

# 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:* **2024-04-26**



**FKITMCMXIX**

*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

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

dr. sc. Nataša Perin, poslijedoktorandica FKIT-a

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

**Zagreb, rujan 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 prire eni klasi nim reakcijama organske sinteze te aminacijom potpomognutom mikrovalnim zra enjem. Benzimidazolil-supstituirani akrilonitril **6** prire en iz 2-cijanometil-5(6)-piperidinilbenzimidazola **4** i *o*-klorbenzaldehida **5**, dok je benzimidazo[1,2-*a*]kinolin **7** prire en termi kom ciklizacijom akrilonitrila **6** u sulfolanu pri emu je dobivena smjesa dva regioizomera. Strukture prire enih spojeva potvr ene su  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijom. Spojevi **3-7** okarakterizirani su UV/Vis i fluormetrijskom spektroskopijom.

**Klju ne rije i:** benzimidazoli, benzimidazo[1,2-*a*]kinolini, mikrovalna sinteza,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR, UV/Vis i fluorimetrijska spektroskopija

## SUMMARY

This work presents the synthesis of novel 2-benzimidazolyil-substituted acrylonitrile **6** and it's cyclic analog, benzimidazo[1,2- ]quinoline **7**. Novel compounds were prepared by using a classical reactions of organic chemistry and microwave assisted amination. Benzimidazolyil-substituted acrylonitrile **6** was prepared in reaction of 2-cyanomethyl-5(6)-piperidinylbenzimidazole **4** with *o*-chlorobenzaldehyde **5**. Benzimidazo[1,2- ]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 <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR and UV/Vis and fluorimetric spectroscopy.

**Key words:** benzimidazoles, benimidazo[1,2- ]quinolines, microwave synthesis, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, UV/Vis and fluorescence spectroscopy.

Ovaj rad izrađen 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**

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

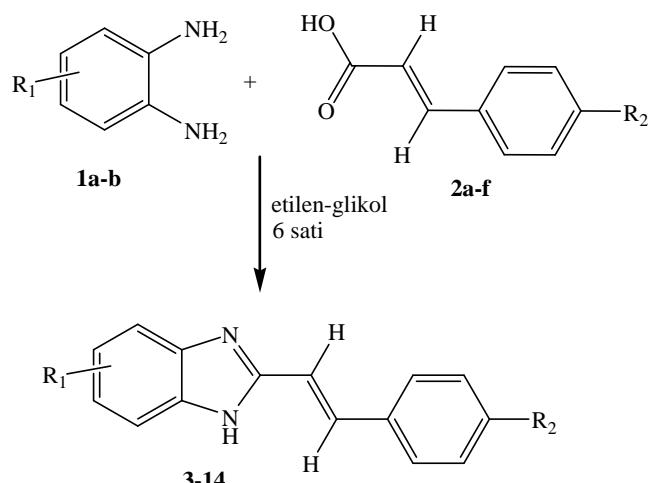
# **1. UVOD**

U zadnjih nekoliko godina izrazito je povećan interes za pripravu potencijalnih biološki aktivnih heteroaromatskih organskih spojeva. Benzimidazoli su važna grupa heterocikličkih 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 značajkih što im pruža razna biološka svojstva kao što su antitumorska, antivirusna, antibakterijska, antifungalna, antihistaminska i antiepileptika svojstva. Također, oni pokazuju strukturu sličnost sa spojevima prirodnog podrijetla kao što su purini te stoga imaju sposobnost interakcije s važnim biomolekulama i proteinima. Ciklični derivati benzimidazola imaju planarnu strukturu koja im omogućuje interkaliranje između parova baza dvostrukih uzvojnica DNA. Interkalativna invezivanja danas je jedan od najvažnijih u djelovanju antitumorskih lijekova. Zbog njihovih spektroskopskih karakteristika koje proizlaze iz injenice da takve molekule posjeduju planarni i visoko konjugirani kromofor, važnu primjenu ova grupa spojeva pronađeni su u optoelektronici, optičkim laserima, organskim luminoforima i fluorescentnim bojama u tradicionalnoj tekstilnoj industriji i polimerima.

## **2. OP I DIO**

## 2.1. Biološka aktivnost i sinteza stirilnih derivata benzimidazola

Ramya V.Shingalapur<sup>1</sup> 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.



R<sub>1</sub>: a=-NO<sub>2</sub>, b=-Br  
R<sub>2</sub>: a=H, b = 3,4 (OCH<sub>3</sub>), c = 4- CH<sub>3</sub>, d = 3,4- (CH<sub>2</sub>)O<sub>2</sub>, e = 2,4-(Cl), f = 3 - OH

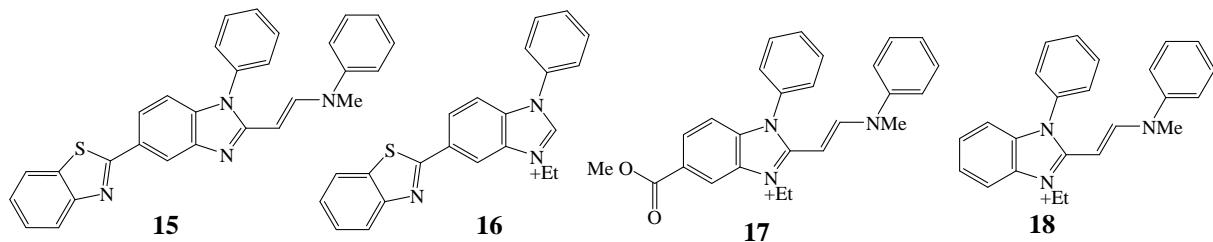
**Shema 1.**

*In vitro* metodom ispitana je antituberkulostatska aktivnost na *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub> 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 potreboj za inhibiciju rasta mikroorganizama. Strukture navedenih spojeva potvrene su IR, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C i GC-MS spektroskopijom. Prisutnost broma kao supsituenta na aromatskom prstenu znatno povećava aktivnost tih spojeva u odnosu na njihove nitro supstituirane analoge. Moguće poboljšanja u aktivnosti tih spojeva mogu se postići i neznatnom zamjenom supstituenata na osnovnoj benzimidazolskoj jezgri.

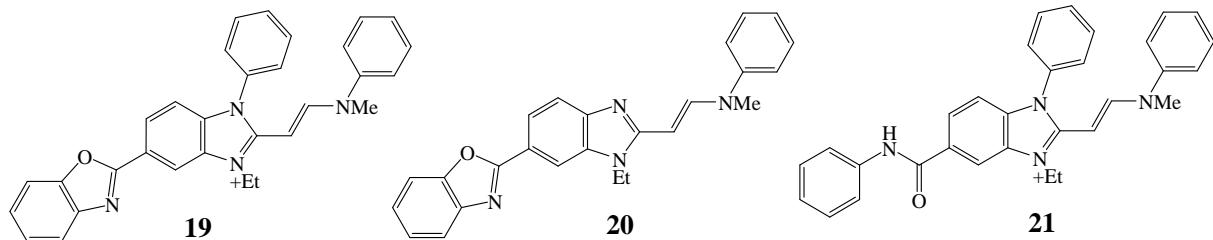
Qi Sun<sup>2</sup> i suradnici predložili su sintezu biološki aktivnih benzimidazolnih analoga AKT (protein kinaza B) inhibitora-IV koji posjeduje antitumorsku i antivirusnu aktivnost. Spojevi su sintetizirani reakcijom ciklizacije 1,2-arylendiamina s  $\alpha$ ,  $\beta$ -nezasi enim aldehidima uz korištenje ZrCl<sub>4</sub> kao katalizatora. Ispitana je aktivnost priređenih derivata na stanićima linije karcinoma grlija i 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 poveava antivirusnu aktivnost i citotoksi nost prema stani nim linijama karcinoma, ali nižu toksi nost prema NHBE stanicama te nikakav efekt na *Mycobacterium fortuitum*. Spoj **34** i **35** pokazuju ja u antivirusnu aktivnost prema rekombinantnom parainfluenza virusu 5 izazivaju i ekspresiju enzima luciferaze u HeLa stanicama.

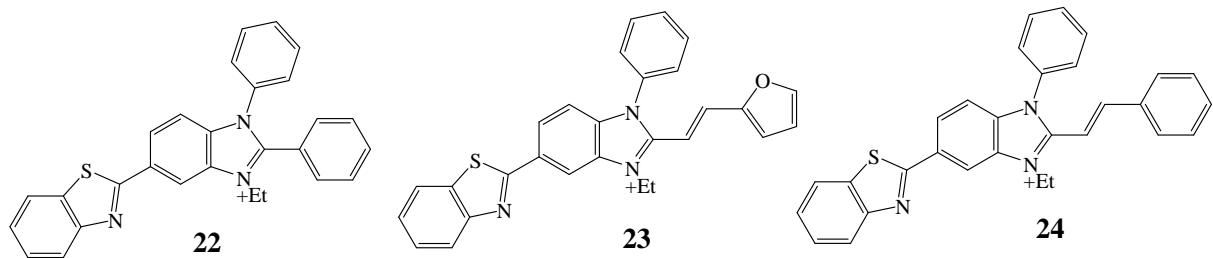
Uklanjanje grupa na C2, N3 i C5 položajima:

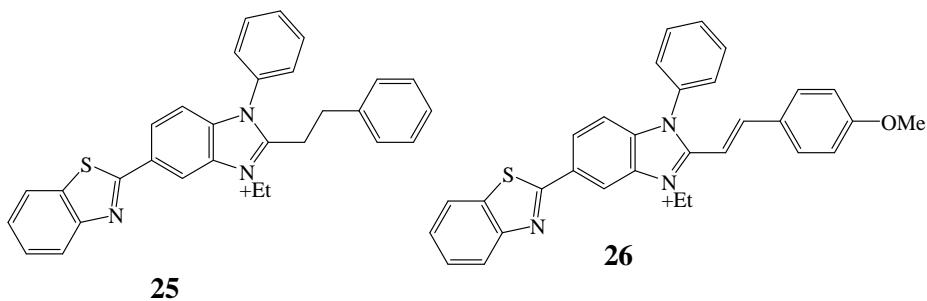


Izmjena na C5 položaju (i uklanjanje na N1 u spoju **20**):



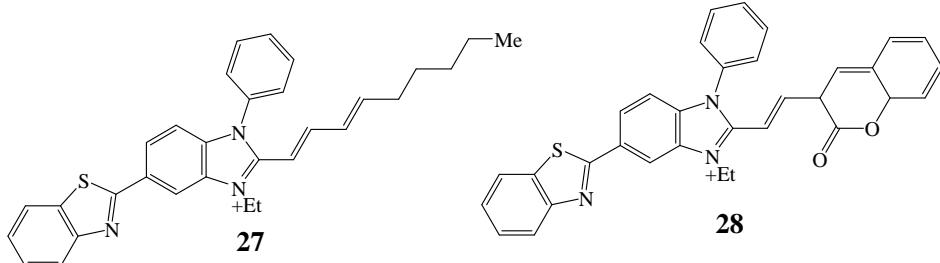
Izmjena na C2 položaju:





**25**

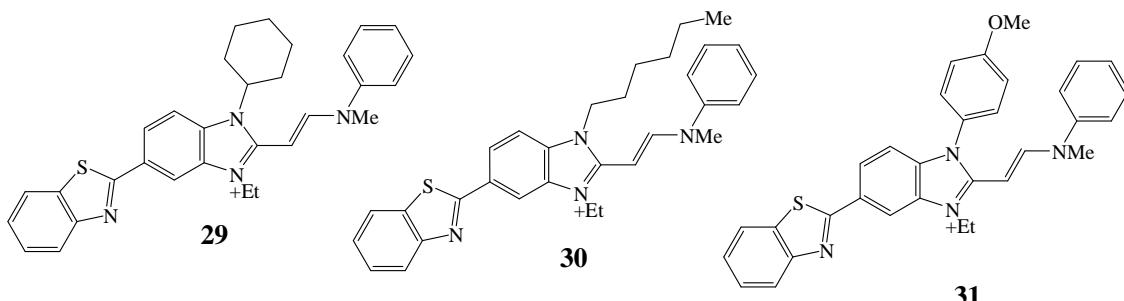
**26**



**27**

**28**

Izmjena na N1:

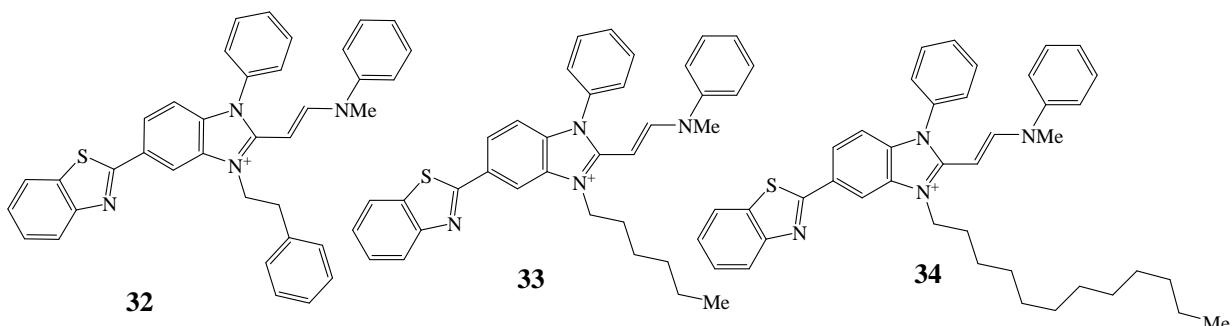


**29**

**30**

**31**

Izmjena na N3 položaju:

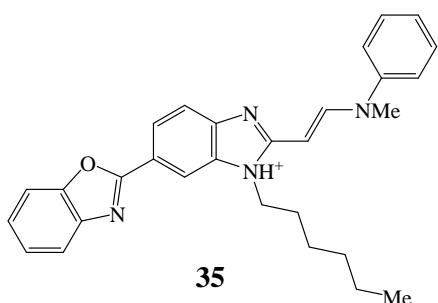


**32**

**33**

**34**

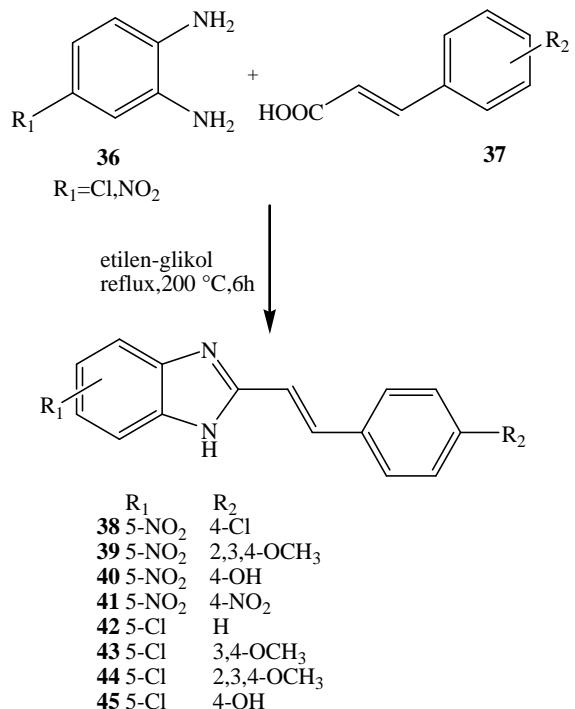
Uklanjanje na N1 i izmjena na N3 i C5 položajima:



**35**

**Slika 1.**

U svom istraživanju L. K. Soni i suradnici<sup>3</sup> sintetizirali su 5-(nitro/kloro)-2-stirilbenzimidazole prema Shemi 2.

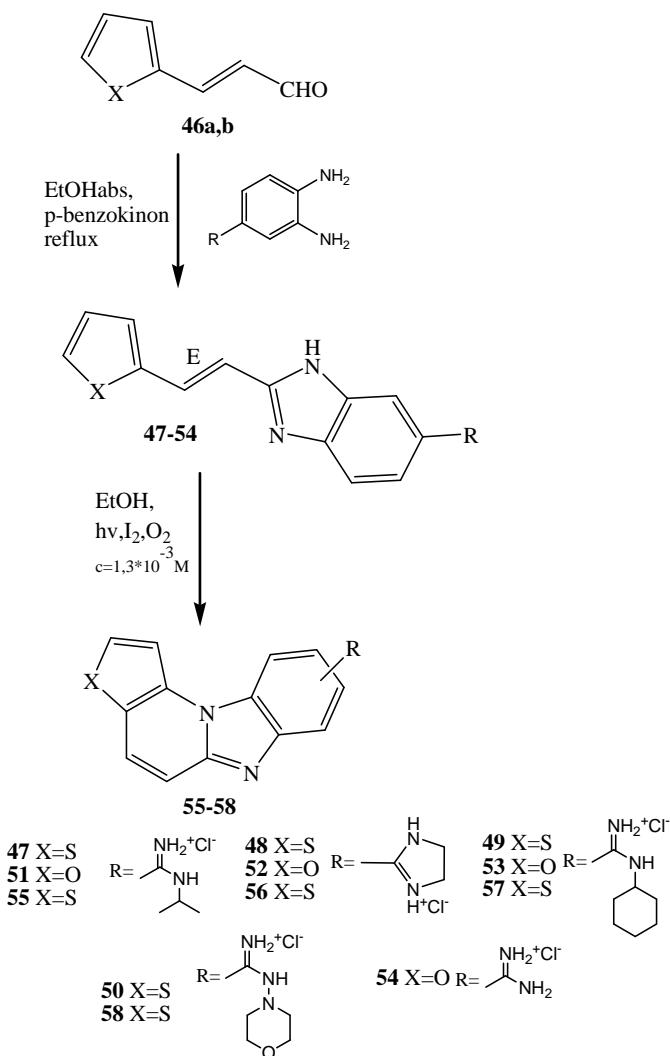


**Shema 2.**

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. Hranjec<sup>4</sup> i suradnici sintetizirali su acikli ke amidino-supstituirane tienil- i furilvinilbenzimidazole i njihove cikli ke derivate prema Shemi 3.

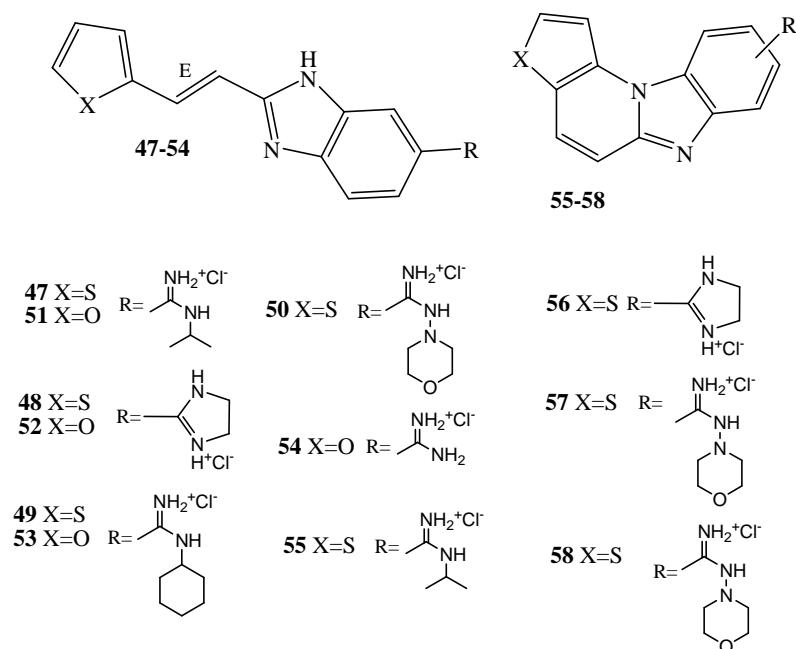
Spojevi **47–54** u obliku hidrokloridnih soli pripravljeni su reakcijom kondenzacije 3-(tiofen-2-il)propenala i 3-(furan-2-il)propenala s amidino-supstituiranim 1,2-fenilendiaminima i *p*-benzokinonom. Za sintezu je korištena Pinnerova reakcija za sintezu amidina iz cijano-supstituiranih prekursora 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.**

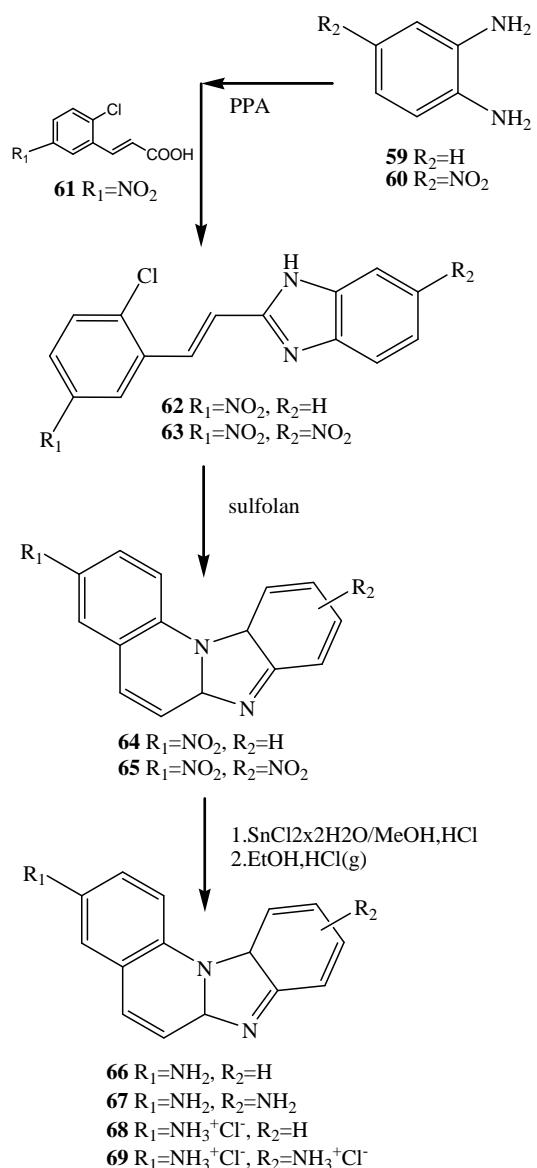
Prije enim spojevima je ispitana antiproliferativna aktivnost na 6 humanih stani nih linija karcinoma posebice stani nih linija karcinoma. Svi ispitani spojevi pokazuju izraženu antitumorsku aktivnost te rastu i inhibitorni efekt, a cikli ki spojevi aktivniji su od acikli kih. Korištenjem spektroskopskih metoda UV/Vis spektroskopije, cirkularnog dikroizma i fluorimetrijske spektroskopije te eksperimenata određivanja temperature taljenja, ispitana je interakcija najaktivnijih spojeva s ct-DNK. Na taj način određeni su neki od mehanizama biološkog djelovanja najaktivnijih spojeva. Cikli ki derivati **56** i **57** pokazuju pozitivne vrijednosti temperature mešanja i jaku stabilizaciju DNK te batokromni i hipokromni efekti u UV/Vis spektrima što upućuje na interkalativni način 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 dvostrukih uzvojnica pri čemu 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 uzvojnicu 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. Perin<sup>5</sup> 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 tetracikli 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 SnCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O u smjesi MeOH i HCl-a iz nitro spojeva. Prite enim 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.**

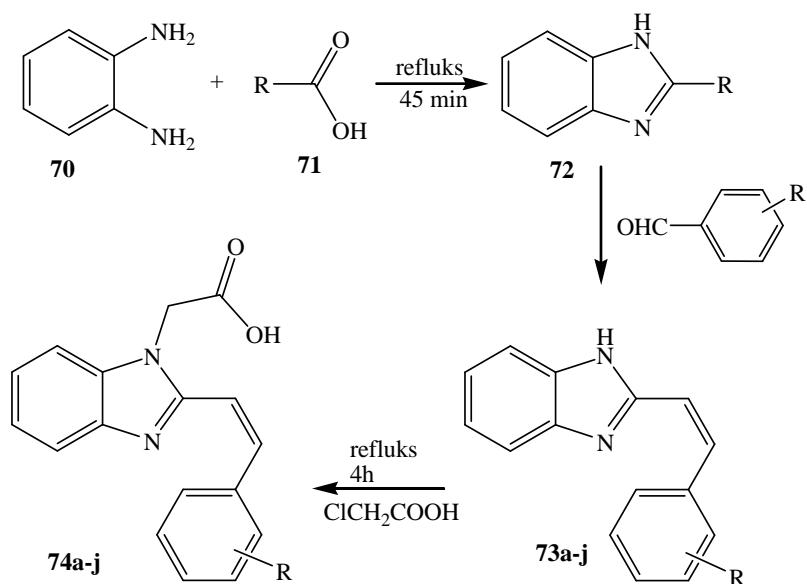
Svi spojevi pokazali su značajno inhibitorno djelovanje na 5 stani nih linija humanih karcinoma u mikromolarnom području koncentracija. Biološka ispitivanja (utjecaj na stanični ciklus i fluorescencijska mikroskopija) pokazali su da DNK molekula nije primarni cilj njihovog biološkog djelovanja. Viskozimetrijska ispitivanja potvrdila su interkaliranje 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 mešanja DNK što nije uobičajeno za interkalatore. Moguće objašnjenje je djelomično interkaliranje zbog amino grupa koje onemogućuju umetanje molekule između parova baza DNK.

Nema zna ajne razlike u osjetljivosti izme u stani nih linija, ali spoj **62** pokazuje jaku selektivnost prema HCT 116 stanicama. Diamino supstituiranom derivatu **67**, njegovom dihidrokloridnom analogu **69** i monosupstituiranim analozima ispitani je utjecaj na perturbaciju stani nog ciklusa prototonom citometrijom. Rezultati potvrjuju 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 unutarstani na 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 AP<sup>6</sup> i suradnici sintetizirali su niz derivata benzimidazola s različitim supstituentima na položaju C-2 i octenom kiselinom ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 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.

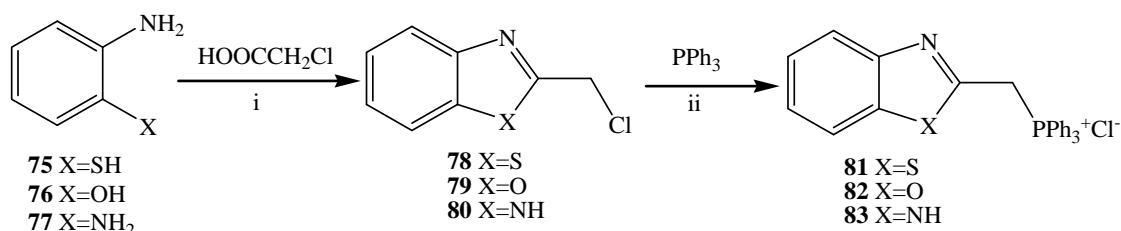
Strukture novopriređenih spojeva potvrđene su  $^1\text{H}$ , NMR i IR spektroskopijom. 2-supstituirani benzimidazoli pokazali su analgetika i protuupalna svojstva *in vitro* metodom inhibicije denaturacije albumina. Svi spojevi podvrgnuti su analgeti kom u inkubaciji pri 50 mg/kg tjelesne težine testom 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* ( $\text{IC}_{50}=142,17,150,07,147,88,120,72$  i 117,58 ppm). Rezultati ovog istraživanja upućuju na mogućnost razvoja i optimiranja ovakvih derivata benzimidazola kao potencijalnih protuupalnih lijekova.



R = p-Cl, m-NO<sub>2</sub>, p-OCH<sub>3</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 2-OH, (3,4,5) OCH<sub>3</sub>, CH=CH-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, p-NO<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, m-Cl

**Shema 5.**

G. R. Morais<sup>7</sup> i suradnici sintetizirali su nove stirilne fluorirane benzazolne derivate **87**, **88**, **91** i **94** kao potencijalne amiloidne probe. Kondenzacijom 2-klorometilbenzazola **78–80** i *o*-fenilenamina **75–77** s kloroctenom kiselinom pripremljeni su fosfonijevi derivati **81–83** prema Shemci 6.

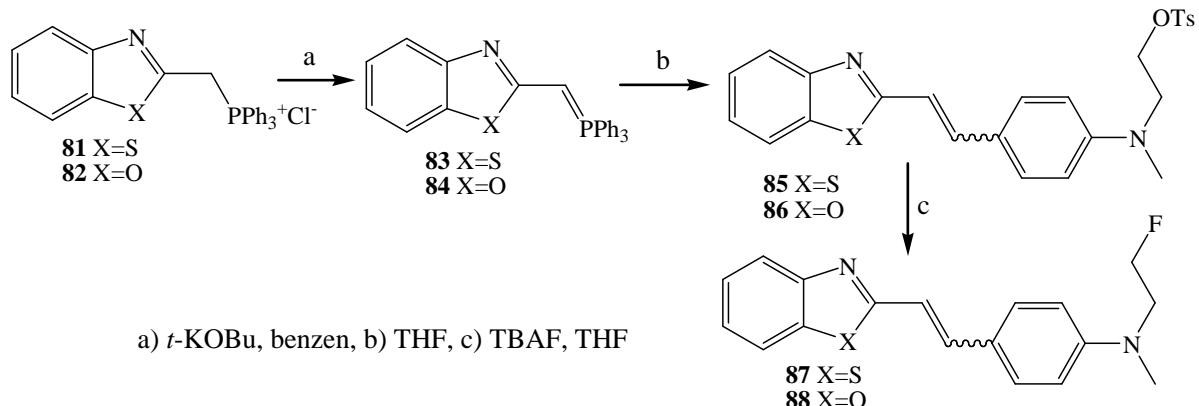


i. CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>H/SiO<sub>2</sub> za 78, PPA za 79 i HCl za 80; ii. toluen za 81 i 82, acetonitril za 83

**Shema 6.**

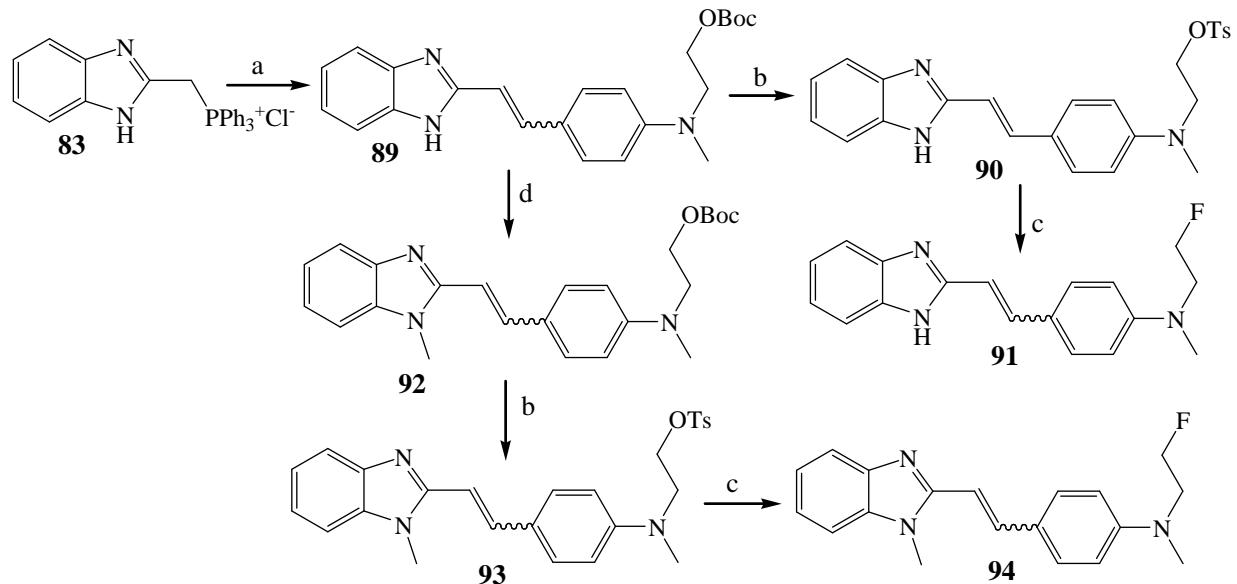
Iz spojeva **81** i **82** dobiveni su fosforani **83** i **84** uz prisutnost kalijeva *tert*-butoksida u benzenu iz kojih su Wittigovom reakcijom prire eni stirilbenzotiazol **85** i stirilbenzoksazol **86**. Smjesa ovih izomera dala je kona ne spojeve **87** i **88** (Shema 7.). Spoj **91** dobiven je tretiranjem spoja **83** s Boc-zašti enim benzaldehidom i natrijevim metoksidom u metanolu. Tretiranjem smjesi spojeva **89** u metil-jodidu dobiven je spoj **92**, a njegovim *O*-tosiliranjem i uz prisunost tetrabutilamonijevig fluorida dobiven je spoj **94** (Shema 8.). Kona ni spojevi

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



**Shema 7.**

Spojevi **87**, **88**, **91** i **94** skloni su fotoizomerizaciji u otopini dok nastavak izomerizacije ovisi o prirodi azolnog prstena. *E*-benzimidazolni stirlni derivati u potpunosti izomeriziraju u *Z*-izomer dok benzotiazolni i benzoksazolni derivati podliježu djelomičnoj izomerizaciji. Iskorištanjem 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.



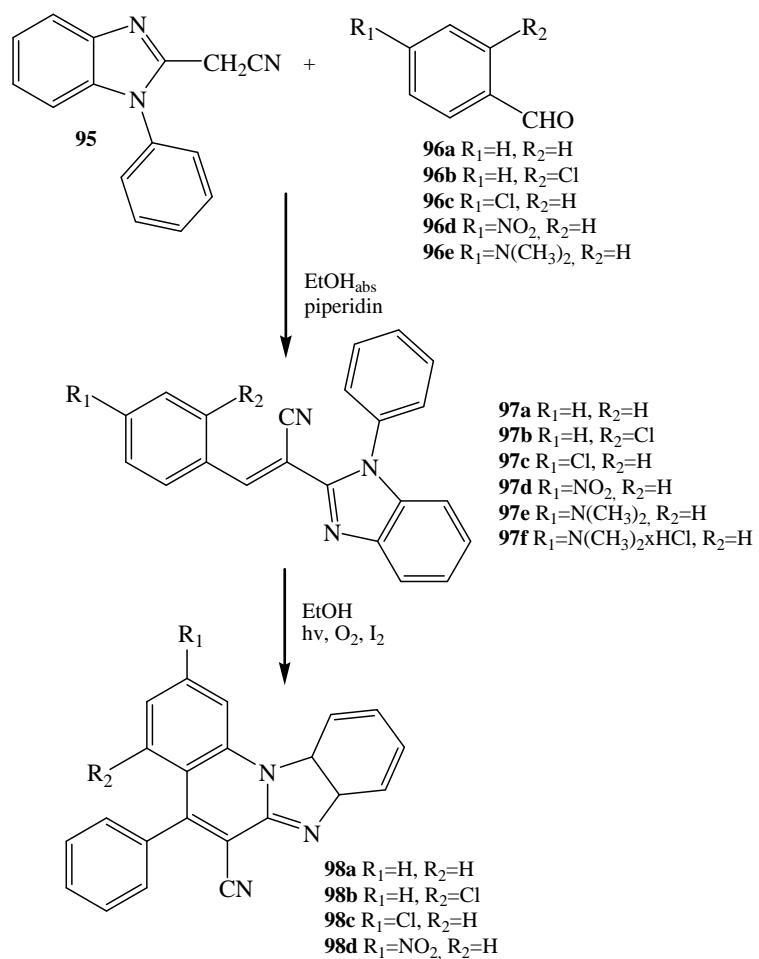
**Shema 8.**

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

Rezultati ukazuju na to da spojevi pokazuju slične osobine vezanja na različita vlastita inzulina, -sinuklein, -amiloida te prepoznavanja njihove "unakrsne" strukture -polje.

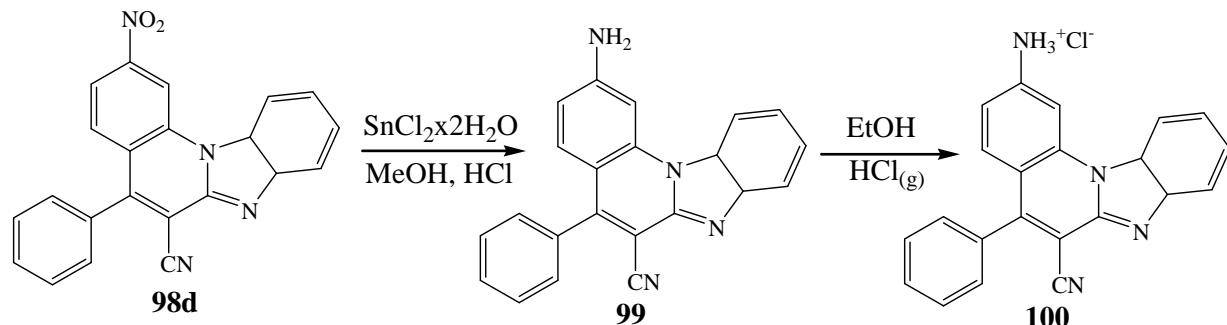
## 2.1. Biološka aktivnost i sinteza akrilonitrilnih derivata benzimidazola

M. Hranjec<sup>8</sup> i suradnici sintetizirali su nove acikličke E-3-fenil-2-(1-fenilbenzimidazol-2-il)akrilonitrite **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** pridaju se reakcijom fotokemijske dehidrociklizacije, a amino-supstituirani spoj **99** redukcijom sa SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O u metanolu i HCl iz nitro-supstituiranog prekursora **98d**.



Shema 9.

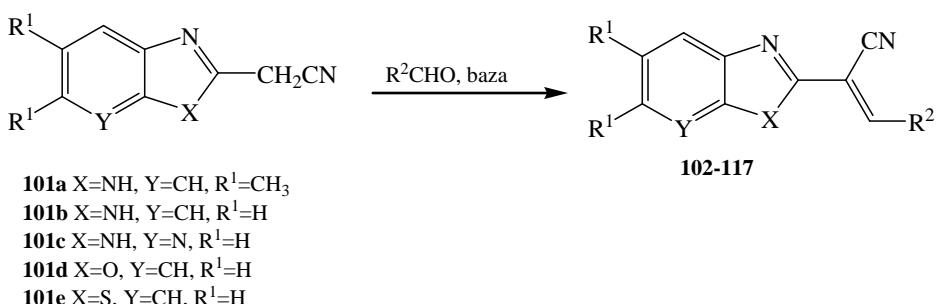
Njegova hidroklorna sol **100** pripremljena je uvo enjem plinovitog HCl-a u etanolnu otopinu.



**Shema 10.**

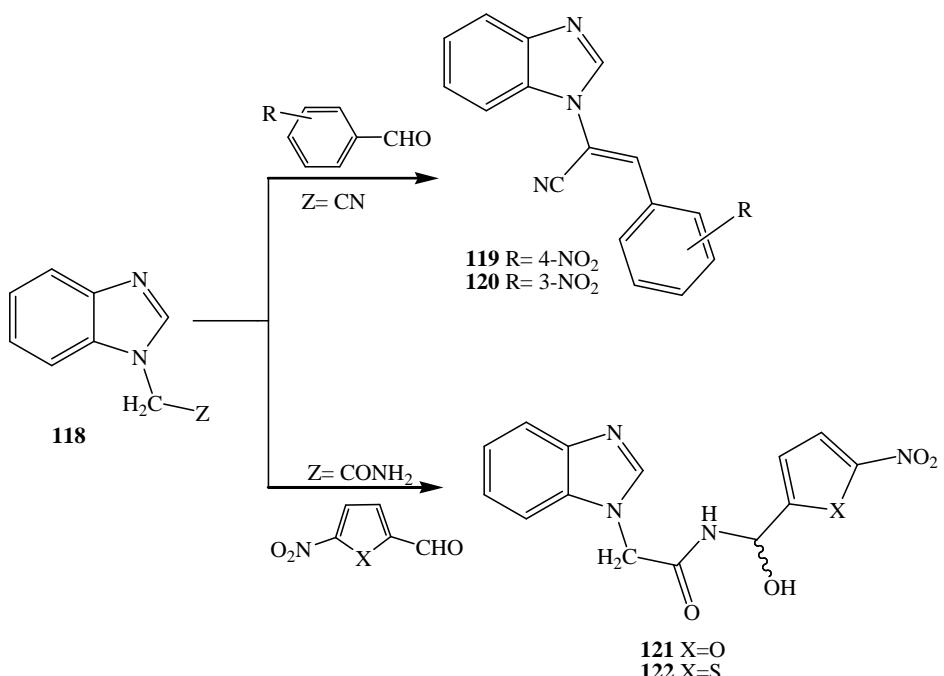
Među acikličkim derivatima, nitro-supstituirani spoj **97d** pokazuje izraženi batokromni pomak s maksimumom emisije na 561 nm, dok ciklički spoj **98a** pokazuje najizraženiji intenzitet fluorescencije. Prema rezultatima, intenzitet fluorescencije spoja **99** opada u prisutnosti Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Li<sup>+</sup> i Fe<sup>3+</sup> kationa dok u prisutnosti Zn<sup>2+</sup> i Ag<sup>+</sup> intenzitet fluorescencije raste. Spoj **99** pokazuje posebnu osjetljivost prema Zn<sup>2+</sup> kationu što sugerira na mogućnost primjene za detekciju i kvantifikaciju Zn<sup>2+</sup> 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. Saczewski<sup>9</sup> i suradnici sintetizirali su nove 2,6-disupstituirane akrilonitrile i derive (benzimidazol-1-il)aceamida (Shema 11. i 12.) i ispitali njihovu antibakterijsku i citotoksičnu aktivnost na 12 stanih linija humanog karcinoma.



**Shema 11.**

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



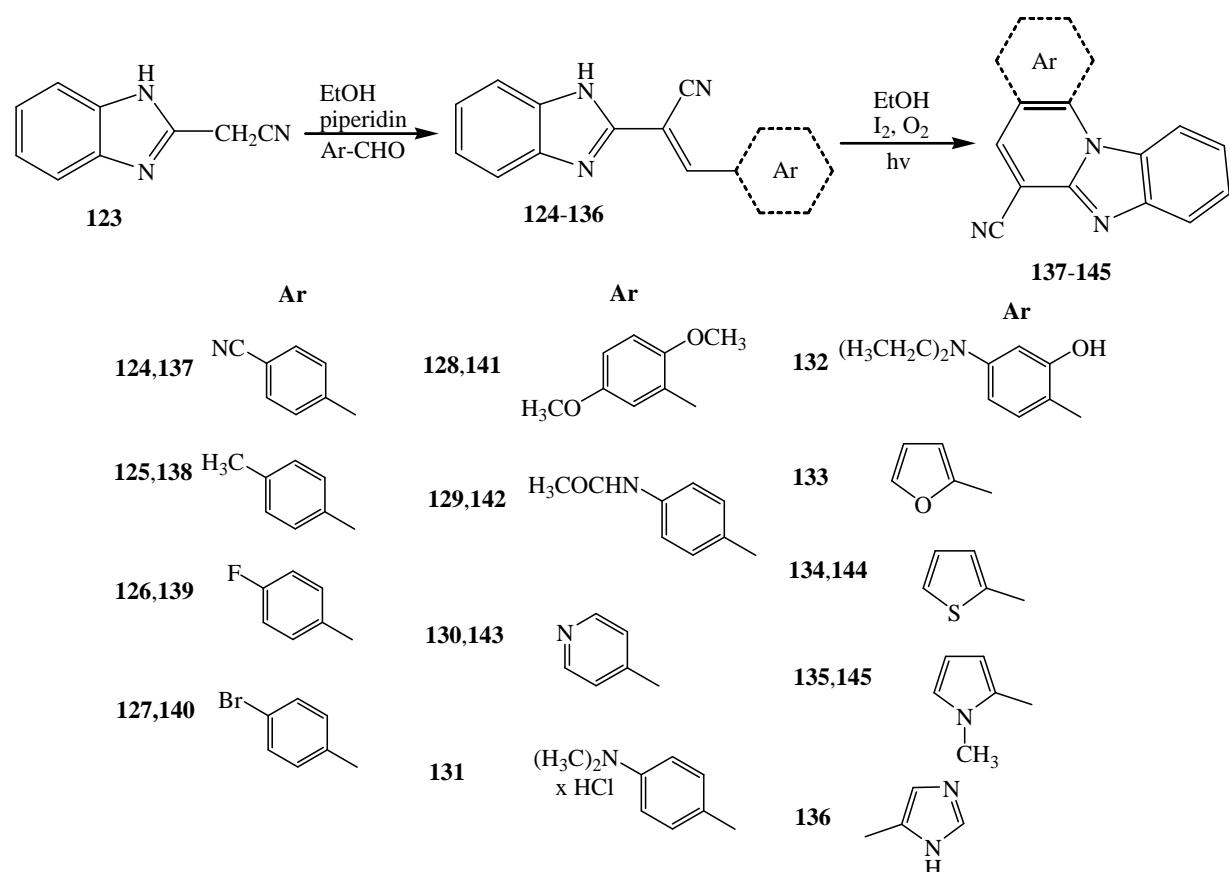
**Shema 12.**

Utvrđeno je da na temeljnoj strukturi 2-(benzimidazol-2-il)-3-(5-nitrotiofen-2-il)akrilonitrila metilne grupe na petom i šestom položaju benzimidazolnog prostena uzrokuju trostruko povećanje citotoksične aktivnosti. Zamjena nitrotiofenske jezgre s piridinskom smanjuje citotoksičnu aktivnost, kao i zamjena nitro grupe s metoksi grupom. Citotoksičnu 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 akumlacije 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. Hranjec<sup>10</sup> i grupa istraživala su 2,3-disupstituirane akrilonitrilne derivate benzimidazola, benzimidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrile i heteroatomske fluorene prema shemi 13. Ačiščeni 2-benzimidazolil supstituirani akrilonitrili **124–136** priređeni su kondenzacijom 2-cijanometilbenzimidazola **123** i odgovarajućih heteroatomskih aldehida u absolutnom etanolu uz par kapi piperidina.

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

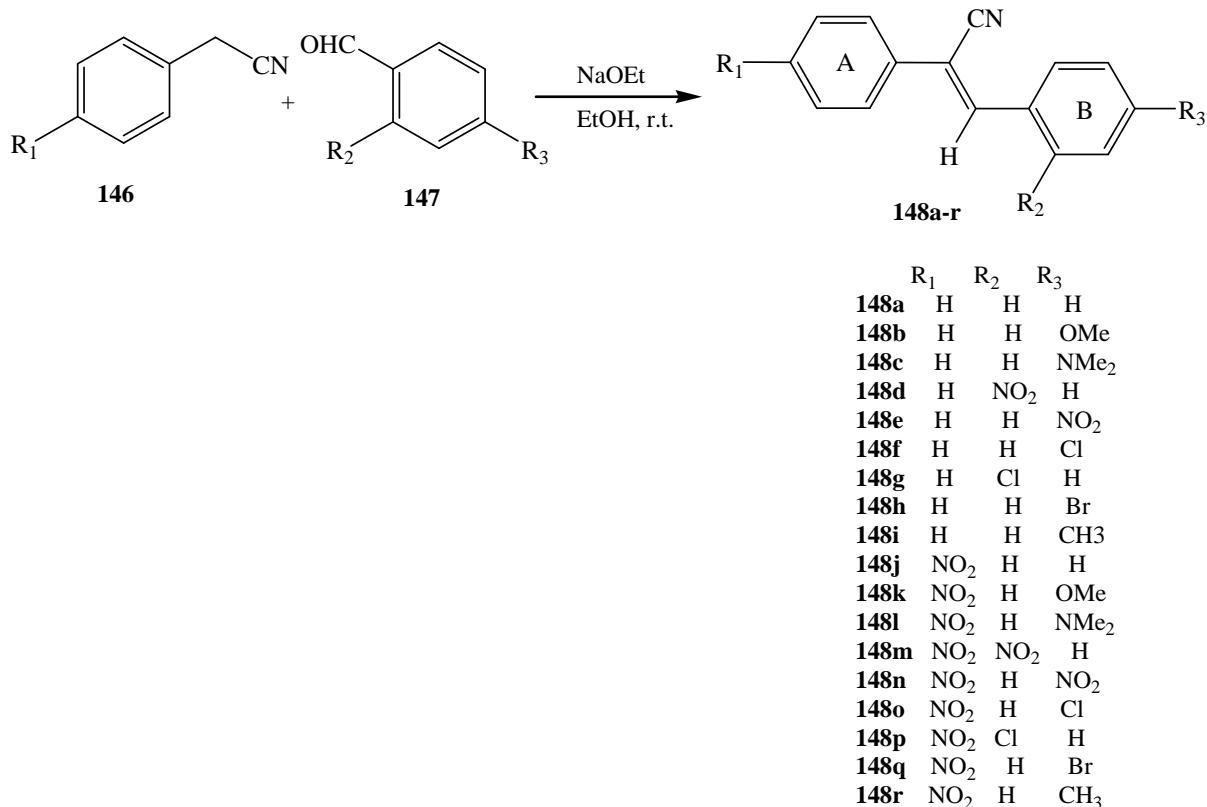
Svi spojevi, osim **136** i **138**, pokazuju antiproliferativnu aktivnost prema stani nim linijama karcinoma, a posebno jaku aktivnost i selektivnost prema liniji stanica HeLa pokazao je spoj **135** i njegov cikli ki analog **145**. Cikli ki i acikli ki derivati benzimidazola ne pokazuju veliku razliku u biološkoj aktivnosti te se pretpostavlja da njihova antitumorska aktivnost proizlazi iz interakcije s DNK molekulom. Cikli ki derivati interkaliraju u dvostruku uzvojnicu 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. Alam<sup>11</sup> 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 bavnog katalizatora. Ve ina novoprire enih spojeva pokazuje supresivan efekt na rast stani nih linija karcinoma.

Spoj **148c** pokazuje najveću aktivnost prema svim staničnim linijama, a slijede ga spojevi **148f**, **148i** i **148h** sa supstituentima na para-položaju fenilnog prstena A. Spoj **148c** takođe pokazuje 2,5 puta veću aktivnost prema HCT15 stanicama. Prisutnost elektron-donorskih grupa (X, OMe, NMe<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>) na para-položaju fenilnog prstena B doprinosi poboljšanju citotoksične aktivnosti u usporedbi s nesupstituiranim akrilonitrilima. Spojevi sa halogenim supstituentima (**148f** i **148h**) na para-položaju prstena B koji imaju elektron-donorska i elektron-odvlačiva svojstva zbog rezonantnog efekta pokazuju poboljšanu citotoksičnu aktivnost. Iako je metoksi grupa jači elektron-donor, spoj **148b** pokazuje manju citotoksičnu aktivnost od klornog analoga **148f**. Spojevi **148k–m**, **148o**, **148q** i **148r** pokazuju znatno smanjenu aktivnost prema staničnim linijama osim spojeva **148n** i **148p**. Svi spojevi inhibiraju rast bakterije *S. typhi* dok spojevi **148k–n** pokazuju jaču aktivnost prema *S. Aureus* nego prema *S. typhi*, od kojih je **148k** najaktivniji. Može se zaključiti da su (Z)-2,3-difenilakrilonitrili aktivniji prema Gram-negativnim bakterijama.

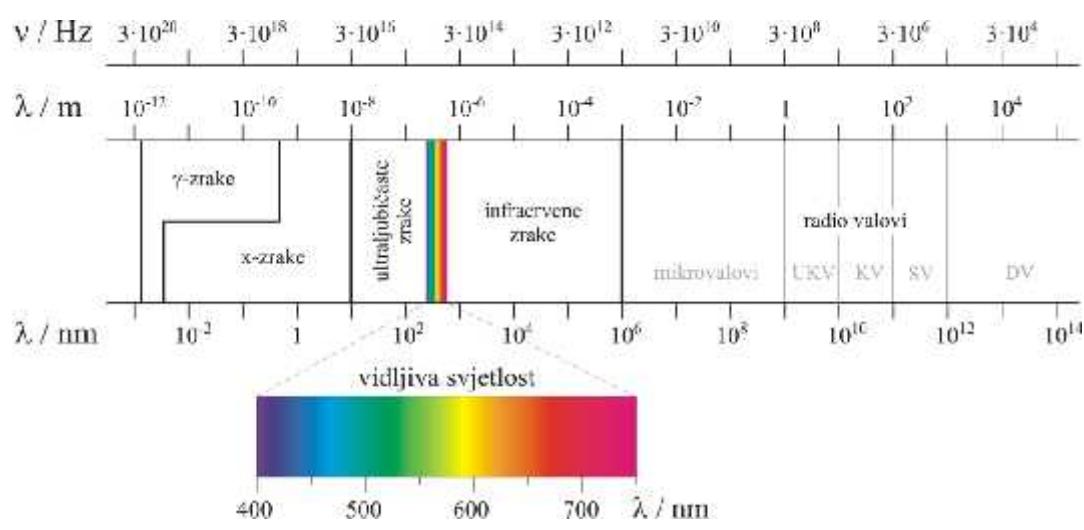


Shema 14.

## 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 radnica o primjerni mikrovalnovoj zračenju u organskoj sintezi od prvog rada kojeg su 1986. objavili Gedye i Majetich. Reakcije su proveli u kućnoj mikrovalnoj peći 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 skraćenje reakcijskog vremena (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.

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



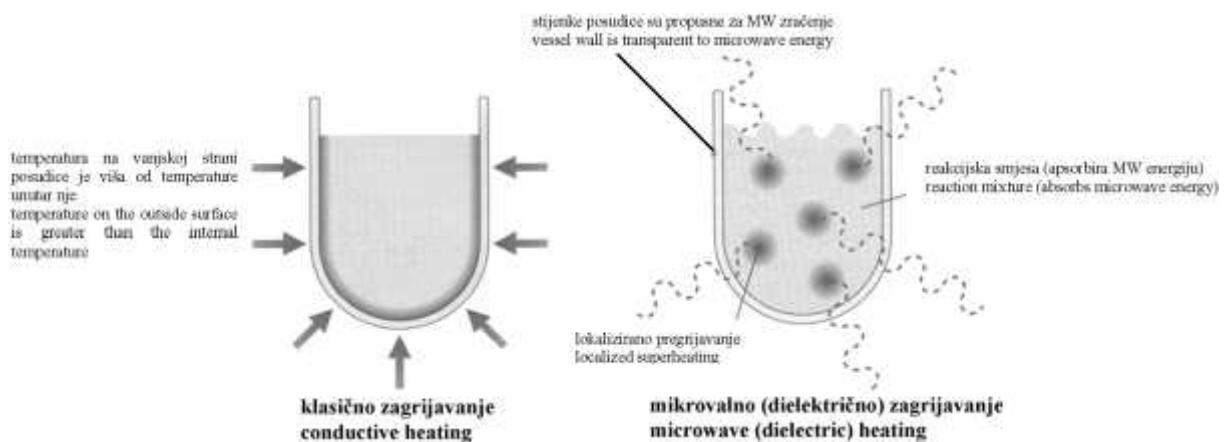
Slika 2. Elektromagnetski spektar<sup>12</sup>

Kao što je mikrovalne peći 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 tvari) da apsorbira mikrovalnu energiju i pretvara je u toplinu. Interakcija izmjeni nog električnog polja visokofrekventnog mikrovalnovog zračenja i materije odgovorna je za u inakzagrijavanja.

Djelovanje elektromagnetskog polja na elektri ni dipol uzrokuje orijentaciju prema smjeru polja što dovodi do trenja molekula tj. gubitka topline (dielektri ni 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 izmjeni nog elektri nog 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-zra enje te dolazi do njihovog kretanja djelovanjem izmjeni nog elektri nog 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-zra enje. Kada su otapala izložena MW-zra enju vrelišta su viša u odnosu na klasi no zagrijavanje što se naziva u inak pregrijavanja. Voda je npr. srednje apsorbiraju e otapalo, zagrijava sporije od etanola, etilen-glikola i DMSO-a (dimetilsulfoksiда) koji su visoko apsorbiraju a otapala dok dioksan uop e ne apsorbira MW-zra enje.

Tradicionalno, organska sinteza se provodi zagrijavanjem reakcijske posude vanjskim izvorom topline (npr. uljna kupelj) pri emu se toplina prenosi na stjenke posude te na otapalo i reaktante. Ova metoda je relativno spora i neu inkovita jer ovisi o toplinskoj vodljivosti materijala što uzrokuje ve u temperaturu posude u odnosu na reakcijsku smjesu. S druge strane, kod mikrovalnog zagrijavanja reakcijska smjesa izravno apsorbira energiju jer su posude izra ene od materijala propusnih za mikrovalno zra enje 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  $27^{\circ}\text{C}$  te pokazuje isti iznos konverzije za 1,61s pri  $227^{\circ}\text{C}$ . Dakle, može se zaklju iti da povišenje temperature uzrokuje brže kretanje molekula i ve i broj energetski povoljnih sudara zbog termi kog/kineti kog djelovanja koje je posljedica jakog trenuta nog grijanja smjese. Neki autori tvrde da ubrzaju reakcije pridonose i tzv. netermi ki mikrovalni u inci koji su posljedica direktnе interakcije elektri nog 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 nosa (silikagel, aluminijevi oksidi, grafit) pri emu vrsti nosa u nekim reakcijama djeluje i kao katalizator. Tako er, kao tehnika mikrovalne sinteze primjenjuje se i me u fazna kataliza (PTC). Reakcije potaknute MW-zra enjem mogu e je provesti primjenom otvorenih ili hermeti ki zatvorenih reakcijskih posuda.

Razvojem i dostupnošću u MW-reaktora koji imaju mogunost 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 biće dosegla 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 kuhinja mikrovalnih penećica, 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,ime se postiže homogena raspodjela polja. Kod jednofunkcijskih zračenja usmjereni su na posudu koja je na odredenoj udaljenosti od izvora zračenja i posude nisu istovremeno podložne zračenju.<sup>13</sup>

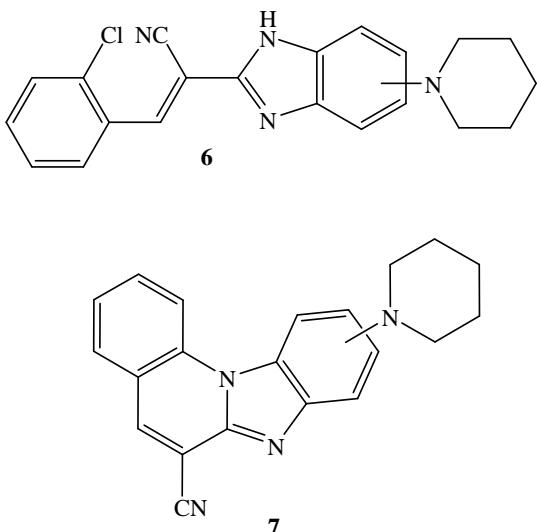


**Slika 3.** Usporedba klasičnog i mikrovalnog zagrijavanja<sup>14</sup>

### **3. REZULTATI I RASPRAVA**

### 3.1. Cilj rada

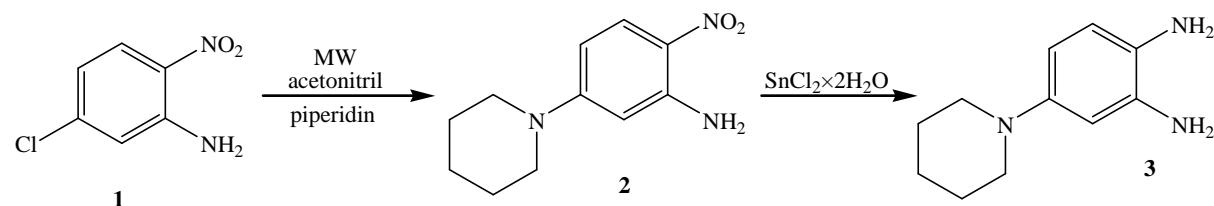
Zadatak ovog rada bila je sinteza potencijalno biološki aktivnog acikli kog 2-benzimidazolil supstituiranog akrilonitrila **6** te njegovog cikli kog analoga benzimidazo[1,2-*a*]kinolina **7**. Ciljni spojevi prire eni su linearnom sintezom iz 2-nitro-5-(piperidin-1-il)anilina **2** te 4-(piperidin-1-il)-1,2-fenilendiamina **3**. Acikli ki derivat benzimidazola **6** prire en je kao smjesa dva tautomera **6a** i **6b**, a cikli ki derivat **7** kao smjesa dva regioizomera **7a** i **7b**. Strukture novoprire enih spojeva prikazanih na Slici 4. potvr ene su  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijom. Spektroskopska karakterizacija spojeva provedena je UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom mati nih otopina pripravljenih u etanolu.



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

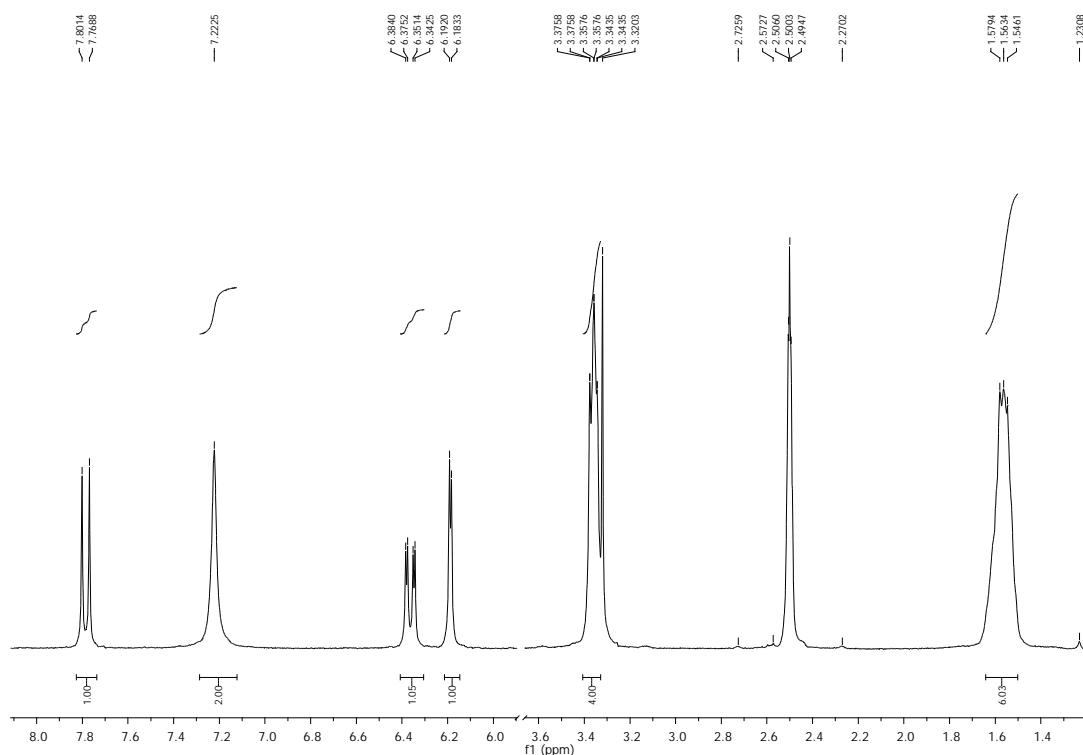
### 3.2. Sinteza prire enih spojeva

4-piperidinil-1,2-fenilendiamin **3**, kao glavni prekursor za pripravu piperidinil-supstituiranog akrilnog derivata benzimidazola **6**, prire en je redukcijom s kositar-kloridom dihidratom u metanolu i kiselom mediju iz 2-nitro-5-piperidinilanilina **2** u iskorištenju od 65%. Spoj **2** je prethodno prire en mikrovalovima potpomognutom aminacijom klor-supstituiranog derivata **1** u acetonitrilu sa suviškom piperidina u iskorištenju od 90%. Struktura spojeva **2** i **3** potvr ena je  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijom.<sup>15,16</sup>



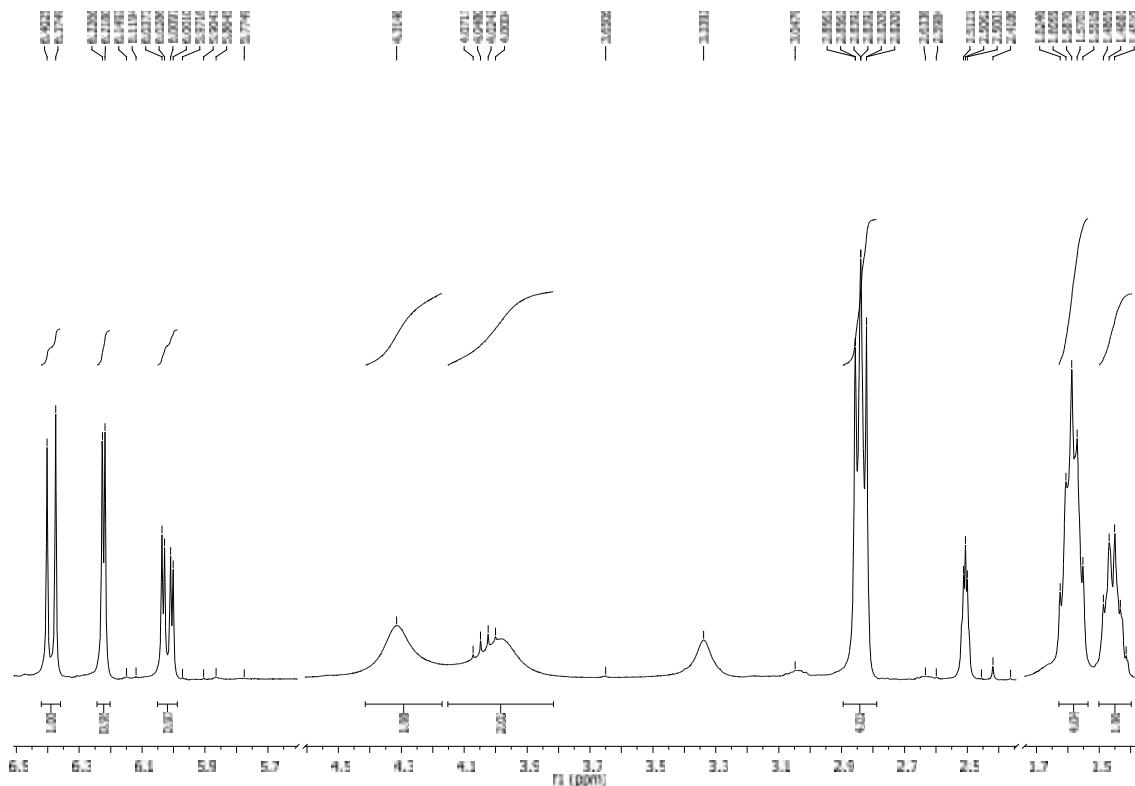
**Shema 15.** Sinteza spojeva **2** i **3**

U  $^1\text{H}$  NMR spektru spoja **2** (Slika 5.) može se uo iti široki singlet koji odgovara dušikovom protonu amino skupine na 7,22 ppm, odgovaraju i broj signala aromatskih protona u podru ju 7,79 – 6,19 ppm, te signali alifatskih protona piperidinske jezgre u podru ju 3,58 – 1,49 ppm. Signali su u odnosu na spektar spoja **3** pomaknuti u niže magnetsko polje.



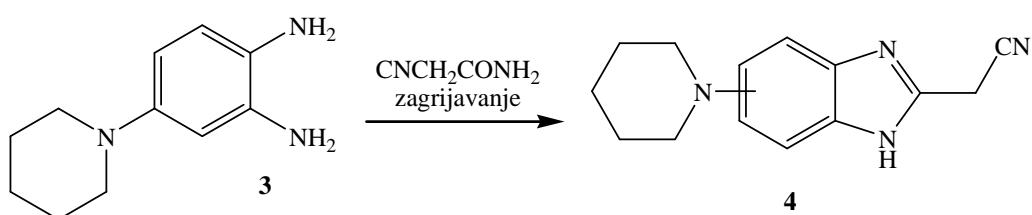
**Slika 5.**  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **2**

U  $^1\text{H}$  NMR spektru spoja **3** (Slika 6.) može se uočiti odgovarajući 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.**  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **3**

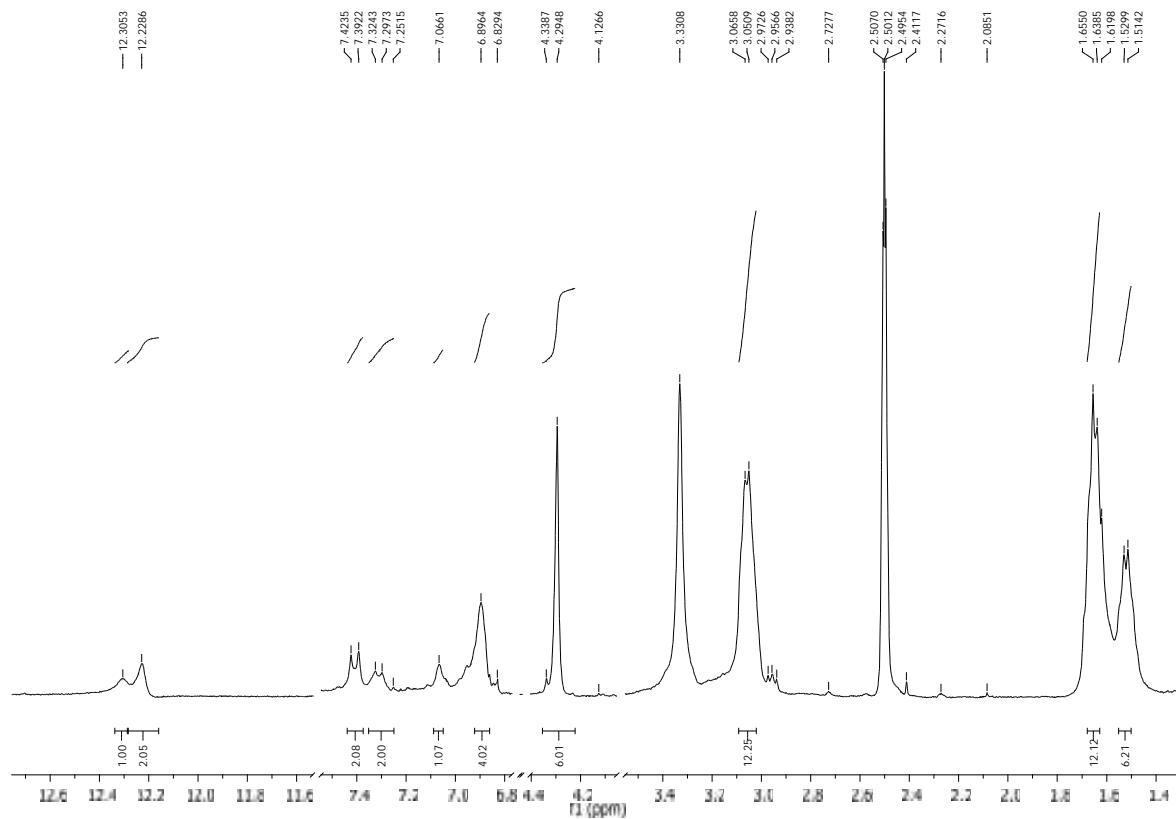
2-cijanometil-5(6)-piperidinilbenzimidazol **4**, kao glavni prekursor za sintezu ciljanih spojeva, dobiven je zagrijavanjem 4-piperidinil-1,2-fenilendiamina **3** i 2-cijanoacetamida u obliku smjese dva tautomera 2-cijanometil-5-piperidinilbenzimidazola **4a** i 2-cijanometil-6-piperidinilbenzimidazola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



**Shema 16.** Sinteza spoja **4**

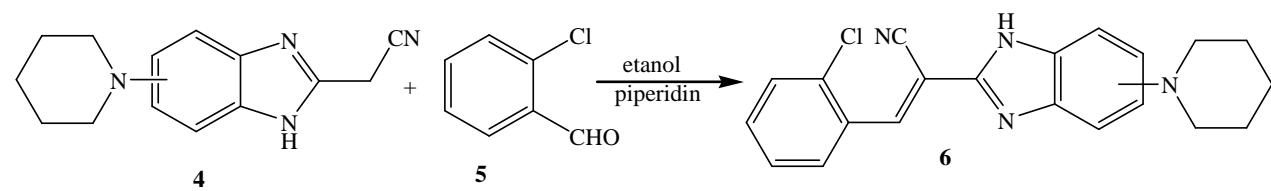
Prema  $^1\text{H}$  NMR spektru, prikazanom na Slici 7., tautomeri su dobiveni u omjeru 1 (**4b**): 2 (**4a**), a u spektru je vidljiv dvostruki broj signala svih protona.

Može se uočiti odgovarajući broj signala aromatskih protona u području 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 području 4,29 – 1,51 ppm.



**Slika 7.**  $^1\text{H}$  NMR spektar smjese regioizomera spoja **4**

Spoj *E*-2-[5(6)-piperidinilbenzimidazol-2-il]-3-(2-klorfenil)akrilonitril **6** priređen 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 Shemii 17.<sup>19,20</sup>

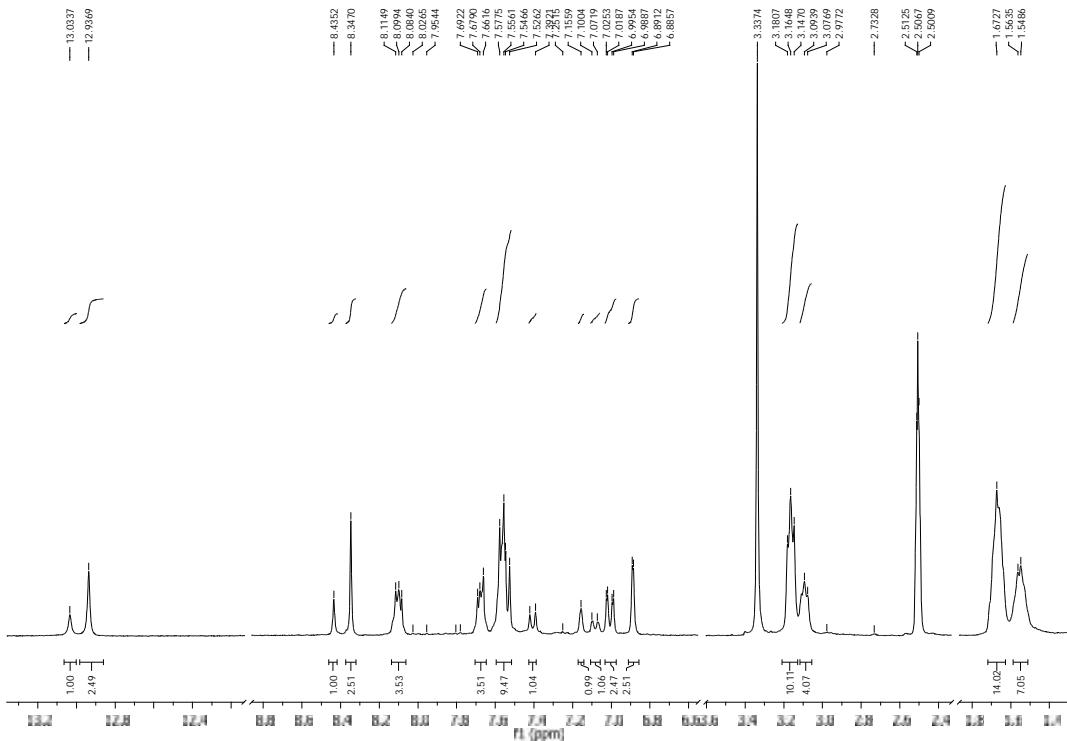


**Shema 17.** Sinteza spoja **6**

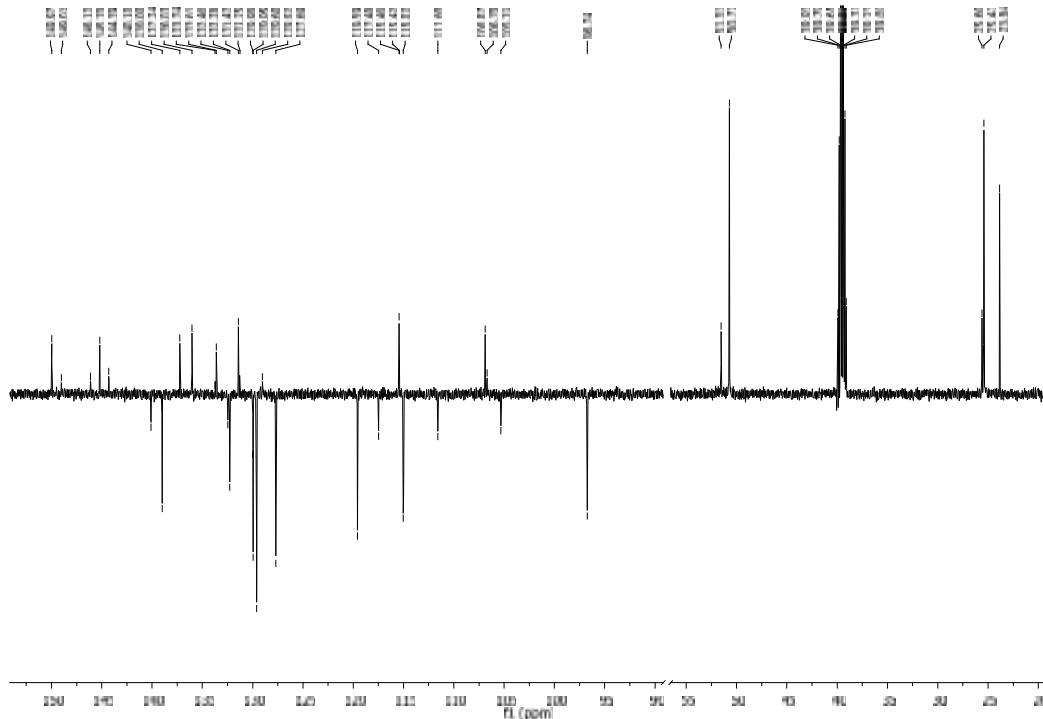
Na Slici 8.a–c prikazani su  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri te kromatogram i MS spektar spoja **6**.

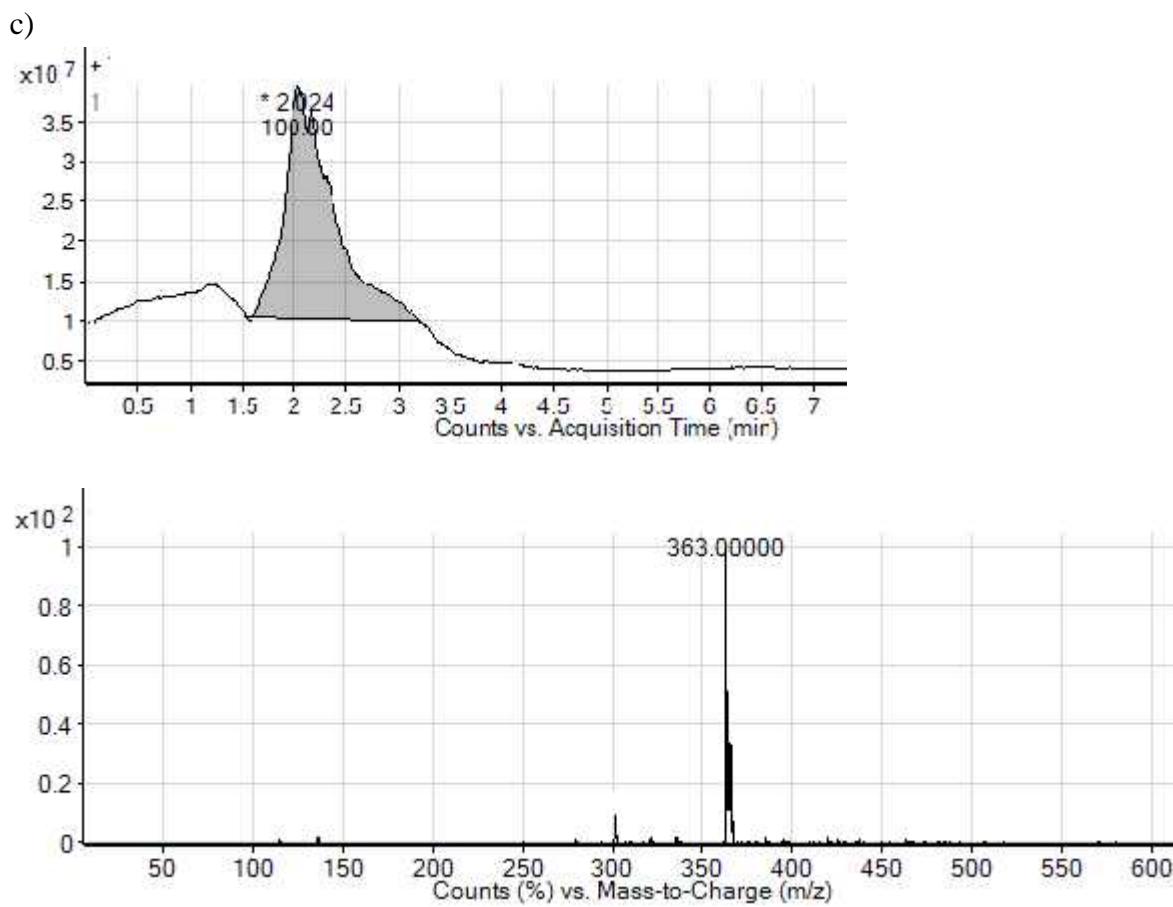
Prema  $^1\text{H}$  NMR spektru, prikazanom na Slici 8.a, tautomeri su dobiveni u omjeru 2 (**6b**): 5 (**6a**), te se može uočiti odgovarajući broj signala aromatskih protona u području 8,43 – 6,89 ppm, signali protona NH skupine benzimidazola na 12,93 ppm i 13,02 ppm te signali alifatskih protona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

a)



b)

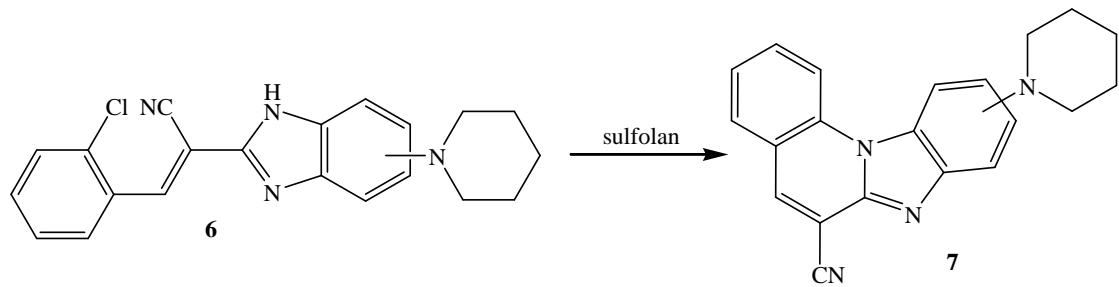




**Slika 8.** a) <sup>1</sup>H NMR spektar; b) <sup>13</sup>C NMR spektar; c) kromatogram i MS spektar spoja **6**

U <sup>13</sup>C NMR spektru spoja **6** na Slici 8.b može se uočiti odgovarajući broj signala koji odgovaraju kvaternim ugljikovim atomima i odgovarajući 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<sub>2</sub> skupina. Na Slici 8.c prikazan je MS spektar i kromatogram spoja **6** u kojem se može uočiti odgovarajući molekulski pik.

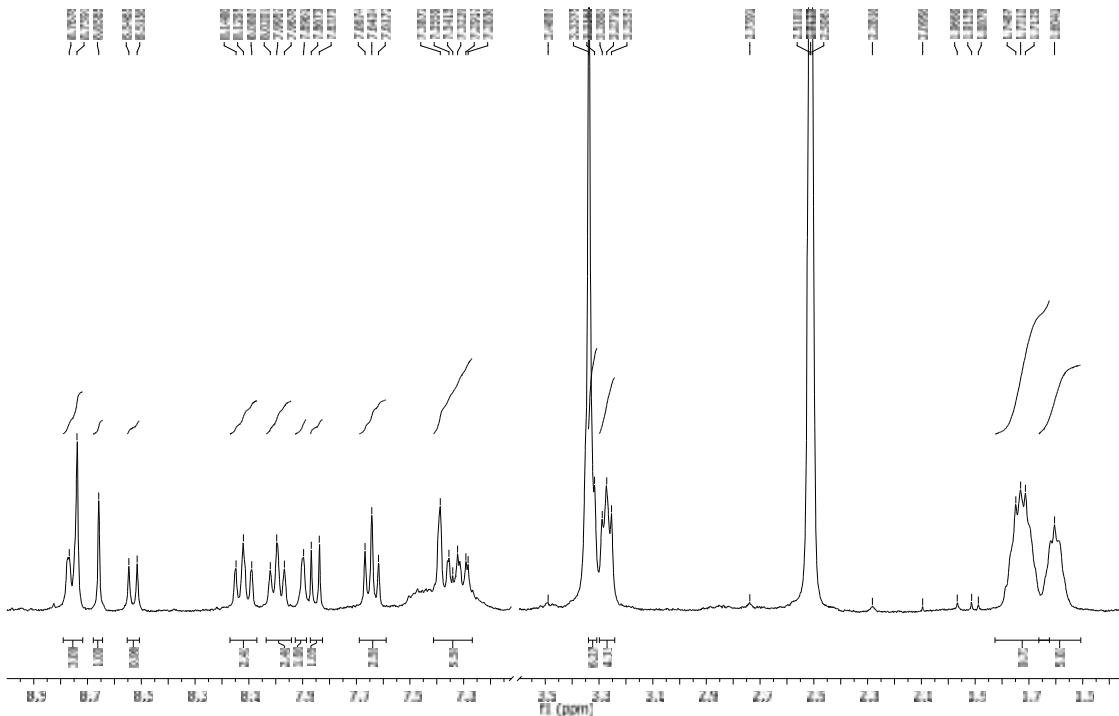
6-cijano-9(10)-piperidinilbenzimidazo[1,2-*a*]kinolin **7** dobiven je ciklizacijom acikličkog spoja **6** u sulfolanu, prema Shemi 19., u obliku smjese dva regioizomera, 6-cijano-9-piperidinilbenzimidazo[1,2-*a*]kinolina **7a** i 6-cijano-10-piperidinilbenzimidazo[1,2-*a*]kinolina **7b**.<sup>21,22</sup> Struktura cikličkog derivata **7** potvrđena je NMR i masenom spektroskopijom, a na Slici 9. a,b prikazani su <sup>1</sup>H NMR i MS spektri.



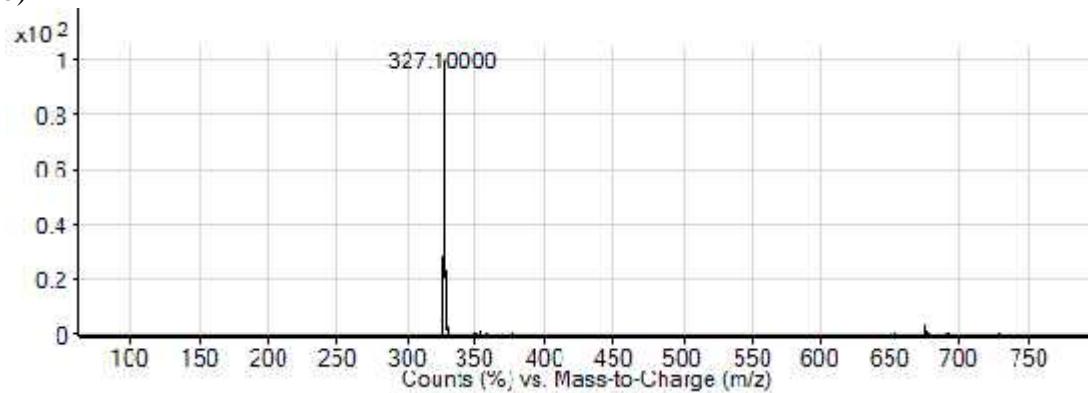
**Shema 19.** Sinteza cikli kog derivata 7

Prema  $^1\text{H}$  NMR spektru, (Slika 9.a) regioizomeri su dobiveni u omjeru 2 (**7b**): 3 (**7a**), a može se uočiti odgovarajući broj signala aromatskih protona, alifatskih protona piperidinske skupine te nestanak signala NH protona benzimidazolske jezgre.

a)



b)

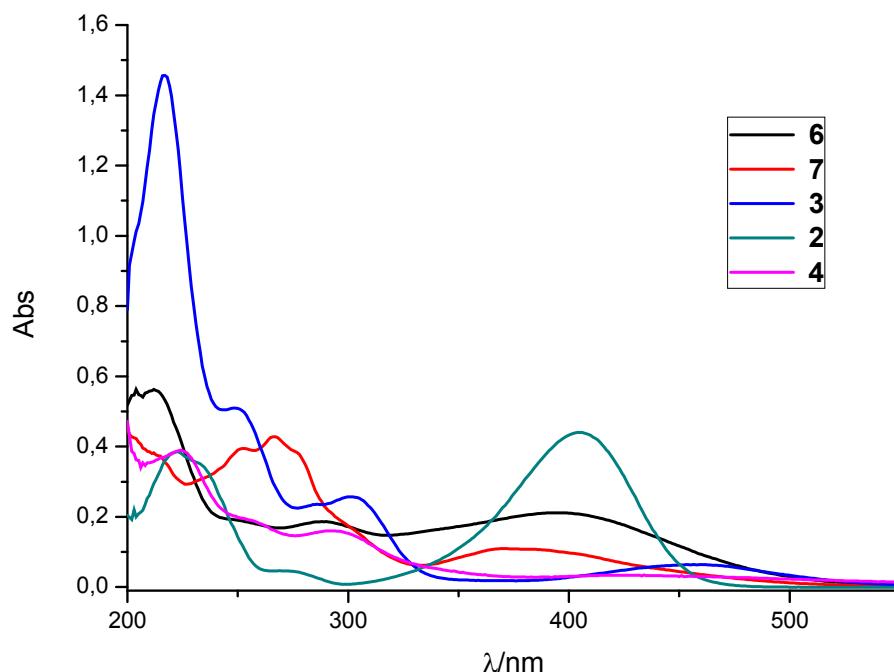


**Slika 9.** a)  $^1\text{H}$  NMR spektar; b) MS spektar spoja 7

## 3.2. Spektroskopska karakterizacija prire enih spojeva

### 3.2.1. UV/Vis spektroskopija

Prire eni derivati, prekursori **2**, **3** i **4** te benzimidazolil-supstuitirani akrilonitril **6** i benzimidazo[1,2- ]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  $2 \times 10^{-5}$  moldm $^{-3}$  u etanolu. Na Slici 10. prikazani su usporedni apsorpcijski spektri spojeva **2**, **3**, **4**, **6** i **7** snimani pri danoj koncentraciji u etanolu.<sup>23</sup>



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 apsorbancije pokazuje polietenički spoj **2**, dok aciklički derivat akrilonitrila **6**, koji u svojoj strukturi ima cijano grupu, pokazuje hiperkromni i blagi batokromni pomak maksimuma apsorbancije u odnosu na ciklički 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 apsorbancije.

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

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

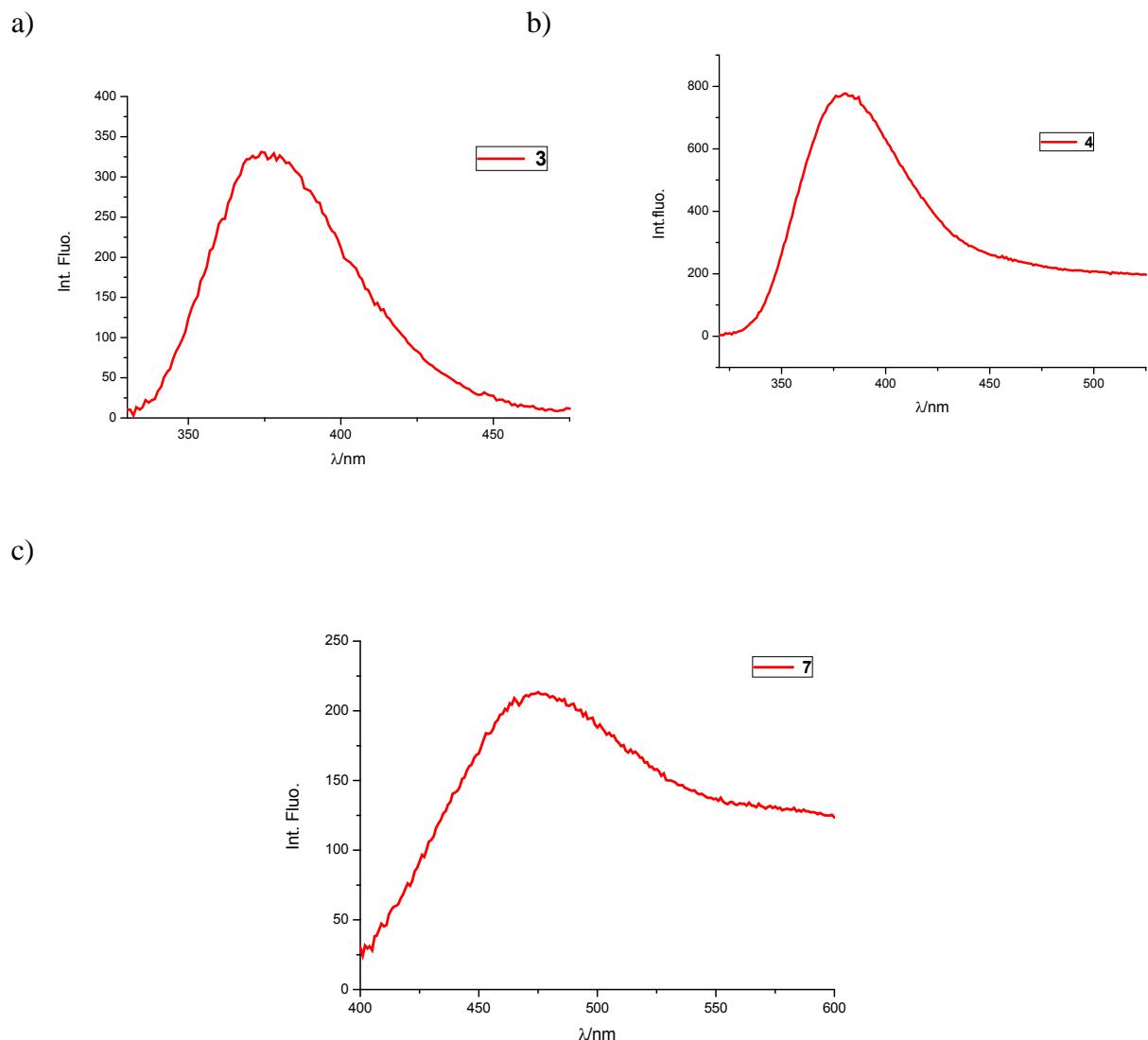
### 3.2.2. Fluorimetrijska spektroskopija

Fluorimetrijska spektroskopska ispitivanja, moguće je zbog visoke osjetljivosti metode provesti kod manjih koncentracija. Mjerenja su provedena pri koncentracijama spojeva  $c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  (**4** i **7**) i  $1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ . Otopine priređene spojeva pobune su svjetlošć u valne duljine ekscitacije koja odgovara valnoj duljini maksimuma apsorbancije.<sup>24</sup>

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

**Tablica 2.** Intenzitet fluorescencije kod maksimuma emisije

<b>Spoj</b>	<b>exc. / nm</b>	<b>emiss. / nm</b>	<b>Fluo.Int.</b>
<b>3</b>	305	374	328
<b>4</b>	293	380	770
<b>7</b>	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. Opće napomene**

Tališta priređenih spojeva određena su na Kofler Mikroheitzisch aparatu i nisu korigirana.

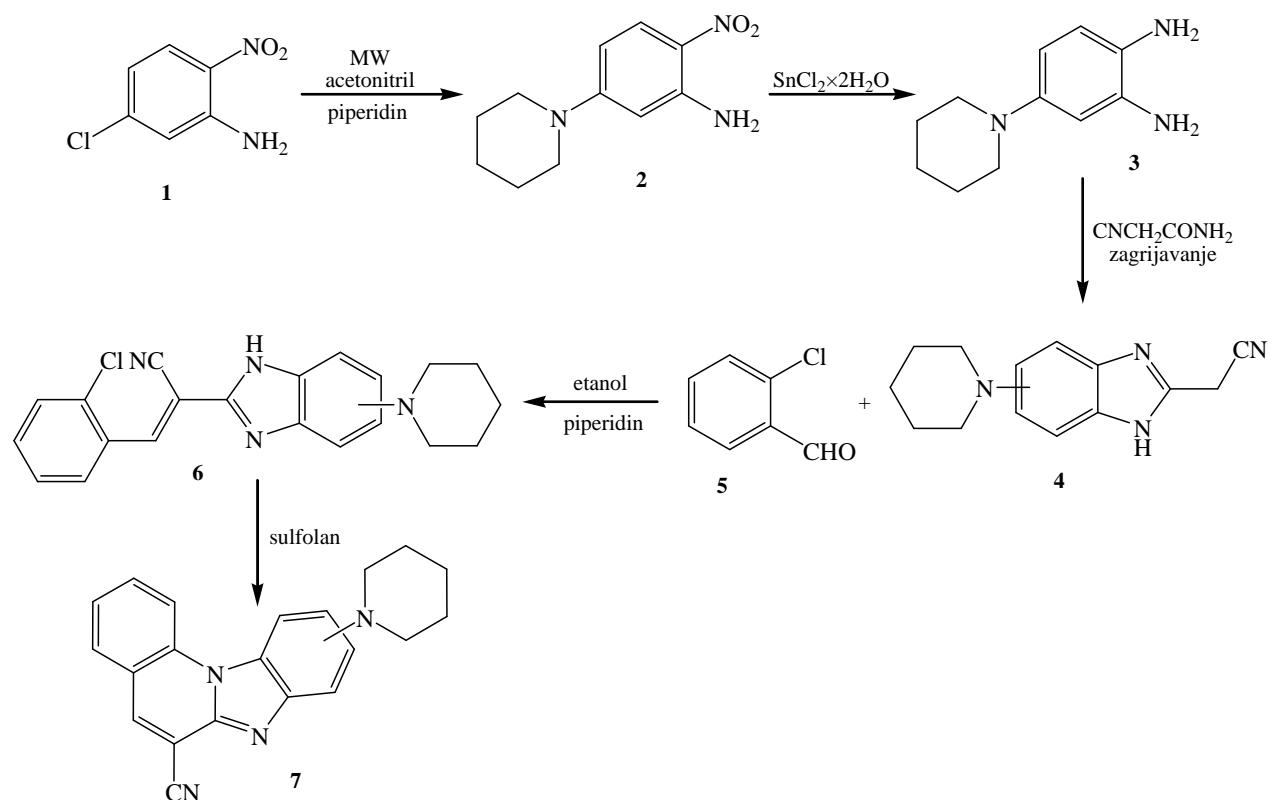
$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri snimljeni su na spektrometrima Bruker AV600 i Bruker AV300 na 300 i 600 MHz odnosno 75 i 150 MHz. Svi NMR spektri snimani su u DMSO- $d_6$  kao otapalo, koristeći tetrametilsilan kao interni standard. Kemijski pomaci ( ) izraženi su u ppm vrijednostima, a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

UV/Vis spektri snimljeni su na spektrofotometru Varian Cary 50. Korištene su kvarcne kivete promjera 1 cm te volumena  $3 \text{ cm}^3$ . Kao otapalo korišten je etanol.

Reakcije potpomognute mikrovalnim zrajenjem provedene su u Milestone Start S mikrovalnoj peći opremljenoj pyrex (1 bar) ili kvarcnim posudama (40 bar).

Svi spojevi su rutinski provjeravani tankoslojnom kromatografijom (TLC) koristeći ploče presvuene silikagelom Merck 60F-254 te detektirani pod UV svjetлом (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** priređen je sintezom potpomognutom mikrovalovima korištenjem MW zračenja snage 800 W i temperature 170 °C, iz 5-kloro-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 proisti kolonskom kromatografijom na silikagelu uz  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  kao eluens. Dobiveno je 0,58 g (90%) naranastog kristaliničnog produkta. T.t. 105–110 °C.

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

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 75 MHz):  $\delta$ /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  $\text{HCl}_{\text{konec}}$ . 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  $\text{MgSO}_4$ , profiltrira se i upari do suha. Dobiveno je 1,12 g (65%) tamno smeđeg kristaliničnog produkta. T.t. 70–75 °C.

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz): /ppm = 6,38 (d, 1H,  $J$  = 8,28 Hz, H<sub>arom</sub>), 6,21 (d, 1H,  $J$  = 2,55 Hz, H<sub>arom</sub>), 6,01 (dd, 1H,  $J_1$  = 2,58 Hz,  $J_2$  = 8,25 Hz, H<sub>arom</sub>), 4,31 (šs, 2H, NH<sub>2</sub>), 3,95 (šs, 2H, NH<sub>2</sub>), 2,83 (t, 4H,  $J$  = 5,28 Hz, CH<sub>2</sub>), 1,53–1,63 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 1,40–1,50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>);

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 75 MHz): /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 prekristalizira 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:**  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz): /ppm = 12,22 (s, 1H, NH), 7,34–7,28 (m, 1H, H<sub>arom</sub>), 6,94–6,86 (m, 2H, H<sub>arom</sub>), 4,29 (šs, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,11–3,00 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 1,68–1,62 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 1,54–1,51 (m, 2H, CH<sub>2</sub>);

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

#### **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 proisti kolonskom kromatografijom na silikagelu uz  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  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:**  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz): /ppm = 12,93 (s, 1H, NH), 8,34 (s, 1H, H<sub>arom.</sub>), 8,11–8,08 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7,70–7,65 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7,58–7,51 (m, 3H, H<sub>arom.</sub>), 7,00 (dd, 1H,  $J_1$  = 2,01 Hz,  $J_2$  = 8,94 Hz, H<sub>arom.</sub>), 6,89 (d, 1H,  $J$  = 1,65 Hz, H<sub>arom.</sub>), 3,16 (t, 4H,  $J$  = 5,05 Hz, CH<sub>2</sub>), 1,73–1,61 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 1,66–1,49 (m, 2H, CH<sub>2</sub>);

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 150 MHz): /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:**  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz): /ppm = 13,02 (s, 1H, NH), 8,43 (s, 1H, H<sub>arom.</sub>), 8,11–8,08 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7,70–7,65 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7,58–7,51 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7,40 (d, 1H,  $J$  = 8,76 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,11 (šs, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7,08 (dd, 1H,  $J_1$  = 1,68 Hz,  $J_2$  = 8,58 Hz, H<sub>arom.</sub>), 3,09 (t, 4H,  $J$  = 4,95 Hz, CH<sub>2</sub>), 1,73–1,61 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 1,66–1,49 (m, 2H, CH<sub>2</sub>);

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 150 MHz): /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<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 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:**  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz): /ppm = 8,75 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 8,12 (t, 1H,  $J$  = 8,50 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,99 (t, 1H,  $J$  = 7,90 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,64 (t, 1H,  $J$  = 7,50 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,41–7,27 (m, 3H, H<sub>arom.</sub>), 3,35–3,31 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 1,83–1,64 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 1,63–1,55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>);

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 150 MHz): /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:**  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz): /ppm = 8,67 (s, 1H, H<sub>arom.</sub>), 8,53 (d, 1H,  $J$  = 9,30 Hz, H<sub>arom.</sub>), 8,12 (t, 1H,  $J$  = 8,50 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,99 (t, 1H,  $J$  = 7,90 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,90 (s, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7,89 (d, 1H,  $J$  = 9,00 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,41–7,27 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 3,28–3,25 (t, 4H,  $J$  = 5,19 Hz, CH<sub>2</sub>), 1,83–1,64 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 1,63–1,55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>);  
 $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 150 MHz): /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. ZAKLJU AK**

- U ovom radu prire eni u sljede 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 pripravu ciljanog derivata akrilonitrila prvotno je prire en 4-piperidinil-1,2-fenilendiamin **3** linearnom sintezom po evši 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**.
- Acikli ki derivat benzimidazola **6** prire en 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** prire en je termi kom ciklizacijom acikli kog analoga **6** u sulfolanu kao smjesa dva regioizomera u omjeru 2:3.
- Struktura prire enih spojeva potvr ena je  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima.
- Spektroskopska karakterizacija spojeva **2-7** provedena je korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije.

## **6. LITERATURA**

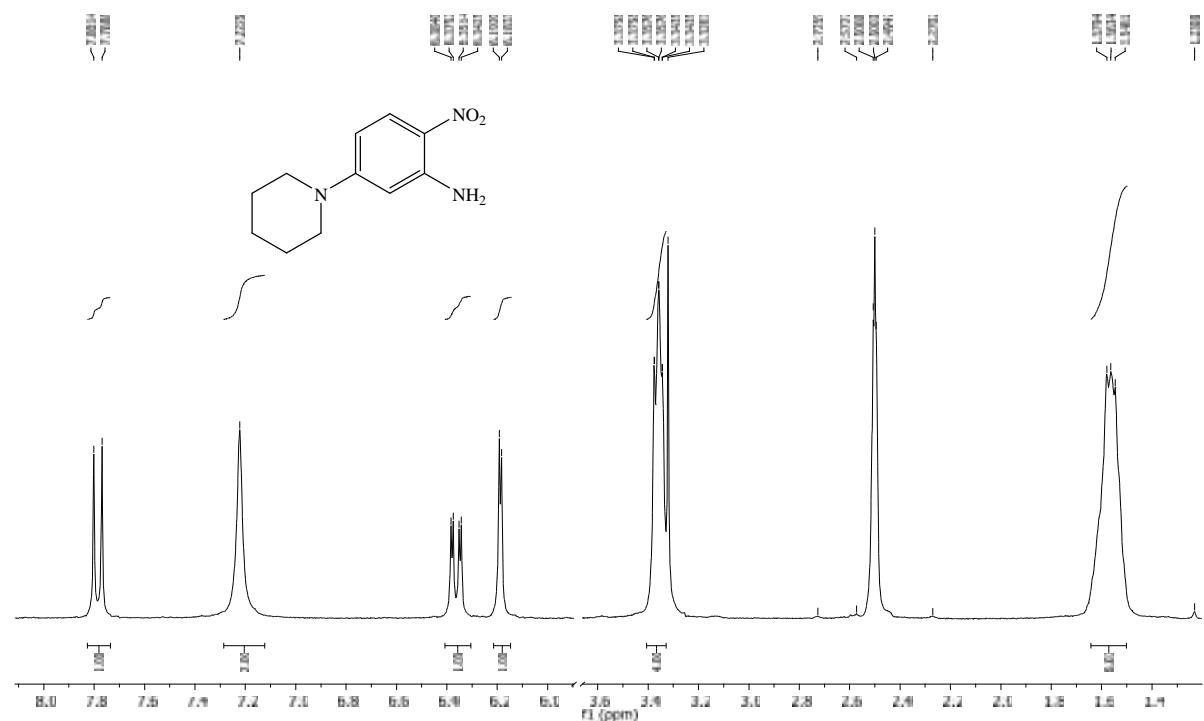
1. R. V. Shingalapur, K. M. Hosamani, R. S. Keri; *J. Med. Chem.* **44** (2009) 4244-4248
2. Q. Sun, R. Wu, Su. Cai, Y. Lin, L. Sellers, K. Sakamoto, B. He, B. R. Peterson; *J. Med. Chem.* **54** (2011) 1126–1139.
3. L. K. Soni, T. Narsinghani, A. Sethi; *Med Chem Res* **21** (2012) 4330–4334
4. M. Hranjec, 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. Halasa, 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.

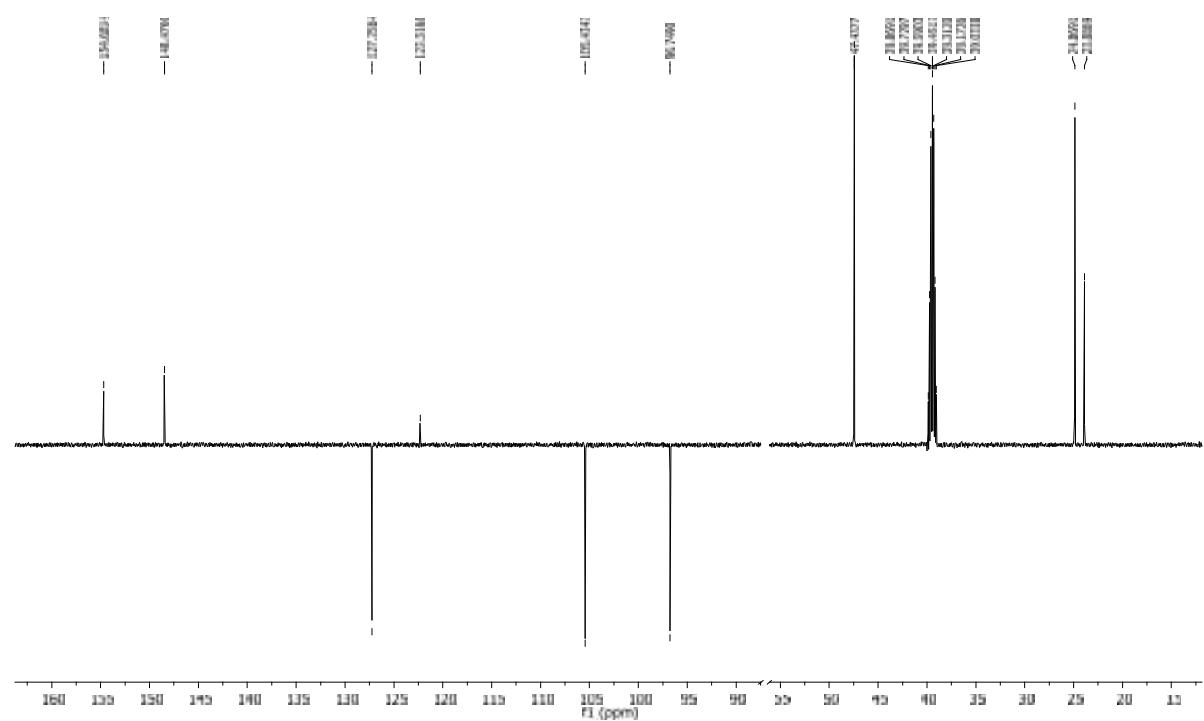
## **7. PRILOZI**

**Prilog 1.**

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar 2-nitro-5-piperidinilanolina **2**

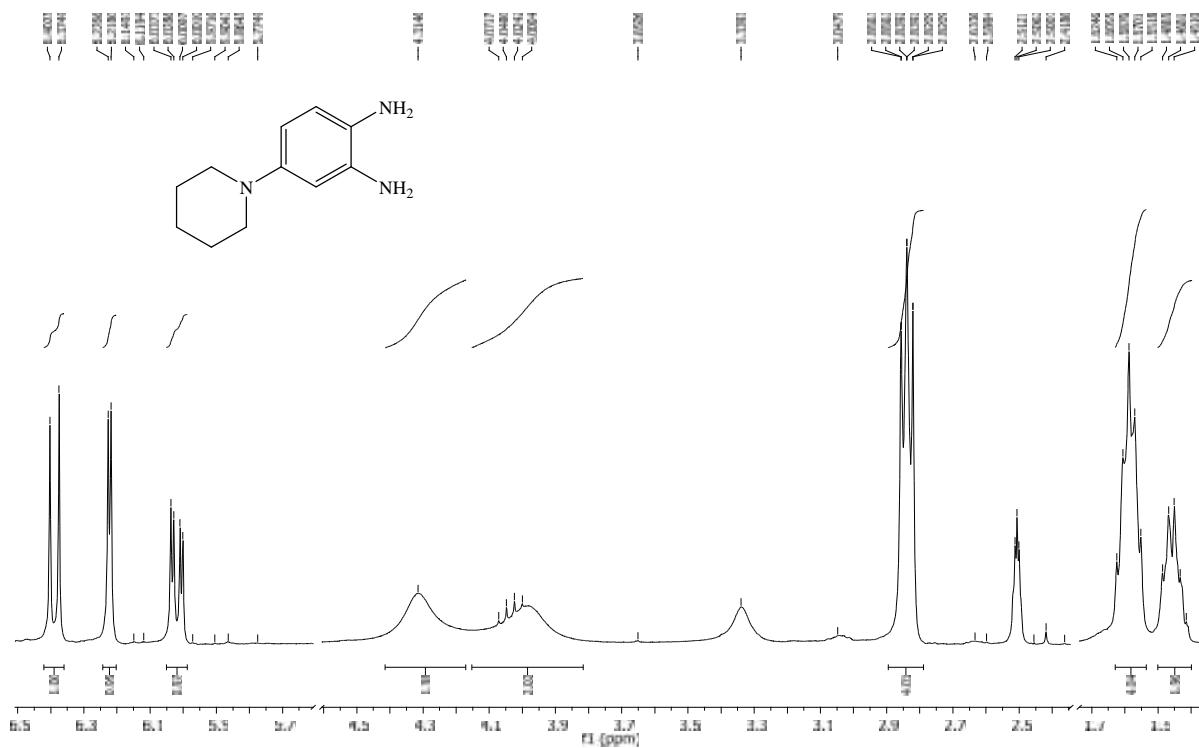


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar 2-nitro-5-piperidinilanolina **2**

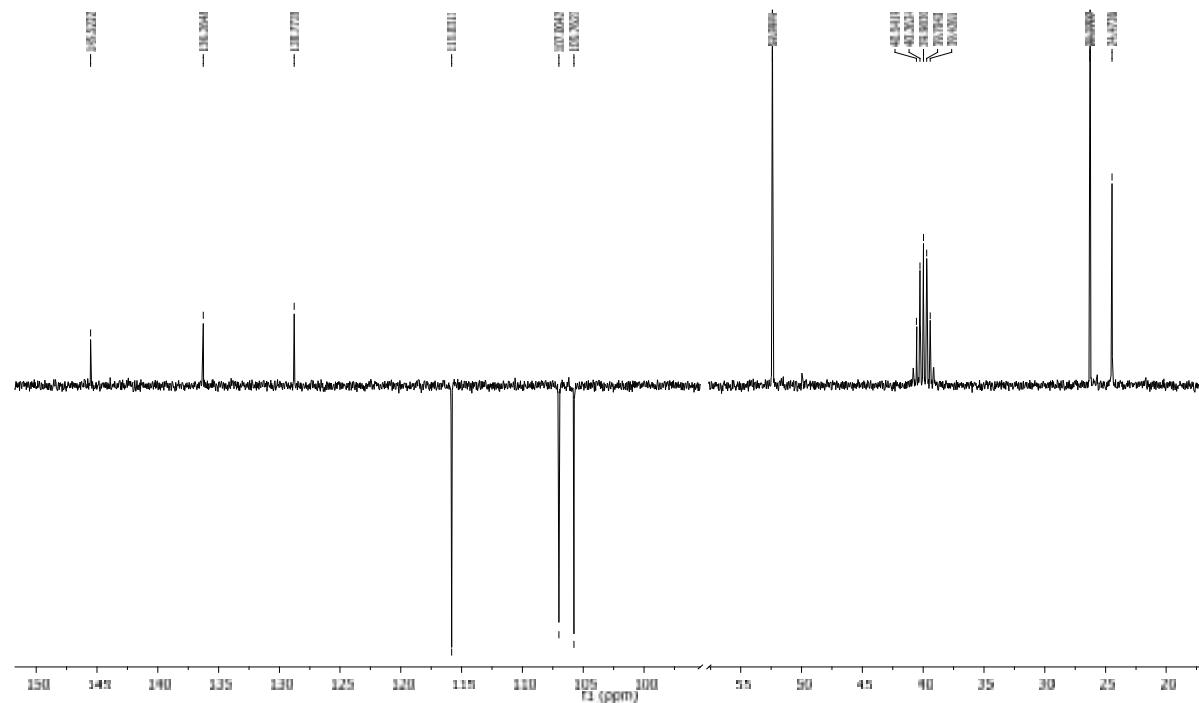


**Prilog 2.**

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar 4-piperidinil-1,2-fenilendiamina **3**

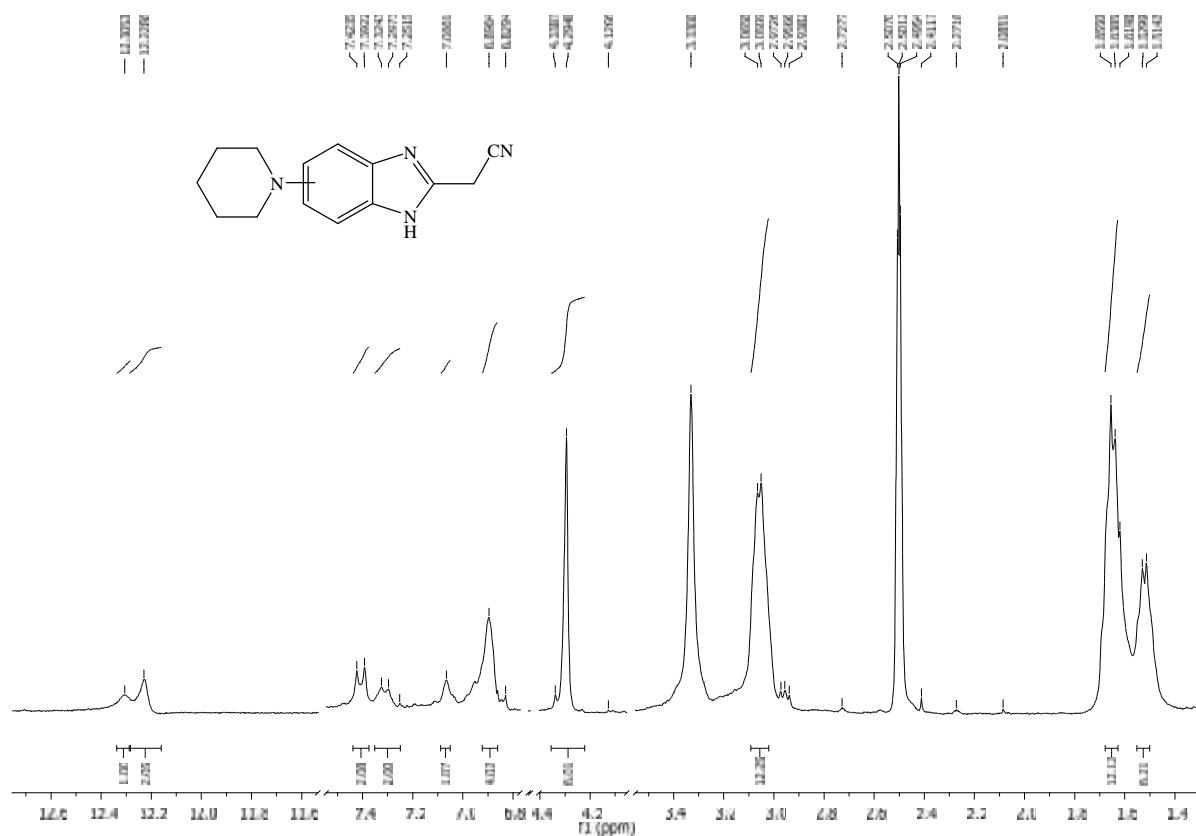


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar 4-piperidinil-1,2-fenilendiamina **3**



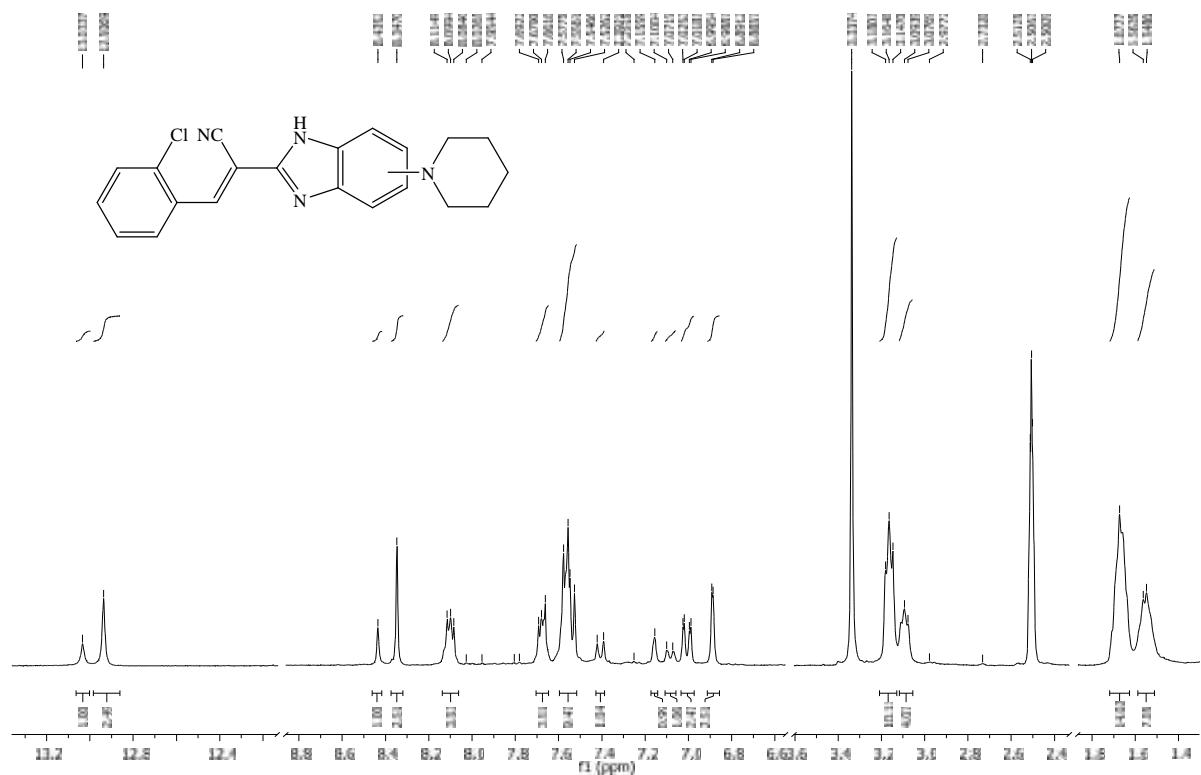
**Prilog 3.**

<sup>1</sup>H NMR spektar 2-cijanometil-5(6)-piperidinilbenzimidazola **4**

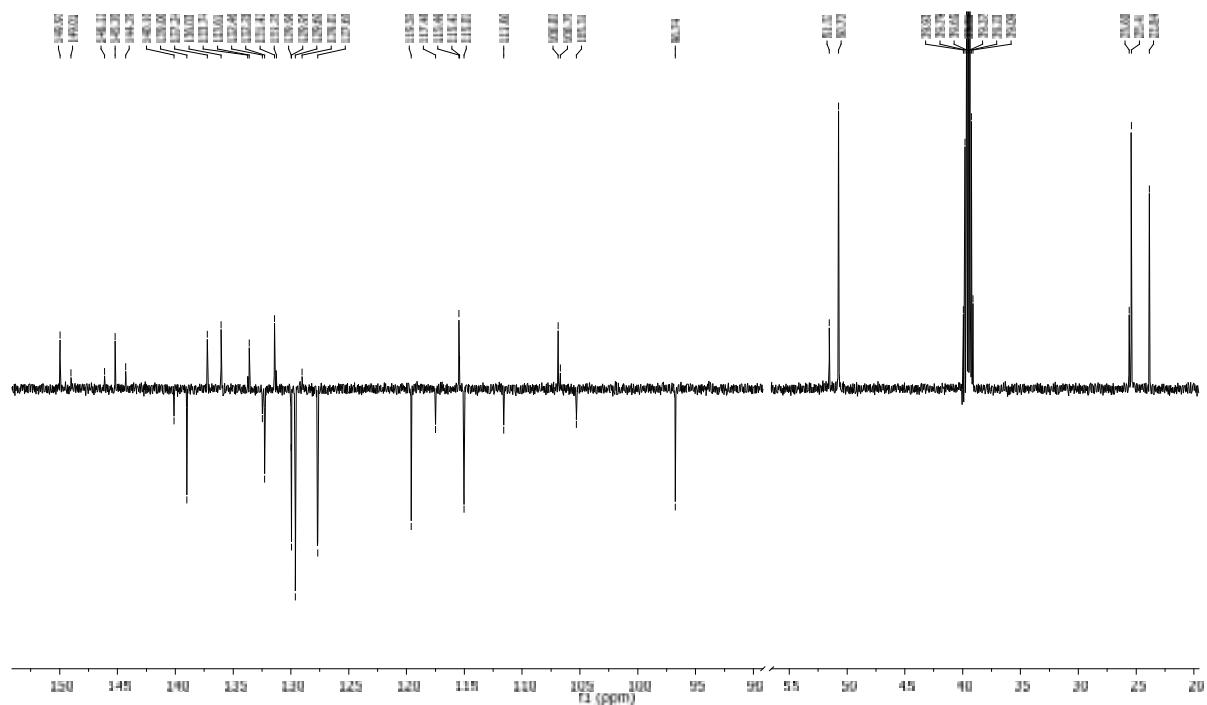


Prilog 4.

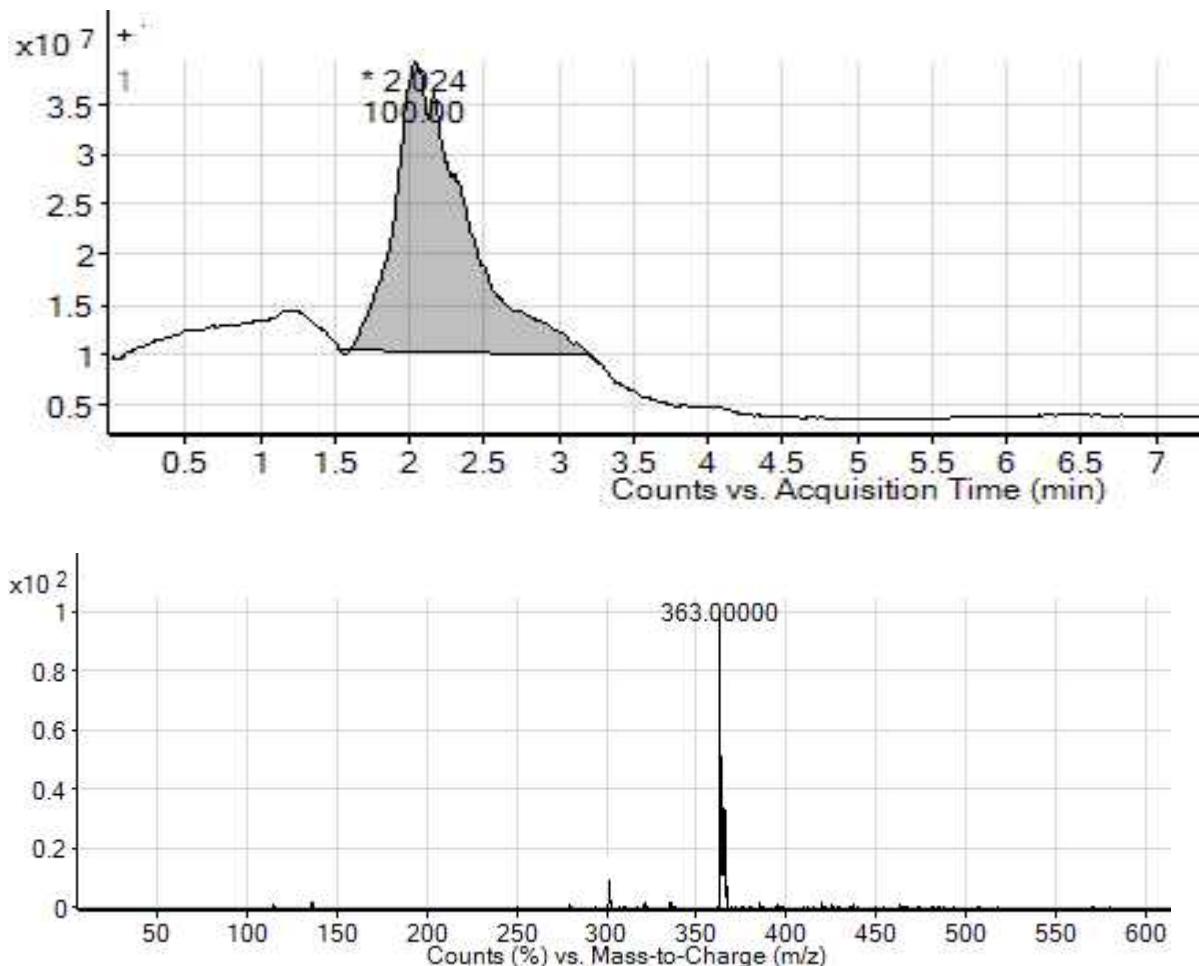
a)  $^1\text{H}$  NMR spektar *E*-2-[5(6)-piperidinilbenzimidazol-2-il]-3-(2-klorfenil)akrilonitrila **6**



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

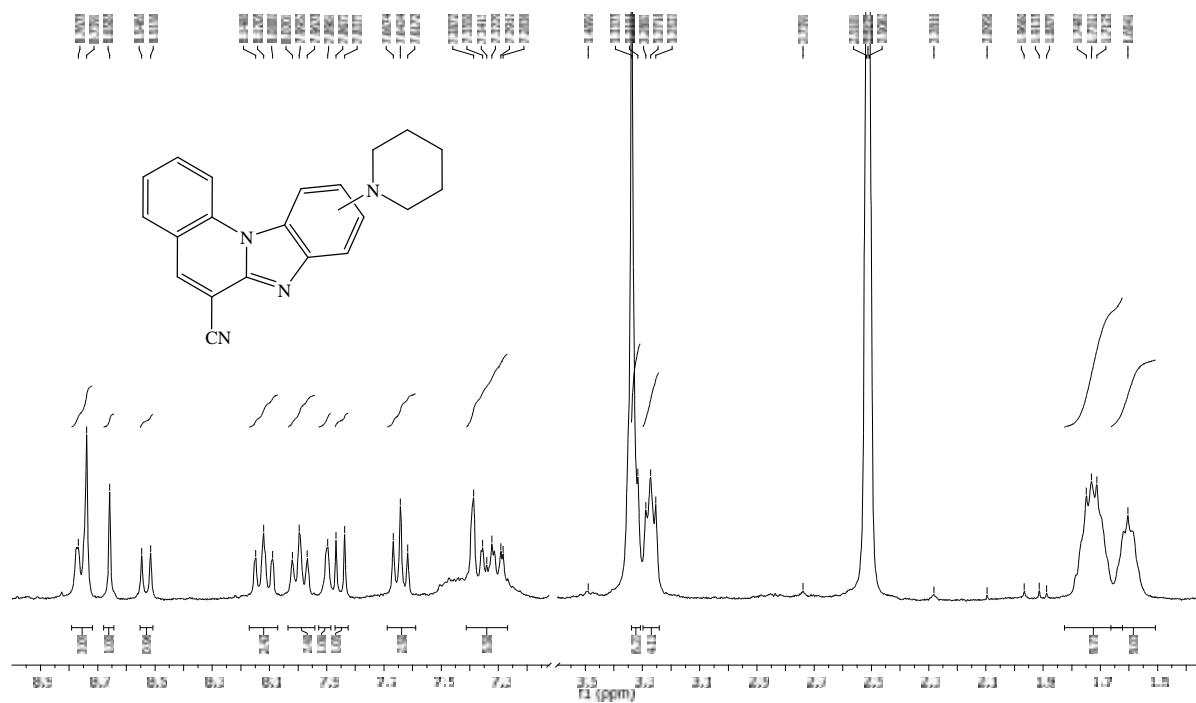


c) Kromatogram i MS spektar *E*-2-[5(6)-piperidinilbenzimidazol-2-il]-3-(2-klorfenil)akrilonitrila **6**

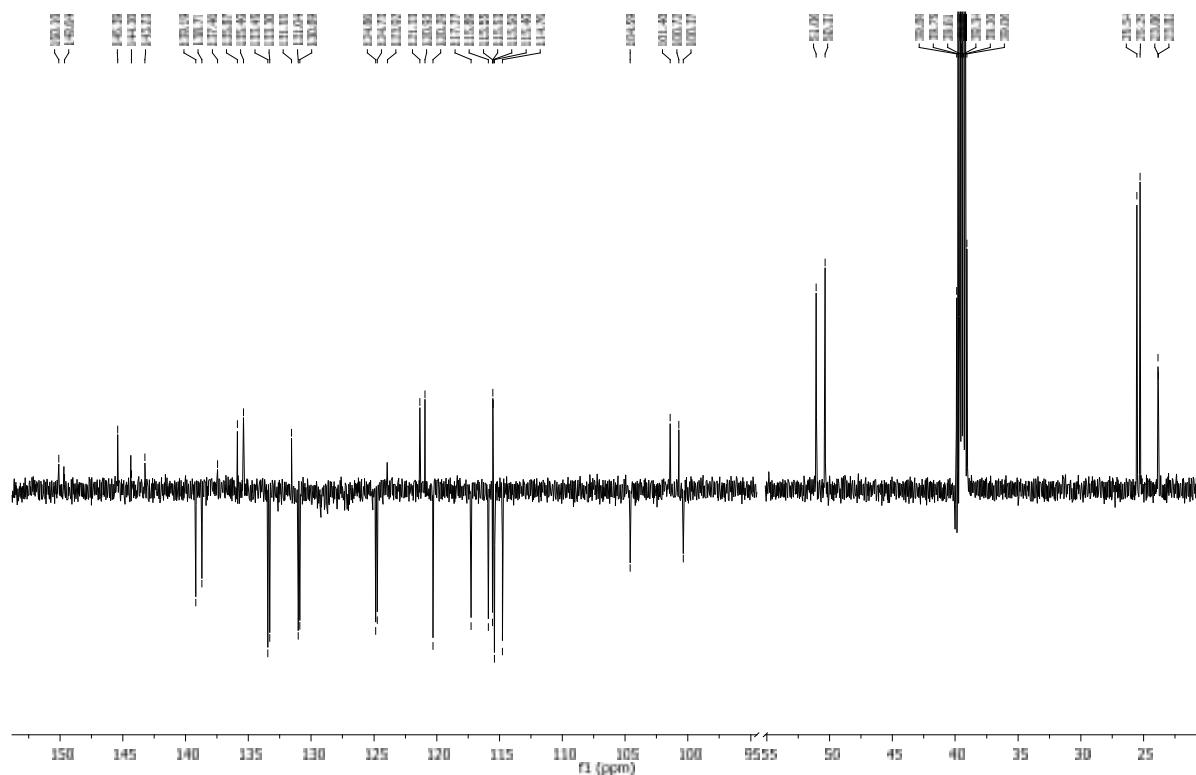


Prilog 5.

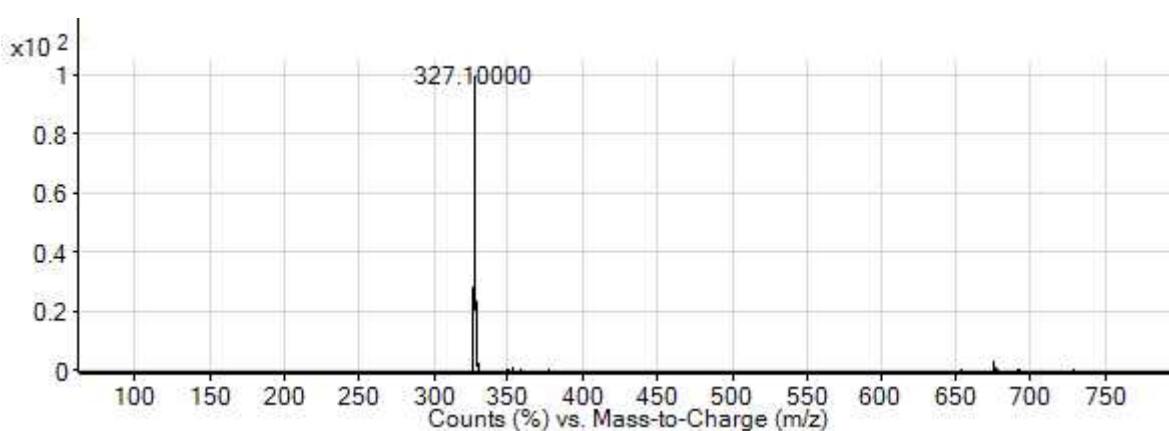
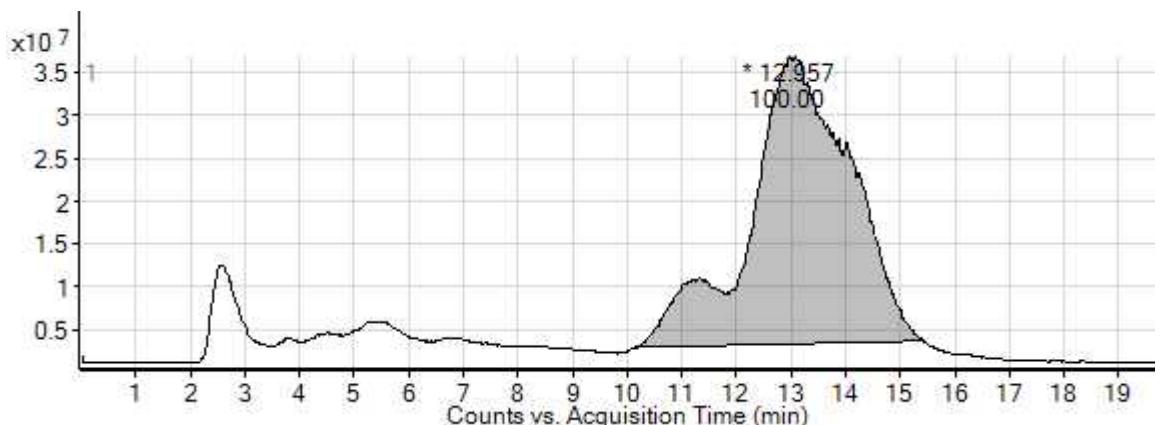
a)  $^1\text{H}$  NMR spektar 6-cijano-9(10)-piperidinilbenzimidazo[1,2-*a*]kinolina **7**



b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar 6-cijano-9(10)-piperidinilbenzimidazo[1,2-*a*]kinolina 7



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



## 8. ŽIVOTOPIS

Anja Bećro ena je 6. lipnja 1994. godine u Đakovcu. 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.