

Spektroskopska karakterizacija benzo[b]tieno-2-karboksamida u prisustvu metalnih kationa korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije

Katavić, Adriana

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:149:282381>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Adriana Katavić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Adriana Katavić

SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA BENZO[*B*]TIENO-2-KARBOKSAMIDA
U PRISUSTVU METALNIH KATIONA KORIŠTENJEM UV/VIS I
FLUORIMETRIJSKE SPEKTROSKOPIJE

ZAVRŠNI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. izv. prof. dr. sc. Marijana Hranjec, FKIT
2. dr. sc. Nataša Perin, poslijedoktorandica FKIT-a
3. izv. prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum, FKIT

Zagreb, rujan 2016.

SAŽETAK

Spektroskopska karakterizacija benzo[*b*]tieno-2-karboksamida u prisustvu metalnih kationa korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije

U okviru ovog rada priređeni su derivati benzo[*b*]tiofen-2-karboksamida kao potencijalni biološki aktivni spojevi. Za pripravu ciljanih molekula korištene su klasične metode organske kemije. Ciljani derivati **6a-6d** priređeni su reakcijom kondenzacije odgovarajućih anilina **5a-5c** i 3-klor-benzo[*b*]tiofen-2-karbonil-klorida **4a** i **4b**. Ciljani amino supstituirani derivati **6e** i **6f** priređeni su redukcijom NO₂ supstituiranih derivata **6b** i **6d**. Struktura priređenih karboksamida potvrđena je korištenjem ¹H i ¹³C NMR spektroskopije, a spojevi su dodatno okarakterizirani UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom. Da bi se potvrdila moguća primjena ovih spojeva kao senzora za određivanje kationa u otopinama ili za detekciju pH, provedene su i UV/Vis i fluorimetrijske titracije otopina spojeva s otopinama metalnih soli ili u puferima različitog pH.

Ključne riječi: benzo[*b*]tiofen-2-karboksamidi, organska sinteza, UV/Vis, fluorimetrijska, i NMR spektroskopija, kemosenzori, pH

SUMMARY

Spectroscopic characterization of benzo[*b*]thieno-2-carboxamides in the presence of metal cations by UV/Vis and fluorimetric spectroscopy

The aim of this study was the synthesis of benzo[*b*]thieno-2-carboxamide derivatives as potential biologically active compounds. For the preparation of target molecules, classical methods of organic synthesis were used. Targeted compounds **6a-6d** are prepared in the condensation of appropriate anilines **5a-5c** and 3-chlorobenzo[*b*]thiophene-2-carbonyl chlorides **4a** and **4b**. Amino substituted compounds **6e** and **6f** are prepared by reduction of nitro substituted compounds **6b** and **6d**. The structures of all synthesized compounds were confirmed by means of ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy and also the prepared compounds were additionally characterized by UV/Vis and fluorimetric spectroscopy. To explore the possibility of synthesized compounds for their application as chemosensors for detection of cations or pH sensors, UV/Vis and fluorimetric titrations of aqueous compounds solutions with aqueous solutions of metal chloride salts or with buffers having different pH were performed.

Key words: benzo[*b*]thieno-2-carboxamides, organic synthesis, UV/Vis, fluorimetric and NMR spectroscopy, chemosensors, pH

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Marijani Hranjec, mentorici, na pomoći koju mi je pružila tijekom izrade ovog rada, korisnim savjetima i strpljenju.

Također, zahvaljujem se i svim članovima Zavoda za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost 3386 - *Dizajn i sinteza novih dušikovih heterocikličkih fluorofora i fluorescentnih nanomaterijala kao kemijskih senzora za pH i metalne ione(iNF_iNiTE-SENS).*

Sadržaj

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. OPĆI DIO | 3 |
| 2.1. Strukturne i fizikalno-kemijske karakteristike amida | 4 |
| 2.2. Sinteza i reakcije amida | 5 |
| 2.3. Derivati benzo[<i>b</i>]tiofen-2-karboksamida i njihova biološka aktivnost..... | 9 |
| 2.4. Spektroskopija..... | 17 |
| 3. REZULTATI I RASPRAVA | 23 |
| 3.1. Ciljevi rada..... | 24 |
| 3.2. Sinteza priređenih spojeva | 25 |
| 3.3. Spektroskopska karakterizacija UV/Vis spektroskopijom | 29 |
| 3.4. Fluorimetrijska spektroskopija..... | 33 |
| 3.5. Utjecaj pH na spektroskopska svojstva spojeva 6e i 6f | 36 |
| 4. EKSPERIMENTALNI DIO | 38 |
| 4.1. Opće napomene..... | 39 |
| 4.2. Priprava supstituiranih 3-klor-benzo[<i>b</i>]tiofen-2-karboksamida..... | 40 |
| 4.3. Priprava disupstituiranih 3-klor-benzo[<i>b</i>]tiofen-2-karboksamida..... | 43 |
| 5. ZAKLJUČAK | 45 |
| 6. LITERATURA | 47 |
| 7. PRILOZI | 50 |
| 8. ŽIVOTOPIS | 55 |

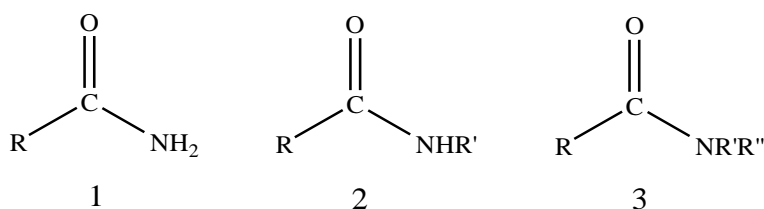
1. UVOD

Amidi su građevne jedinice velikog broja biološki važnih molekula, a amidna je veza osnovna građevna jedinica koja povezuje aminokiseline u strukturi proteina. Ova funkcionalna skupina je također vrlo zastupljena u strukturi mnogih prirodnih ili sintetskih lijekova poput antibiotika penicilina i antitumorskih lijekova, ali i u strukturi molekula koje dolaze u sastavu svile, najlona ili vina. Amidne skupine se mogu povezivati vodikovim vezama te zbog toga takve molekule imaju vrlo visoka tališta i vrelišta. Njihova topljivost u vodi ovisi o broju ugljikovih atoma u molekuli amida. Uglavnom su dobro topljivi u polarnim otapalima ili vodi jer stvaraju vodikove veze. Amidna (peptidna) veza ima ključnu ulogu u živim organizmima. Osim što se njome povezuju aminokiseline u peptide i izgrađuju proteine, imaju značajnu ulogu u enzimskoj katalizi budući da su gotovo svi enzimi proteini.

2. OPĆI DIO

2. 1. Strukturne i fizikalno-kemijske karakteristike amida

Amidi su derivati karboksilnih kiselina kod kojih je amino skupina vezana na acilnu skupinu. Mogu nastati kao produkti reakcije primarnih i sekundarnih amina te amonijaka s karboksilnim kiselinama i drugim derivatima karboksilnih kiselina poput acil-halogenida, anhidrida karboksilnih kiselina ili estera. Najčešće metode pripreme amida su reakcije acil-halogenida ili estera s amonijakom ili aminom. Kako bi reakcija tekla brže, provodi se u bazičnoj ili kiseljoj sredini.¹

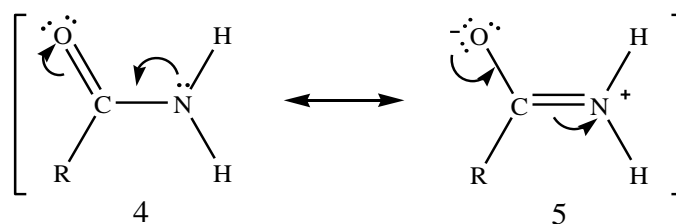


1-primarni amid, 2-sekundarni amid, 3-tercijarni amid

Shema 1. Općenita struktura amida

Većina amida koji imaju slobodnu CONH₂ grupu jesu krutine i neutralne čvrste tvari pri sobnoj temperaturi. Imaju visoku temperaturu vrelišta jer se takve molekule mogu međusobno povezivati vodikovim vezama. Amidi monokarboksilnih kiselina koje imaju pet ili manje ugljikovih atoma u svojoj strukturi topljivi su u vodi. Tekući amidi odlična su otapala za otapanje drugih organskih spojeva. U reakcijama hidrolize amida u kiseljoj reakcijskoj sredini nastaju odgovarajuće karboksilne kiseline i amonijak, a u bazičnoj sredini kao produkti hidrolize nastaju odgovarajuća sol i amonijak.² Amidi su najmanje reaktivni derivati karboksilnih kiselina te je u reakcijama sa amidima potreban katalizator koji može biti kiselina ili baza.³

Amidi imaju planarnu geometriju. Iako je veza ugljik-dušik zapravo jednostruka veza, rotacija oko veze je ograničena zbog rezonancije.



Shema 2. Rezonancija amida

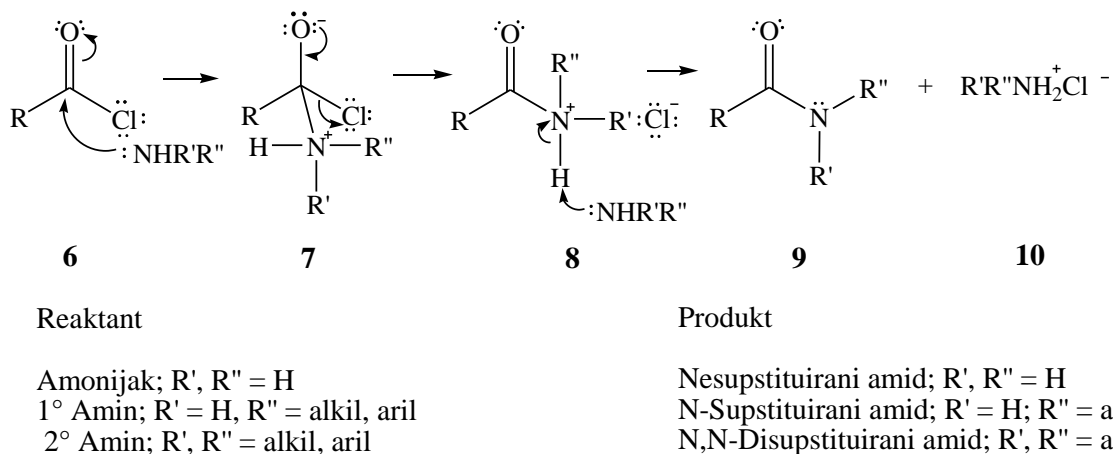
Dipolarni doprinos je jako važan pa se veza ugljik-dušik ponaša mnogo više kao dvostruka veza. Zbog toga, dušik i karbonilni ugljik te dva atoma koja se nalaze i na jednom i na drugom atomu, leže u ravnini i rotacija oko C-N veze je ograničena. Također, C-N veza u amidima iznosi samo 1,32 angstrema što je puno kraće od uobičajene duljine C-N veze koja iznosi oko 1,47 angstrema. Kao što dipolarni rezonancijski doprinos sugestira, amidi su jako polarni i tvore jake vodikove veze.

2. 2. Sinteza i reakcije amida

Amide možemo prirediti na razne načine, počevši od acil-klorida, kiselinskih anhidrida, estera, karboksilnih kiselina i karboksilatnih soli. Sve metode uključuju nukleofilnu adicijsko-eliminacijsku reakciju amonijaka ili amina s elektrofilnim acilnim ugljikovim atomom. Acil-kloridi su u toj reakciji najreaktivniji budući da imaju najbolju izlazeću skupinu, a karboksilatni anioni najmanje su reaktivni.

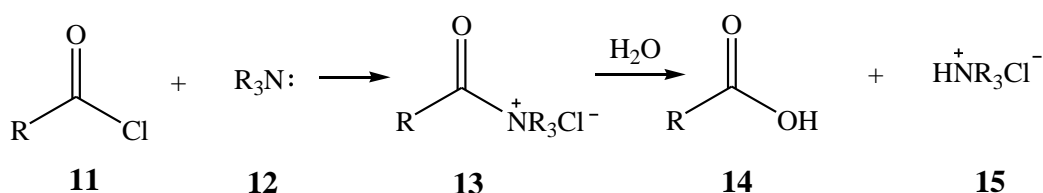
2.2.1. Priprava amida iz acil-klorida

Primarni i sekundarni amini te amonijak reagiraju brzo s acil-kloridima dajući amide. Suvišak amonijaka ili amina koristi se kako bi se neutralizirala klorovodična kiselina koja nastaje u reakciji. Reakcija amina s acil-kloridima je jedna od najviše korištenih laboratorijskih metoda za sintezu amida zato što se acil-kloridi mogu vrlo lako prirediti iz karboksilnih kiselina.



Shema 3. Mehanizam reakcije za pripremu amida iz acil-klorida

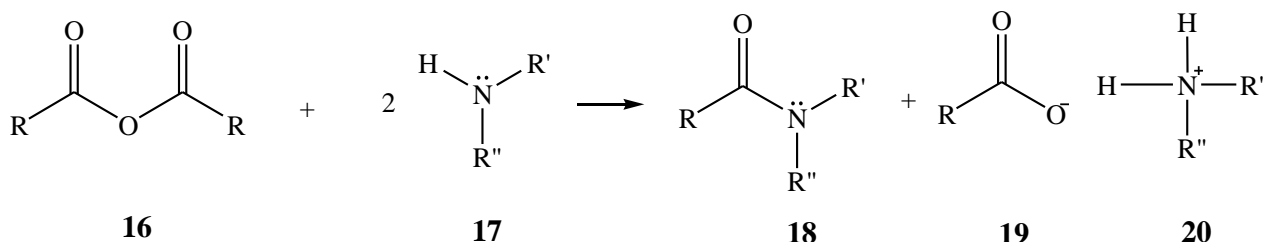
Reakcija između acil-klorida i amina (ili amonijaka) obično se provodi pri sobnoj temperaturi (ili nižoj) i daje amide u visokim iskorištenjima. Acil-kloridi također reagiraju i s tercijskim aminima. Acil-amonijev ion tog oblika, međutim, nije stabilan u prisutnosti vode ili drugih otapala s hidroksilnom skupinom u strukturi jer dolazi do zamjene amino skupine sa hidroksilnom, odnosno, nastaju karboksilne kiseline.



Shema 4. Reakcija acil-klorida s tercijskim aminom

2.2.2. Priprema amida iz kiselinskih anhidrida

Kiselinski anhidridi reagiraju s amonijakom i primarnim i sekundarnim aminima dajući amide u reakciji koja je identična reakciji pripreme amida iz acil-klorida.



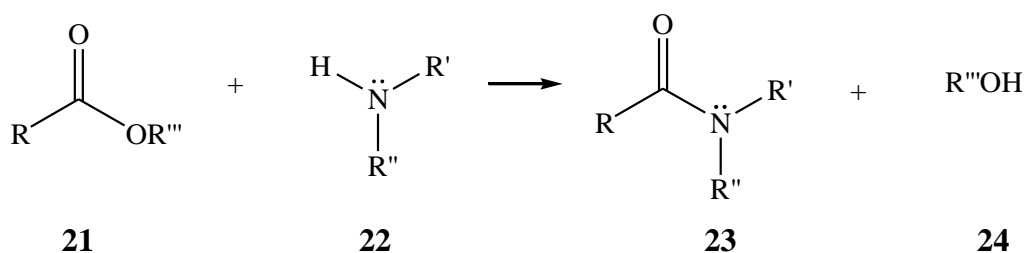
R', R'' mogu biti H, alkil ili aril.

Shema 5. Priprema amida iz kiselinskih anhidrida

Ciklički anhidridi reagiraju s amonijakom ili aminom prema istom općem principu kao kiselinski anhidridi, međutim, reakcija daje dva produkta, a to su amid i kiselina.

2.2.3. Priprava amida iz estera

Esteri se podvrgavaju nukleofilnoj adicijsko-eliminacijskoj reakciji na svom elektrofilnom acilnom ugljiku kada se tretiraju s amonijakom ili primarnim i sekundarnim aminima. Te reakcije idu puno sporije i slabije od reakcija s acil-kloridima i anhidridima, ali one se također mogu koristiti u organskoj sintetskoj kemiji.

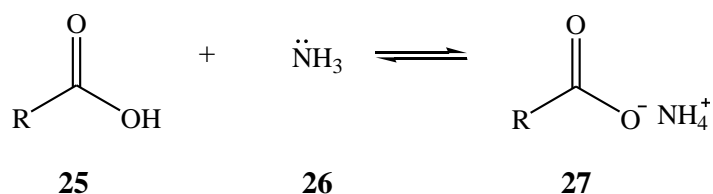


R' i/ili R'' mogu biti H

Shema 6. Priprava amida iz estera

2.2.4. Priprava amida iz karboksilnih kiselina i amonijevih karboksilata

Karboksilne kiseline reagiraju s vodenom otopinom amonijaka i formiraju amonijeve soli.

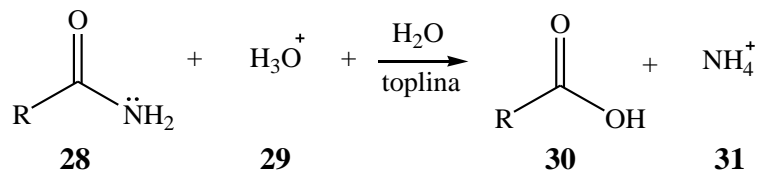


Shema 7. Priprava amida iz karboksilnih kiselina

Zbog loše reaktivnosti karboksilatnog iona u nukleofilnoj acilnoj supstituciji, daljnja reakcija se ne odvija u vodenoj otopini. Međutim, ako uklonimo vodu i zatim zagrijavamo suhu sol, dehidracijom nastaju amidi. To je općenito loša metoda za sintezu amida. Puno bolja sintetska metoda je prevođenje kiseline u acil-klorid i nakon toga tretiranje acil-klorida s amonijakom ili aminom.

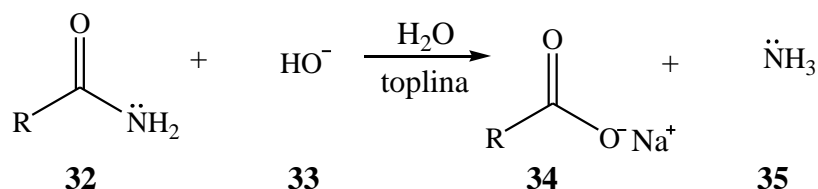
2.2.5. Hidroliza amida

Amidi se podvrgavaju hidrolizi kada se zagrijavaju s razrijeđenom kiselinom ili razrijeđenom bazom. Kiselinska hidroliza prikazana je na Shemi 8.



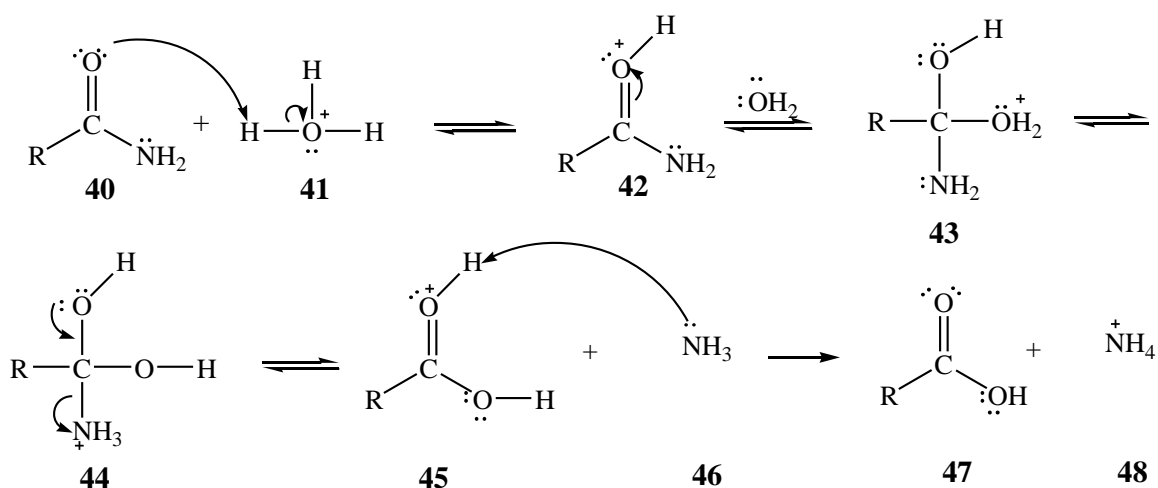
Shema 8. Kiselinska hidroliza

Bazna hidroliza amida prikazana je na Shemi 9.



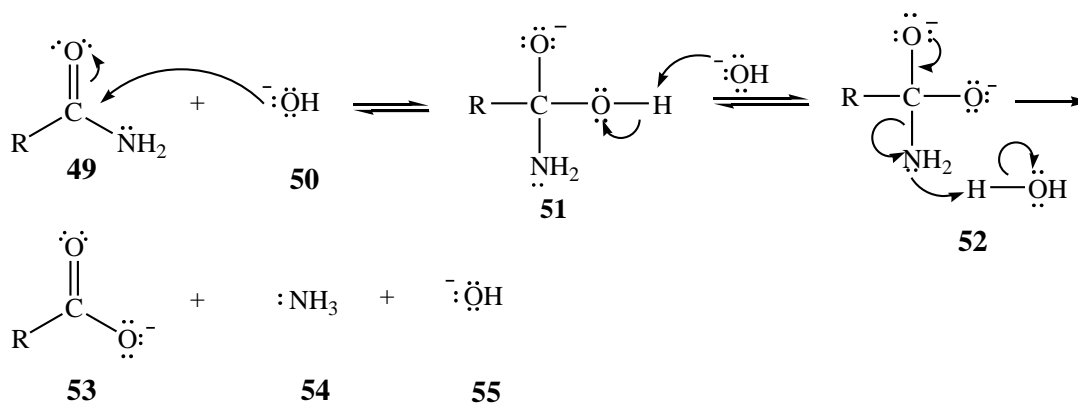
Shema 9. Bazna hidroliza

N-supstituirani amidi i *N,N*-disupstituirani amidi također se mogu podvrgnuti hidrolizi u vodenoj otopini kiseline ili baze. Hidroliza amida u obje metode provodi se puno sporije uspoređujući ju s hidrolizom estera. Stoga, hidroliza zahtijeva zagrijavanje i jaku kiselinu ili bazu. Odlazeća skupina u kiselinskoj hidrolizi je amonijak ili amin.



Shema 10. Mehanizam kiselinske hidrolize amida

Dokazano je da u baznoj hidrolizi amida hidroksidni ion djeluje i kao nukleofil i kao baza.⁴

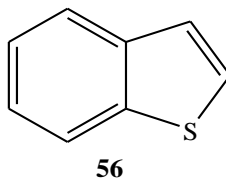


Shema 11. Mehanizam bazne hidrolize amida

2. 3. Derivati benzo[*b*]tiefen-2-karboksamida i njihova biološka aktivnost

2.3.1. Karakteristike benzo[*b*]tiefena

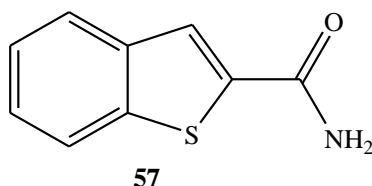
Benzo[*b*]tiefen je aromatski heterociklički spoj molekulske formule C₈H₆S. U svojoj strukturi ima benzenski prsten koji je kondenziran s tiefenskom jezgrom. Njegova aromatičnost čini ga relativno stabilnim, premda kao heterociklički spoj ima reaktivna mjesta dostupna za kemijske reakcije. Pojavljuje se u obliku bijele krutine koja se tali na 32°C i ima temperaturu vrelišta na 221°C. Miris mu je sličan mirisu naftalena. On se prirodno javlja kao sastojak nafti srodnih depozita, kao na primjer u sastavu lignitnog katrana. Nalazi svoju primjenu u industriji i istraživanjima, a u domaćinstvu se ne koristi. Upotrebljava se kao početni reaktant za sintezu kompleksnijih, najčešće bioaktivnih spojeva. Neki od njegovih derivata su selektivni modulatori estrogenog receptora, inhibitori sinteze leukotriena, antifungicidi, antitumorski agensi *itd.* Nalazi se kao građevna jedinica u strukturi mnogih kliničkih lijekova, kao što su npr. raloksifen, zileuton i sertakonazola te BTCP. Također, koristi se i za proizvodnju boja kao što je tioindigo te boja za tkaninu.⁵



Slika 1. Benzo[*b*]tiefen

2.3.2. Derivati benzo[*b*]tiofen-2-karboksamida i njihova biološka aktivnost

U pripravi benzo[*b*]tiofen-2-karboksamida ključni intermedijer je benzo[*b*]tiofen-2-karbonil-klorid, koji se može prirediti iz cimetne kiseline ili cimetnog aldehida u reakciji s tionil-kloridom u prisutnosti piridina kao katalizatora. Priređeni acilni klorid može se prevesti u različite karboksamide u reakciji s aromatskim i heterocikličkim aminima. Priređeni karboksamidi vrlo se često podvrgavaju fotokemijskom dehidrokloriranju pri čemu nastaju benzo[*b*]tieno-kinolonski derivati.⁶

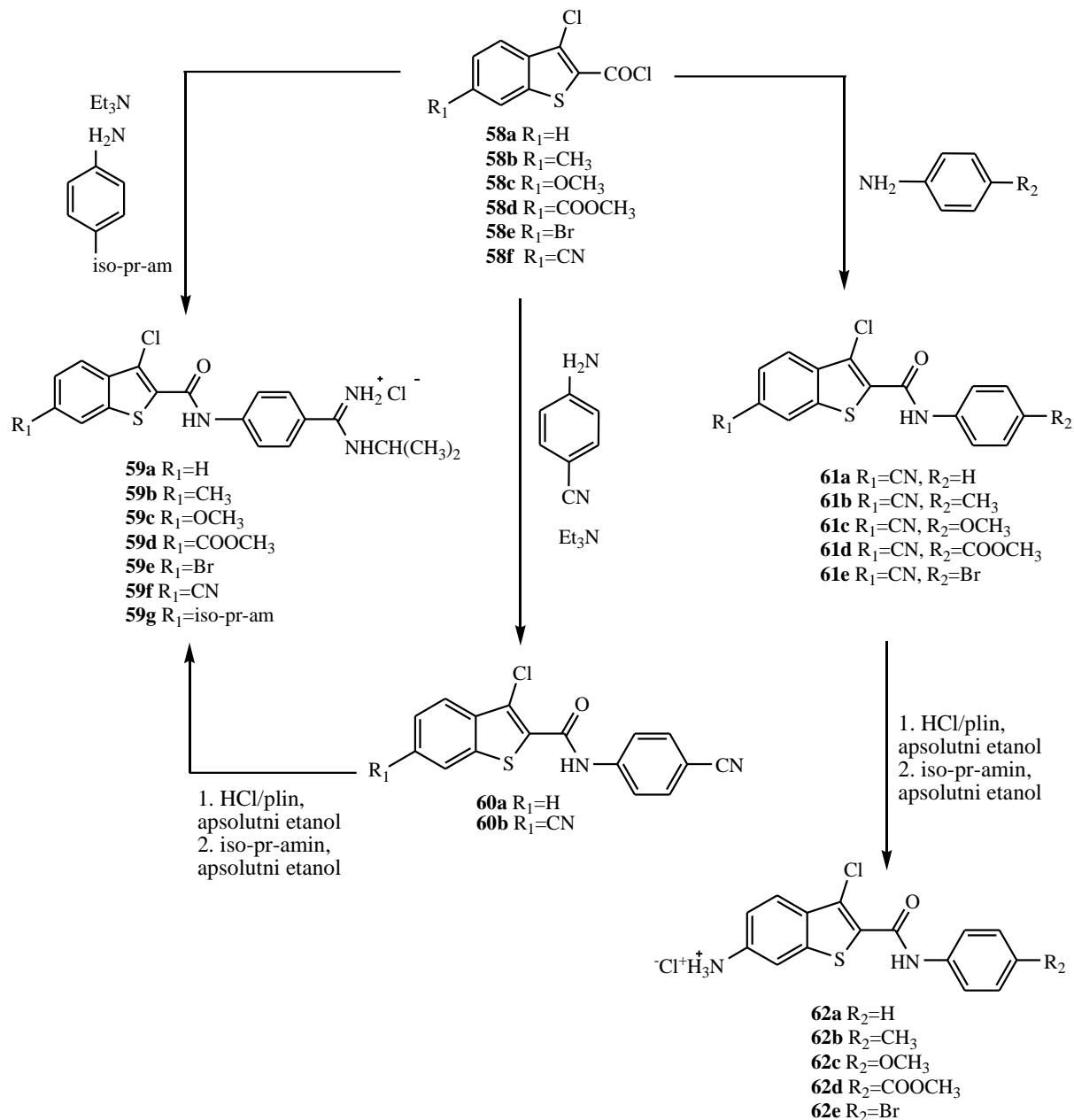


Slika 2. Benzo[*b*]tiofen-2-karboksamid

U daljnjem tekstu nevedena su neka biološka svojstva derivata benzo[*b*]tiofen-2-karboksamida. (*R*)-7-klor-*N*-(kinuklidin-3-il)benzo[*b*]tiofen-2-karboksamid upotrebljava se za poboljšanje kognitivnosti kod pacijenta koji boluju od Alzheimer-ove bolesti ili shizofrenije.⁷ 3-tio ili amino supstituirani benzo[*b*]tiofen-2-karboksamidi su učinkoviti terapijski agensi za liječenje upalnih bolesti. Također, isti derivati se koriste i za inhibiciju aktivacije virusa HIV-a. Neki od 3-supstituiranih karboksamida služe kao inhibitori 5-lipoksigenaze za tretiranje alergija, astma i upalnih stanja te za liječenje osteoporoze. 3-alkoksi, ariloksi, arilalkiloksi i-benzo[*b*]tiofen-2-karboksamidi su inhibitori stanične adhezije.⁸

2005. godine Ivana Jarak i suradnici⁹ objavili su sintezu derivata 3-klor-benzo[*b*]tiofen-2-karboksamilida. Utvrđeno je da svi sintetizirani spojevi pokazuju izraženo antitumorsko djelovanje koje je ispitano na nekoliko humanih tumorskih stanica. Njihova biološka aktivnost temelji se na interakciji s *ct*-DNK i RNK. Svi spojevi priređeni su počevši od 3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karbonil-klorida ili 6-supstituiranog 3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karbonil-klorida prema Shemi 12. Derivati cijano supstituiranih 3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karboksamilida **60a**, **60b** i **61a-e** priređeni su u reakciji odgovarajućeg karbonil-klorida s *p*-cijanoanilinom ili reakcijom 6-cijano supstituiranih 3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karbonil-klorida s odgovarajućim *p*-supstituiranim anilinima.

N-izopropilamidino supstituirani 3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karboksamilidi **59a**, **59f** i **62a-e** priređeni su Pinnerovom reakcijom iz cijano derivata dok su karboksamilidi **59b-e** priređeni direktnom kondenzacijom 3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karbonil-klorida s 4-(*N*-izopropilamidino)-anilinom, kao i s diamidino supstituiranim karboksamilidom.

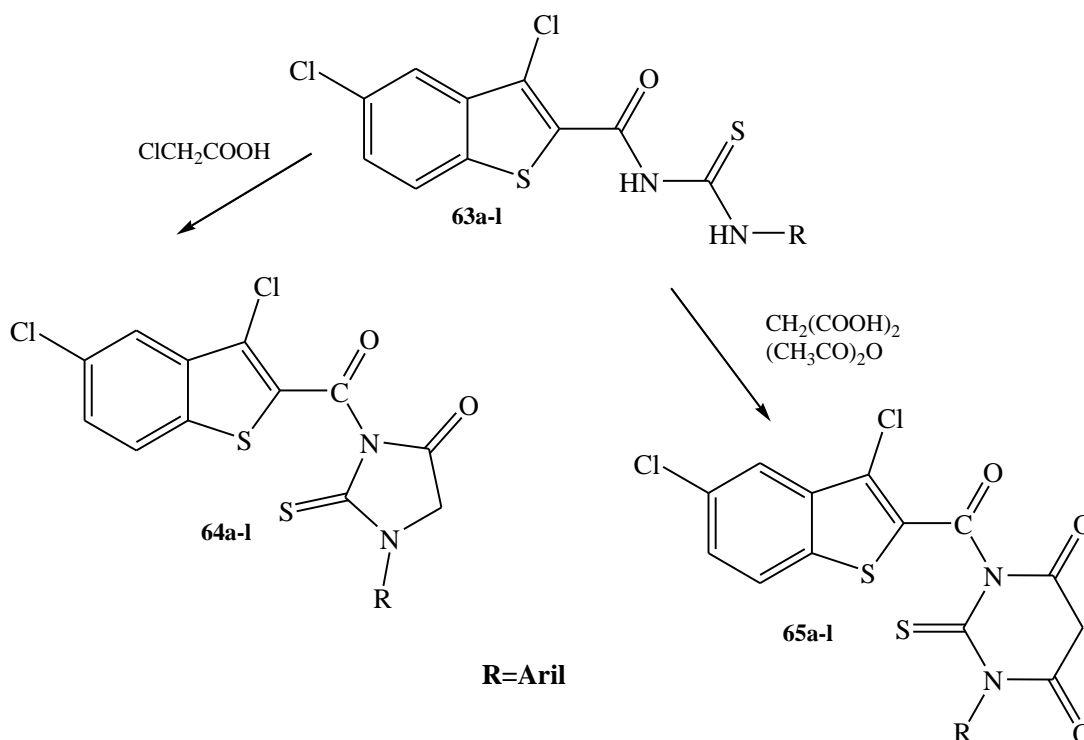


Shema 12. Sinteza derivata 3-klor-benzo[*b*]tiofen-2-karboksianilida

Najizraženije antiproliferativno djelovanje na rast humanih tumorskih stanica pokazali su derivati s amidinskim supstituentom. To se može objasniti postojanjem pozitivnog naboja smještenog na amidinskoj grupi, a koji može uzrokovati niz adicijskih interakcija s biološkim

metama. Spojevi s dvije amidino grupe pokazuju vrlo slabo biološko djelovanje što se može objasniti postojanjem steričkih smetnji između dvije amidinske pozitivno nabijene grupe.

2005. godine K. M. Thakar i suradnici¹⁰ objavili su sintezu derivata tioureje koji sadrže benzo[*b*]tiofensku jezgru kao potencijalnih antimikrobnih derivata. Grupa derivata tihidantoina i tiobarbiturata sintetizirana je počevši od 2-*N*-ariltiopiridokarbonil-3, 5-diklorbenzo[*b*]tiofena. U *in vitro* uvjetima ustanovljeno je da derivati tihidantoina pokazuju antivirusno, antigljivično i antiepileptično djelovanje, a derivati tioksopirimidina uz navedena djelovanja pokazuju još i antiupalna i antidepresivna djelovanja.



Shema 13. Derivati tioureje

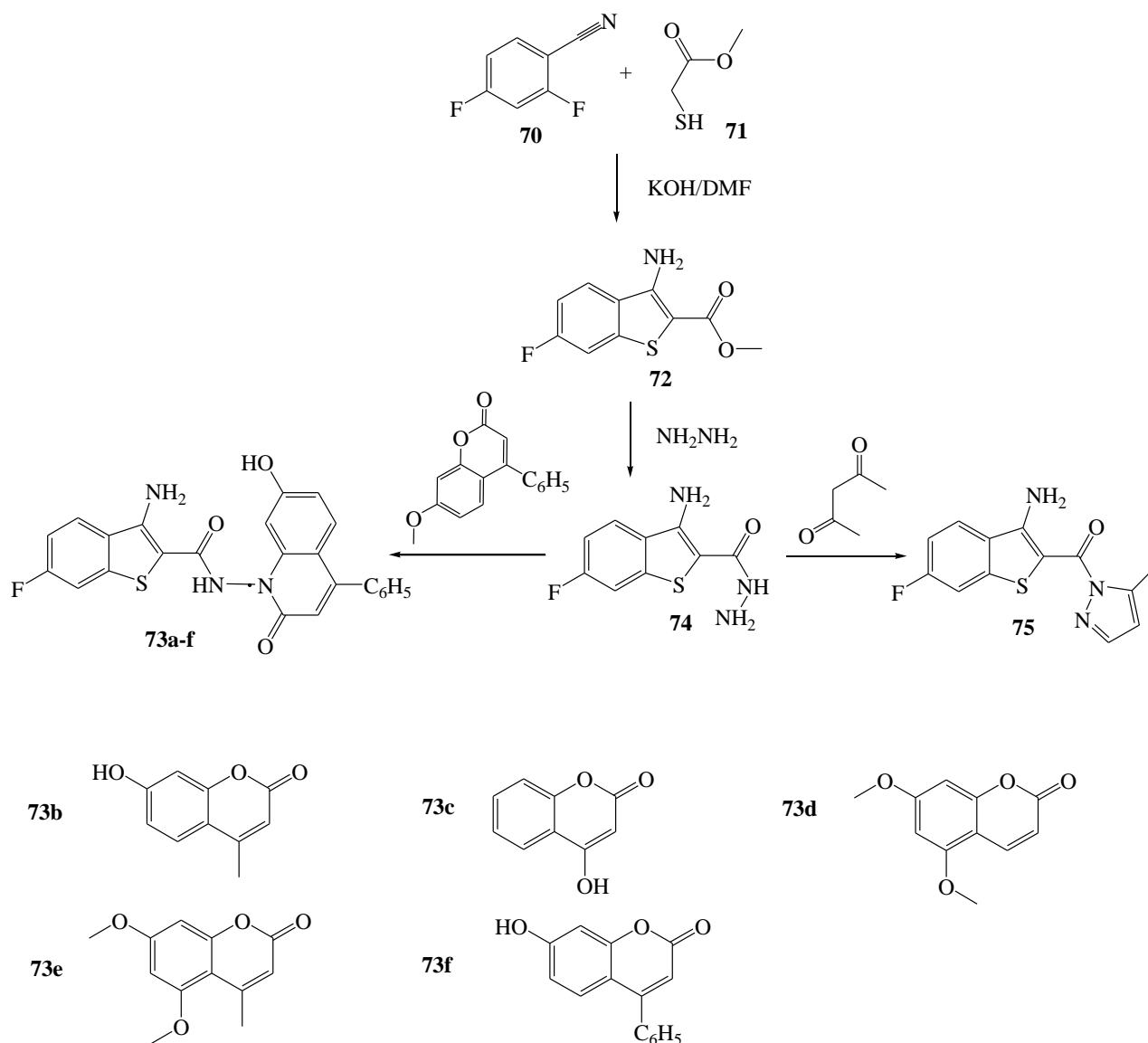
Tablica 1. Derivati tioureje

| | | |
|---|---|---|
| 63a C ₆ H ₅ - | 64a C ₆ H ₅ - | 65a C ₆ H ₅ - |
| 63b 4-NHCOCH ₃ -C ₆ H ₄ - | 64b 4-NHCOCH ₃ -C ₆ H ₄ - | 65b 4-NHCOCH ₃ -C ₆ H ₅ - |
| 63c 2-C ₇ H ₄ NS- | 64c 2-C ₇ H ₄ NS- | 65c 2-C ₇ H ₄ NS- |
| 63d 2,4-(Cl) ₂ -C ₆ H ₃ - | 64d 2,4-(Cl) ₂ -C ₆ H ₃ - | 65d 2,4-(Cl) ₂ -C ₆ H ₃ - |
| 63e 2,6-(CH ₃) ₂ -C ₆ H ₃ - | 64e 2,6-(CH ₃) ₂ -C ₆ H ₃ - | 65e 2,6-(CH ₃) ₂ -C ₆ H ₃ - |
| 63f 2,4-(NO ₂) ₂ -C ₆ H ₃ - | 64f 2,4-(NO ₂) ₂ -C ₆ H ₃ - | 65f 2,4-(NO ₂) ₂ -C ₆ H ₃ - |
| 63g 4-COOC ₂ H ₅ -C ₆ H ₄ - | 64g 4-COOC ₂ H ₅ -C ₆ H ₄ - | 65g 4-COOC ₂ H ₅ -C ₆ H ₄ - |
| 63h 4-CH(CH ₃) ₂ -C ₆ H ₄ - | 64h 4-CH(CH ₃) ₂ -C ₆ H ₄ - | 65h 4-CH(CH ₃) ₂ -C ₆ H ₄ - |
| 63i 4-OCH ₃ -C ₆ H ₄ - | 64i 4-OCH ₃ -C ₆ H ₄ - | 65i 4-OCH ₃ -C ₆ H ₄ - |
| 63j 2-CH ₃ -5-Cl-C ₆ H ₃ - | 64j 2-CH ₃ -5-Cl-C ₆ H ₃ - | 65j 2-CH ₃ -5-Cl-C ₆ H ₃ - |
| 63k 2-C ₅ H ₄ N- | 64k 2-C ₅ H ₄ N- | 65k 2-C ₅ H ₄ N- |
| 63l 2,4,6-(Br ₂) ₃ -C ₆ H ₂ - | 64l 2,4,6-(Br ₂) ₃ -C ₆ H ₂ - | 65l 2,4,6-(Br ₂) ₃ -C ₆ H ₂ - |

Spomenuti spojevi priređeni su prema Shemi 14, počevši od supstituiranih 3-klorbenzo[*b*]tiofenkarbonil-klorida **58a,b,d,e,f,g** i 3-klortieno[2,3-*b*]tiofen- ili 3-klor[3,2-*b*]tiofen-2-karbonil-klorida. Kloridi **58a,b,d,e,g** daju u reakciji s *p*-aminobenzojevom kiselinom 6-supstituirane *N*-(4-karboksifenil)-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karboksamide **61a,f,g,h,i,j,k,l**, koji u reakciji sa SOCl₂ daju odgovarajuće acilne kloride 6-supstituiranih *N*-(4-klorkarbonilfenil)-3-klorbenzo[*b*]tiofen-karboksamida **66a-e**. Acidni kloridi **58a** i **f** reagiraju s *p*-aminobenzonitrilom dajući odgovarajuće cijano-supstituirane karboksamide **61a,k,l**. Cijano-supstituirani karboksamidi **61a,k,l** u Pinnerovoj reakciji provedeni su u odgovarajuće 2-imidazolinil supstituirane karboksamide **69a-c**.

Ustanovljeno je da svi spojevi pokazuju vrlo izraženu antiproliferativnu aktivnost, pri čemu su 2-imidazolinil supstituirani derivati najaktivniji. Njihova antitumorska aktivnost povezana je s njihovom sposobnosti vezivanja na DNK. Amidino supstituirani benzo[*b*]tienokinoloni, snažni ds-DNK interkalatori, općenito su pokazali jače i selektivnije antitumorsko djelovanje od njihovih acikličkih prekursora amida koji ne interkaliraju u potpunosti. Spojevi s jednom amidinskom grupom pokazali su najbolje antiproliferativno djelovanje prema ispitivanim tumorskim stanicama što bi se moglo objasniti postojanjem pozitivnog naboja smještenog na amidinskoj grupi, koji može utjecati na dodatne interkacije s biomakromolekulama poput DNK. Postojanje dviju amidinskih grupa smanjuje biološku aktivnost, što je neočekivano. Pretpostavlja se da su uzrok tomu sterički efekti.

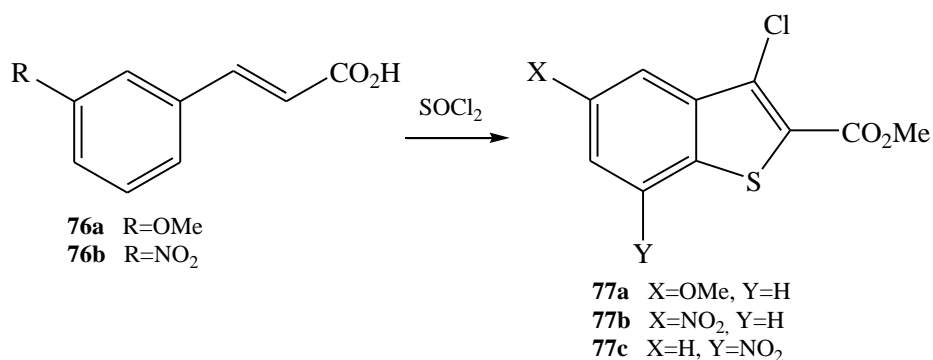
2014. godine H. K. Nagesh¹² i suradnici objavili su sintezu benzotiofenskih derivata kumarina, pirimidina i pirazola te potvrdili njihovu antimikrobnu aktivnost prema nekim sojevima bakterija (*Echerichia Coli*, *Salmonela*, *Candida* i ostali). Niz novih derivata sintetiziran je počevši od 2,4-difluorbenzonitrila i metil-tioglikolata kao početnih reaktanata (Shema 15). Kumarini kondenzirani s benzotiofenoskom jezgrom, strukturne su jedinice koje se nalaze u strukturi velikog broja kompleksnih prirodnih produkata te pokazuju izraženi i široki spektar bioloških aktivnosti kao što su antivirusna, antikoagulacijska, antibakterijska, anti-HIV i antifungalna aktivnost. Također, takvi derivati djeluju i kao antihistaminici. Pirimidini kondenzirani s benzotiofenskom jezgrom su strukturni analozi biogenih purina i možemo ih razmatrati i kao potencijalne antimetabolite nukleinskih kiselina. Mnogi derivati pirimidina kondenziranih s benzotiofenom zanimljivi su medicinskim kemičarima jer uvođenje takve strukturne jedinice poboljšava farmakološka svojstva i poboljšava antitumorsku, protuupalnu, antihiperlipidemijsku i antimikrobnu aktivnost. Pirazoli kondenzirani s benzotiofenom uz činjenicu da pokazuju antimikrobna, protuupalna i ostala svojstva djeluju i kao antidepresivi.



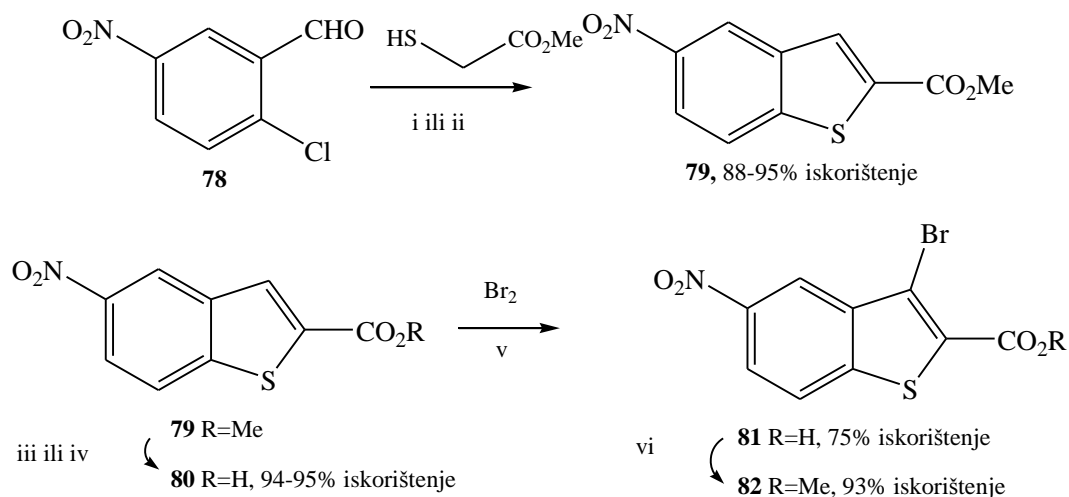
Shema 15. Sinteza benzotiofenskih derivata kumarina, pirimidina i pirazola

Derivati su priređeni prema Shemi 15, počevši od 2,4-difluorbenzonitrila **70** koji u reakciji s metiltioglikolatom **71** i kalijevim hidroksidom u DMF-u daje metil-3-amino-6-fluorbenzotiofen-2-karboksilat **72**. Spoj **72** u apsolutnom alkoholu reagira s hidrazin-hidratom pri čemu nastaje 3-amino-6-fluorbenzotiofen-2-karbohidrazid **74**. Derivati kumarina **73a-f** dobiveni su reakcijom odgovarajućeg kumarina sa spojem **74**, a derivat pirazola **75** dobiven je reakcijom spoja **74** s acetil-acetonom.

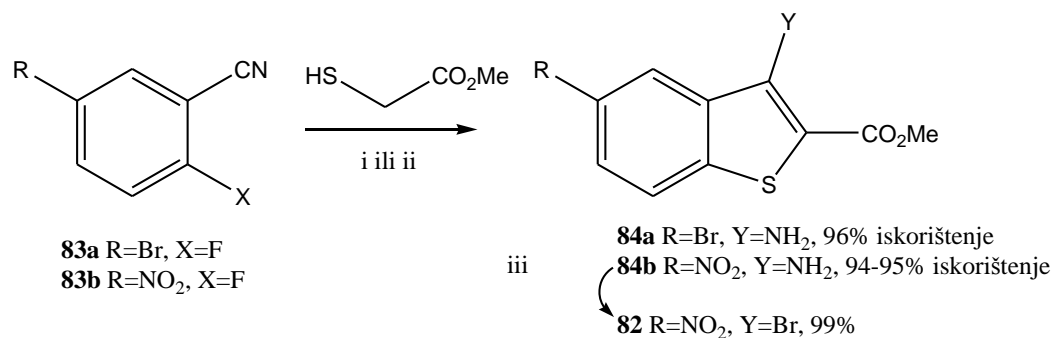
2015. godine Mark C. Bagley¹³ i suradnici objavili su sintezu 3-aminobenzo[*b*]tiofenskih derivata kao potencijlnih inhibitora LIMK1, MK2 i PIM kinaze potpomognutu mikrovalnim zračenjem. Takva sinteza je brza, jednostavna za provesti i rezultira visokim iskorištenjem.



Shema 16. Sinteza benzo[*b*]tiofena **77a-c**



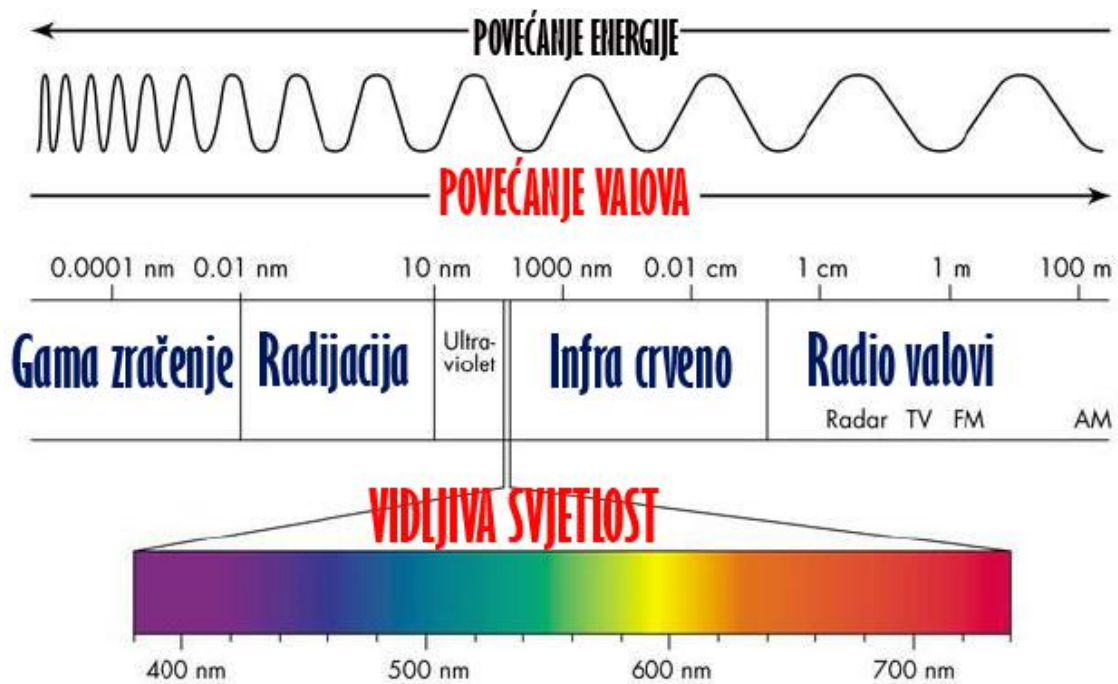
Shema 17. Reagensi i uvjeti: (i) K₂SO₄, DMF, RT, 17 h; (ii) K₂CO₃, DMF, mikrovalovi, 90°C, 15 min; (iii) NaOH, MeOH-H₂O, reflux, 3 h; (iv) NaOH, MeOH-H₂O, mikrovalovi, 100°C, 3 min; (v) Br₂, AcOH, NaOAc, 55°C, 48 h; (vi) MeI, K₂CO₃, DMF, RT, 3 h.



Shema 18. Reaktanti i uvjeti: (i) Et₃N, DMSO, 100°C, 2 h; H₂O; (ii) Et₃N, DMSO, mikrovalovi, 130°C, 11 min; H₂O; (iii) *tert*-BuONO, CuBr₂, MeCN, 0°C; RT, 2 h; HCl (aq.).

2. 4. Spektroskopija

Spektroskopija je znanost koja se bavi spektrima kao odrazom energijskih ili strukturnih promjena u atomima i molekulama tvari nakon njihova međudjelovanja s elektromagnetskim zračenjem ili sa subatomske i drugim česticama u svrhu kvalitativnih i kvantitativnih ispitivanja materije ili studija fizikalnih procesa. Pritom se obično mjeri intenzitet emitiranog, apsorbiranog ili raspršenog zračenja ovisno o njegovoj valnoj duljini, odnosno frekvenciji. Tako nastali spektri karakteristični su za određenu tvar ili molekulu.¹⁴



Slika 3. Elektromagnetski spektar

Spektroskopija se najčešće dijeli prema spektralnom području, a kao rezultat spektroskopskog istraživanja dobiva se odgovarajući spektar. Možemo ju podijeliti i prema vrsti interakcije s ispitivanom tvari na apsorpcijsku, emisijsku i interakcijsku spektroskopiju. U atomima i molekulama postoji više energijskih nivoa u kojima su smješteni elektroni. Te energetske nivoe označavamo slovima K, L, M, N, O, P i Q. Energijska stanja atoma i molekula su kvantizirana što bi značilo da atomi ili molekule mogu emitirati ili apsorbirati samo određene karakteristične količine energije. Osnovno stanje odgovara stanju najniže dozvoljene energije. Elektroni u apsorpcijskoj spektroskopiji prelaze iz osnovnog u pobuđeno stanje. Na osnovu dobivenih podataka možemo dobiti informacije o strukturi, optičkim karakteristikama, a i koncentracijama molekula u nekom sustavu.

U emisijskoj spektroskopiji dolazi do emisije elektromagnetskog zračenja prelaskom elektrona iz pobuđenog u osnovno stanje. Pri interferencijskoj spektroskopiji upadno zračenje se ogiba na pravilnim strukturama te se analizira položaj interferencijskih maksimuma.



Slika 4. Apsorpcijski spektar: Tamne linije na kontinuiranom spektru,
Emisijski spektar: Izolirane svijetle linije

Kako je skup energijskih razina karakteristika atoma i molekula određene tvari, detekcijom i tumačenjem spektara zračenja mogu se dobiti podatci o kemijskom sastavu i strukturi tvari, ali i spoznaje o pobuđenom stanju, elektronskoj, vibracijskoj i rotacijskoj energiji, atomskim i molekularnim energijskim prijelazima, kemijskoj vezi i drugo.

Energija koju tijelo apsorbira ili emitira dana je izrazom (1) koji se naziva Bohrovo pravilo frekvencije:

$$E_2 - E_1 = h\nu \quad (1)$$

gdje je E_2 energija elektrona na višem energijskom nivou, a E_1 na nižem energijskom nivou, h -Planckova konstanta, a ν -frekvencija svjetlosti.

Koncentracija analizirane tvari može se izračunati iz Lambert-Beerovog zakona (2):

$$A = -\log(I_0/I) = \epsilon bc \quad (2)$$

gdje je A -apsorbancija, I_0 –intenzitet upadnog zračenja, I -intenzitet propuštenog zračenja, ϵ -molarni apsorpcijski koeficijent, T -transmitancija, c -koncentracija, a b -duljina puta zrake kroz uzorak.

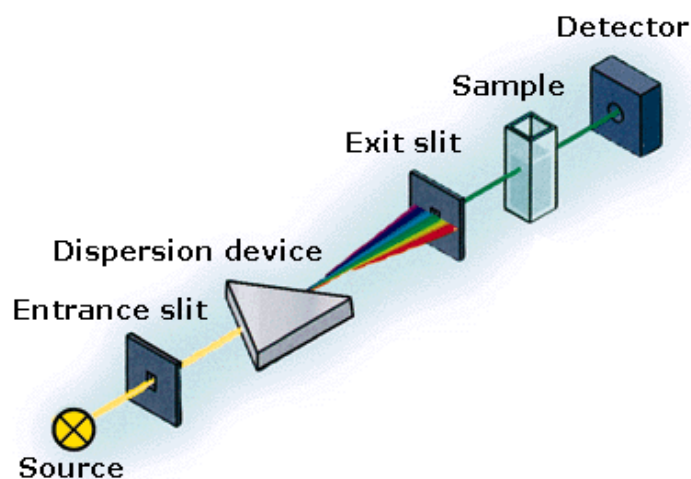
Apsorbancija predstavlja količinu apsorbiranog zračenja.

Prilikom snimanja spektra potrebno je imati izvor zračenja koje mogu biti volframove, halogene ili ksenonske žarulje te deuterijske lampe, monokromator i detektor. Monokromator (od grčkih riječi mono, jedna i chroma, boja) optički je uređaj koji se temelji na disperziji svjetlosti na jednoj ili više prizmi ili difrakcijskim rešetkama na njene konstitutivne valne duljine. Okretanjem rešetke ili prizme odabiremo kut upada elektromagnetskog zračenja i time postizemo da monokromator propušta samo željenu valnu duljinu. Monokromator nije potreban u slučaju da kao izvor zračenja imamo laser, čija se valna duljina može ugađati. Laser emitira zračenje točno određene valne duljine, koje je puno bolje od svjetlosti koja izlazi iz monokromatora. Elektromagnetsko zračenje koje propušta monokromator usmjerava se na uzorak koji može apsorbirati, raspršiti ili reflektorati svjetlost. Prolazno zračenje kroz uzorak dolazi do detektora koji pretvara primljeno zračenje u signal koji se zapisuje kao spektar.

2. 4. 1. Spektroskopija vidljivog zračenja (UV/Vis spektroskopija)

Spektroskopija vidljivog zračenja koristi vidljivu svjetlost kao medij proučavanja. Vidljivo zračenje uzrokuje pobudu elektrona unutar atoma, molekula, kristalnih ili amorfni tvari. Spektroskopijom vidljivog zračenja se proučavaju efekti prouzrokovani promjenom elektronske strukture atoma ili molekula te sama elektronska struktura. Ova spektroskopija obuhvaća i blisko ultraljubičasto zračenje, jer se za to optičko područje koriste iste tehnike i isti materijali, a instrumenti često mogu snimati spektre u oba spektralna područja. Takva spektroskopija se označava kraticom UV/Vis. Ultraljubičasto zračenje u ovom slučaju obuhvaća valne duljine od 200-400 nm, a vidljivo od 400-800 nm. Djelovanjem zračenja tih valnih duljina apsorbira se energija koja premješta elektrone neke molekule iz njihova osnovnog stanja u pobuđeno stanje. Pomoću UV/Vis spektroskopije analiziraju se organske molekule i to takve strukture koje u sebi sadrže π -elektrone i nevezne elektrone (najčešće konjugirane molekule). Mnogi su organski spojevi obojeni jer se njihova UV-apsorpcija proširuje u vidljivo područje. UV spektri pokazuju prisutnost skupine ili konjugiranog sustava koji apsorbira zračenje i na njih malo utječe ostatak molekule. Nezasićene skupine atoma koje su odgovorne za apsorpciju i uzrokuju obojenost organskih spojeva nazivaju se kromofori. To su na primjer skupina s nizom konjugiranih dvostrukih veza među ugljikovim atomima ($C=C-C=C-$), karbonilna skupina ($>C=O$), nitrozo-skupina ($-N=O$), nitro-skupina ($-NO_2$), azo-skupina ($-N=N-$) i slično. Njezinim uvođenjem u molekulu spoja (većinom aromatskoga) apsorpcija elektromagnetskog zračenja pomiče se, zbog mezomerije u konjugiranom sustavu, iz ultraljubičastog u vidljivi dio spektra, što spoju daje obojenost.

Uređaji koji služe za UV/Vis spektroskopiju nazivaju se spektrofotometri. To su instrumenti koji mjere količinu svjetla koju uzorak apsorbira. Kao izvor zračenja kod UV/Vis spektroskopije koriste se deuterijska i volframova lampa. Deuterijska lampa koristi se za rad u UV dijelu spektra. Ona predstavlja cijev za pražnjenje od kvarca u kojoj se nalazi deuterij pod određenim pritiskom. Za rad u Vid dijelu spektra koristi se volframova lampa. Kao osnovni disperzijski elementi koriste se prizma i difrakcijska rešetka. Disperzijski elementi razlažu kontinuirano zračenje primarnog izvora. Prizme se prave od kvarca ili stakla. Kao detektori se koriste silikonske fotodiode koje sve više zamjenjuju fotocijevi i fotoćelije. U naprednijim instrumentima koriste se fotomultiplikatori čija je osnovna prednost mogućnost „odgovora“ u cijelom opsegu valnih duljina (190-950nm). Otopine u kojima se prethodno moraju otopiti ispitivane molekule moraju zadovoljavati neke uvjete; ispitivana tvar se mora dobro otapati u izabranom otapalu, otapalo mora biti inertno u smislu interakcija na nivou otopljenja tvar-otapalo. Od polarnih otapala najčešće se koriste etanol (95%), voda i metanol. Od alifatskih ugljikovodika koriste se heksan, heptan i cikloheksan. Ograničavajući faktor kod njihove primjene je to što ova otapala imaju često primjese aromata ili alkena i zahtijevaju dodatno pročišćavanje. Od organskih cijanida najviše se koriste acetonitril i propionitril. Kivete u koje se stavljaju uzorci izrađuju se od stakla, ukoliko se spektri snimaju u vidljivom dijelu spektra, ili kvarca ukoliko se spektri snimaju u UV dijelu spektra. Kivete su najčešće širine 1 cm, iako dužina apsorpcijskog puta u kivetama može biti različita što ovisi o zahtjevima mjerenja i uzorcima koji se ispituju.¹⁵



Slika 5. Dijelovi spektrofotometra

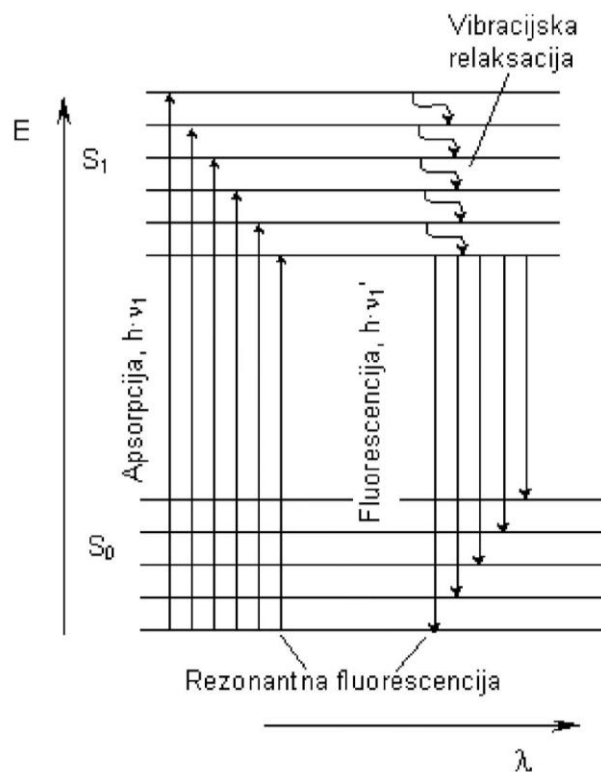
2. 4. 2. Fluorimetrijska spektroskopija

Fluorimetrijska spektroskopija se temelji na pobudi molekula ultraljubičastim svjetlom koje se u tom pobuđenom stanju zadržavaju vrlo kratko (10^{-9} - 10^{-6} s) te prilikom povratka u osnovno stanje emitiraju svjetlost u vidljivom dijelu spektra. Iz dobivenog dijela spektra moguće je dobiti kvalitativne i kvantitativne informacije o promatranom uzorku koji fluorescira. Fluorimetrijske su metode 10-1000 puta osjetljivije od apsorpcijskih metoda. Međutim, postoji mali broj spojeva koji se mogu odrediti fluorimetrijskom spektroskopijom. Uglavnom su to spojevi koji sadrže mnoštvo dvostrukih veza i aromatsku strukturu te polieni i spojevi koji sadrže karbonilnu skupinu. Učinkovitost fluorescencije može se definirati veličinom koja se naziva kvantno iskorištenje (3):

$$\Phi = N_e / N_a \quad (3)$$

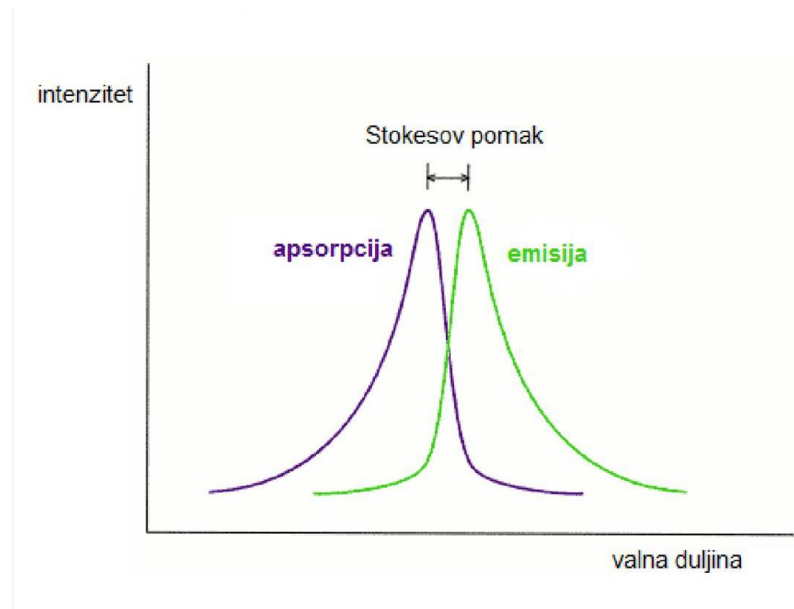
Gdje je N_e broj emitiranih fotona, a N_a broj apsorbiranih fotona¹⁶

Naime, u većini slučajeva se dio energije pobuđivanja pretvara u vibracijsku energiju, a dio se troši na fotoemisiju te je zbog toga broj emitiranih fotona manji od broja apsorbiranih fotona.



Slika 6. Dijagram fluorescencije

Energija emisije, odnosno fluorescencije niža je od apsorbirane energije te se ona odvija pri većim valnim duljinama. Molekule se pobuđuju u razna vibracijska stanja iz kojih se brzo vraćaju u najniže vibracijsko stanje. Taj proces prethodi emisiji koja se zatim događa prijelazom iz najnižeg vibracijskog stanja u osnovno stanje. Upravo ta pojava rezultira pomakom u valnim duljinama apsorpcije i emisije, koja se naziva Stokesov pomak.



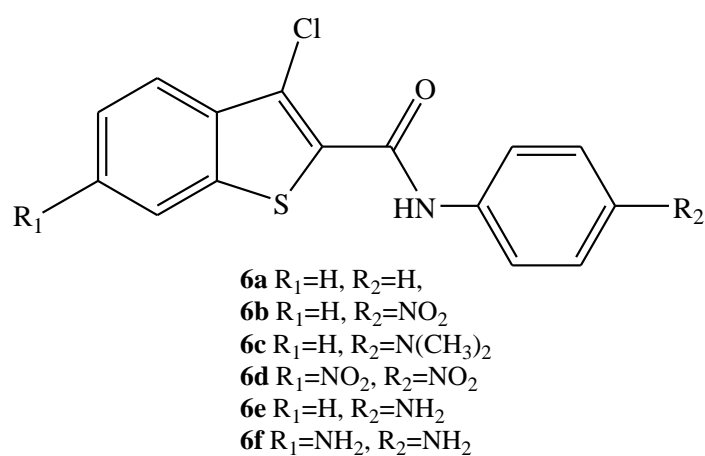
Slika 7. Stokesov pomak

Sastavni dio molekule tj. funkcionalna skupina koja uzrokuje fluorescenciju molekula naziva se fluorofor. Endogeni fluorofori su aminokiseline, strukturni proteini, enzimi i koenzimi, vitamini, lipidi i porfirini. Egzogeni fluorofori su fotosensitizeri. Fluorofori apsorbiraju energiju određene valne duljine te je re-emitiraju na drugoj specifičnoj valnoj duljini. Iznos i valna duljina emitirane energije ovisi i o fluoroforu i njegovoj kemijskoj okolini. Tipični fluorofori su triptofan, fluorescein, rodamin B, klorofil A, kinin i drugi. Fluorescencija se koristi i u analitičke svrhe: tvari koje fluoresciraju mogu se detektirati u vrlo niskim koncentracijama. Odličan je način usporedbe serija spojeva koje zbog malih razlika u strukturama pokazuju različite intenzitete fluorescencije. U biologiji se različite stanične strukture mogu obojiti fluorescentnom bojom i tako učiniti vidljivima. Posebno je važno bojilo etidijev bromid čije se molekule vežu s molekulama DNK ulazeći između nukleotida.¹⁷

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Cilj rada

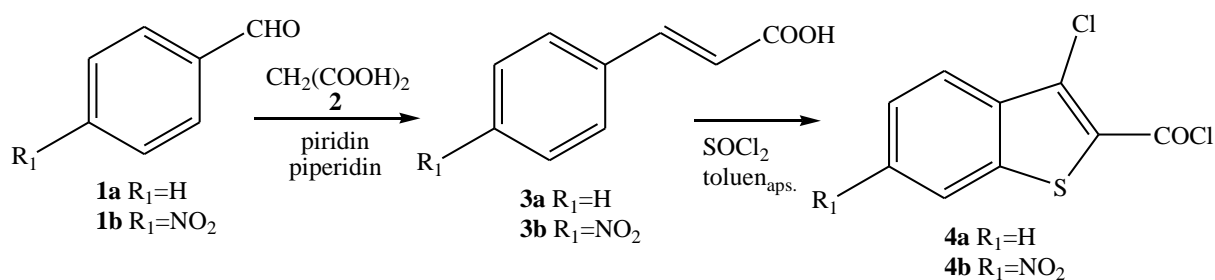
Cilj ovog rada bila je priprava supstituiranih i disupstituiranih 3-klor-benzo[*b*]tiofen-2-karboksamida kao potencijalnih senzora za detekciju metalnih kationa u otopinama ili za detekciju pH. Na Slici 8 prikazane su strukture priređenih spojeva **6a-6f**. Struktura priređenih derivata 3-klor-benzo[*b*]tiofen-2-karboksamida potvrđena je ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom a spojevi su dodatno okarakterizirani UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom. Provedene su i UV/Vis i fluorimetrijske titracije otopina spojeva sa otopinama metalnih soli ili puferima različitih pH vrijednosti.



Slika 8. Strukture priređenih spojeva **6a-6f**

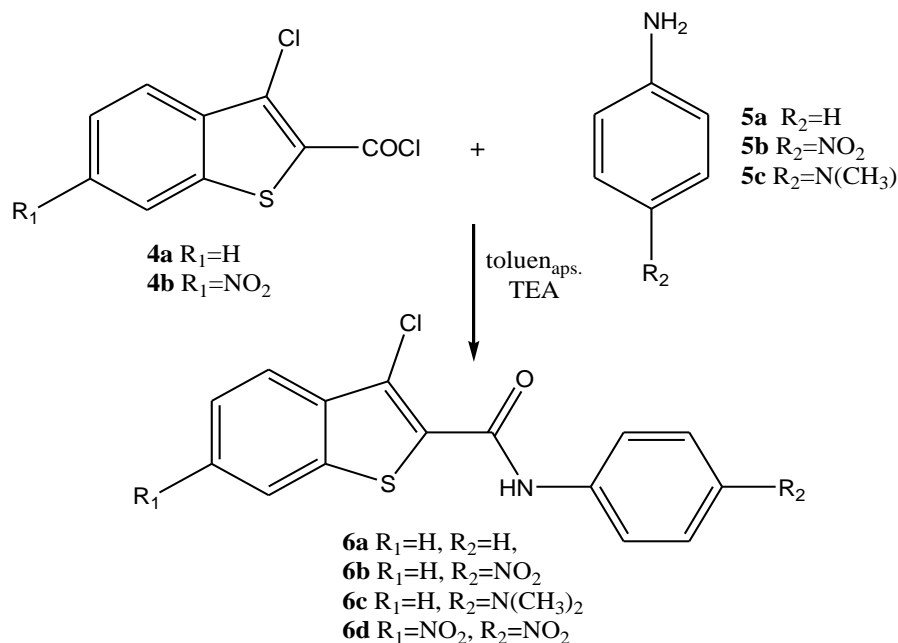
3.2. Sinteza priredenih spojeva

Za sintezu ciljanih derivata 3-klor-benzo[*b*]tiofen-2-karboksamida prvo je bilo potrebno prirediti odgovarajuće cimetne kiseline **3a** i **3b** reakcijom odgovarajućeg benzaldehida **1a** i **1b** i malonske kiseline **2** u piridinu uz dodatak piperidina kao katalizatora.¹⁹ Iskorištenja provedenih reakcija iznose 77,4% i 83,7%. Tretiranjem odgovarajuće cimetne kiseline **3a** i **3b** s tionil-kloridom u apsolutnom toluenu dobiveni su odgovarajući 3-klor-benzo[*b*]tiofen-2-karbonil kloridi **4a** i **4b**.²⁰



Shema 20. Sinteza cimetne kiseline **3a** i **3b** i 3-klor-benzo[*b*]tiofen-2-karbonil-klorid **4a** i **4b**

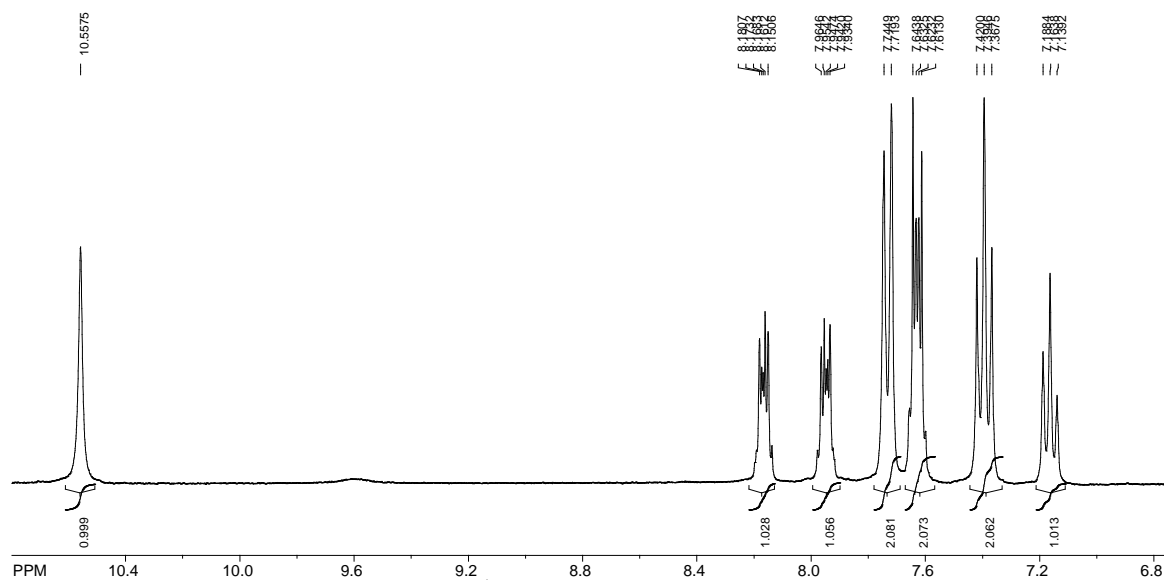
Supstituirani 3-klor-benzo[*b*]tiofen-2-karboksamidi **6a-6d** priređeni su reakcijom kondenzacije odgovarajućih anilina **5a-5c** i 3-klor-benzo[*b*]tiofen-2-karbonil-klorida **4a** i **4b** u apsolutnom toluenu uz dodatak trietilamina.^{21, 22}



Shema 21. Sinteza ciljanih spojeva **6a-6d**

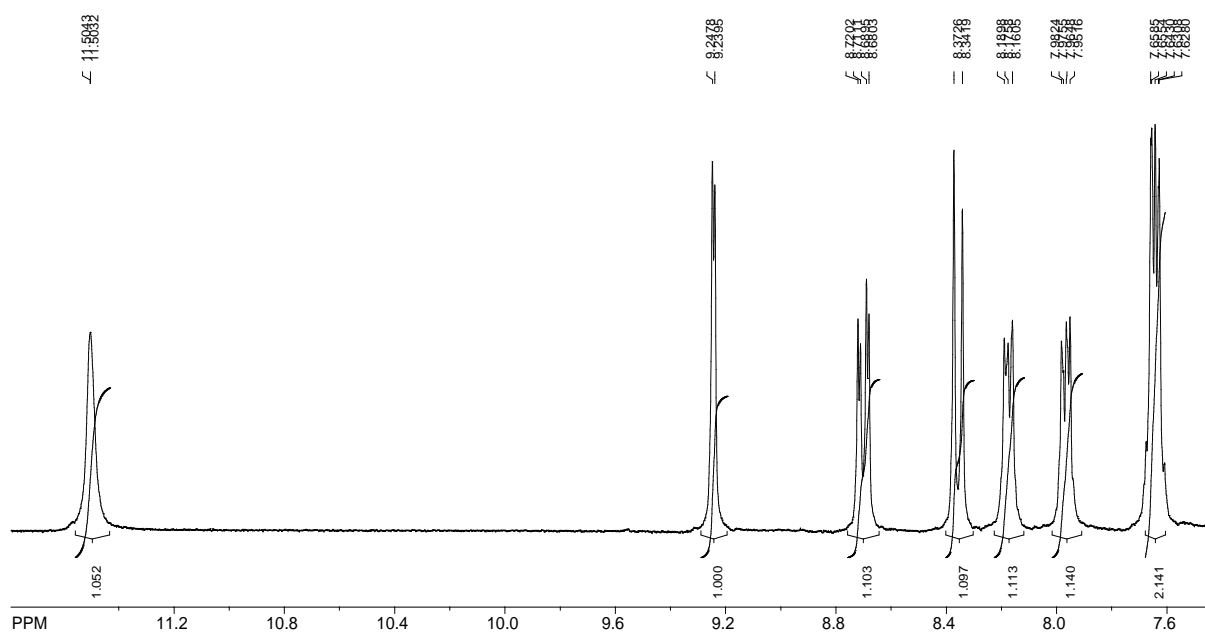
Konačni produkti dobiveni su nakon zagrijavanja reakcijske smjese na temperaturi refluksa 24h za **6a-6d** u iskorištenju od 33,19%-92,26%.

Strukture svih priređenih spojeva potvrđene su korištenjem ^1H i ^{13}C NMR spektroskopije. Na Slici 9 prikazan je ^1H NMR spektar spoja **6a**. Signal na 10,56 ppm odgovara protonu CONH skupine a ostali signali u području od 8,18 do 7,14 ppm odgovaraju aromatskim protonima.



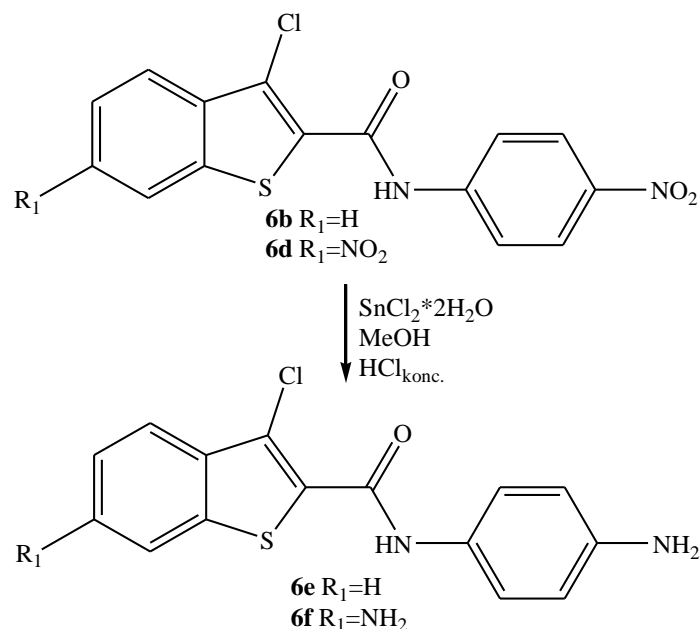
Slika 9. ^1H NMR spektar spoja **6a**

U ^1H NMR spektru spoja **6b** na Slici 10 možemo uočiti signal protona CONH skupine na 11,50 ppm te signale u području od 9,25 ppm do 7,66 ppm koji odgovaraju aromatskim protonima.



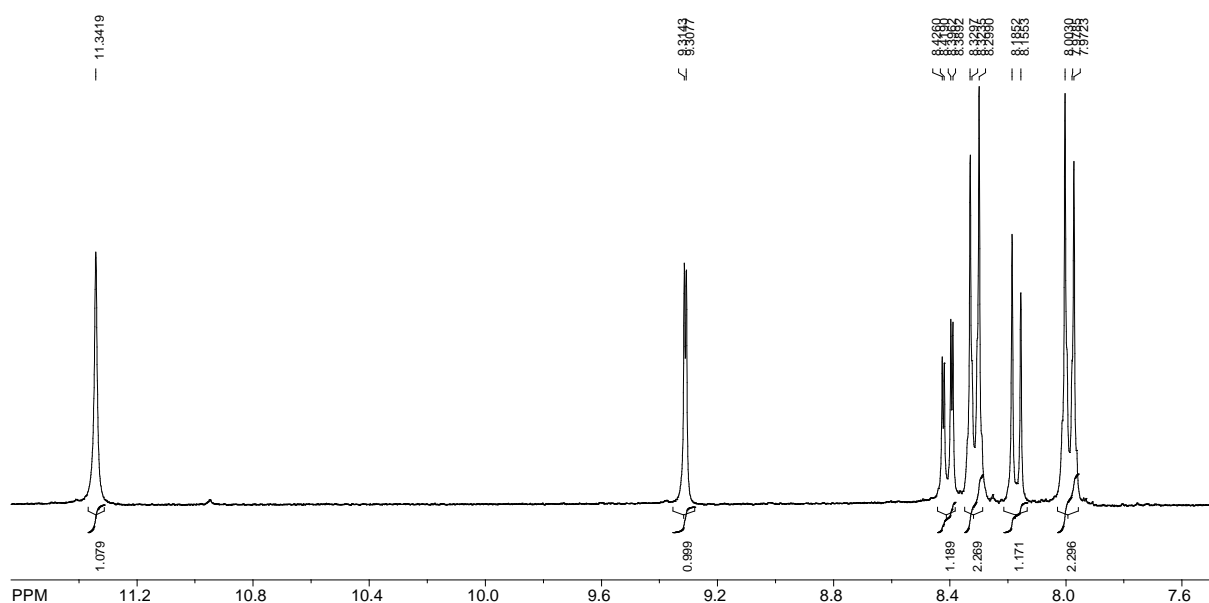
Slika 10. ^1H NMR spektar spoja **6b**

Amino supstituirani derivati **6e** i **6f** priređeni su redukcijom NO₂ supstituiranih derivata **6b** i **6d** s kositar-kloridom dihidratom u metanolu i kloridnoj kiselini u iskorištenju od 91,89 % i 92,26 %.^{23, 24}



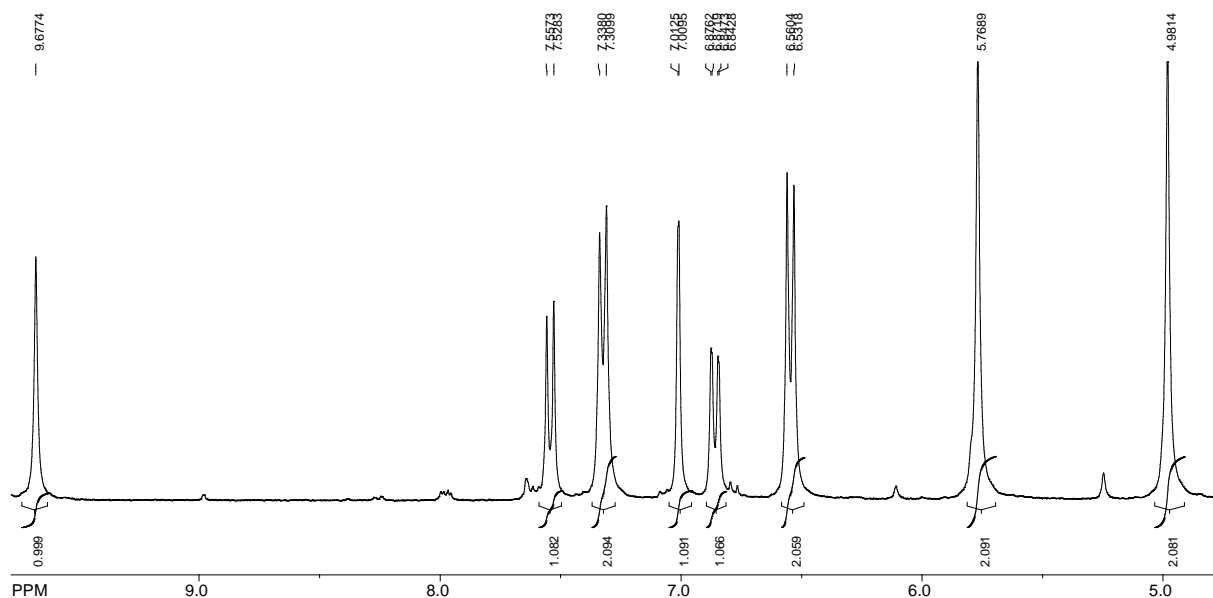
Shema 22. Sinteza spojeva **6e** i **6f**

Na Slici 11 prikazan je ¹H NMR spektar dinitro supstituiranog derivata **6d** kod kojeg je signal protona CONH skupine vidljiv na 11,34 ppm te signali aromatskih protona u području od 9,31 do 7,97 ppm.



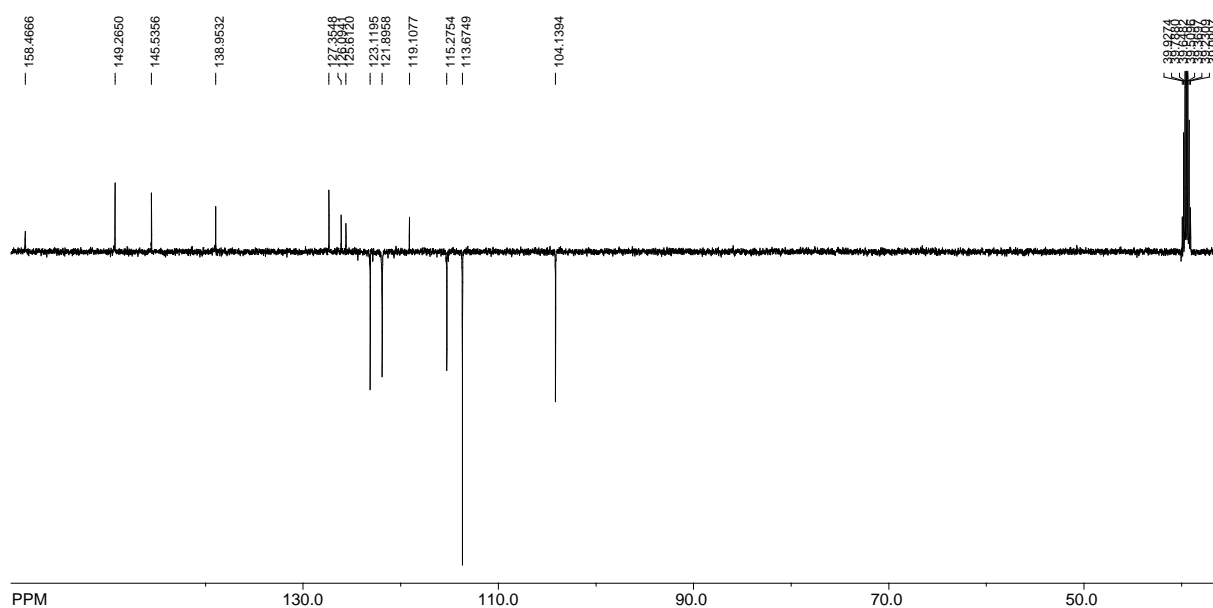
Slika 11. ¹H NMR spektar spoja **6d**

U ^1H NMR spektru diamino supstituiranog analoga **6f** se na 9,68 ppm može uočiti signal protona CONH skupine te možemo zaključiti da je signal pomaknut u više magnetsko polje u odnosu na nitro derivat. U području od 7,57 ppm do 6,53 ppm mogu se uočiti signali aromatskih protona. Na 5,77 ppm i 4,98 ppm nalaze se signali protona dviju NH_2 skupina koji nisu vidljivi u spektru dinitro analoga **6d**.



Slika 12. ^1H NMR spektar spoja **6f**

Struktura spoja **6f** potvrđena je i ^{13}C NMR spektrom prikazanim na Slici 13 u kojem se može uočiti odgovarajući broj signala kvaternih i ugljikovih atoma aromatskih CH skupina.



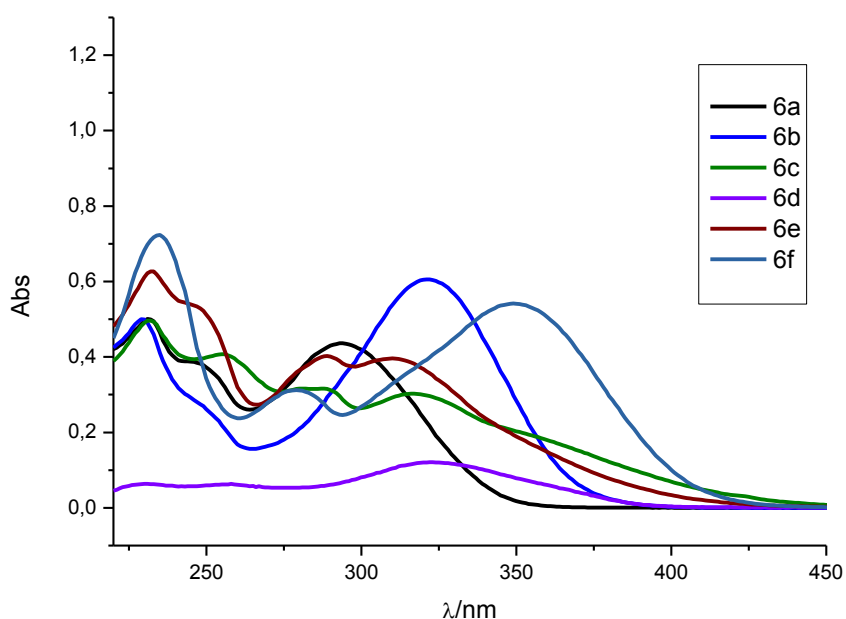
Slika 13. ^{13}C NMR spektar spoja **6f**

3.3. Spektroskopska karakterizacija UV/Vis spektroskopijom

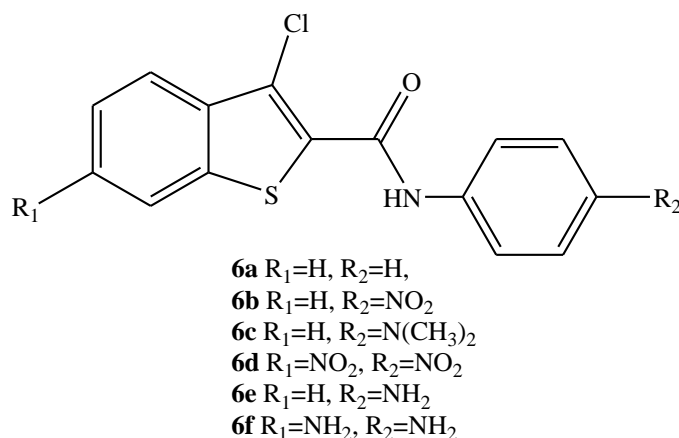
3.3.1. Kvantitativni UV/Vis spektri

UV/Vis apsorpcijski spektri svih priređenih spojeva snimani su pri istoj koncentraciji od 2×10^{-5} mol/dm³ u metanolu (polarno protično otapalo). Na Slici 14 prikazani su usporedni apsorpcijski spektri spojeva **6a-6f**.²⁵

a)



b)



Slika 14. a) Apсорpcijski spektri spojeva **6a-6f** u metanolu i b) strukture spojeva

Iz prikazanog spektra može se zaključiti da najveći intenzitet apsorpcije pokazuje nitro supstituirani derivat **6b** s maksimumima apsorpcije na 321 nm i 229 nm.

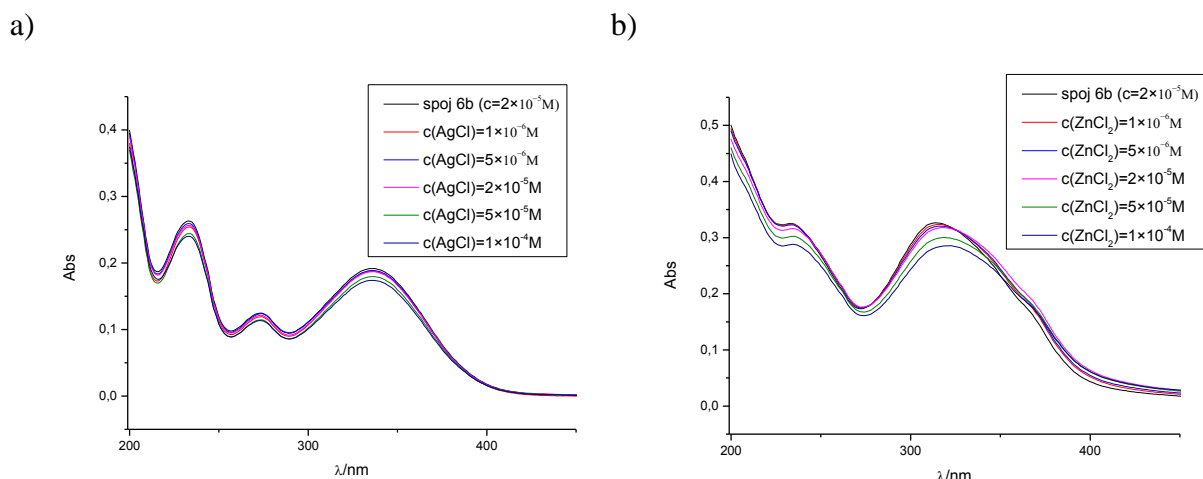
Najveći pomak valne duljine maksimuma apsorbancije pokazuje (batokromni pomak) pokazuje diamino supstituirani derivat **6f** s maksimuma apsorbancije na 350 nm, 279 nm i 234 nm. Najniži intenzitet apsorbancije pokazuje dinitro supstituirani derivat **6d**. Nesupstituirani derivat 3-klor-benzo[*b*]tiofen-2-karboksamid **6a** pokazuje hipsokromni pomak maksimuma apsorbancije na 294 nm. *N,N*-dimetilamino supstituirani derivat **6c** pokazuje u odnosu na ostale monosupstituirane derivate karboksamida **6a**, **6d** i **6d** smanjene intenziteta apsorbancije (hipokromni pomak).

Tablica 2. UV/Vis podaci ispitanih spojeva **6a-6f** u metanolu

| Spoj | λ_{\max} / nm | ϵ / $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ |
|-----------|-----------------------|---|
| 6a | 294 | 21800 |
| | 244 | 19450 |
| | 232 | 25050 |
| 6b | 321 | 30200 |
| | 229 | 24950 |
| 6c | 317 | 15050 |
| | 285 | 15700 |
| | 256 | 20300 |
| | 231 | 24700 |
| 6d | 321 | 6000 |
| 6e | 310 | 19800 |
| | 288 | 20100 |
| | 247 | 26650 |
| | 233 | 31350 |
| 6f | 350 | 27000 |
| | 279 | 15600 |
| | 234 | 34150 |

3.3.2. UV/Vis spektroskopske titracije s otopinama metalnih kationa

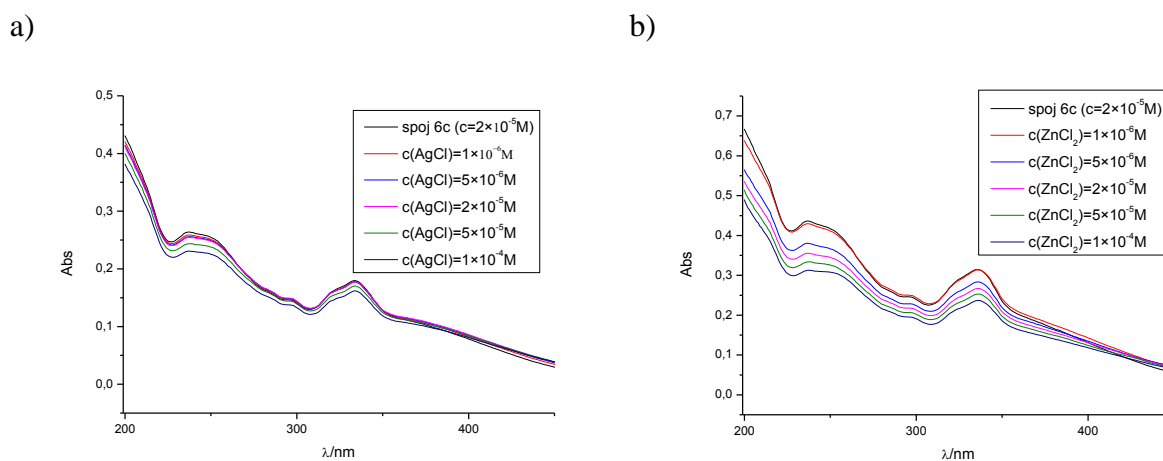
Spektroskopske titracije provedene su kako bi se ispitala mogućnost primjene priređenih spojeva kao senzora za detekciju metalnih kationa. Titracije s vodenim otopinama AgCl i ZnCl₂ provedene su kod koncentracije spojeva od 2×10^{-5} mol/dm³ uz dodatak određenih koncentracija metalnih soli (1×10^{-6} mol/dm³, 5×10^{-6} mol/dm³, 2×10^{-5} mol/dm³, 5×10^{-5} mol/dm³, 1×10^{-4} mol/dm³). Slika 15 prikazuje apsorpcijske krivulje titracije nitro supstituiranog derivata **6b** s metalnim solima.²⁶



Slika 15. Apсорpcijske krivulje ispitivanja interakcije spoja **6b** sa metalnim solima a) AgCl;
b) ZnCl₂

Iz dobivenih krivulja vidi se da spoj **6b** pokazuje veći afinitet prema vezanju Zn²⁺ pri čemu dolazi do opadanja intenziteta apsorpcije spoja s porastom koncentracije kationa.

Slika 16 prikazuje apсорpcijske krivulje titracije *N,N*-dimetilamino supstituiranog derivata **6c** s metalnim solima.

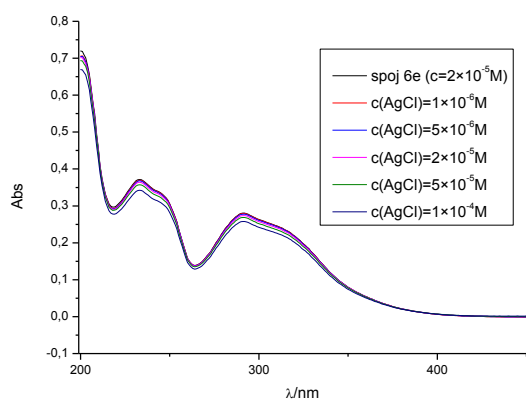


Slika 16. Apсорpcijske krivulje ispitivanja interakcije spoja **6c** s metalnim solima a) AgCl; b)
ZnCl₂

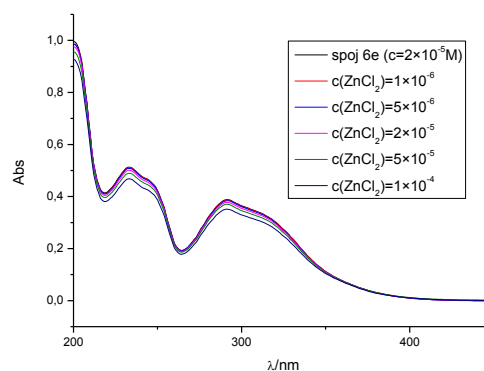
Spoj **6c** također pokazuje veći afinitet prema vezanju Zn²⁺ kationa uz opadanje intenziteta apsorpcije porastom koncentracije kationa.

Na Slici 17 prikazane su apсорpcijske krivulje titracije amino supstituiranog derivata **6e** s metalnim solima.

a)



b)

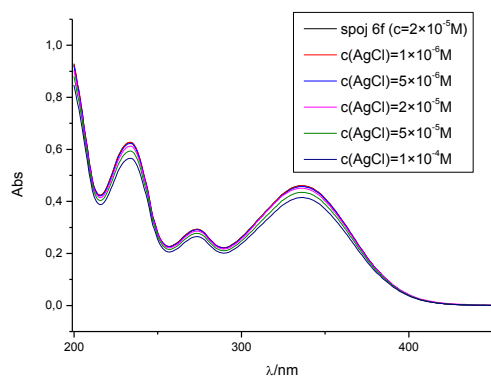


Slika 17. Apsorpcijske krivulje ispitivanja interakcije spoja **6e** s metalnim solima a) AgCl; b) ZnCl₂

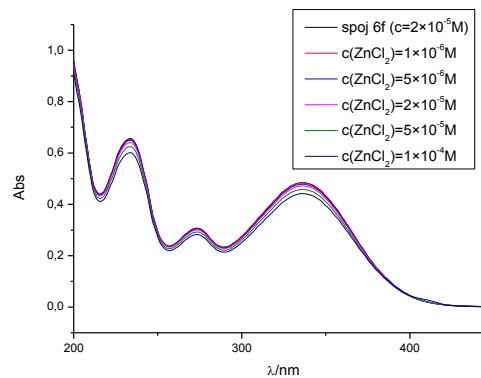
Spoj **6e** pokazuje gotovo zanemarivi afinitet prema Ag⁺ i Zn²⁺ kationima.

Slika 18 prikazuje apsorpcijske krivulje titracije diamino supstituiranog spoja **6f** s metalnim solima.

a)



b)



Slika 18. Apsorpcijske krivulje ispitivanja interakcije spoja **6f** sa metalnim solima a) AgCl; b) ZnCl₂

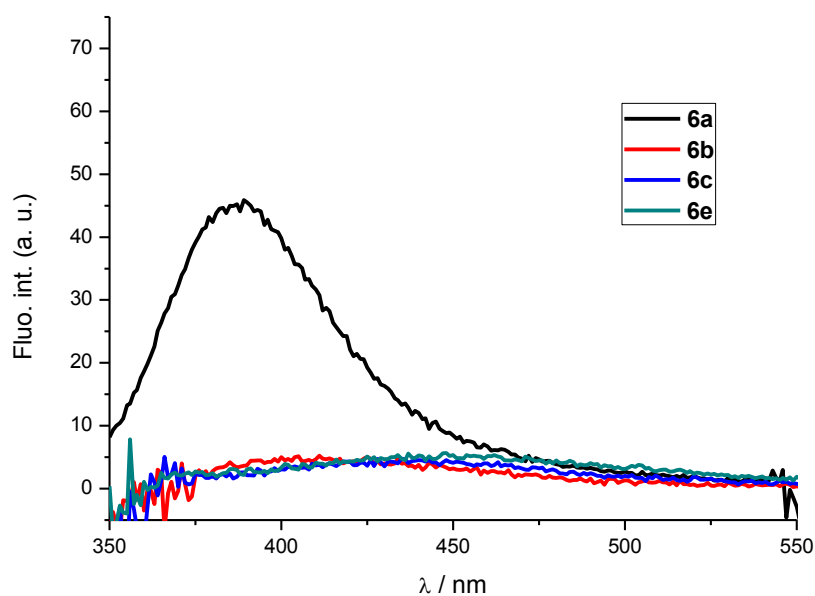
Spoj **6f** pokazuje gotovo podjednak afinitet prema vezanju Ag⁺ i Zn²⁺ kationa uz lagano opadanje intenziteta apsorpcije porastom koncentracije kationa.

3.4. Fluorimetrijska spektroskopija

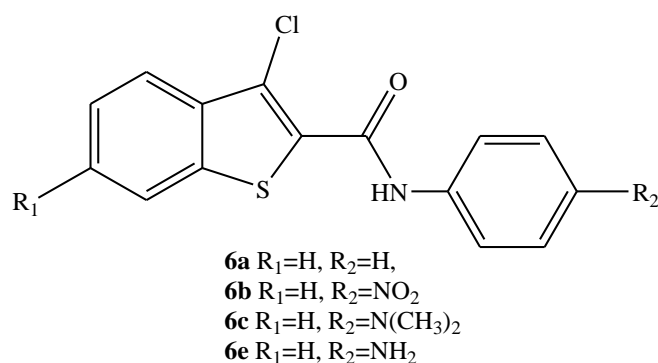
3.4.1. Emisijski spektri

Zbog velike osjetljivosti metode, fluorimetrijska ispitivanja moguće je provesti kod vrlo niskih koncentracija. Fluorimetrijski emisijski spektri spojeva **6a-6c** i **6e** snimani su pri koncentracijama 2×10^{-6} mol/dm³ u metanolu.²⁷

a)



b)



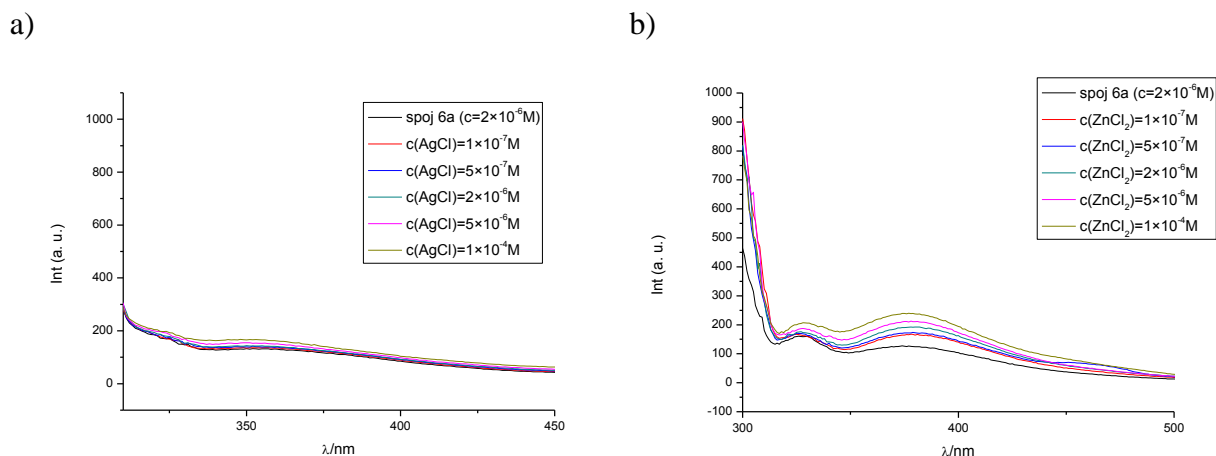
Slika 19. a) Emisijski spektri spojeva **6a-6f** u metanolu i b) strukture spojeva

Iz prikazanog spektra može se zaključiti da najveći intenzitet fluorescencije pokazuje spoj **6a** s maksimumom emisije na 375 nm. Ostali spojevi ne pokazuju izražen intenzitet fluorescencije.

3.4.2. Fluorimetrijske spektroskopske titracije s otopinama metalnih soli

Spektroskopske titracije spojeva s vodenim otopinama AgCl i ZnCl₂ provedene su kod niskih koncentracija spojeva od 2×10^{-6} mol/dm³ uz dodatak određene koncentracije metalnih soli (1×10^{-7} mol/dm³, 5×10^{-7} mol/dm³, 2×10^{-6} mol/dm³, 5×10^{-6} mol/dm³, 1×10^{-5} mol/dm³).

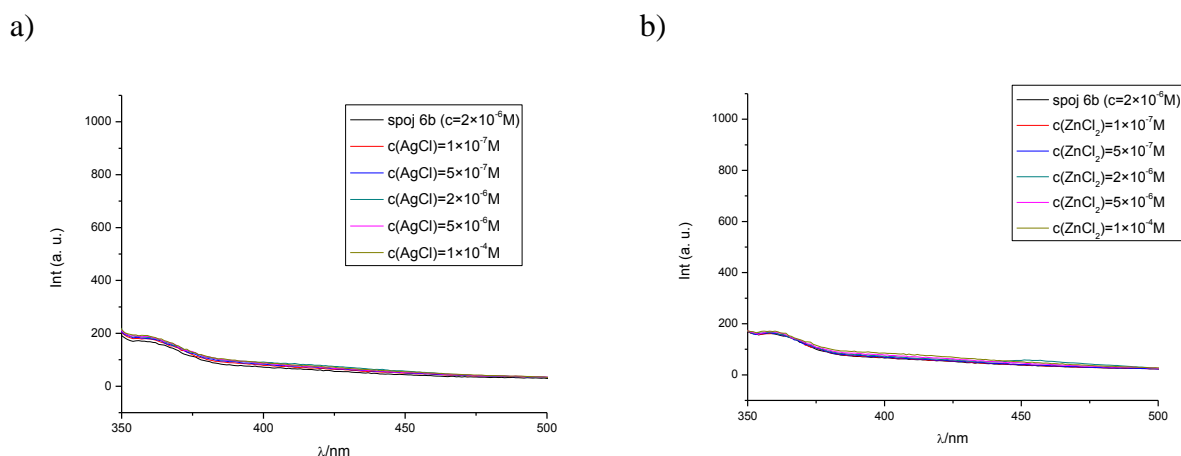
Slika 20 prikazuje emisijske krivulje titracije spoja **6a** s metalnim solima.



Slika 20. Emisijske krivulje ispitivanja spoja **6a** s metalnim solima a) AgCl; b) ZnCl₂

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da dodatkom ZnCl₂ dolazi do blagog porasta intenziteta fluorescencije.

Na Slici 21 prikazane su emisijske krivulje titracije spoja **6b** s metalnim solima.

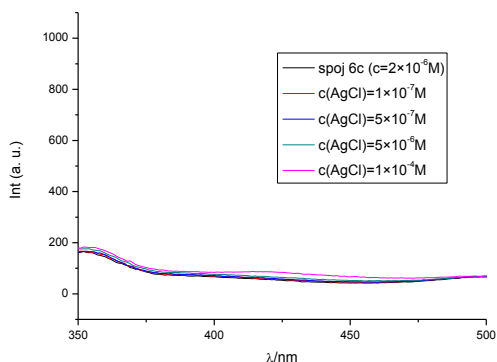


Slika 21. Emisijske krivulje ispitivanja spoja **6b** s metalnim solima a) AgCl; b) ZnCl₂

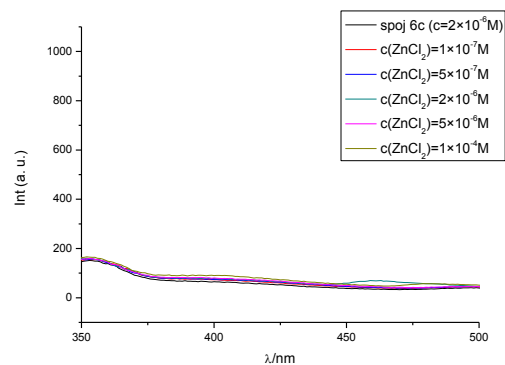
Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da spoj **6b** pokazuje slab afinitet prema vezanju metalnih kationa.

Na Slici 22 prikazane su emisijske krivulje titracije spoja **6c** s metalnim solima.

a)



b)

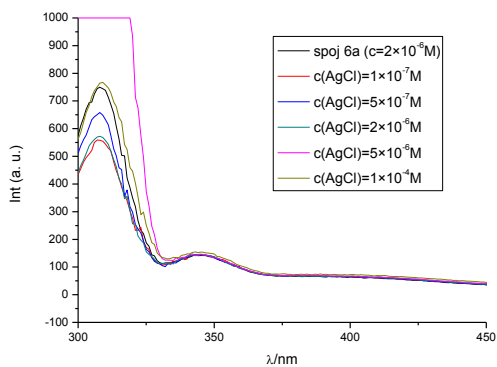


Slika 22. Emisijske krivulje ispitivanja spoja **6c** s metalnim solima a) AgCl ; b) ZnCl_2

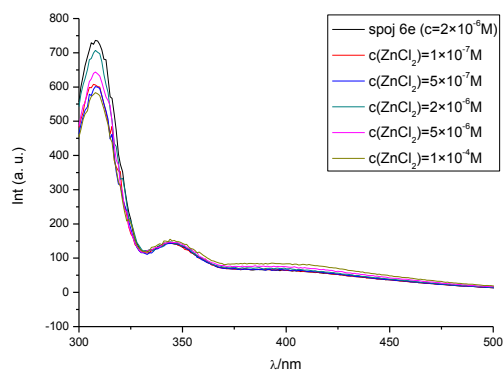
Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da spoj **6c** također pokazuje slab afinitet prema vezanju metalnih kationa.

Na Slici 23 prikazane su emisijske krivulje titracije spoja **6e** s metalnim solima.

a)



b)

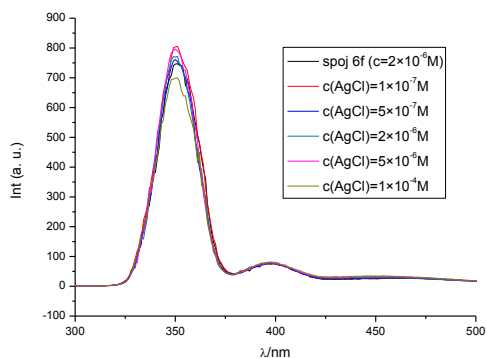


Slika 23. Emisijske krivulje ispitivanja spoja **6e** s metalnim solima a) AgCl ; b) ZnCl_2

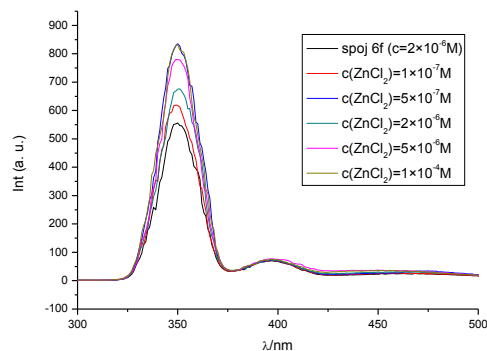
Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da spoj **6e** također pokazuje slab afinitet prema vezanju metalnih kationa.

Na Slici 24 prikazane su emisijske krivulje titracije spoja **6f** s metalnim solima.

a)



b)



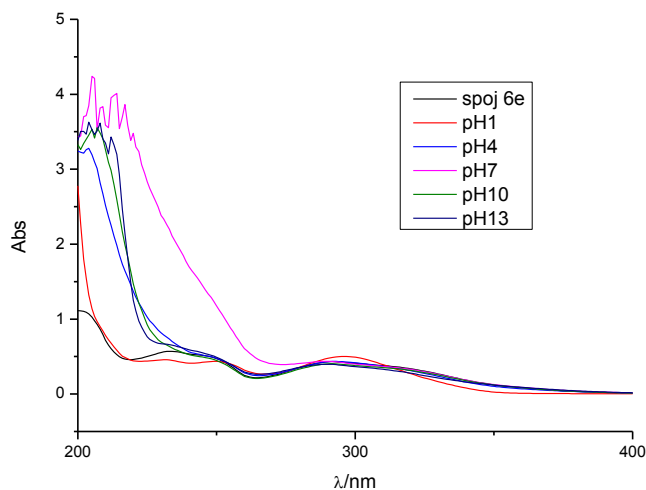
Slika 24. Emisijske krivulje ispitivanja spoja **6f** s metalnim solima a) AgCl ; b) ZnCl_2

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da spoj **6f** pokazuje dobar afinitet prema vezanju Zn^{2+} kationa dok je taj afinitet prema vezanju Ag^+ kationa slab.

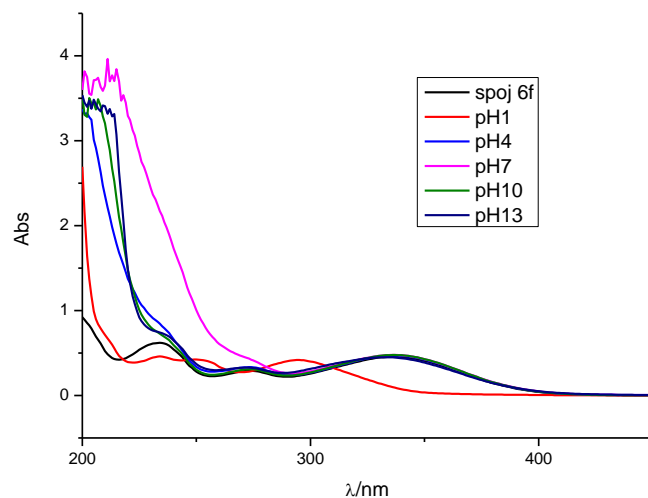
3.5. Utjecaj pH na spektroskopska svojstva spojeva **6e** i **6f**

Korištenjem UV/Vis spektroskopije ispitana je promjena spektroskopskih svojstava spojeva **6e** i **6f** ovisno o pH vrijednosti otopine kako bi se ispitala mogućnost primjene istih kao optičkih pH senzora. Snimljeni su apsorpcijski spektri spojeva u otopinama univerzalnog pufera i metanola različitih vrijednosti pH što nam prikazuje Slika 25.²⁸

a)



b)



Slika 25. Apsorpcijski spektar spoja a) **6e** i b) **6f** u otopinama univerzalnog pufera različitih vrijednosti pH

Iz dobivenih rezultata može se uočiti slaba promjena spektroskopskih svojstava ispitivanih spojeva kod različitih vrijednosti pH. Iz apsorpcijskih spektara spojeva **6e** i **6f** vidljivo je da promjenom pH vrijednosti pufera dolazi do promjene u intenzitetu apsorbancije i pomaka maksimuma apsorbancije u slučaju spoja **6f** kod pH 1.

4. EKSPERIMENTALNI DIO

4.1. Opće napomene

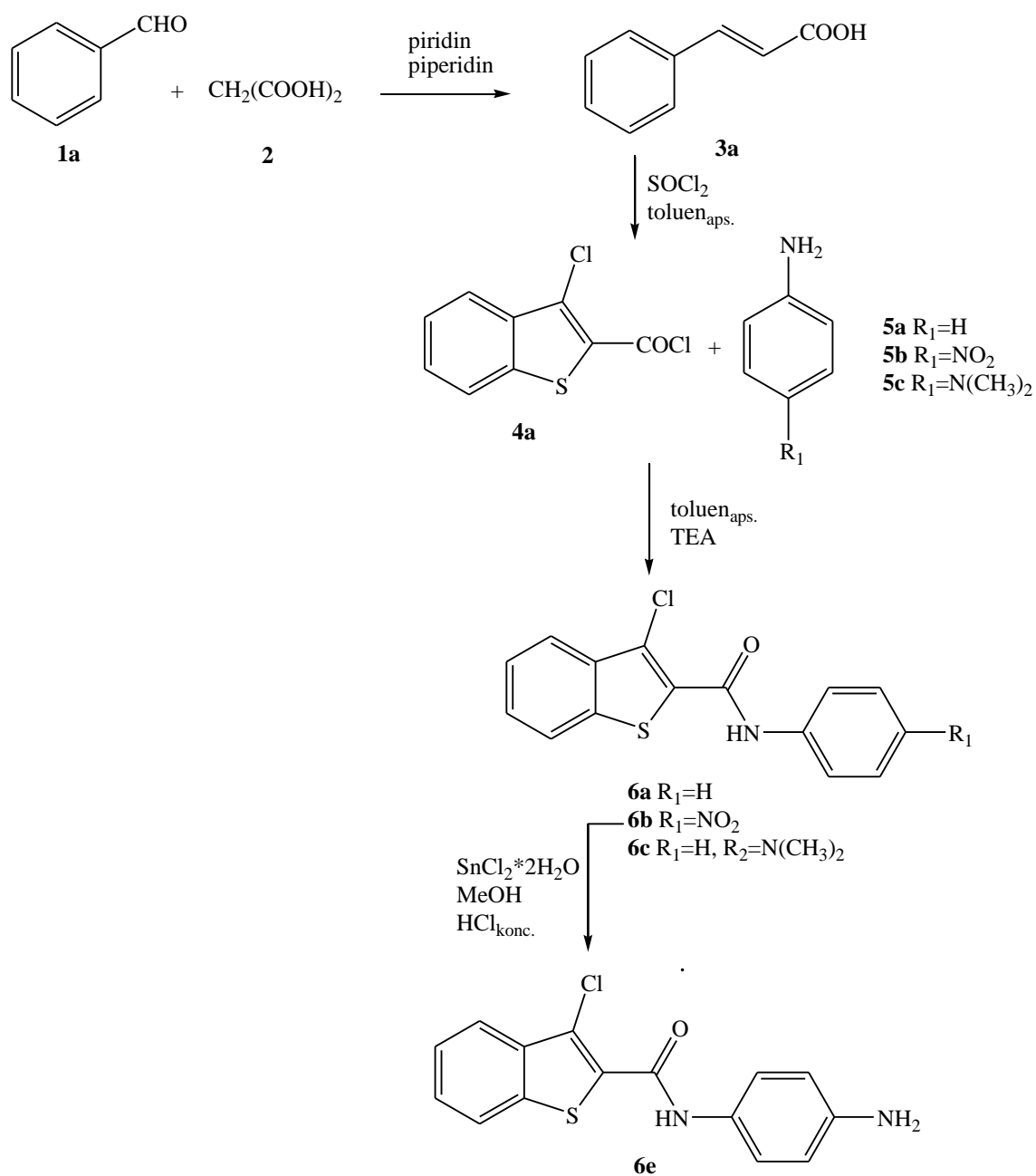
Kemijske reakcije provedene su uobičajenim sintetskim metodama.

Tališta priređenih spojeva određena su na SMP10 Bibby aparatu i nisu korigirana.

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

UV spektri snimljeni su na spektrofotometru Varian Cary 50 spektrofotometru a fluorescencijski spektri snimljeni su na Cary Eclipse spektrofotometru. U oba slučaja korištene su kvarcne kivete promjera 1 cm te volumena 3 cm^3 .

4.2. Priprava supstituiranih 3-klor-benzo[*b*]tiofen-2-karboksamida



Shema 23.

4.2.1. Priprava cimetine kiseline 3

Otopina benzaldehida **1** (2,5 ml, 0,0245 mol), malonske kiseline **2** (3,05 g, 0,0295 mol) i piperidina (2 ml) u piridinu (61 ml) zagrijava se na temperaturi vrenja 20 sati. Nakon što se reakcijska smjesa ohladi, izlije se na led te zakiseli koncentriranom HCl uz snažno miješanje. Nastali produkt se profiltrira, dobro ispere vodom i prekrizalizira iz 50%-tnoga etanola. Dobiveno je 11,08 g (77,4%) bijelog kristaliničnog produkta. T.t. 132-134°C. (T.t.lit. 230-232°C)¹⁸

4.2.2. Opći postupak za pripravu 3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karboksamida **6a**, **6b**, **6c** i **6e**

Otopini 3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karbonil klorida **4** u apsolutnom toluenu doda se odgovarajući anilin te trietilamin. Reakcijska smjesa zagrijava se na temperaturi vrenja. Hlađenjem dobiveni produkt se profiltrira, ispere razrijeđenom otopinom HCl te prekrizalizira iz odgovarajućeg otapala.

4.2.2.1. Priprava *N*-fenil-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karboksamida **6a**

0,25 g (1,825 mmol) **4** u apsolutnom toluenu (20 ml) i 0,10 ml (1,095 mmol) **5a** uz dodatak 0,215 ml (1,551 mmol) Et₃N zagrijava se na temperaturi vrenja 24 sata. Dobiveno je 0,192 g (34,22%) bijelog kristala. T.t. 169-173°C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 10,56 (s, 1H, CONH), 8,18-8,15 (m, 1H, H_{arom}), 7,96-7,93 (m, 1H, H_{arom}), 7,73 (d, 2H, *J*=7,68 Hz, H_{arom}), 7,65-7,61 (m, 2H, H_{arom}), 7,39 (t, 2H, *J*=7,62 Hz, H_{arom}), 7,16 (t, 1H, *J*=7,38 Hz, H_{arom}).

4.2.2.2. Priprava *N*-(4'-nitrofenil)-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karboksamida **6b**

0,50 g (2,165 mmol) **4** u apsolutnom toluenu (20 ml) i 0,299 g (2,165 mmol) **5b** uz dodatak 0,43 ml (3,102 mmol) Et₃N zagrijava se na temperaturi vrenja 24 sata. Dobiveno je 0,44 g (61,11%) žutog praškastog produkta. T.t. 227-230°C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 11,50 (d, 1H, *J*=0,33 Hz CONH), 9,25 (d, 1H, *J*=2,49 Hz, H_{arom}) 8,70 (dd, 1H, *J*₁=9,23 Hz, *J*₂=2,75 Hz, H_{arom}), 8,35 (d, 1H, *J*=9,21 Hz, H_{arom}), 8,17 (d, 1H, *J*=8,79 Hz, H_{arom}), 7,97 (dd, 1H, *J*₁=6,23 Hz, *J*₂=3,02 Hz, H_{arom}), 7,66-7,63 (m, 2H, H_{arom}).

4.2.2.3. Priprava *N*-(4'-(*N*', *N*'-dimetilamino)fenil)-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karboksamida **6c**

0,50 g (2,165 mmol) **4** u apsolutnom toluenu (40 ml) i 0,294 g (2,165 mmol) **5c** uz dodatak 0,43 ml (3,102 mmol) Et₃N zagrijava se na temperaturi vrenja 24 sata. Dobiveno je 0,310 g (43,3%) zlatno smeđeg kristaliničnog produkta. T.t. 200-204°C.

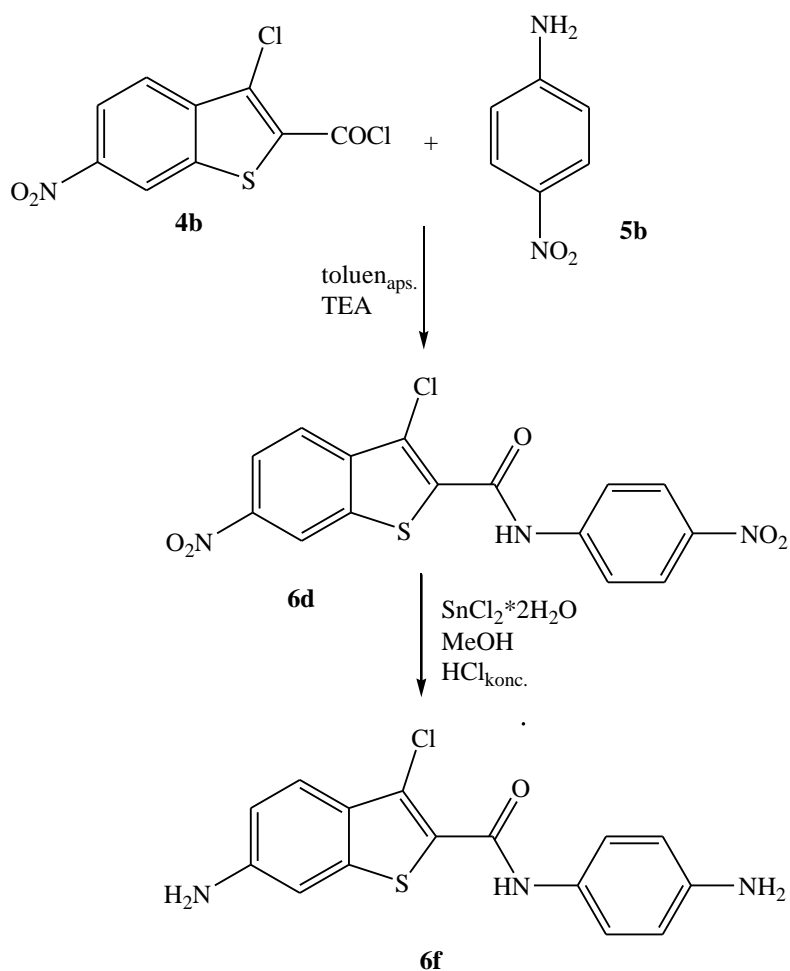
¹H NMR (DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 10,19 (s, 1H, CONH), 8,15-8,11 (m, 1H, H_{arom}), 7,96-7,91 (m, 1H, H_{arom}), 7,64-7,58 (m, 2H, H_{arom}), 7,54 (d, 2H, *J*=8,9 Hz, H_{arom}), 6,74 (d, 2H, *J*=8,9 Hz, H_{arom}), 2,89 (s, 6H, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 158,6, 148,2, 137,0, 136,3, 133,3, 128,3, 127,8, 126,5, 123,9, 122,9, 122,1, 119,4, 112,9, 40,8.

4.2.3. Priprava *N*-(4'-aminofenil)-3-klor benzo[*b*]tiofen-2-karboksamida **6e**

0,20 g (0,00061 mol) **6b**, 1,376 g (0,0061 mol) SnCl₂·2H₂O uz dodatak koncentrirane HCl (3,5 ml) i metanola (3,5 ml) zagrijava se na temperaturi vrenja 2,5 sata. Dobiveno je 0,170 g (91,89%) žutog produkta. T.t. 178-180°C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 10,10 (s, 1H, CONH), 8,15-8,12 (m, 1H, H_{arom}), 7,94-7,91 (m, 1H, H_{arom}), 7,62-7,59 (m, 2H, H_{arom}), 7,36 (d, 2H, *J*=8,7 Hz, H_{arom}), 6,57 (d, 2H, *J*=8,7 Hz, H_{arom}), 5,05 (s, 2H, NH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 158,5, 146,4, 137,0, 136,3, 127,8, 127,7, 126,6, 124,0, 122,9, 122,3, 119,2, 114,2.

4.3. Priprava disupstituiranih 3-klor-benzo[*b*]tiofen-2-karboksamida 9 i 10



Shema 24.

4.3.1. Priprava 6-nitro-*N*-(4'-nitrofenil)-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karboksamida 6d

Reakcijska smjesa 6-nitro-3-klor-benzo[*b*]tiofen-2-karbonil klorida **8** (0,50 g, 1,812 mmol), toluena (60 ml), *p*-nitroanilina **5b** (0,250 g, 1,812 mmol) i TEA (0,257 g, 2,537 mmol) zagrijava se na temperaturi vrenja 24 sata. Nakon što se reakcijska smjesa ohladi, nastali talog se profiltrira i ispere razrijeđenom otopinom HCl te prekrystalizira iz smjese metanola, acetona i par kapi dimetilformamida. Dobiveno je 0,227 g (33,19%) žutog kristala.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 11,34 (s, 1H, CONH), 9,31 (d, 1H, *J*=1,98 Hz, H_{arom}), 8,40 (dd, 1H, *J*₁=8,94 Hz, *J*₂=2,1 Hz, H_{arom}), 8,31 (d, 2H, *J*=9,21 Hz, H_{arom}), 8,17 (d, 1H, *J*=8,97 Hz, H_{arom}), 7,99 (d, 2H, *J*=9,21 Hz, H_{arom}).

4.3.2. Priprava 6-amino-*N*-(4'-aminofenil)-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karboksamida **6f**

Reakcijska smjesa AK-5 (0,200 g, 0,53 mmol), SnCl₂*2H₂O (1,196 g, 5,3 mmol), koncentrirane HCl (4 ml) i metanola (4 ml) zagrijava se na temperaturi vrenja 4 sata. Nakon završetka reakcije, smjesa se upari, zaostli talog se ispere vodom te se dodaje NaOH do pH=14. Smjesa se profiltrira i produkt se ispere vodom. Dobiveno je 0,155 g (92,26%) žuto smeđeg kristala.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 9,68 (s, 1H, CONH), 7,54 (d, 1H, *J*=8,7 Hz, H_{arom}), 7,33 (d, 2H, *J*=8,43 Hz, H_{arom}), 7,01 (d, 1H, *J*=0,9 Hz, H_{arom}), 6,85 (dd, 1H, *J*₁=1,29 Hz, *J*₂=1,35 Hz, H_{arom}), 6,55 (d, 1H, *J*=8,58 Hz, H_{arom}), 5,77 (s, 2H, NH₂), 4,98 (s, 2H, NH₂) ¹³C (DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 158,5, 149,3, 145,5, 139,0, 127,4, 126,1, 125,6, 123,1, 122,0, 119,1, 115,3, 113,7, 104,1, 39,7

5. ZAKLJUČAK

- U ovom radu priređeni su sljedeći spojevi: *N*-fenil-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karboksamid **6a**, *N*-(4'-nitrofenil)-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karboksamid **6b**, *N*-(4'-(*N,N'*-dimetilamino)fenil)-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karboksamid **6c**, *N*-(4'-aminofenil)-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karboksamid **6e**, 6-nitro-*N*-(4'-nitrofenil)-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karboksamida **6d** i 6-amino-*N*-(4'-aminofenil)-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karboksamida **6f**.
- Spojevi **6a-6d** priređeni su reakcijom kondenzacije odgovarajućih anilina **5a-5c** i 3-klor-benzo[*b*]tiofen-2-karbonil-klorida **4a** i **4b** u apsolutnom toluenu uz dodatak trietilamina.
- Spojevi **6e** i **6f** priređeni su redukcijom NO₂ skupine spojeva **6b** i **6d** u NH₂ skupinu.
- Strukture svih priređenih spojeva potvrđene su korištenjem ¹H i ¹³C NMR spektroskopije.
- Spektroskopska UV/Vis i fluorimetrijska karakterizacija provedena je za sve priređene spojeve u metanolu.
- Moguća primjena spojeva **6a**, **6b**, **6c**, **6e** i **6f** kao senzora za detekciju metalnih kationa u otopinama ispitana je UV/Vis i fluorimetrijskim titracijama vodenih otopina spojeva s vodenim otopinama metalnih soli AgCl i ZnCl₂.
- Iz rezultata UV/Vis spektroskopskih titracija spojeva može se zaključiti da spoj **6c** pokazuje najveći afinitet za vezanje metalnih kationa.
- Iz rezultata fluorimetrijskih titracija spojeva može se zaključiti da spoj **6f** pokazuje najizraženiji afinitet prema Zn²⁺ kationima.
- Kako bi se ispitala mogućnost primjene spojeva **6e** i **6f** kao optičkih pH senzora, ispitana je promjena njihovih spektroskopskih svojstava ovisno o vrijednosti pH otopine korištenjem UV/Vis spektroskopije.
- Iz dobivenih rezultata pH titracija može se zaključiti da se spektroskopska svojstva ispitivanih spojeva mijenjaju samo kod pH 1.

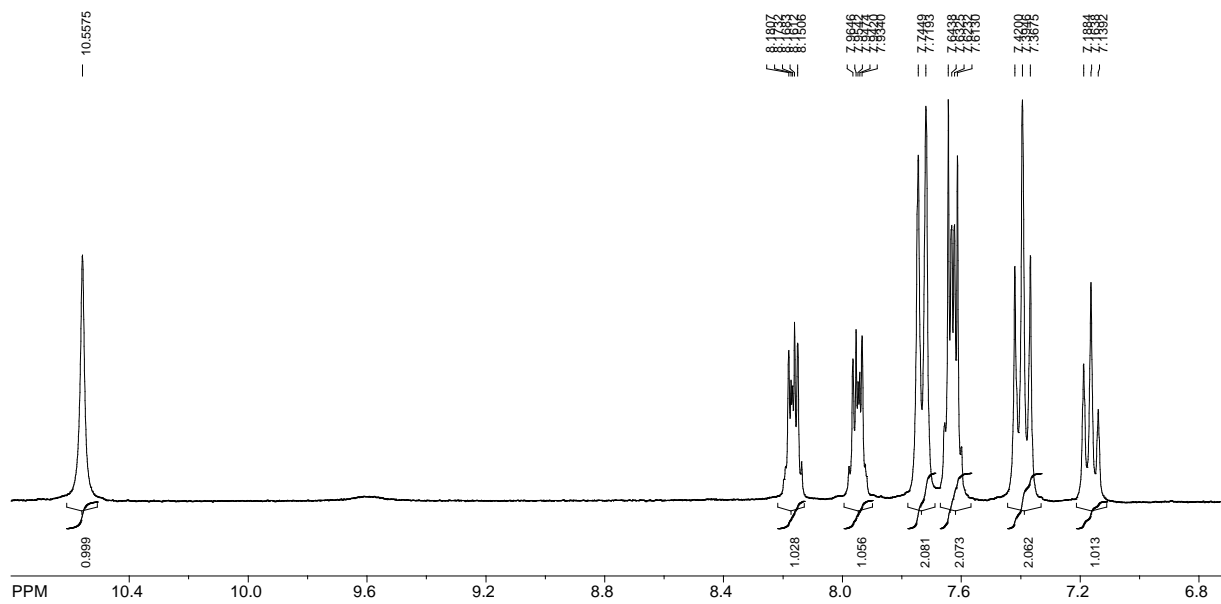
6. LITERATURA

- 1 S. H. Pine, *Organska kemija*, Školska knjiga, 1987., Zagreb, 283.
- 2 C. R. Noller, *Kemija organskih spojeva*, Tehnička knjiga, 1968., Zagreb, 244-245.
- 3 https://prezi.com/hcgm6el_enyk/amidi/
- 4 T. W. G. Solomons, C. Fryhle, S. Snyder, *Organic Chemistry*, 11th Ed., Wiley, New York, 2014.
- 5 M. J. O'Neil, *The Merck index: An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*, 15th Ed, 2013.
- 6 J.A. Joule, K. Mills, *Heterocyclic Chemistry*, Wiley-VCH, 5th Ed, 2010.
- 7 Lj. Kuterovac, *Hrvatski glasnik intelektualnog vlasništva*, Zagreb, 31. 01. 2013.
- 8 D. S. Boschelli, D. T. Connor, J. B. Kramer, P. C. Unangst, *US patent*, US5350748, 1994.
- 9 I. Jarak, M. Kralj, L. Šuman, G. Pavlović, J. Dogan, I. Piantanida, M. Žinić, K. Pavelić, G. Karminski-Zamola, *J. Med. Chem.* **48** (2005) 2346-2360.
- 10 K. M. Thakar, D. K. Paghdar, P. T. Chovatia, H. S. Joshi, *J. Med. Chem. Soc.* **70** (2005) 807-815.
- 11 M. Aleksić, B. Bertoša, R. Nhili, L. Uzelac, I. Jarak, S. Depauw, M.-H. D.-Cordonnier, M. Kralj, S. Tomić, G. Karminski-Zamola, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 5044-5060.
- 12 H. K. Nagesh, B. Padmashali, C. Sandeep, T.C.M. Yuvaraj, M.B. Siddesh, S.M. Mallikarjuna, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Re.s* **28(2)** (2014) 6-10.
- 13 M.C. Bagley, J.E. Dwyer, M.D. Beltron Molina, A.W. Rand, H.L.Rand, N.C.O. Tomkinson, *Org. Biomol. Chem.* **13** (2015) 6814.
- 14 J. D. J. Ingle, S. R. Crouch, *Spectrochemical Analysis*, Prentice Hall, New Jersey (1988).
- 15 https://www.academia.edu/7286315/Seminarski_rad_Spektroskopija?auto=download
- 16 *Tehnički leksikon*, Leksikografski zavod Miroslav Krleža, glavni urednik Zvonimir Jakobović, 2007.
- 17 Skoog, et al. *Principles of Instrumental Analysis*, 6th ed, Thomson Brooks/Cole. 2007, 169-173.
- 18 A. R. Battersby et al., *J. Chem. Soc.* (1964) 1595-1609.
- 19 M. Aleksić, *Sinteza, fotokemijska sinteza, qsar analiza i antitumorsko djelovanje novih derivata benzotieno- i tienotieno-kinolona*, Doktorski rad, 2013, Zagreb.
- 20 J. Dogan Koružnjak, M. Grdiša, N. Slade, B. Zamola, K. Pavelić, G. Karminski-Zamola, *J. Med. Chem.* **46** (2003) 4516-4524.

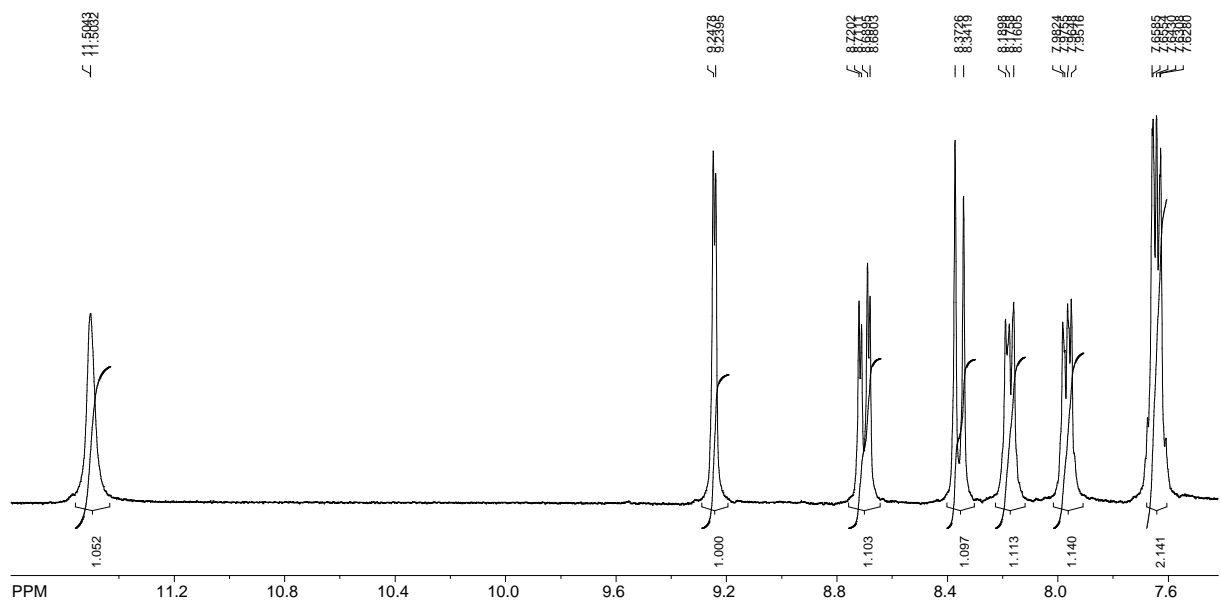
21. M. Aleksić, B. Bertoša, R. Nhill, Sabine Depauw, I. Martin-Kleiner, M. David-Cordonnier, S. Tomić, M. Kralj, *Eur. J. Med. Chem.* **71** (2014) 267–281.
22. K. Starčević, I. Čaleta, D. Cinčić, B. Kaitner, M. Kralj, K. Ester, G. Karminski-Zamola, *Heterocycles* **68** (11) (2006) 2285.
23. N. Perin, Doktorska disertacija *Sinteza i biološka aktivnost novih amino supstituiranih benzimidazo[1,2-a]kinolina*, Zagreb, 2014.
24. N. Perin, L. Uzelac, I. Piantanida, G. Karminski-Zamola, M. Kralj, M. Hranjec; *Bioorg. Med. Chem.* **19** (2011) 6329-6339.
25. N. Perin, M. Hranjec, G. Pavlović i G. Karminski-Zamola, *Dyes and Pigments* **91** (2011) 79-88.
26. M. Hranjec, E. Horak, M. Tireli, G. Pavlović i G. Karminski-Zamola, *Dyes and Pigments* **95** (2012) 644-656.
27. a) B. Valeur In: *Topics in fluorescence spectroscopy, probe design and chemical sensing*. Volume 4, New York: Plenum Press; (1994) p.21; b) B. Wang i E. Anslyn, *Chemosensors: Principles, Strategies and Applications*, Wiley, 2011.
28. I. Boček, P. Roškarić, Rad za Rektorovu nagradu *Sinteza, spektroskopska karakterizacija i antioksidativna aktivnost novih hidroksi supstituiranih heteroaromatskih derivata kao potencijalnih senzora za detekciju pH i/ili metalnih kationa u otopinama*, Zagreb, 2016.

7. PRILOZI

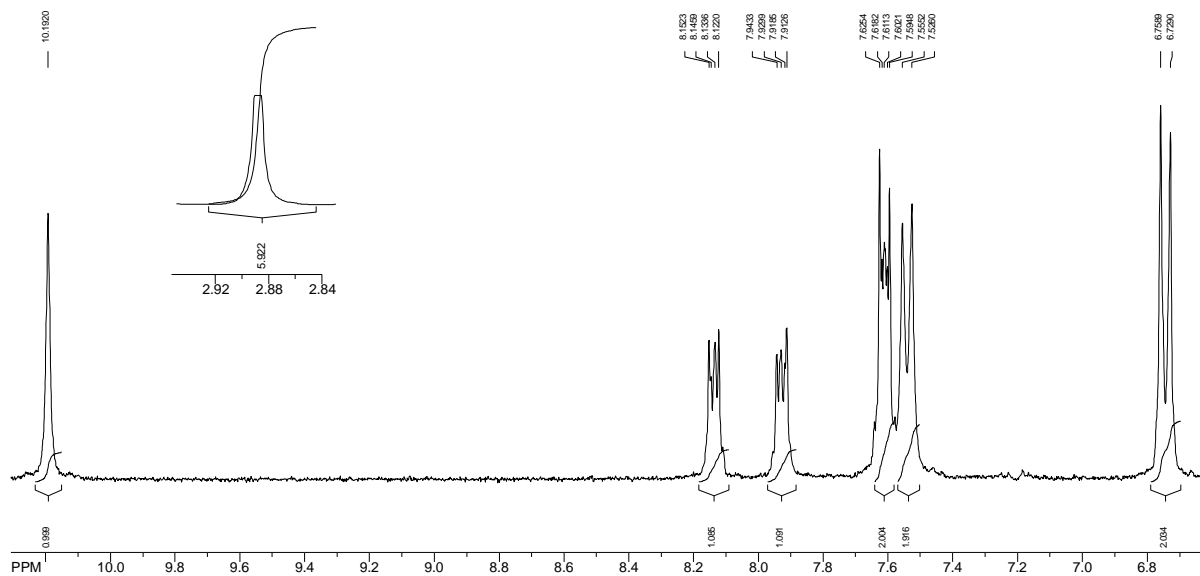
Prilog 1. ^1H NMR spektar *N*-fenil-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karboksamida **6a**



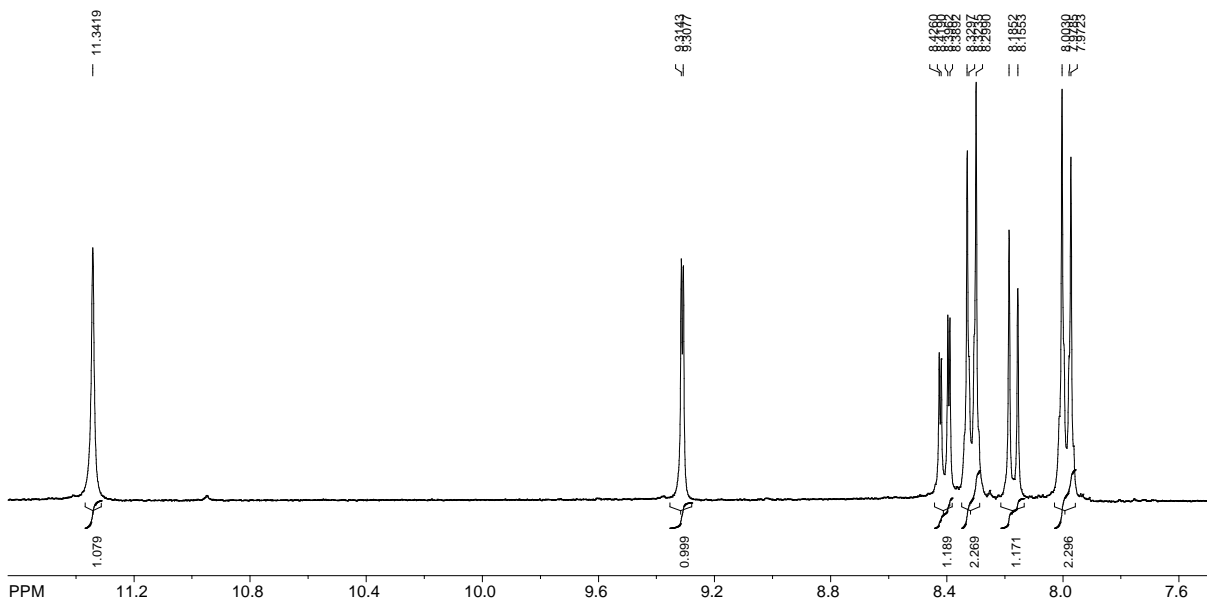
Prilog 2. ^1H NMR spektar *N*-(4'-nitrofenil)-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karboksamida **6b**



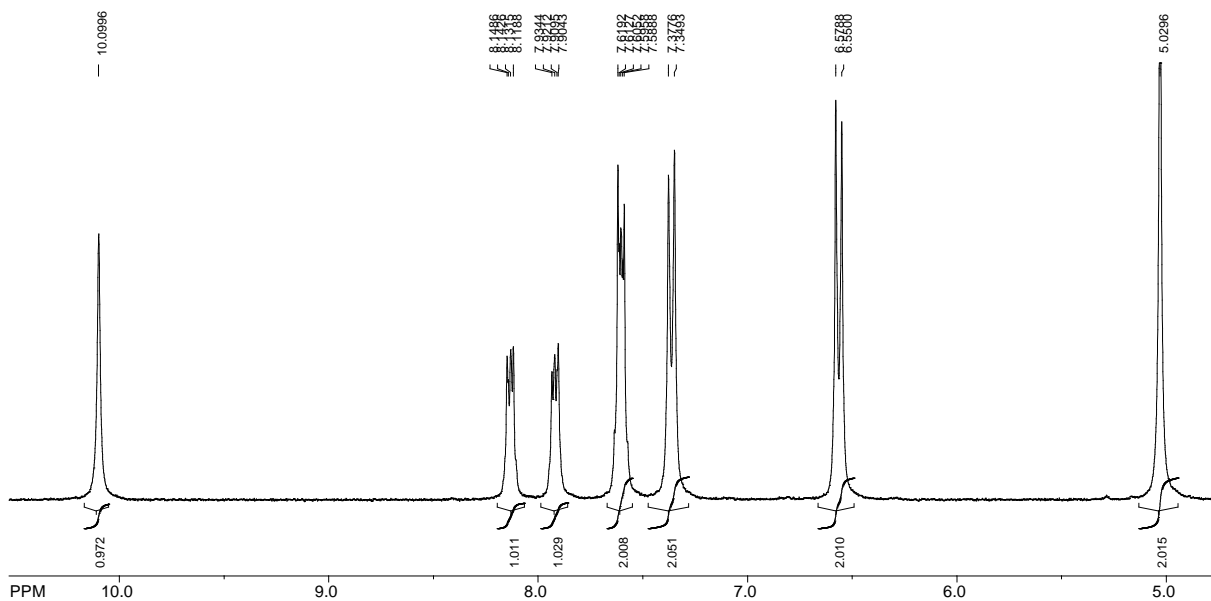
Prilog 3. ^1H NMR spektar *N*-(4'-(*N*', *N*'-dimetilamino)fenil)-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karboksamida **6c**



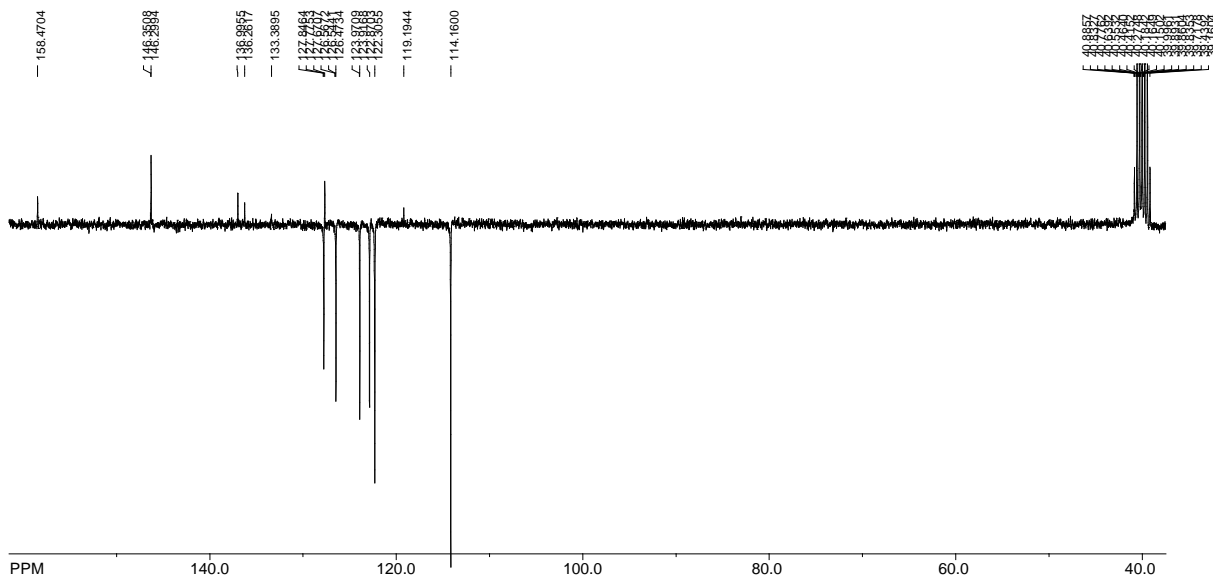
Prilog 4. ^1H NMR spektar 6-nitro-*N*-(4'-nitrofenil)-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karboksamida **6d**



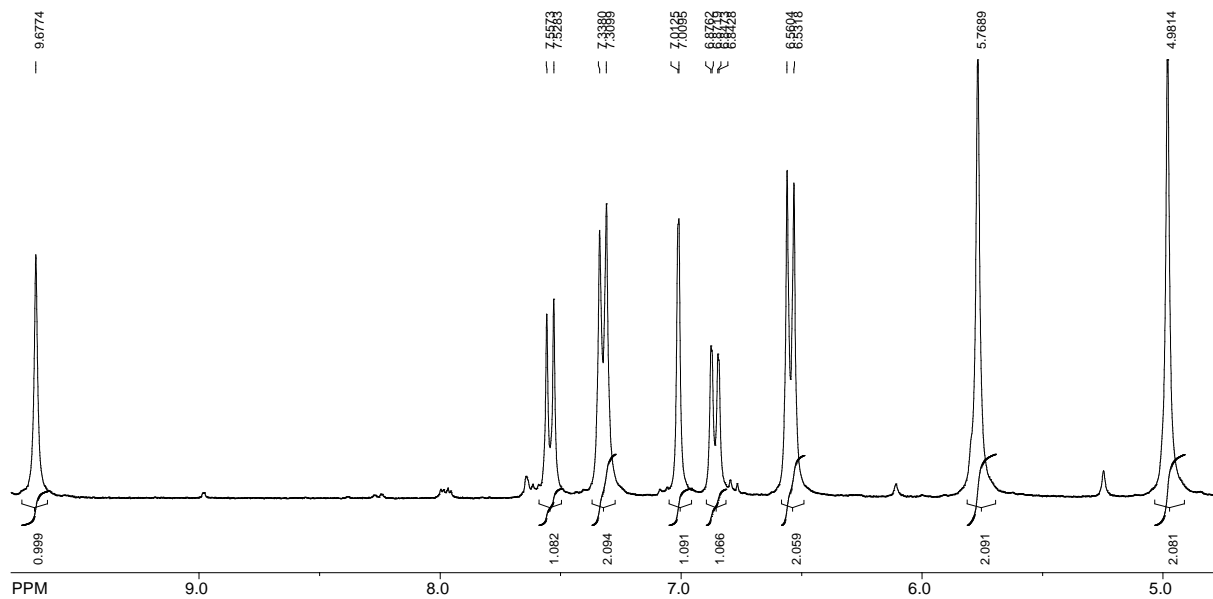
Prilog 5. ^1H NMR spektar *N*-(4'-aminofenil)-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karboksamida **6e**



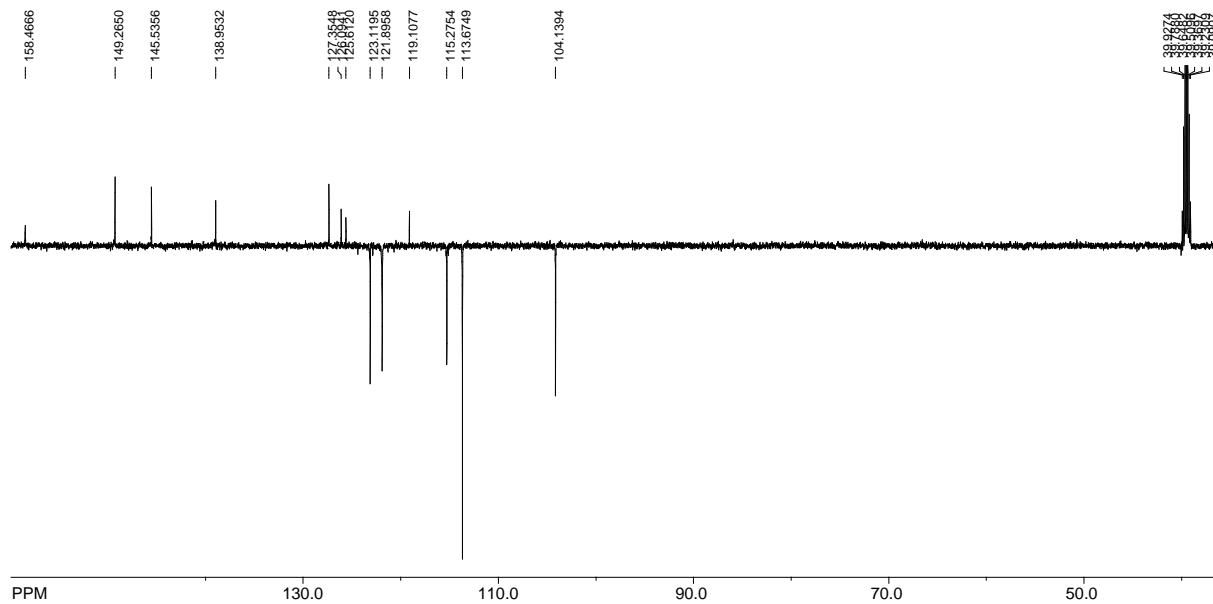
Prilog 6. ^{13}C NMR spektar *N*-(4'-aminofenil)-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karboksamida **6e**



Prilog 7. ^1H NMR spektar 6-amino-N-(4'-aminofenil)-3-klorbenzo[b]tiofen-2-karboksamida
6f



Prilog 8. ^{13}C NMR spektar 6-amino-N-(4'-aminofenil)-3-klorbenzo[b]tiofen-2-karboksamida
6f



8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 16.01.1995. godine u Našicama. Osnovnu školu pohađala sam od 2001.-2009. godine u OŠ Vladimira Nazora u Feričancima, nakon čega sam upisala Opću gimnaziju u Našicama. Maturirala sam 2013. godine. Nakon završene srednje škole upisala sam Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Kemijsko inženjerstvo. Stručnu praksu odradila sam na Hrvatskom vojnom učilištu „Franjo Tuđman“.