7%) tamnocrvenog praškastog produkta u obliku smjese dva tautomera u omjeru 1 (**4b**): 2 (**4a**). T.t. 119–123 °C.

4a: ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ ppm = 12,22 (s, 1H, NH), 7,34–7,28 (m, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,94–6,86 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 4,29 (šs, 2H, CH_2), 3,11–3,00 (m, 4H, CH_2), 1,68–1,62 (m, 4H, CH_2), 1,54–1,51 (m, 2H, CH_2);

4b: ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ ppm = 12,30 (s, 1H, NH), 7,42–7,39 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,06 (šs, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 4,29 (šs, 2H, CH_2), 3,11–3,00 (m, 4H, CH_2), 1,68–1,62 (m, 4H, CH_2), 1,54–1,51 (m, 2H, CH_2).

4.2.4. Priprava *E*-2-[5(6)-piperidinilbenzimidazol-2-il]-3-(2-klorfenil) akrilonitrila **6a,b**

Reakcijska smjesa 2,54 g (10,5 mmol) 2-cijanometil-5(6)-piperidinilbenzimidazola **4a,b**, 1,19 g (10,5 mmol) *o*-klorbenzaldehida **5**, 15 ml apsolutnog etanola i 3 kapi piperidina refluksira 2 h. Nastali produkt se pro isti kolonskom kromatografijom na silikagelu uz CH_2Cl_2 kao eluens.

Dobiveno je 0,61 g (16%) tamnocrvenog kristalini nog produkta u obliku smjese dva tautomera u omjeru 2 (6b): 5 (6a). T.t. 95–105 °C.

6a: ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ ppm = 12,93 (s, 1H, NH), 8,34 (s, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 8,11–8,08 (m, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,70–7,65 (m, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,58–7,51 (m, 3H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,00 (dd, 1H, $J_1 = 2,01$ Hz, $J_2 = 8,94$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,89 (d, 1H, $J = 1,65$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 3,16 (t, 4H, $J = 5,05$ Hz, CH_2), 1,73–1,61 (m, 4H, CH_2), 1,66–1,49 (m, 2H, CH_2);

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz): δ ppm = 146,97, 145,20, 139,00, 137,24, 136,03, 133,61, 132,28, 131,42, 129,95, 129,60, 127,69, 119,59, 115,46, 115,02, 106,87, 96,74, 51,53 (2C), 25,60 (2C), 23,84.

6b: ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ ppm = 13,02 (s, 1H, NH), 8,43 (s, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 8,11–8,08 (m, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,70–7,65 (m, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,58–7,51 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,40 (d, 1H, $J = 8,76$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,11 (šs, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,08 (dd, 1H, $J_1 = 1,68$ Hz, $J_2 = 8,58$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 3,09 (t, 4H, $J = 4,95$ Hz, CH_2), 1,73–1,61 (m, 4H, CH_2), 1,66–1,49 (m, 2H, CH_2);

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz): δ ppm = 149,01, 146,12, 144,29, 140,10, 133,74, 132,46, 131,25, 129,98, 129,61, 129,02, 127,69, 117,48, 115,42, 111,60, 106,70, 105,31, 51,53 (2C), 25,60 (2C), 23,84.

4.2.5. Priprava 6-cijano-9(10)-piperidinilbenzimidazo[1,2-*a*]kinolina 7a,b

U okruglu tikvicu stavi se 0,46 g (1,3 mmol) 2-[5(6)-piperidinilbenzimidazol-2-il]-3-(2-klorfenil)akrilonitrila **6a,b**, 1,5 ml sulfolana te se reakcijska smjesa zagrijava 10 min na 280 °C. Tijek reakcije je pra en UV/Vis spektroskopijom. Nakon hla enja, reakcijskoj smjesi se doda voda i dobiveni talog se profiltrira. Nastali produkt se pro isti kolonskom kromatografijom na silikagelu uz CH_2Cl_2 kao eluens. Dobiveno je 0,01 g (3%) tamnocrvenog praškastog produkta u obliku smjese dva regioizomera u omjeru 2 (7b): 3 (7a). T.t. 125–130 °C.

7a: ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ ppm = 8,75 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 8,12 (t, 1H, $J = 8,50$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,99 (t, 1H, $J = 7,90$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,64 (t, 1H, $J = 7,50$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,41–7,27 (m, 3H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 3,35–3,31 (m, 4H, CH_2), 1,83–1,64 (m, 4H, CH_2), 1,63–1,55 (m, 2H, CH_2);

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz): δ ppm = 150,10, 145,39, 143,23, 139,19, 135,40, 133,45, 131,55, 131,04, 124,86, 120,93, 120,29, 115,89, 115,53, 115,40, 104,59, 101,40, 50,37 (2C), 25,29 (2C), 23,86.

7b: ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ ppm = 8,67 (s, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 8,53 (d, 1H, $J = 9,30$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 8,12 (t, 1H, $J = 8,50$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,99 (t, 1H, $J = 7,90$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,90 (s, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,89 (d, 1H, $J = 9,00$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,41–7,27 (m, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 3,28–3,25 (t, 4H, $J = 5,19$ Hz, CH_2), 1,83–1,64 (m, 4H, CH_2), 1,63–1,55 (m, 2H, CH_2);

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz): δ ppm = 149,64, 144,30, 138,71, 137,44, 135,87, 133,30, 130,89, 124,73, 123,92, 121,33, 117,27, 115,55, 115,50, 114,76, 100,72, 100,37, 51,06 (2C), 25,54 (2C), 23,82.

5. ZAKLJUČAK

- U ovom radu pripremljeni su i spojevi: 2-nitro-5-piperidinilanilin **2**, 4-piperidinil-1,2-fenilendiamin **3**, 2-cijanometil-5(6)-piperidinilbenzimidazol **4**, *E*-2-[5(6)-piperidinilbenzimidazol-2-il]-3-(2-klorfenil)akrilonitril **6**, 6-cijano-9(10)-piperidinilbenzimidazo[1,2-*a*]kinolin **7**.
- Za pripremu ciljanog derivata akrilonitrila prvotno je pripremljen 4-piperidinil-1,2-fenilendiamin **3** linearnom sintezom po eviši iz 5-klor-2-nitroanilina **1** koji u reakciji nekatalizirane aminacije potpomognute mikrovalovima u acetonitrilu daje 2-nitro-5-piperidinilanilin **2**; Redukcijom derivata **2** sa kositar-kloridom dihidratom nastaje 4-piperidinil-1,2-fenilendiamin **3** koji u reakciji ciklokondenzacije s 2-cijanoacetamidom daje 2-cijanometil-6-piperidinilbenzimidazol **4**, glavni prekursor za sintezu akrilonitrila **6**.
- Aciklički derivat benzimidazola **6** pripremljen je reakcijom kondenzacije 2-cijanometil-5(6)-piperidinilbenzimidazola i *o*-klorbenzaldehida u obliku tautomera **6a** i **6b** u omjeru 2:5.
- 6-cijano-9(10)-piperidinilbenzimidazo[1,2-*a*]kinolin **7** pripremljen je termičkom ciklizacijom acikličkog analoga **6** u sulfolanu kao smjesa dva regioizomera u omjeru 2:3.
- Struktura pripremljenih spojeva potvrđena je ¹H NMR i ¹³C NMR spektrima.
- Spektroskopska karakterizacija spojeva **2-7** provedena je korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije.

6. LITERATURA

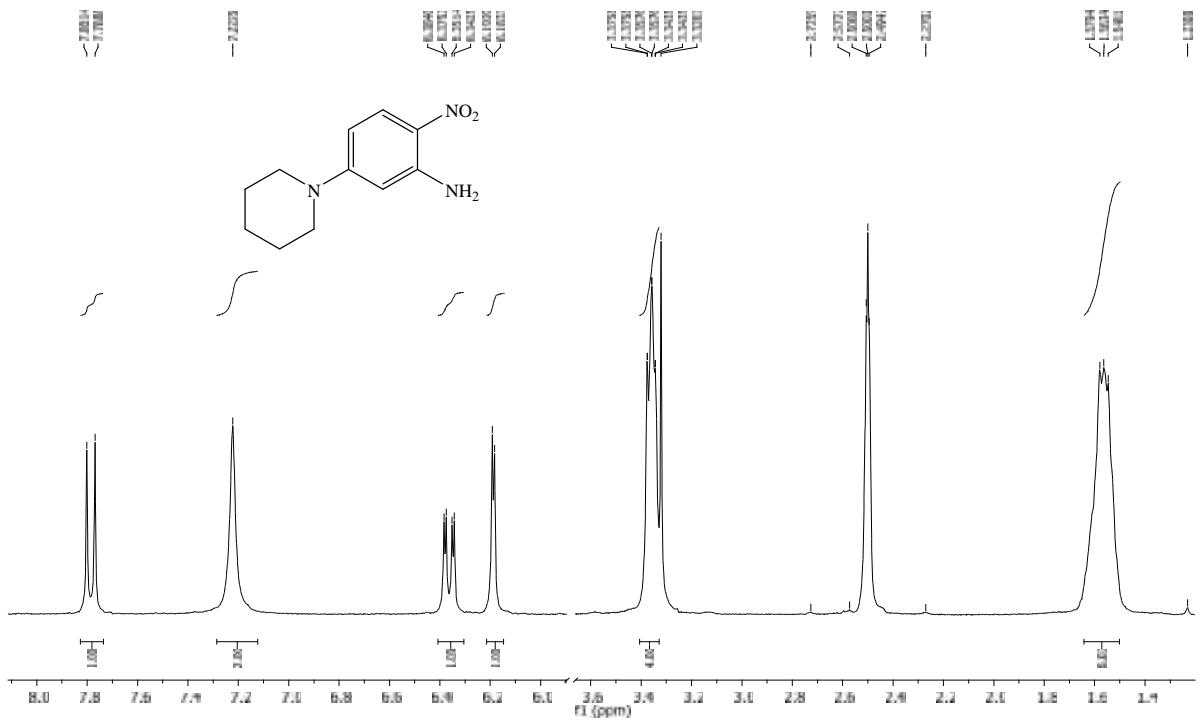
1. R. V. Shingalapur, K. M. Hosamani, R. S. Keri; *J. Med. Chem.* **44** (2009) 4244-4248
2. Q. Sun, R. Wu, Su. Cai, Y. Lin, L. Sellers, K. Sakamoto, B. He, B. R. Peterson; *J. Med. Chem.* **54** (2011) 1126–1139.
3. L. K. Soni, T. Narsinghani, A. Sethi; *Med Chem Res* **21** (2012) 4330–4334
4. M. Hranjec, M. Kralj, I. Piantanida, L. Šuman, K. Paveli , G. Karminski-Zamola; *J. Med. Chem.* **51** (2008) 4899-4910.
5. N. Perin, L. Uzelac, I. Piantanida, G. Karminski-Zamola, M. Kralj, M. Hranjec; *Bioorg. Med. Chem.* **19** (2011) 6329-6339.
6. T. AP, P. PY, M. BY, M. SD; *J. Pharm. Biolog. Chem. Sci.* (2013) 928-935.
7. G. R. Morais, H. V. Miranda, I. C. Santos, I. Santos, T. F. Outeiro, A. Paulo; *Bioorg. Med. Chem.* **19** (2011) 7698-7710.
8. M. Hranjec, E. Horak, M. Tireli, G. Pavlovi , G. Karminski-Zamola; *Dyes and Pigments* **95** (2012) 644-656.
9. F. Saczewski, A. Stencel, A. M. Bienczak, K. A. Langowska, M. Michaelis, W. Werel, R. Hałasa, P. Reszka, P. J. Bednarski; *J. Med. Chem.* **43** (2008) 1847-1857.
10. M. Hranjec, G. Pavlovi , M. Marjanovi , M. Kralj, G. Karminski-Zamola; *J. Med. Chem.* **45** (2010) 2405-2417.
11. M. S. Alam, Y. Nam, D. Lee; *J. Med. Chem.* (2013) 790-797.
12. glossary.periodni.com
13. C. O. Kappe; *Angew. Chem. Int. Ed.* **43** (2004) 6250-6284.
14. I. Zrinski, M. Eckert Maksi , *Kem. Ind.* **54** (2005) 469-476.
15. N. Perin, I. Martin-Kleiner, R. Nhili, W. Laine, M.-H. David-Cordonnier, O. Vugrek, G. Karminski-Zamola, M. Kralj, M. Hranjec, *Med. Chem. Commun.* **4** (2013) 1537-1550.
16. N. Perin, R. Nhili, K. Ester, W. Laine, G. Karminski-Zamola, M. Kralj, M.-H. David-Cordonnier, M. Hranjec, *Eur. J. Med. Chem* **80** (2014) 218-227.
17. N. Perin, *Doktorska disertacija „Sinteza i biološka aktivnost novih amino supstituiranih benzimidazo[1,2-a]kinolina”* Zagreb, 2014.
18. M. Hranjec, G. Pavlovi , M. Marjanovi , M. Kralj, G. Karminski-Zamola, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 2405-2417.
19. N. Perin, M. Hranjec, G. Pavlovi , G. Karminski-Zamola, *Dyes & Pigments* **91** (2011) 79-88.
20. M. Hranjec, G. Karminski-Zamola, *Molecules* **12** (2007) 1817–1828.
21. M. Hranjec, M. Kralj, I. Piantanida, M. Sedi , L. Šuman, K. Paveli , G. Karminski-Zamola, *J. Med. Chem.* **50** (2007) 5696–5711.

22. M. Hranjec, *Doktorska disertacija „Sinteza, biološko djelovanje i interakcija s ct-DNK novih derivata benzimidazola”* Zagreb, (2007).
23. J. R. Albani, *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*, Blackwell Publishing (2007) 98-123.
24. B. Valeur *In: Topics in fluorescence spectroscopy, probe design and chemical sensing*. Volume 4, New York: *Plenum Press*; 1994. p.21.

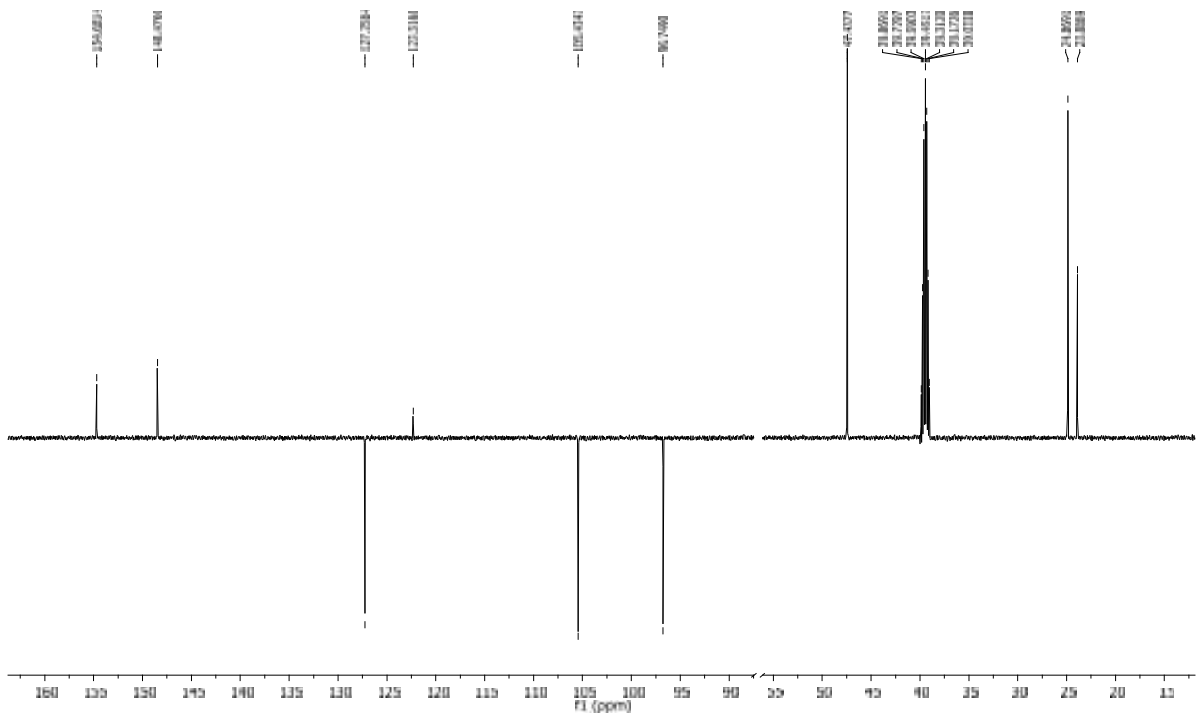
7. PRILOZI

Prilog 1.

a) ^1H NMR spektar 2-nitro-5-piperidinilanilina 2

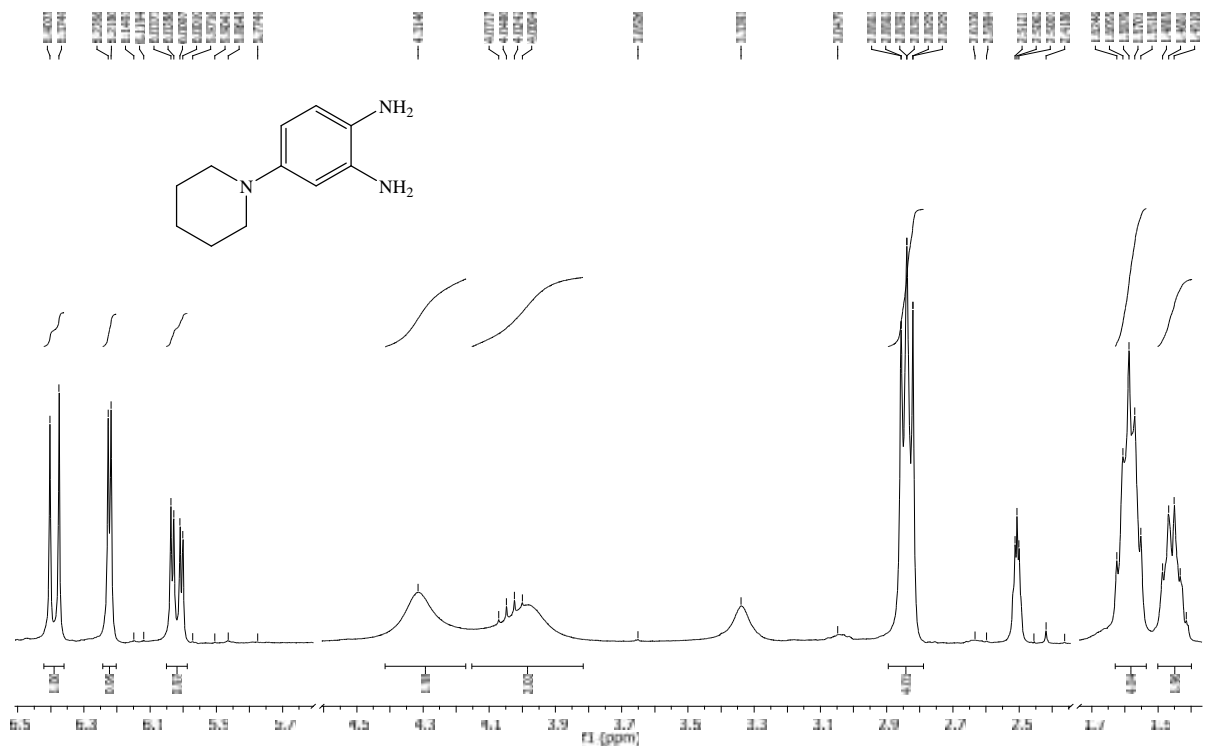


b) ^{13}C NMR spektar 2-nitro-5-piperidinilanilina 2



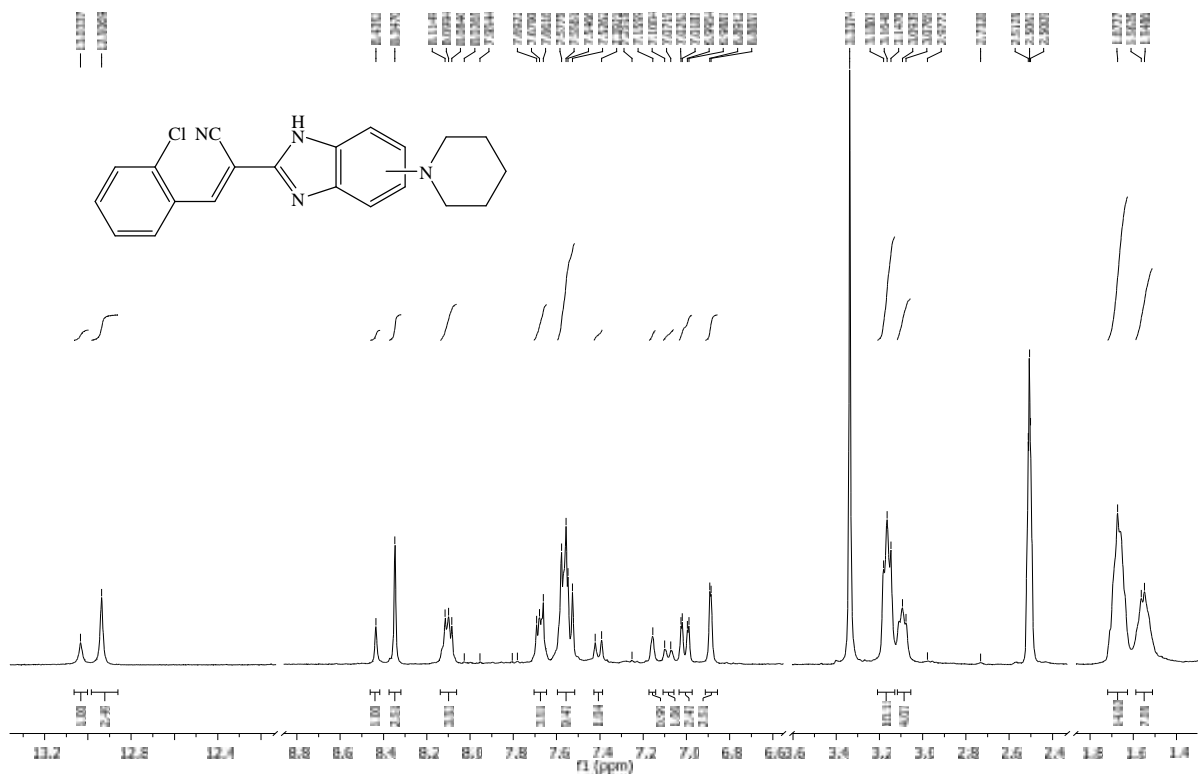
Prilog 2.

a) ^1H NMR spektar 4-piperidinil-1,2-fenilendiamina **3**

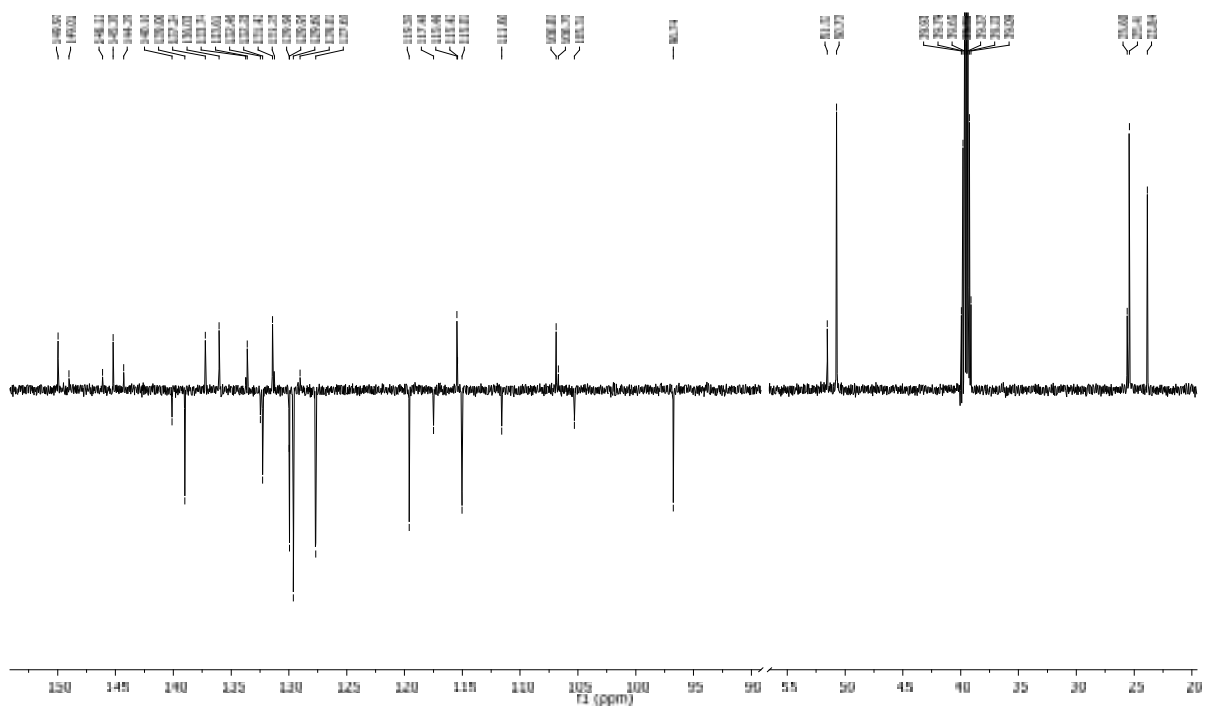


Prilog 4.

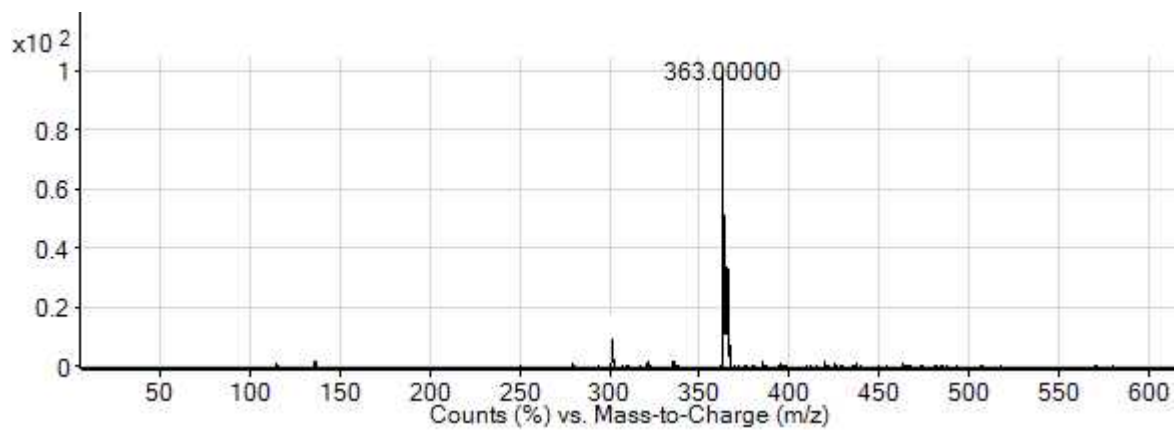
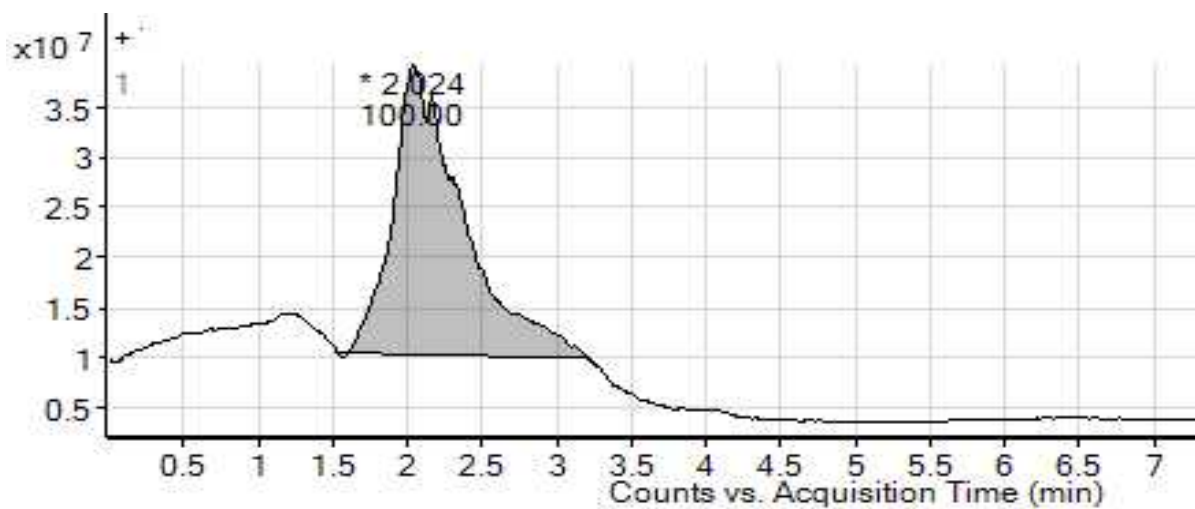
a) ^1H NMR spektar *E*-2-[5(6)-piperidinilbenzimidazol-2-il]-3-(2-klorfenil)akrilonitrila **6**



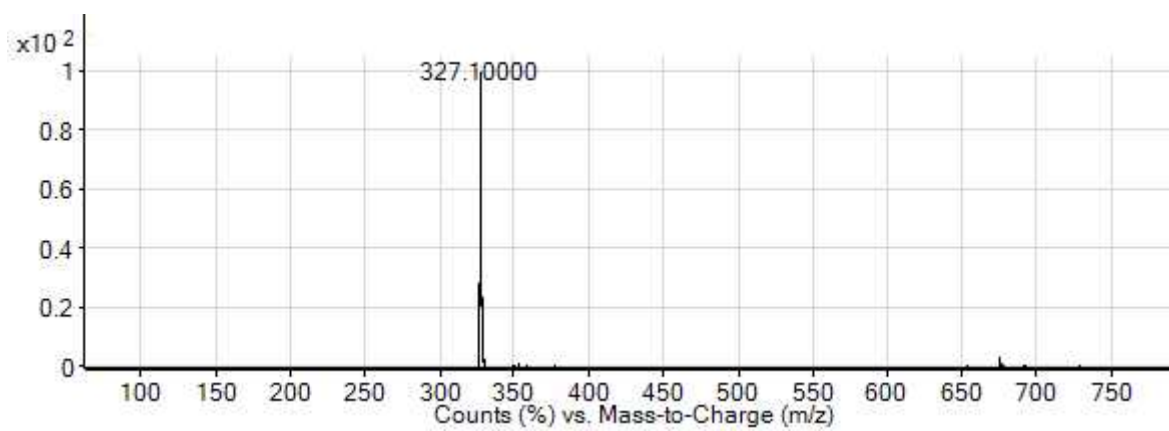
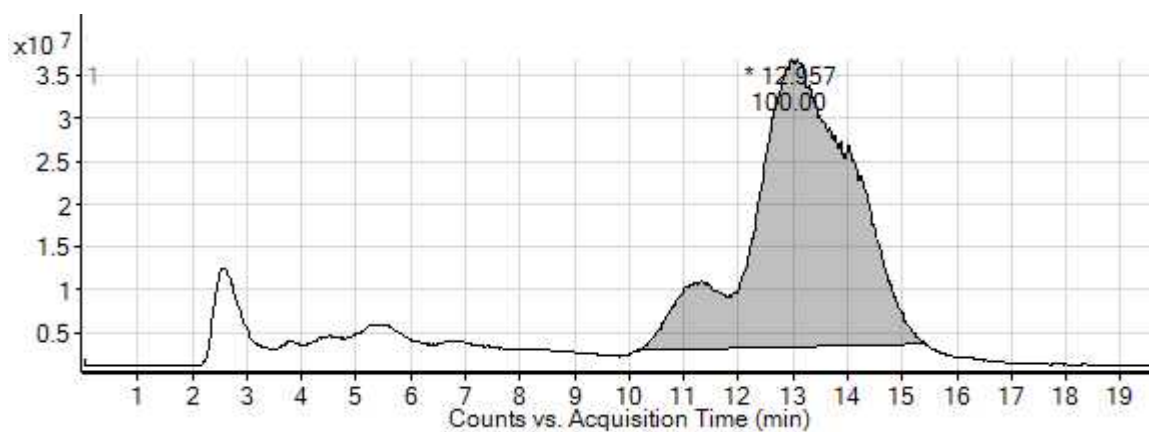
b) ^{13}C NMR spektar *E*-2-[5(6)-piperidinilbenzimidazol-2-il]-3-(2-klorfenil)akrilonitrila **6**



c) Kromatogram i MS spektar *E*-2-[5(6)-piperidinilbenzimidazol-2-il]-3-(2-klorfenil)akrilonitrila **6**



c) Kromatogram i MS spektar 6-cijano-9(10)-piperidinilbenzimidazo[1,2-*a*]kinolina 7



8. ŽIVOTOPIS

Anja Beronja je 6. lipnja 1994. godine u Pakovcu. Osnovnu školu završila je u Ivanovcu 2009. godine i te iste godine upisuje 1. Gimnaziju u Varaždinu. Maturirala je 2013. godine s odličnim uspjehom i iste godine upisala preddiplomski studij na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Primijenjena kemija. Stručnu praksu odradila je u Bioinstitutu d.o.o. u laboratoriju za ekologiju, kemiju hrane te predmete opće uporabe.