

Sinteza, spektroskopska karakterizacija i antioksidativna aktivnost novih metoksi- i hidroksi-supstituiranih heteroaromatskih derivata

Roškarić, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:311203>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Petra Roškarić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Petra Roškarić

**Sinteza, spektroskopska karakterizacija i antioksidativna
aktivnost novih metoksi- i hidroksi-supstituiranih
heteroaromatskih derivata**

DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

Izv. prof. dr. sc. Marijana Hranjec, FKIT

Dr. sc. Maja Cindrić, poslijedoktorandica, FKIT

Izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger, FKIT

Zagreb, rujan 2017.

Zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Marijani Hranjec na predloženoj temi, uloženom vremenu, strpljenju, razumijevanju, stručnom vodstvu i pomoći pruženoj tijekom izrade i pisanja diplomskog rada. Od srca se zahvaljujem na protekle tri godine i svemu što sam uz Vas naučila i postigla.

Također se zahvaljujem poslijedoktorandicama dr. sc. Ireni Sović i dr. sc. Nataši Perin na ukazanom strpljenju, savjetima i stručnom vodstvu tijekom izrade eksperimentalnog dijela.

Veliko hvala dr.sc. Kristini Starčević, sa Veterinarskog fakulteta, Zavoda za stočarstvo, na pomoći pri određivanju antioksidativne aktivnosti i korisnim savjetima.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji, dečku i prijateljici na bezuvjetnoj potpori tijekom čitavog školovanja.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Marijane Hranjec i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Irene Sović i dr. sc. Nataše Perin u sklopu projekata Hrvatske nacionalne zaklade br. 5596 (*Synthesis and cytostatic evaluations of novel nitrogen heterocycles library*) i 3386 (*Design and Synthesis of Novel Nitrogen-Containing Heterocyclic Fluorophores and Fluorescent Nanomaterials for pH and Metal- Ion Sensing*).



SAŽETAK

Sinteza, spektroskopska karakterizacija i antioksidativna aktivnost novih metoksi- i hidroksi-supstituiranih heteroaromatskih derivata

U okviru ovog rada provedena je sinteza, spektroskopska karakterizacija i antioksidativna aktivnost novih metoksi- i hidroksi- derivata amino supstituiranih benzamida, benzamidnih derivata benzimidazola, 2-benzimidazola te hidrokloridnih soli benzamida, 2-benzimidazolil i 2-benzotiazolil supstituiranih benzamida. Novi spojevi priređeni su klasičnim reakcijama organske sinteze. Kondenzacijom odgovarajućih supstituiranih benzoil-klorida **2**, **14**, **15** i **41** s odgovarajućim aminom **3**, **4**, **16** ili 2-amino-5(6)-nitrobenzimidazolom **42** priređeni su metoksi supstituirani benzamidi **5**, **6**, **17**, **18** i **43**. Amino supstituirani derivati **7**, **8**, **19**, **20** i **44** priređeni su reakcijom redukcije sa $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$. Hidroksi supstituirani derivati benzamida **21** i **22** priređeni su uklanjanjem zaštitnih metoksi skupina korištenjem reagensa BBr_3 . Hidroksi derivat nitro supstituiranog benzimidazola **30** priređen je reakcijom kondenzacije benzojeve-kiseline **27** s 4-nitro-1,2-fenilendiaminom **29**, dok su metoksi derivati cijano supstituiranog benzimidazola **36-38** priređeni reakcijom kondenzacije odgovarajućeg aromatskog aldehida **32-34** s *p*-cijano-1,2-fenilendiaminom **35**, a uklanjanjem zaštitne metoksi skupine korištenjem reagensa BBr_3 priređeni su hidroksi derivati cijano supstituiranog benzimidazola **39** i **40**. Hidrokloridne soli priređene su reakcijom protoniranja amino supstituiranih derivata benzamida **9**, **10**, **23**, **24**, **25**, **26**, **52**, **53**, **54** i **55**, 2-benzimidazolil supstituiranih benzamida **47**, **64**, **65** i **66** i 2-benzotiazolil supstituiranih benzamida **61**, **62** i **63**.

Priređenim derivatima **5**, **6**, **7**, **8**, **17**, **18**, **19**, **20**, **21** i **22** dodatno su ispitane spektroskopske karakteristike korištenjem UV/Vis spektroskopije. Kako bi se ispitala mogućnost primjene spojeva **7**, **8**, **19**, **20**, **21** i **22** kao optičkih pH senzora, ispitana je i promjena njihovih spektroskopskih svojstava ovisno o vrijednosti pH otopine korištenjem UV/Vis spektroskopije. Ispitana je i antioksidativna aktivnost korištenjem DPPH i FRAP metode. Spojevi **22**, **26**, **62** i **63** pokazali su značajnu antioksidativnu aktivnost.

Ključne riječi: benzamidi, benzimidazoli, benzotiazoli, UV/Vis spektroskopija, pH senzori, antioksidativna aktivnost

SUMMARY

Synthesis, spectroscopic characterization and antioxidative activity of novel methoxy- and hydroxy-substituted heteroaromatic derivatives

This work presents the synthesis, spectroscopic characterization and antioxidative activity of novel methoxy- and hydroxyl- derivatives of amino substituted benzamides, benzamide derivatives of benzimidazole, 2-benzimidazole derivatives and hydrochloride salts of benzamides, 2-benzimidazolyl and 2-benzothiazolyl substituted benzamides. Novel compounds were prepared by classical reactions of organic chemistry. Due to the condensation of substituted benzoyl-chlorides **2, 14, 15 and 41** with corresponding amine **3, 4, 16** or 2-amino-5(6)-nitrobenzimidazole **42** methoxy substituted benzamides **5, 6, 17, 18 and 43** were prepared. Amino substituted derivatives **7, 8, 19 and 20** were prepared by reduction of nitro analogues with $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$. By the removal of methoxy protecting groups with BBr_3 , hydroxy substituted benzamide derivatives **21 and 22** were synthesized. Hydroxy derivative of nitro substituted benzimidazole **30** was prepared in the cyclocondensation from benzoic acid **27** with 4-nitro-1,2-phenylenediamine **29** while methoxy derivatives of cyano substituted benzimidazole **36-38** were prepared in the cyclocondensation from aromatic aldehyde **32-34** with 4-cyano-1,2-phenylenediamine **35**. By the removal of methoxy protecting groups with BBr_3 , hydroxy derivatives cyano substituted benzimidazole **39 and 40** were synthesized. Hydrochloride salts were prepared by protonation reaction of amino substituted derivatives benzamides **9, 10, 23, 24, 25, 26, 52, 53, 54 and 55**, 2-benzimidazolyl substituted benzamides **47, 64, 65** and **66** and 2-benzothiazolyl substituted benzamides **61, 62 and 63**.

In addition, the spectroscopic properties of prepared compounds **5, 6, 7, 8, 17, 18, 19, 20, 21** and **22** were studied by UV/Vis and fluorescence spectroscopy. In order to determine the possibility of compounds **7, 8, 19, 20, 21** and **22** for analytical applications as pH sensors, the changes of their spectroscopic properties depending on the pH value were studied by UV/Vis spectroscopy. Also, the antioxidative activity of chosen compounds was determined by DPPH and FRAP method. Compounds **22, 26, 62** and **63** showed the most pronounced activity.

Key words: benzamides, benzimidazoles, benzothiazoles, UV/Vis spectroscopy, pH sensors, antioxidative activity

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
2. Opći dio	3
2.1. Reaktivne kisikove čestice i slobodni radikali.....	4
2.2. Oksidacijski stres	5
2.3. Antioksidacijska obrana od reaktivnih kisikovih čestica.....	5
2.3.1. Izvori i podrijetlo antioksidansa	7
2.3.2. Klasifikacija antioksidansa	8
2.3.3. Tipovi antioksidansa.....	9
2.3.4. Kemija antioksidanata	14
2.3.5. Oštećenja i bolesti nastale djelovanjem slobodnih radikala	15
2.4. Antioksidacijski hibridni pristup	15
2.4.1. Hibridi koji se temelje na 1,2-ditiolnoj jezgri	16
2.4.2. Hibridi koji se temelje na α,β -nezasićenim karbonilnim skupinama	20
2.5. Biološka aktivnost hidroksi supstituiranih benzamida	20
2.6. Biološka aktivnost benzimidazola i benzotiazola	24
3. Rezultati i rasprava	32
3.1. Cilj rada	32
3.2. Sinteza ciljanih spojeva	34
3.3. Spektroskopska karakterizacija UV/Vis spektroskopijom	50
3.3.1. Kvantitativni UV/Vis spektri.....	50
3.3.2. Utjecaj pH na spektroskopska svojstva spojeva 7, 8, 19, 20, 21 i 22.....	53
3.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti	55
3.4.1. DPPH metoda	55
3.4.2. FRAP metoda	57
4. Eksperimentalni dio	60
4.1. Opće napomene	61
4.2. Sinteza cijano supstituiranih derivata benzamida	62
4.2.1. Priprava <i>p</i> -cijano-benzoil-klorida 2.....	63
4.2.2. Opći postupak pripreme metoksi supstituiranih benzamida	63
4.2.3. Opći postupak pripreme metoksi i amino supstituiranih benzamida.....	63

4.2.4.	Opći postupak pripreve hidrokloridnih soli.....	64
4.3.	Sinteza metoksi supstituiranih benzamida	66
4.3.1.	Opći postupak pripreve metoksi supstituiranih benzoil-klorida.....	67
4.3.2.	Opći postupak pripreve metoksi supstituiranih benzamida	67
4.3.3.	Opći postupak pripreve metoksi supstituiranih amino benzamida	68
4.3.4.	Opći postupak pripreve hidroksi supstituiranih benzamida	69
4.3.5.	Opći postupak pripreve hidrokloridnih soli.....	69
4.4.	Sinteza hidroksi supstituiranih nitro derivata 2-benzimidazola.....	71
4.5.	Sinteza cijano supstituiranih hidroksi derivata 2-benzimidazola	72
4.5.1.	Opći postupak pripreve metoksi derivata cijano supstituiranih benzimidazola .	72
4.5.2.	Opći postupak pripreve hidroksi derivata cijano supstituiranih benzimidazola .	73
4.6.	Sinteza hidroksi supstituiranih derivata benzimidazola	74
4.7.	Sinteza hidrokloridnih soli benzamida	76
4.8.	Sinteza metoksi supstituiranih benzimidazola- i benzotiazola-hidroklorida	78
5.	Zaključak	81
6.	Literatura	84
7.	Životopis	87
8.	Prilozi	89

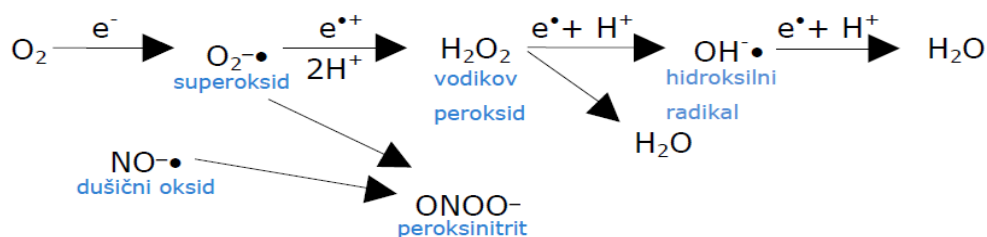
1. Uvod

Supstituirani benzimidazoli i njihovi kondenzirani ciklički derivati privlače značajnu pažnju organskih i medicinskih kemičara zahvaljujući jedinstvenim strukturnim karakteristikama i širokom rasponu biološke aktivnosti koje pokazuju. Osim činjenice da su derivati benzimidazola strukturni izosteri prirodnih nukleotida i imaju sposobnost interakcije s biomolekulama, benzimidazolska jezgra je sastavni dio brojnih biološki važnih prirodnih i sintetskih spojeva. Optimizacija supstituenata na benzimidazolskoj jezgri rezultirala je mnogim farmaceutski važnim spojevima s raznolikim biološkim aktivnostima kao što su antimikrobna, antiviralna, antitumorska, protuupalna, antioksidativna, antihipertenzivna, antifungalna, antidijabetska, i mnoge druge, čineći benzimidazolsku jezgru neizostavnom u razvoju novih terapijskih agensa. Kondenzirani ciklički derivati benzimidazola pokazuju zanimljive spektroskopske karakteristike kao što su maksimumi apsorpcije u vidljivom dijelu UV spektra i jako izraženi intenzitet fluorescencije, a zbog planarne strukture i posjedovanja visoko konjugiranog kromofora imaju mogućnost interkaliranja između parova baza u molekulama DNK i RNK, a potencijalnu primjenu nalaze i kao fluorescentne probe za detekciju i obilježavanje biomakromolekula u biomedicinskoj dijagnostici. Derivati benzimidazola, osim navedenih, potencijalnu primjenu nalaze i u drugim područjima kao organska bojila i fluorescentne boje u tekstilnoj industriji i polimerima, u optoelektronici, laserskoj tehnologiji te kao potencijalni kemosenzori.

2. Opći dio

2.1. Reaktivne kisikove čestice i slobodni radikali

Pojavom prvih modrozelenih algi na Zemlji prije 2×10^6 godina povećala se količina kisika u atmosferi što je životu na Zemlji dalo odgovarajuće prednosti i nedostatke. Jedna od prednosti bila je stvaranje i iskorištavanje veće količine energije za obavljanje životnih funkcija aerobnih organizama u odnosu na anaerobne organizme. Međutim, nedostatak je da je aerobni metabolizam povezan s toksičnim djelovanjem kisika oksidacijom osnovnih bioloških makromolekula. Naime, tijekom normalnog oksidativnog metabolizma u aerobnim organizmima, kao odgovor na vanjske podražaje, stvaraju se reaktivne kisikove čestice (ROS). To su male molekule ili ioni koji se formiraju nepotpunom redukcijom kisika i uključuju slobodne radikale kao što su superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilni radikal (OH^{\cdot}), peroksidni radikal (RO_2^{\cdot}) i alkoksilni radikal (RO^{\cdot}), kao i neradikalske čestice koje su oksidacijska sredstva i/ili lako prelaze u radikale poput vodikovog peroksida (H_2O_2), hipoklorne kiseline ($HOCl$), ozona (O_3) i singletnog kisika (1O_2). Ukoliko se nespareni elektron nalazi na atomu dušika, govori se o reaktivnim dušikovim česticama (RNS) poput dušičnog oksida (NO^{\cdot}) ili dušičnog dioksida (NO_2^{\cdot}). U reaktivne dušikove čestice ubrajaju se i reaktivne molekule koje nisu radikali poput dušične kiseline (HNO_3) i peroksinitrita ($ONOO^-$). Slobodni radikal je svaka kemijska vrsta (atom, ion ili molekula) sposobna za samostalan život koja u vanjskoj ljusci posjeduje jedan ili više nesparenih elektrona koji su odgovorni za nestabilnost i reaktivnost svih radikala što je rezultat njihova nastojanja da popune valentnu orbitalu i time postignu stabilnu elektronsku konfiguraciju. Prema naboju radikali mogu biti pozitivni, negativni ili neutralni, a mogu biti organske i neorganske prirode. Proces nastanka radikala u stanicama je neprekidan, „slučajan“, a jednom stvoreni slobodni radikal može izazvati niz lančanih reakcija reagirajući s drugim manje reaktivnim vrstama. Karakteristične reakcije slobodnih radikala su: davanje elektrona (s reducirajućeg radikala), primanje elektrona (na oksidirajući radikal), oduzimanje vodika, reakcija adicije, reakcija poništavanja, reakcija disproporcionalnosti (Slika 1.)¹



Slika 1. Put redukcije kisika i nastanak slobodnih radikala

ROS nastaju pod utjecajem egzogenog izvora kao što je ultravioletno i ionizirajuće zračenje, ozon, stres, kemoterapeutici, alkohol, opijati, herbicidi, kemijski onečišćivači (sastojci smoga, duhanski dim), a može biti i masna hrana i sušeno meso ili se endogeno stvaraju u organizmu tijekom metaboličkih procesa, prvenstveno u procesima fosforilacije.² Slobodni radikali su u organizmu većinom prisutni u niskoj koncentraciji (10^{-5} - 10^{-9} mola). U višim koncentracijama pokazuju toksične učinke pri čemu dolazi do stanja oksidacijskog stresa i može doći do oksidacije nukleinskih kiselina, proteina ili lipida.^{3,4,5} Oštećenje bioloških makromolekula može dovesti do promjena u staničnoj strukturi i funkciji te inicirati degenerativne bolesti. Međutim, oni istovremeno pomažu u metabolizmu, oksidirajući ugljikohidrate, masti i bjelančevine, stvarajući toplinu i energiju. Zato se funkcija sustava antioksidansa ne sastoji u tome da se oksidans u potpunosti ukloni, nego da ga se drži na optimalnoj razini.⁶

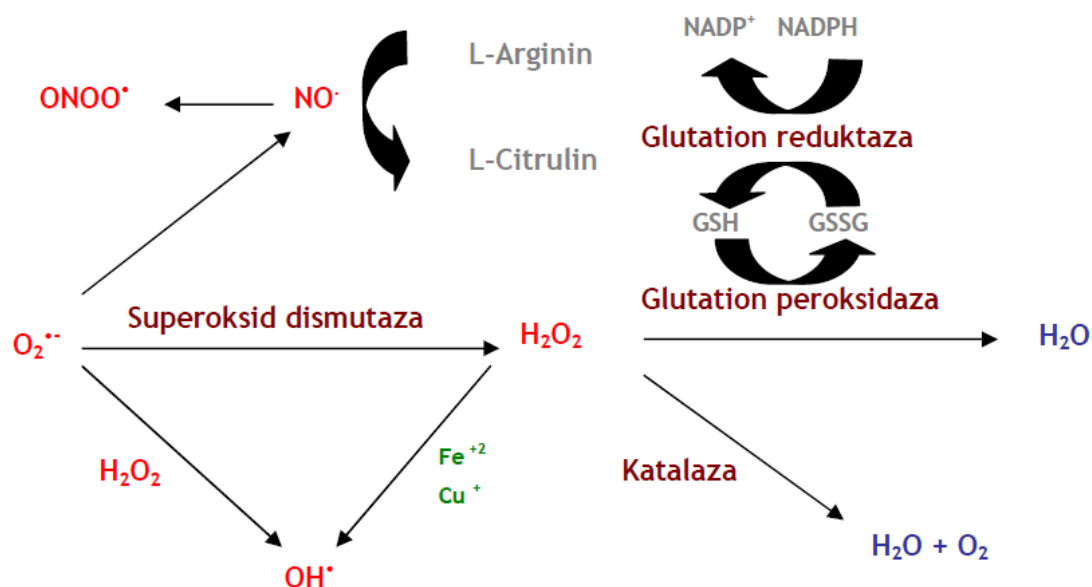
2.2. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres definira se kao pomak ravnoteže u staničnim oksidativno-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije koje može dovesti do oštećenja tkiva i organa. Riječ je o stanju prekomjernog stvaranja slobodnih radikala kisika ili smanjene antioksidacijske zaštite pri čemu dolazi do gubitka ravnoteže stvaranja slobodnih radikala i mogućnosti neke stanice da ih razgradi, a rezultira promjenama vezanim uz oštećenje stanice. Na molekularnoj razini oksidacijsko oštećenje može utjecati na strukturu i funkciju brojnih biomolekula poput ugljikohidrata, proteina i nukleinskih kiselina te započeti lančanu reakciju peroksidacije lipida što konačno rezultira promjenama u strukturi i funkciji stanici, tkiva i organa. Tako nastala oštećenja mogu narušiti homeostazu iona, prijenos signala u stanici, gensku transkripciju i dovesti do drugih poremećaja. Oksidacijski stres ima značajnu ulogu u etiopatogenezi kardiovaskularnih i infektivnih bolesti, karcinoma, dijabetesa, neurodegenerativnih bolesti, procesa starenja. Još uvijek nije poznato je li oksidacijski stres uzrok ili posljedica bolesti.⁷

2.3. Antioksidacijska obrana od reaktivnih kisikovih čestica

Antioksidans je molekula sposobna da uspori ili spriječi oksidaciju drugih molekula i štiti stanice od oštećenja uzrokovanog nestabilnim molekulama poznatih kao slobodni radikali. Antioksidansi reagiraju i stabiliziraju slobodne radikale na način da doniraju elektron slobodnim radikalima i oni više nemaju potrebu napadati stanicu te na taj način mogu spriječiti neka od oštećenja koje bi oni mogli uzrokovati i dovesti do nastajanja raka. Kao rezultat

antioksidansi su često reducirajući agensi, kao na primjer tioli, askorbinska kiselina ili polifenoli. Znanstvene spoznaje upućuju na to da antioksidansi utječu na smanjenje rizika od kroničnih bolesti, karcinoma i kardiovaskularnih poremećaja. Primjer antioksidansa uključuje beta-karoten, likopen, vitamine C, E, A i ostale supstance. Niska razina antioksidanta ili inhibicija enzima antioksidansa uzrokuje oksidacijski stres i može oštetiti ili ubiti stanice. Oksidacijski stres može biti važan čimbenik u nastajanju mnogih ljudskih bolesti pa je zbog toga upotreba antioksidansa u farmakologiji vrlo proučavana, osobito kao lijek protiv moždanog udara i neurodegenerativnih bolesti. Antioksidansi se široko koriste kao sastojak dodataka prehrani u nadi da će održati zdravlje i spriječiti bolesti poput raka i koronarne bolesti srca. Antioksidansi se svrstavaju u dvije velike skupine, ovisno o tome jesu li topljivi u vodi ili u mastima. Oni topljivi u vodi (askorbinska kiselina) reagiraju s oksidansima u citosolu stanica i krvne plazme, a oni topljivi u lipidima (vitamin E, karotenoidi, koenzim Q10) štite stanične membrane od peroksidacije lipida. Organizam sadrži složenu mrežu antioksidativnih metabolita i enzima koji zajednički sprječavaju oksidacijsko oštećenje staničnih komponenti, DNK, proteina i lipida. Stanična zaštita od reaktivnih oksidansa u aerobnom metabolizmu organizirana je u tri razine, i to kao prevencija, hvatanje slobodnih radikala i popravak štete. Antioksidacijski sustav enzima (Slika 2) vrlo je složen i sastoji se od primarnih enzimskih antioksidacijskih sustava kao što su superoksidna dismutaza (SOD, katalizira dismutaciju $O_2^{\bullet-}$), glutation-peroksidaza (GPx, odstranjuje H_2O_2 i sprječava stvaranje OH^{\bullet}) i katalaza (KAT, odstranjuje H_2O_2 razgradnjom u vodu i kisik) te sekundarnih enzimskih antioksidacijskih sustava (glutation-reduktaza, glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, glutation, glutaredoksin, peroksiredoksin i tioredoksin). U biološkim sustavima antioksidansi odstranjuju slobodne radikale, najčešće katalitičkim putem, kao čistači ili u obliku proteina koji umanjuju valjanost prooksidansa, primjerice iona metala ili dr. Antioksidansi mogu pomoći pri antioksidacijskoj regeneraciji. Primjerice koenzim Q10 regenerira vitamin E, lipoična kiselina regenerira vitamin E, vitamin C, koenzim Q10 i glutation čime se sprječava oštećenje lipidnog sloja staničnih membrana. Iako se većina antioksidansa stvara endogeno, neki se primjenjuju egzogeno kao dodaci hrani ili im je hrana izvor. Egzogeni antioksidansi su vitamin E, vitamin C, beta-karoten (prethodnik vitamina A), likopen iz rajčice te flavonoidi iz voća, vina ili čaja.⁸ Važnost interakcije između različitih antioksidansa je vrlo složeno pitanje jer različiti metaboliti i enzimski sustavi imaju sinergistično djelovanje i ovisni su jedni o drugima. Djelovanje jednog antioksidansa može ovisiti o pravilnoj funkciji ostalih članova sustava.⁹ Enzimi (SOD, CAT, GSHPx) ne mogu obavljati svoju funkciju bez prisustva antioksidansa koje unosimo putem hrane.



Slika 2. Sustav antioksidacijskih enzima¹

Osim upotrebe prirodnih antioksidansa u medicini, ovi spojevi imaju i velike industrijske namjene kao konzervansi u hrani i kozmetici, sprječavanju degradacije guma i benzina. Vrlo je bitno da ulja za podmazivanje ostanu stabilna i tekuća da ne bi došlo do isušivanja boje. Zbog toga ulja obično sadrže malu količinu antioksidansa kao npr. fenol ili derivate amina. Iako plastika često nastaje djelovanjem slobodnih radikala, isto tako se može slomiti istim postupkom pa zbog toga i plastika treba antioksidanse kao zaštitu poput fenola ili naftola. Niska gustoća polietilena također je zaštićena pomoću čađe koja apsorbira ultraljubičasto zračenje koje uzrokuje stvaranje radikala.¹⁰

2.3.1. Izvori i podrijetlo antioksidansa

Većina stanica u našem organizmu sposobna je tolerirati blagi oblik neravnoteže prooksidansa/antioksidansa ukoliko unosimo dovoljno antioksidacijskih nutrijenata iz hrane. Antioksidansi se u velikoj količini nalaze u voću i povrću, ali i u drugoj hrani uključujući orahe, žitarice, neko meso, perad i ribu. Beta-karoten nađen je u većini hrane narančaste boje poput batata, mrkve, dinje, marelica, bundeva i manga. Također i zeleno lisnato povrće bogato je beta-karotenom uključujući špinat, kelj i raštiku.¹¹ Lutein, najpoznatiji za zdrave oči, obilno je prisutan u zelenom lisnatom povrću kao što je špinat, kelj i raštika. Likopen je snažan antioksidant pronađen u rajčicama, lubenicima, papaji, marelicima, crvenom grejpu, crvenim narančama i ostalom voću. Selen je mineral, neantioksidativni nutrijent, međutim, sastavni je

dio antioksidacijskih enzima. Riža i pšenica su glavni prehrambeni izvor selena u većini zemalja. Količina selena u tlu razlikuje se od regije do regije što u konačnici određuje količinu selena u hrani uzgojene na tom tlu. Životinje koje jedu žitarice i biljke uzgajane na tlu bogatom selenom imaju veću količinu selena u svojim mišićima. U SAD-u su meso i kruh uobičajeni izvori selena. Brazilski oraščić također sadrži velike količine selena. Vitamin A nalazi se u tri glavna oblika: retinol (vitamin A1), 3,4-didehidroretinol (vitamin A2) i 3-hidroksiretinol (vitamin A3). Hrana bogata vitaminom A uključuje slatki krumpir, mrkvu, mlijeko, žumanjke, mozzarella sir. Vitamin C poznat kao askorbinska kiselina može se naći u velikoj količini u većini voća i povrća, također i u žitaricama, govedini, peradi i ribi. Vitamin E, poznat kao alfa-tokoferol, može se naći u bademima i u mnogim uljima pšeničnih klica kao što su suncokretovo, kukuruzno i sojino ulje, a osim toga i u mangu, orasima, brokuli i sličnim namirnicama.

2.3.2. Klasifikacija antioksidansa

Antioksidansi se dijele u dvije skupine:

- 1) *Primarni ili prirodni antioksidansi*
- 2) *Sekundarni ili sintetski antioksidansi*

PRIMARNI ILI PRIRODNI ANTIOKSIDANSI

To su antioksidansi koji kidaju lance u reakciji s lipidnim radikalima i pretvaraju ih u stabilnije produkte. U svojoj strukturi većinom sadrže fenolnu skupinu i obuhvaćaju sljedeće¹²:

- 1) Mineralni antioksidansi – kofaktori antioksidativnih enzima njihov izostanak će utjecati na metabolizam mnogih makromolekula poput ugljikohidrata. Primjer: selenij, bakar, željezo, cink i mangan.
- 2) Antioksidativni vitamini – potrebni za većinu metaboličkih funkcija. Primjer: vitamin C, vitamin E i vitamin B.
- 3) Fitokemikalije – to su većinom fenolni spojevi koji nisu ni vitamini ni minerali, a uključuju: flavonoide koji daju boju voću i povrću, žitaricama, lišću, cvijeću i kori drveta. Katehini su najaktivniji antioksidansi u zelenom i crnom čaju. Karotenoidi su pigmenti koji daju boju voću i povrću. Beta-karoten se u velikoj količini nalazi u mrkvi, pretvara se u vitamin A kada tijelo nema dovoljno vitamina.

Likopen, snažan antioksidans kojim je bogata crvena rajčica i zeaksantin koji se u velikoj količini nalazi u špinatu i u ostalom zelenom povrću, često se naziva „vitamin za oči“.

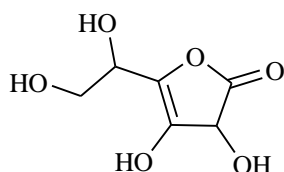
SEKUNDARNI ILI SINTETSKI ANTIOKSIDANSI

Fenolni spojevi koji obavljaju funkciju hvatanja slobodnih radikala i zaustavljaju lančane reakcije. Ti spojevi uključuju:

- 1) Butilirani hidroksi anizol (BHA)
- 2) Butilirani hidroksi toluen (BHT)
- 3) Propil-galat (PG) i metalni kelirajući agens (EDTA)
- 4) *Tert*-butilni hidrokinon (TBHQ)

2.3.3. Tipovi antioksidansa

ASKORBINSKA KISELINA

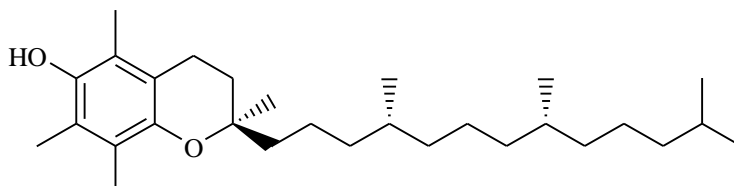


Slika 3. Struktura askorbinske kiseline

Vitamin C ili askorbinska kiselina, monosaharidni je antioksidans topiv u vodi pronađen u biljkama i životinjama. Ljudi ga, za razliku od životinja, ne mogu sami proizvesti, nego se mora unositi u organizam putem hrane i vitamina. Vitamin C je elektron-donor te može smanjiti aktivnost oksidansa koji reagiraju s tri kategorije biomolekula; mastima, proteinima i s DNK. Može reagirati i s tvarima koje nisu radikali, ali su vrlo reaktivne kao što je nitrozamin te ima mogućnost regenerirati druge antioksidanse kao npr. vitamin E. Važan izvor vitamina C je citrusno voće, zelena paprika, brokula, zeleno lisnato povrće, jagode, sirovi kupus i krumpir.¹³

VITAMIN E

Vitamin E (α -tokoferol) je naziv za skup od 8 u masti topivih tokoferola i tokotrienola sa značajnom sposobnošću zaštite staničnih membrana od oštećenja reaktivnim kisikovim česticama. Svojim antioksidacijskim svojstvima odgađa starenje i odumiranje stanica, a ima ulogu i u razvoju te održavanju funkcije živčanog i mišićnog sustava, štiti stanice od negativno g utjecaja zagađivača iz okoliša i UV zraka.



Slika 4. Struktura vitamina E

Prema dosadašnjim ispitivanjima, značaj vitamina E u malignim bolestima uočava se kroz preventivni utjecaj na karcinom dojke te smanjenje učestalosti karcinoma prostate i kardiovaskularnih oboljenja.

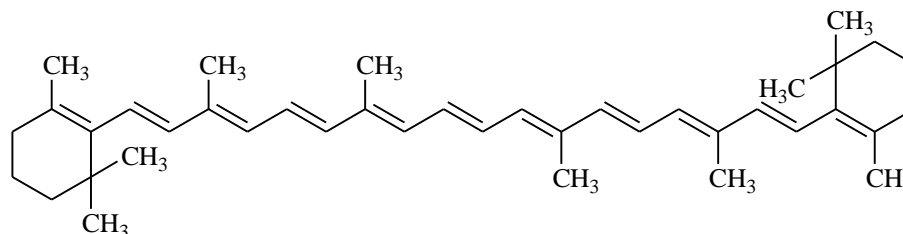
KAROTENOIDI

Beta-karoten, kriptoksantin, alfa-karoten, zeaksantin, lutein i likopen su prirodni pigmenti odgovorni za crvenu, narančastu, žutu i zelenu boju voća i povrća. Sintetiziraju ih svi fotosintetski organizmi, neke bakterije i gljivice. Razina karotenoida u tkivu sisavaca povezana je s njihovim potencijalnim životnim vijekom odnosno što je u tkivu više vrsta karotenoida, duži je prosječni životni vijek. Najvažniji karotenoidi su beta-karoteni, koji u organizmu sisavaca prelaze u vitamin A. Skladištenjem karotenoidi mogu izgubiti svoja aktivna svojstva zbog djelovanja enzima i izloženosti svjetlu i kisiku, međutim zamrzavanjem se održava stabilnost karotenoida. Kombinacija beta-karotena, vitamina C i vitamina E pokazala je poboljšanu funkciju pluća kod sportaša prekomjerno izloženih zagađenom zraku.¹⁴

BETA-KAROTEN

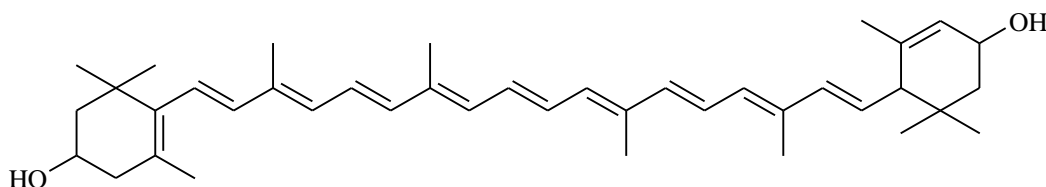
Beta-karoten je prirodni, u masti topiv crveni pigment, izoliran 1830 god. iz mrkve (*eng. carrot*) te je stoga nazvan "karoten". Njegova apsorpcija i učinkovitost ovise o njegovu obliku i unosu masti i ulja, a odvija se pasivnom difuzijom u tankom crijevu. Jedna se molekula beta-karotena pomoću crijevnih enzima cijepa u dvije molekule vitamina A koji djeluje kao

snažan antioksidans, podržavajući imunološki sustav. Također stimulira obrambene snage organizma te je potreban za stvaranje pigmenta melanina u koži. Beta-karoten pomaže stimulaciji proizvodnje sluzi u nosu, očima, plućima, grlu i crijevima te štiti od virusa djelovanjem na imunološki sustav tako što podržava funkciju bijelih krvnih stanica.



Slika 5. Struktura β -karotena

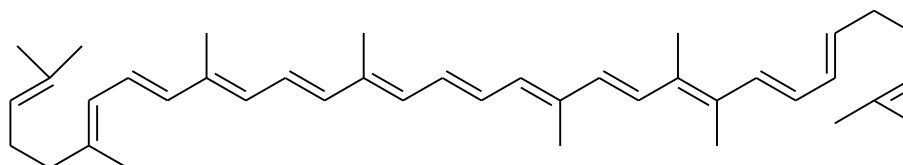
LUTEIN



Slika 6. Struktura luteina

Lutein je žućkasti pigment također topljiv u mastima, a otkriven je u žutanjku jajeta. Sačinjava veliki dio očnog pigmenta, a kao izraziti antioksidans ima snažno zaštitno djelovanje na makulu. Naime, lutein izgrađuje zaštitni pigmentni sloj koji filtrira plavi dio svjetlosnog spektra (upravo je plavi dio spektra odgovoran za oksidacijska oštećenja struktura oka) prikuplja svjetlosne pigmente i na taj način štiti od toksičnog djelovanja UV zračenja.

LIKOPEN



Slika 7. Struktura likopena

Likopen je pigment crvene boje, istaknuti član karotenoida, topljiv u mastima. U većoj ga koncentraciji ima u rajčici (bioraspodivnost likopena je u termički obrađenoj rajčici četiri puta veća nego u sirovjoj), lubenici, crvenoj paprici i u mikroorganizmima gdje prikuplja

svjetlosne pigmente i štiti od toksičnih efekata kisika i zraka. Likopen ima jedinstvenu sposobnost inaktivacije slobodnih radikala koji mogu oštetiti naše stanice, a kao glavni karotenoid u ljudskoj krvi, štiti lipide, proteine i DNK od oksidacije. Apsorbirani likopen akumulira se u jetri, nadbubrežnoj žlijezdi i testisima.

SELEN

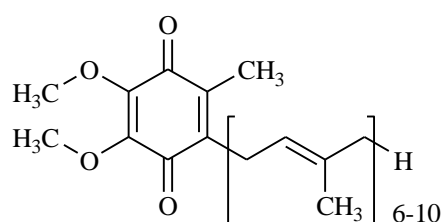
Selen je element u tragovima, uzajamno djeluje sa svakim nutrijentom koji utječe na antioksidativnu ravnotežu u stanicama. Ovaj mineral sprječava oštećenje stanica od reaktivnih kisikovih čestice i na taj način štiti stanicu od nastanka raka. Sudjeluje u očuvanju elastičnosti tkiva i smanjenju simptoma artritisa te štiti tijelo od starenja. Selen je najbolje unositi preko hrane jer velike doze u obliku dodataka prehrani mogu biti toksične. Bogat prirodni izvor selena je riba, školjke, crveno meso, žitarice, jaja, piletina i češnjak. Povrće također može biti dobar izvor ako se uzgaja na tlu bogatom selenom.

CINK

Cink je esencijalni mineral potreban za izvršenje velikog broja metaboličkih procesa u tijelu. Štiti od UV zračenja, smanjuje rizik od raka i kardiovaskularnih bolesti. U obliku dvovalentnih iona pruža zaštitu kože od UV zraka. Cink je uključen u velik broj enzimatskih sustava. Fiziološke funkcije koje ovise o cinku su rast i dioba stanica, spolno sazrijevanje, reprodukcija te zacjeljivanje rana, a višestruko je uključen i u sam imunostni sustav. Poznata su dva antioksidativna mehanizma cinka. Cinkovi ioni mogu zamijeniti redoks aktivne molekule na kritičnim mjestima stanične membrane i stabilizirati proteine koji inače mogu reagirati s vrlo nestabilnim mineralima, osobito bakrom i željezom u obliku slobodnih radikala. Cink se u mozgu nalazi u većoj koncentraciji od bilo kojeg drugog minerala. Nedostaci cinka nisu uobičajeni u razvijenim zemljama, međutim, pojavljuje se kod trudnica i djece u razvoju. Niska razina cinka ograničava prijenos željeza i vitamina A do ciljnih tkiva. Osiromašeno tlo, zagađivači okoliša i dijeta bogata ugljikohidratima znatno smanjuju količinu cinka u našem organizmu. Prirodni izvori su rakovi, puretina, tuna, iznutrice, pivski kvasac, sjemenke bundeve, sir, soja, grašak, sirove kamenice, sirove pšenične klice.

KOENZIM Q10

Koenzim Q10 kao prirodna tvar prisutan je u svakoj tjelesnoj stanici a pripada skupini tvari koje se nazivaju ubikinoni (ubiquitus – svugdje prisutan). U njegovoj građi sudjeluju ugljik (82.08%), vodik (10.51%), kisik (7.41%). Nastaje u svim tkivima sisavaca iz aminokiselina tirozina i fenilalanina te iz acetil-CoA. Ubikinoni su lipofilne u vodi netopive tvari uključene u transport elektrona i protona te na taj način omogućuje stvaranje energije kod aerobnih organizama. Snažan je antioksidans koji štiti lipidnu membranu, proteine i DNK.



Slika 8. Struktura koenzima Q10

Koenzim Q10 nalazi se prvenstveno u ribi (skuša, losos, srdela) i govedem mesu te orasima, ali su koncentracije u hrani daleko manje od količine koju možemo dobiti putem dodataka.

Tablica 1. Antioksidativni kapacitet svježeg povrća, žitarica i mahunarki dobiven pomoću DPPH metode.

Namirnica	Antioksidativni kapacitet TE/100 g
Crveni grah	11459
Groždice	5900
Pšenične mekinje	4620
Crveno grožđe	1350
Crveni kupus	1000
Pšenično brašno (rafinirano)	600
Cvijet brokule	500
Špinat	500
Zeleno grožđe	400

Rajčica	300
Grašak	175
Zeleni kupus	150

2.3.4. Kemija antioksidanata

Pod pojmom *kemija antioksidanata* podrazumijeva se mehanizam djelovanja antioksidanata te su predložena dva moguća mehanizma djelovanja. Prvi je mehanizam cijepanja lanaca u kojem primarni antioksidans donira elektrone slobodnom radikalu prisutnom u sustavu, npr. lipidnom radikalu. Drugi mehanizam uključuje uklanjanje inicijatora ROS (reaktivnih kisikovih čestica) i RNS (reaktivnih dušikovih čestica).

LANČANA REAKCIJA SLOBODNIH RADIKALA

INICIJACIJA – dolazi do pucanja kovalentne veze i u molekuli nastaju dva slobodna radikala, povećava se broj slobodnih radikala;

- 1) $RH \rightarrow R\cdot + H\cdot$
- 2) $R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$
- 3) $2ROOH \rightarrow ROO\cdot + RO\cdot + H_2O$

PROPAGACIJA – stvoreni slobodni radikal daje novi radikal i stabilan produkt, održava se broj slobodnih radikala;

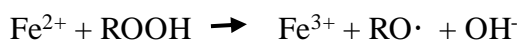
- 1) $R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$
- 2) $ROO\cdot + RH \rightarrow ROOH + R\cdot$
- 3) $RO\cdot + RH \rightarrow ROH + R\cdot$

TERMINACIJA – spajanje dvaju radikala i nastajanje stabilnog neradikalskog produkta te smanjenje broja slobodnih radikala;

- 1) $R\cdot + R\cdot \rightarrow R-R$
- 2) $R\cdot + ROO\cdot \rightarrow ROOR$
- 3) $ROO\cdot + ROO\cdot \rightarrow ROOR + O_2$
- 4) $\text{Antioksidans} + O_2 \rightarrow \text{oksidirani antioksidans}$

2.3.5. Oštećenja i bolesti nastale djelovanjem slobodnih radikala

Slobodni radikali pridonose razvoju mnogih različitih bolesti. Kemijski, tvar koja se oksidira otpušta elektron, a tvar koja se reducira prima elektron. Sve kemijske reakcije uključuju prijenos elektrona. Tijelo generira energiju postepenom oksidacijom hrane i na kontrolirani način ju pohranjuje u obliku kemijske potencijalne energije ATP-a (adenozin-trifosfata). Slobodni radikali generiraju se uglavnom tijekom proizvodnje ATP-a u mitohondrijima. Tijekom tog procesa, radikali dolaze iz mitohondrija od reaktivnih kisikovih čestica, kao što je superoksidni anion (O_2^-) i hidroksi radikal ($HO\cdot$) i ostalih reaktivnih kisikovih čestica kao što je singletni kisik (O_2^1), uništavaju sustav tijela posebice kod mjesta gdje se generiraju slobodni radikali. Ultraljubičasto zračenje koje prodire u kožu, kao i onečišćeni zrak, s visokom koncentracijom smoga koji udišemo, također stvara slobodne radikale. Hrana poput lipida, u prisutnosti Fe^{3+} i Fe^{2+} , vodi do stvaranja vodikovog peroksida iz kojih se dalje generira hidroksilni radikal iz reakcije koja očigledno ovisi o prisutnosti iona željeza.



Formiranje alkilnih slobodnih radikala direktnom reakcijom masti i ulja.



Aktivacija molekularnog kisika u singletni kisik.

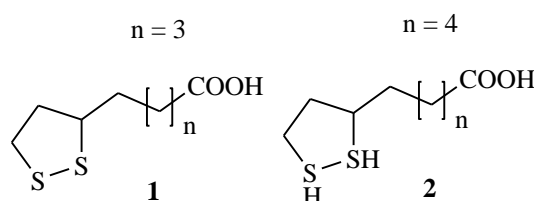


2.4. Antioksidacijski hibridni pristup

Hibridni sustavi izgrađeni su od različitih molekularnih jedinica prirodnog i neprirodnog podrijetla a koji mogu transformirati ili povećati različite jedinice ili stvoriti molekule s višefunkcionalnim značajkama i novim svojstvima. Ovaj dizajn antioksidacijskih enzima i neenzimskih antioksidansa u konjugaciji s drugim bioaktivnim molekulama/lijekovima koji se koriste u bolestima induciranim oksidacijskim stresom mogle bi biti korisne i povećati potencijal i raznolikost lijekova kandidata/molekula.¹⁵

2.4.1. Hibridi koji se temelje na 1,2-ditiolnoj jezgri

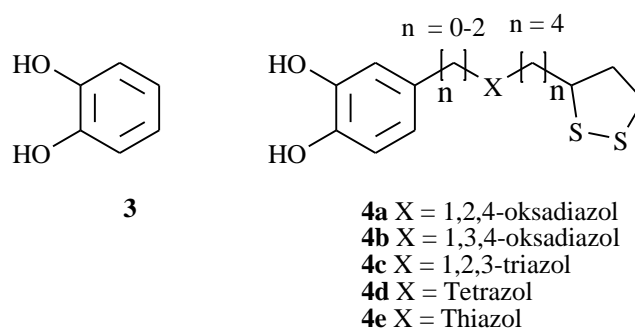
Alfa-lipoična kiselina (ALA) **1** također poznata kao 1,2-ditiofen-3-pentanska kiselina, prirodni je antioksidans koji hvata ROS i obnavlja ili reciklira endogene antioksidanse. Postoji u *R*- i *S*- enatiomernim oblicima, međutim, samo je *R*-LA konjugirana na konzervativni lizinski ostatak povezana amidnom vezom s mitohondrijskim multi-enzimskim kompleksom koji katalizira oksidativnu dekarboksilaciju keto kiseline (npr. piruvat-dehidrogenaza, 2-oksoglutarat-dehidrogenaza i transketolaza) i cijepanje glicina pa prema tome ima ključnu ulogu u energetskom metabolizmu mitohondrija. ALA se lako prenosi i reducira u stanicama i tkivima u dihidrolipoičnu kiselinu (DHLA) **2** i vrši oksidativnu zaštitu u unutarstaničnom i međustaničnom području. Osim toga kiseline su također uključene i u regeneraciju ostalih antioksidana (vitamina C i vitamina E) preko redoks spojke (coupling) i u povećanje unutarstanične razine glutationa. Tiolna skupina glutationa značajno pridonosi oksidativnoj obrani mozga, ali glutation se za razliku od α -LA ne može direktno primijeniti. *In vitro* ispitivanja na životinjama i preliminarne studije na ljudima pokazuju da bi alfa-lipoat mogao biti učinkoviti u brojnim neurodegenerativnim poremećajima.¹⁶



Slika 9. Strukture ALA **1** i dihidrolipoične kiseline **2**

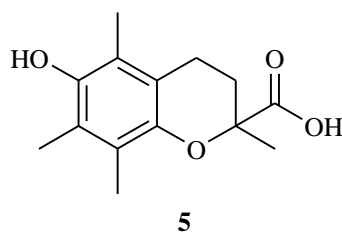
2.4.1.1. Hibridi s 1,2-ditiolnom jezgrom kao neurozaštitna sredstva

U nastojanju da se dizajniraju potencijalni neurozaštitni agensi s 1,2-ditiolnim skeletom, Koufaki M. i suradnici konjugirali su ALA **1** s kateholom **3** (*ortho* izomer benzendiola) koji je izazvao hipokampus HT22 stanica.¹⁷ Zanimljivo je da se neurozaštitni potencijal povećao prilikom bioizosterne zamjene amidne skupine s heteroatomskim prstenovima, kao što su triazol, 1,2,4-oksadiazol, 1,3,4-oksadiazol, tetrazol ili tiazol **4a-e**, u usporedbi s početnom ALA. Rezultati su pokazali da u slučaju **4d** učinak heteroatomskog i slobodne fenolne skupine u jednoj molekuli daje sinergijski učinak bolji nego aditivi.

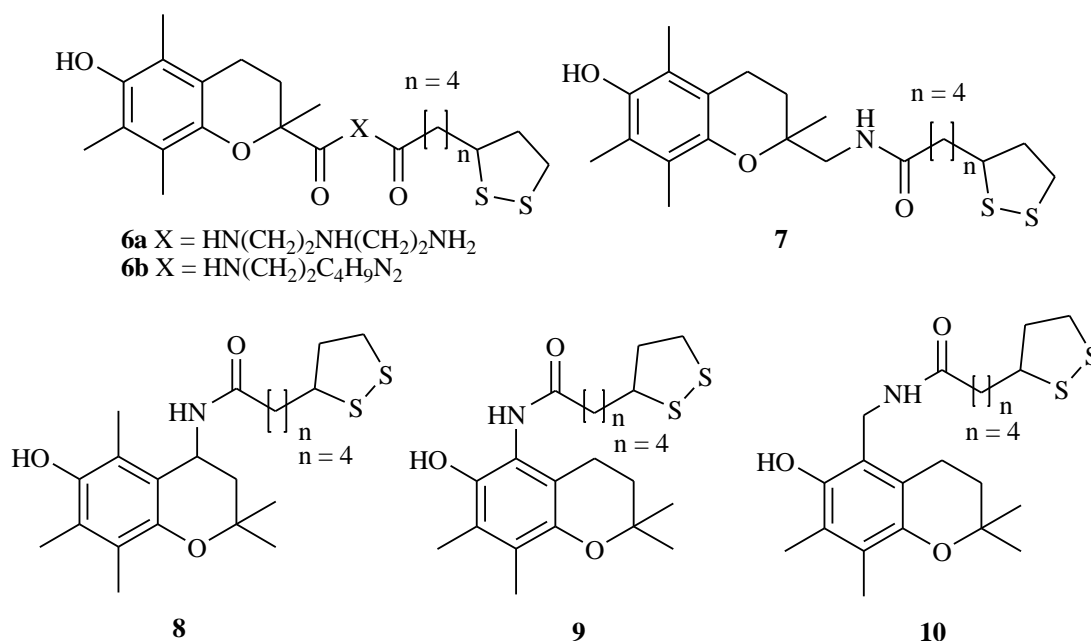
Slika 10. Kemijske strukture katehola **3** i hibrida **4a-4e**

2.4.1.2. Hibridi s 1,2-ditiolnom jezgrom kao kardiozaštitna sredstva

Koronarna začepljenja arterija proizlaze zbog nakupljanja masnih tvari ili štete na endotelnim stanicama krvnih žila što dovodi do srčanog udara (infarkt miokarda). Općenito, liječenje akutne miokardijalne ishemije (smanjen dotok krvi u srce) uključuje upotrebu trombolitika ili perkutane transluminalne koronarne angioplastike (PTCA) koja učinkovito vraća protok krvi u miokardu i smanjuje ukupnu smrtnost. Međutim, ove terapije ne štite srce od oštećenja uzrokovanih ROS proizvedenih prilikom ponovnog primitka oksigenirane krvi u ishemični miokard (reperfuzija). Nadalje, utvrđeno je da slobodne radikalske čestice kisika reagiraju s fosfolipidnim komponentama miokarda i utječu na selektivnu propusnost staničnih membrana što rezultira razvojem po život opasne ventrikularne aritmije i/ili fibrilacije. S druge strane, eksperimentalni podaci podupiru hipotezu da inhibitori lipidne peroksidacije, kao što je vitamin E, štite miokard od I/R ozljeda. Da bi istražili ulogu lipoične kiseline na kardiovaskularna oštećenja, ista skupina istraživača konjugirala je ALA **1** s troloxom **5** te je ispitana inhibicija lipidne peroksidacije i antioksidacijski kapacitet (mjereno kao sadržaj malondialdehida).

Slika 11. Struktura troloxa **5**

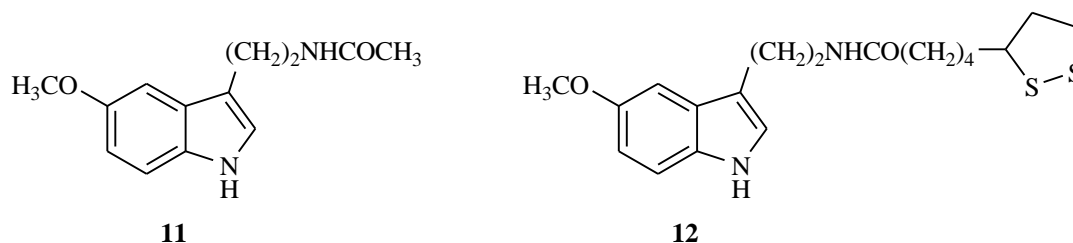
Lipoična kiselina supstituirana amidnom skupinom na položaju C-2 i C-5 pomoću metilenske poveznice **6a-b**, **7-10** utvrđena je kao bitna karakteristika za suzbijanje ukupne reperfuzijske aritmije, dok su spojevi direktno povezani na C-4 položaj **8** i smjesa trolox/lipoične kiseline smanjuje aritmiju sa 63,5% na 53%.



Slika 12. Strukture hibrida trolox-lipoične kiseline

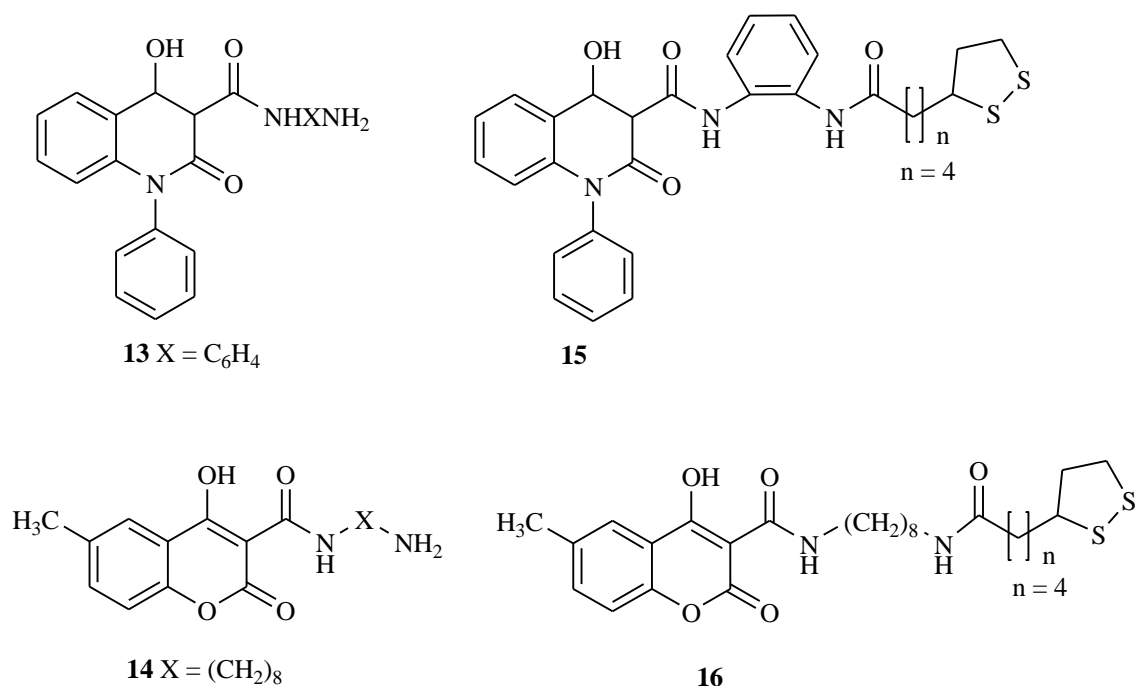
2.4.1.3. Hibridi s 1,2-ditiolnom jezgrom kao radiozaštitna sredstva

Melatonin (*N*-acetil-5-metoksitriptamin) **11**, hormon epifize koji regulira cirkadijurni ritam, kontrolira ciklus spavanja i buđenja, a također ima sposobnost zaštititi nuklearnu i mitohondrijsku DNK od oksidativnog oštećenja. Nadalje, zbog značajne primjene kod raka, poremećaja imunološkog sustava, kardiovaskularne bolesti, depresije, sezonskog emocionalnog poremećaja (SAD), poremećaja ritma spavanja i seksualne disfunkcije čine melatonin vrlo zanimljivom biomolekulom. Radiozaštitna aktivnost melatonina povećana je konjugacijom s 1,2-ditiolnom jezgrom (ALA) **1** tvoreći strukturu nove hibridne molekule melatoninolipoamida **12**.

Slika 13. Struktura melatonina **11** i melatoninolipoamida **12**

2.4.1.4. Hibridi s 1,2-ditiolnom jezgrom kao anti-upalna sredstva

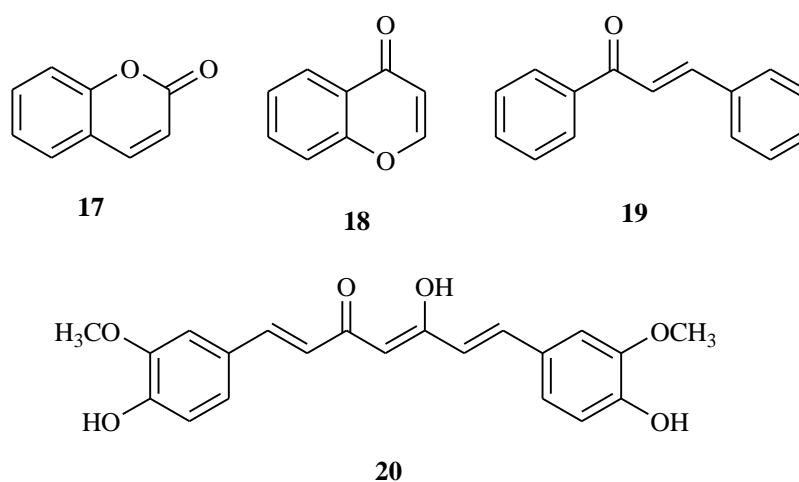
U posljednjih nekoliko godina antioksidansi se koriste i u liječenju upalnih bolesti. Postoje mnogi spojevi s heteroaromatskim prstenima, prirodnog i sintetskog porijekla koji su pokazali potencijalnu inhibiciju upalnih procesa. S obzirom na tu činjenicu, heteroaromatski prsten konjugiran s lipoičnom kiselinom preko amidne veze može tvoriti potencijalni lijek kandidat. Brojne molekule kao što su kinolinon-3-aminoamid **13** i kurmatin-3-aminoamid **14** su konjugirane s lipoičnom kiselinom te im je testirana sposobnost inhibicije lipoksigenaze (LOX %, 0.1 mM) i karagenana koji inducira endem šape štakora (CPE %, 0.01 mmol/Kg težine tijela). Rezultati su pokazali da su spojevi s aromatskim diaminom (posebno 1,2-fenilendiaminom) učinkovitiji u odnosu na alifatski diamin, dok je u obrnutom slučaju alifatski diamin učinkovitiji u inhibiciji %LOX. Hibridi kinolinon-3-aminoamidi-lipoične kiseline **15** pokazali su veću inhibitornu sposobnost lipoksigenaze (100%) u odnosu na odgovarajući roditeljski amino amid. U slučaju inhibicije CPE %, hibridi kumarin-3-aminoamidi-lipoične kiseline **16**, pokazali su veći potencijal (73%) u usporedbi s roditeljskim amino amidom.



Slika 14. Strukture kinolin-3-aminoamida **13**, kumarin-3-aminoamida **14**, hibrida kinolin-3-amidoamida-lipoične kiseline **15**, hibrida kumarin-3-aminoamida-lipoične kiseline **16**

2.4.2. Hibridi koji se temelje na α,β -nezasićenim karbonilnim skupinama

α,β -nezasićena karbonilna skupina pojavljuje se u strukturi prirodnih spojeva poput kumarina (benz- α -piran) **17**, flavona **18**, chalcona **19** i kurkumina **20**. Dugo se smatralo da je mehanizam djelovanja ove klase spojeva povezan s interakcijama tiolnih skupina enzima preko Michaelove adicije na ketovinilnu dvostruku vezu.¹⁸ SAR studije pokazale su da su elektron-privlačee skupine (EW) favorizirane jer povećavaju elektrofilnost C- β veze i tako olakšavaju nukleofilni napad staničnih tiolnih skupina. Kumarin (1,2-benzopiran) jedan je od važnijih klasa α,β -nezasićenih karbonilnih spojeva i nađeno je nekoliko prirodnih i sintetskih kumarina koji pokazuju različite farmakološke aktivnosti kao anti-HIV, antibakterijsku, antioksidativnu, anti-upalnu aktivnost ili se mogu koristiti za fluorescentno obilježavanje molekula.

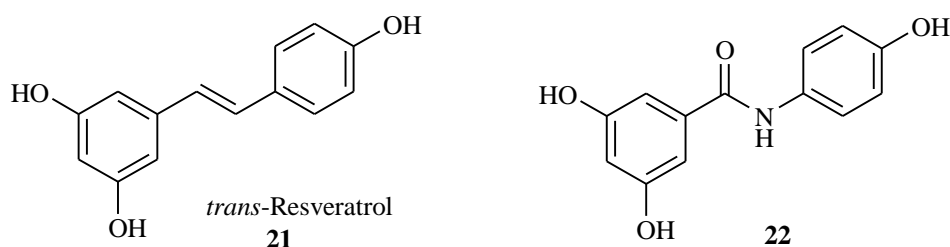


Slika 15. Strukture kumarina **17**, flavona **18**, chalcona **19** i kurkumina **20**.

2.5. Biološka aktivnost hidroksi supstituiranih benzamida

Fotostarenje se većinom javlja zbog ultraljubičastog zračenja sunčeve svjetlosti koje uglavnom pridonosi preranom starenju. Izloženost UV zračenju uzrokuje prekomjerno stvaranje ROS, za koje se smatra da su glavni čimbenik raznih oštećenja kože. Iako koža ima dobro razrađeni antioksidativni obrambeni sustav, prekomjerno stvaranje ROS rezultira stvaranjem oksidans-antioksidans neravnoteže kože. Resveratrol (*trans*-3,4',5-trihidroksistilben) je prirodni hidroksi stilben i smatra se osnovnim antioksidativnim sastojkom crvenog vina. U svojoj strukturi ima dvije važne vrste funkcionalnih skupina; tri fenolne hidroksilne skupine (resorcinol i fenol) i nezasićenu dvostruku vezu.

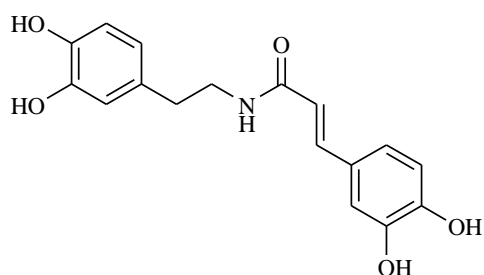
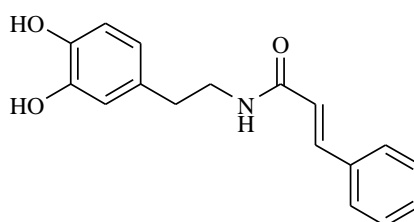
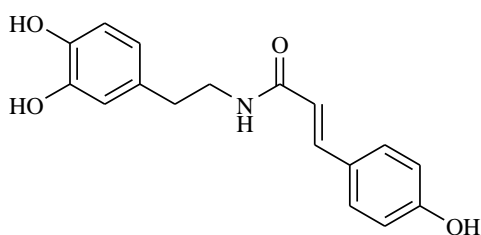
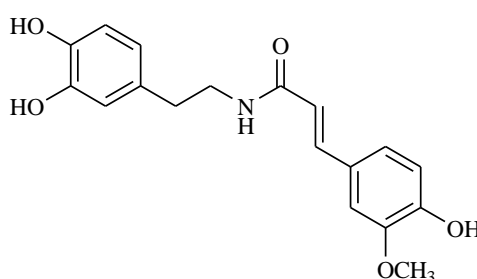
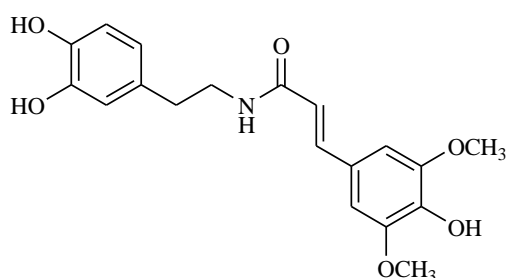
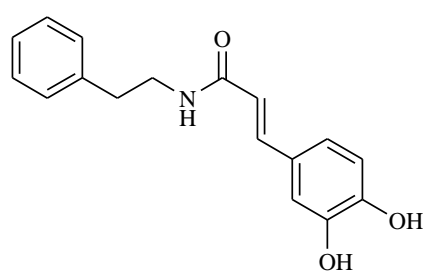
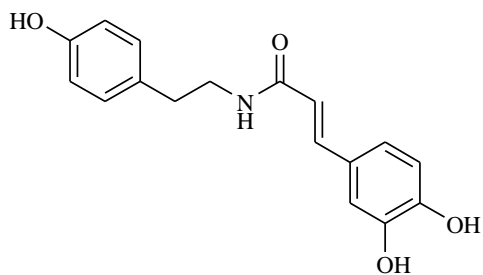
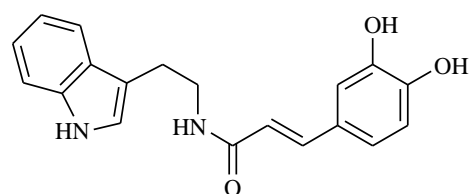
trans-Resveratrol pokazuje široki spektar antioksidativne aktivnosti kao što je vezanje slobodnih radikala, inhibiciju lipidne peroksidacije, inhibiciju agregacije trombocita te antitumorsku aktivnost. Međutim, zbog nepovoljne fotostabilnosti, upotreba *trans*-resveratrola je ograničena. Različiti uvjeti UV zračenja pokazali su da se *trans*-resveratrol lako transformira u *cis*-resveratrol, zbog toga je glavni cilj H. S. Rho i suradnika¹⁹ bio sintetizirati fotostabilan alternativni derivat *trans*-resveratrola. Imitacijom strukture spoja *trans*-resveratrola, 3,5-dihidroksi-*N*-(-4-hidroksifenil)benzamid **22** (Slika 16), sadrži amidnu poveznicu umjesto fotolabilne nezasićene dvostruke veze, budući da se pretpostavlja da biološka aktivnost *trans*-resveratrola proizlazi iz tri hidroksi fenilne skupine. Ispitane su različite biološke aktivnosti spoja **22** i uspoređene s *trans*-resveratrolom.



Slika 16. Struktura *trans*-resveratrola i spoja **22**

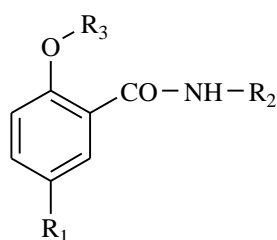
Spoj **22** je pokazao blagu aktivnost vezanja radikala ($IC_{50} = 99.4 \pm 5.6 \mu M$) ispitanu DPPH metodom, što je vrlo slično aktivnosti *trans*-resveratrola. Osim toga, pokazao je umjerenu aktivnost vezanja superoksidnih radikala ($IC_{50} = 227.4 \pm 16.8 \mu M$) koja se u ovom slučaju pokazala boljom od *trans*-resveratrola ($IC_{50} = 388.0 \pm 4.5 \mu M$). Ispitivanje je bilo provedeno da se utvrdi ili aktivnost vezanja superoksidnih radikala ili inhibitorni učinak na ksantinoksidazu. Enzimska aktivnost mjerena je analizom količine mokraćne kiseline. Spoj **22** i *trans*-resveratrol su pokazali sličnu inhibitornu aktivnost ksantin oksidaze. Danas postoji sve veći interes za hibridnim molekulama koje nastaju povezivanjem dviju strukturnih jedinica koje posjeduju odgovarajuću biološku aktivnost u novu molekulu. Takvi konjugati mogu biti puno učinkovitiji i imati izraženiju aktivnost. Uzimajući u obzir dobra antioksidativna svojstva hidroksi supstituiranih cimetnih kiselina i aktivnost aromatskih amina, navelo je E. Marinovu i suradnike²⁰ da ispituju i usporede antioksidativne aktivnosti osam sintetiziranih cimetnih i hidroksicimetnih amida biogenih amina: kafeoldopamin **23**, cimetoildopamin **24**, *p*-kumaroildopamin **25**, feruloildopamin **26**, sinapoildopamin **27**, kafeoilfeniletilamin **28**, kafeoiltiramin **29** i kafeoiltriptamin **30** prikazanih na Slici 17. Iz analize dobivenih kinetičkih parametara nađeno je da prisutnost hidroksilne skupine u amino dijelu molekule (derivati

dopamina i tiramina) dovode do direktne oksidacije molekula tijekom procesa te utječu na stabilizaciju rezultirajućih radikala. Nasuprot tome, amidi bez hidroksilne skupine u amino dijelu (spojevi **28** i **30**) sudjeluju u reakciji s peroksidima te nastali radikali vežu na sebe taj dio molekule u reakciji propagacije kao kofeinsku kiselinu. Osim toga tijekom autooksidacije triacilgicerola suncokretovog ulja (TGSO), sintetizirani cinamoilni i hidroksicinamoilni amidi biogenih amina pokazali su izvrsnu antioksidativnu aktivnost, veću ili usporedivu u odnosu na kofeinsku kiselinu. Najbolju aktivnost pokazao je spoj **23**, zatim slijedi spoj **24** te spoj **29**.

Kafeoidopamin (CaD) **23**Cimetoildopamin (CiD) **24***p*-Kumaroildopamin (*p*-CoD) **25**Feruloildopamin (FD) **26**Sinapoildopamin (SD) **27**Kafeoilfeniletilamin (CaPEA) **28**Kafeoiltiramin (CaTy) **29**Kafeoiltriptamin (CaTr) **30**

Slika 17. Kemijske strukture sintetiziranih spojeva biogenih amina

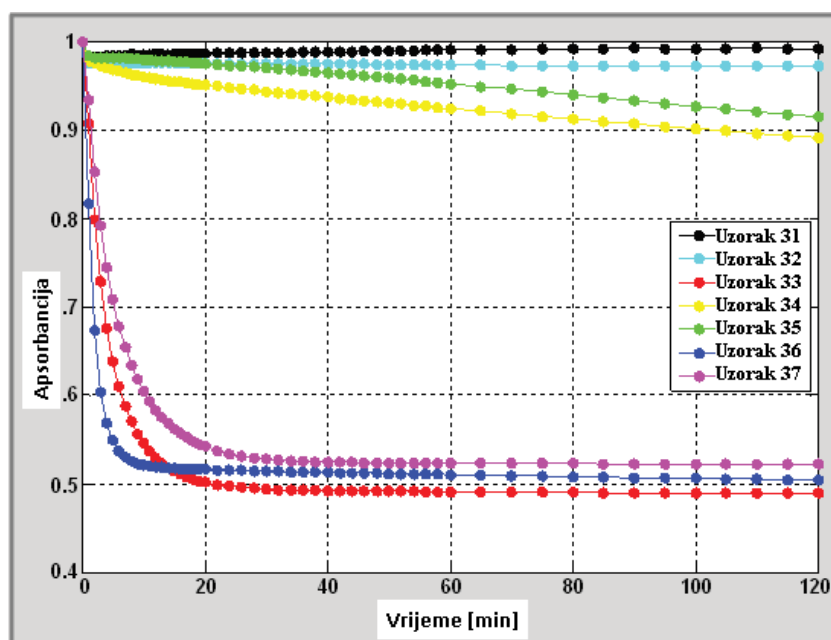
2-hidroksi-benzamidi i njihovi derivati su vrlo važna skupina aromatskih spojeva koji se koriste u različitim farmaceutskim i biokemijskim područjima zbog njihovih antimikrobnih, analgetskih i antiupalnih svojstva.²¹ Neki od spojeva te skupine također pokazuju i antitumorsku aktivnost. U posljednjih nekoliko godina velika pažnja usmjerena je na potencijalnu ulogu antioksidansa u liječenju i prevenciji raka, ateroskleroze, bolesti srca, neurodegenerativnih poremećaja, starenja, dijabetes melitus itd. Antioksidativna aktivnost sintetiziranih spojeva proučavana je *in vitro* korištenjem 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline (ABTS) i FRAP metode (*ferric reducing antioxidant potencial*) te cikličke voltametrije.



- 31** R₁=Br; R₂=H; R₃=CH₂-CO-OC₂H₅
32 R₁=Br; R₂=H; R₃=CH₂-CO-OCH₃
33 R₁=Br; R₂=H; R₃=CH₂-CO-NH-NH₂
34 R₁=Br; R₂=H; R₃=CH₂-CO-NH-N=CH-C₆H₄-pN(CH₃)₂
35 R₁=Br; R₂=H; R₃=H
36 R₁=Cl; R₂=C₆H₅; R₃=CH₂-CO-NH-NH₂
37 R₁=Cl; R₂=C₆H₅; R₃=CH₂(CH₃)-CO-NH-NH₂

Slika 18. Strukture ispitivanih spojeva

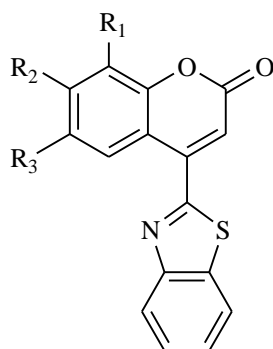
Vrijednosti antioksidativne aktivnosti dobivene pomoću ABTS i FRAP metode su poprilično slične, dok DPPH metoda nije pogodna za određivanje antioksidativne aktivnosti u slučaju ove skupine spojeva, zbog vrlo spore kinetike reakcija između DPPH i ispitivanih spojeva. Hidrazidi (uzorak 33, uzorak 36 i uzorak 37) posjeduju najvišu antioksidativnu aktivnost, zatim slijedi hidrazon (uzorak 34) i amid (uzorak 35), dok se aktivnost testiranih estera (uzorak 31 i uzorak 32) pokazala zanemarivo mala (Slika 19). Među odabranim hidrazidima, 5-brom-2-hidrazinokarbonilmetoksibenzamid (uzorak 33) se ističe s odličnom antioksidativnom aktivnošću (10.601, 12.547 mmol/L Trolox ekv.), nakon čega slijedi 5-klor-2-hidrazinokarbonilmetoksi-*N*-fenilbenzamid (uzorak 37) (10.567, 11.130 mmol/L Trolox ekv.) i 5-klor-2-(1-hidrozinkarbonil-etoksi)-*N*-fenilbenzamid (10.277, 10.154 mmol/L Trolox ekv.) (uzorak 36).



Slika 19. Kinetičke krivulje inhibicije radikala dobivene ABTS metodom

2.6. Biološka aktivnost benzimidazola i benzotiazola

Benzimidazoli i benzotiazoli obuhvaćaju novu klasu terapijskih spojeva koji pokazuju široki spektar biološke aktivnosti poput antioksidativne, antitumorske, antivirusne, anti-HIV, antimikrobne te mnogih drugih aktivnosti. Kumarin, odnosno 2*H*-kromen-2-on, 5,6-benzo-2-piron ili 2*H*-1-benzopiran-2-on se sastoji od kondenziranog benzenskog i pironskog prstena te sadrži dva kisikova atoma kao heteroatome, a strukturno spada u skupinu benzopirona. Većinom se nalaze u biljkama, a posljednjih godina privukli su veliki interes zbog širokog spektra farmakoloških svojstava. Zbog toga su S. Choudhary i suradnici²² sintetizirali spojeve koji sadrže u svojoj strukturi benzotiazol povezan s kumarinskom jezgrom s ciljem dobivanja spojeva s boljom biološkom aktivnosti.



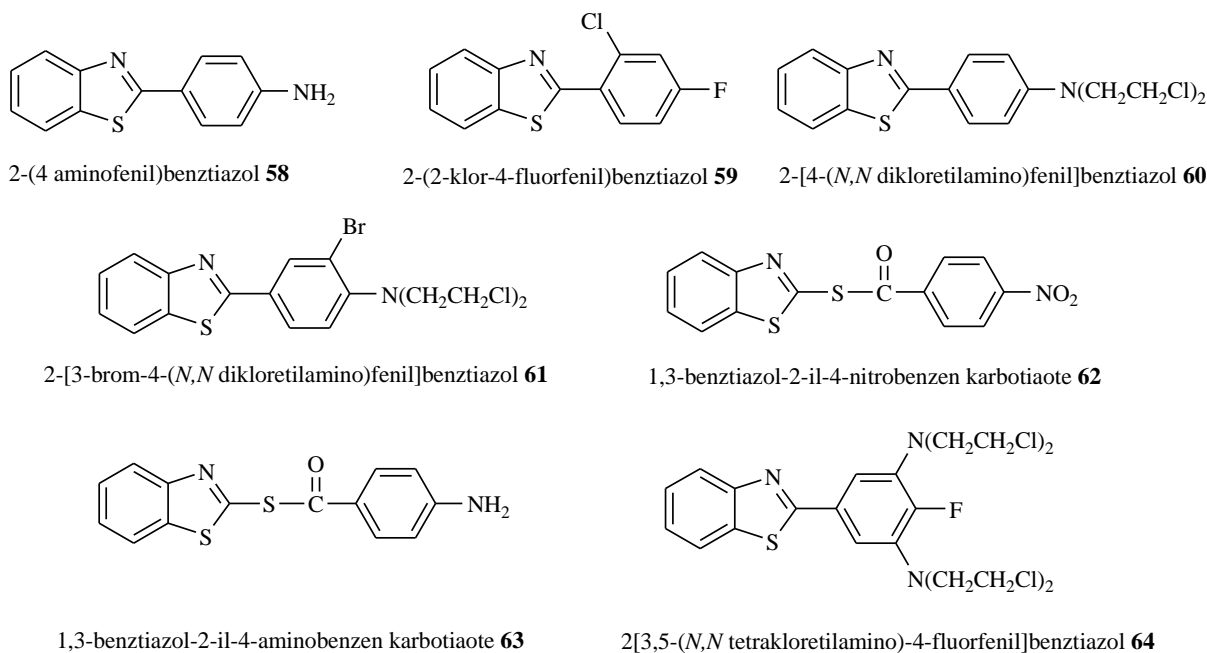
Slika 20. Benzotiazolni derivati kumarina

Tablica 2.

	R₁	R₂	R₃		R₁	R₂	R₃
38	H	OCH ₃	H	48	CH ₃	OCH ₃	H
39	H	OC ₂ H ₅	H	49	CH ₃	OAc	H
40	H	OAc	H	50	H	OCH ₃	Cl
41	H	OCH ₂ CHCH ₂	H	51	H	OCH ₃	OCH ₃
42	H	H	OCH ₃	52	H	OAc	OAc
43	H	H	OC ₂ H ₅	53	H	OC ₂ H ₅	OC ₂ H ₅
44	H	H	OAc	54	H	OCH ₂ CHCH ₂	OCH ₂ CHCH ₂
45	OCH ₃	OCH ₃	H	55	NO ₂	OCH ₃	H
46	OAc	OAc	H	56	H	SCOCH ₃	H
47	H	N(C ₂ H ₅) ₂	H	57	H	SCH ₃	H

Budući da se oksidativni/elektrofilni stres percipira kao jedan o glavnih uzroka akumulacije mutacije u genomu, pretpostavlja se da antioksidansi osiguravaju zaštitu od razvoja tumorskih stanica. Budući da je spoj **44** pokazao dobru *in vitro* antioksidativnu aktivnost, trebao bi spriječiti mutaciju i pokazati i dobru antitumorsku aktivnost. Prekomjerna proizvodnja slobodnih radikala rezultira oksidativnim stresom, što dovodi do oštećenja makromolekula kao što su lipidi koji mogu uzrokovati *in vivo* lipidnu preoksidaciju. Spoj **44** smanjuje povišenu razinu lipidne preoksidacije i povećava sadržaj GST u EAC induciranim miševima.

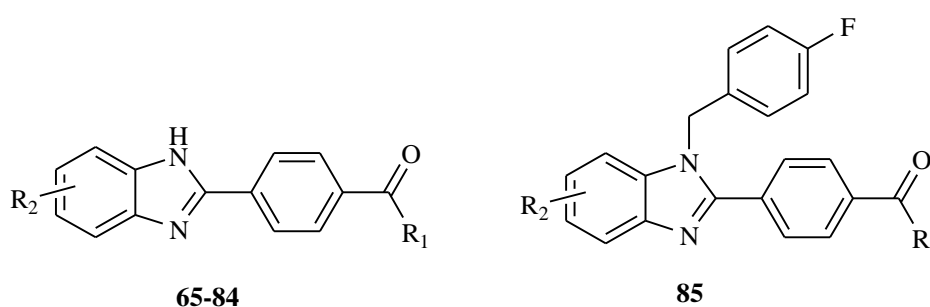
2015. godine skupina istraživača²³ sintetizirala je seriju 2-aril supstituiranih derivata benziazola (Slika 21) budući da je poznato iz literature da takvi spojeva posjeduju vazodilatatornu, antituberkulostatsku, antifungalnu i antioksidativnu aktivnost te djeluju kao središnji živčani stimulansi. Spojevi **60**, **61** i **62** pokazuju najizraženiju aktivnost, dok spojevi **58**, **59**, **63** i **64** pokazuju umjerenu aktivnost hvatanja DPPH radikala. Osim toga, spojevi **58**, **63** i **64** pokazuju aktivnost vezanja superoksidnih radikala u rasponu od 25,10 do 31,34 µg/ml a ostali spojevi pokazuju umjerenu aktivnost.



Slika 21. Sintetizirani derivati benzotiazola

Antioksidacijska svojstva ispitana su i derivatima 2-[4-(supstituirani piperazin/piperidin-1-ilkarbonil)fenil]-1*H*-benzimidazola. Sposobnost vezanja slobodnih radikala spojeva **65-84** i **85** (Slika 22) okarakterizirana je pomoću DPPH i superoksidnih radikala. Osim inhibitorskih učinaka, NADPH-ovisnih o peroksidaciji lipida određivani su mjerenjem nastajanja 2-tiobarbiturne kiseline, reaktivne supstance (TBARS) iz jetre štakora. Spoj **85** koji ima *p*-fluorobenzilni supstituent na položaju 1 pokazao je najjaču inhibiciju lipidne peroksidacije (83%) pri koncentraciji od 10^{-3} M, a nesupstituirani analog **67** je pokazao 57%-tnu inhibiciju. Ovaj rezultat je poprilično u skladu s rezultatom antimikrobne aktivnosti prema *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans* sojevima. Antioksidansi mogu djelovati kao izravni hvatači slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih vrsta ali oni neizravno metaboliziraju slobodne radikale ili njihove intermedijare u bezopasne produkte. Neki od neizravnih antioksidansa su enzimi koji uklanjaju toksične molekule prije nego što oštete stanicu ili sprječavaju formiranje toksičnijih molekula. Neki od antioksidativnih enzima uključuju superoksidnu dismutazu (SOD), podvrstu koja se nalazi u cijeloj stanici i glutation (GSH), peroksidaze (GPx), GSH reduktaze (GRD) te katalaze (CAT). GPx i CAT katalitički uklanjaju H_2O_2 i lipidne hidroperokside iz stanica čime se smanjuje količina $OH\cdot$. Oksidativna oštećenja DNA i drugih makromolekula imaju važnu ulogu u starenju, degenerativnim bolestima i raku. DNA se oksidira u normalni metabolizam jer antioksidacijska obrana, iako brojna, nije savršena.

Zbog oksidacije lipida, pojedini aldehidi koji nastaju su mutageni. Bijele stanice i ostale fagocitne stanice imunološkog sustava, borbene bakterije, paraziti, virusi i inficirane stanice uništavaju se mutagenim oksidacijskim sredstvima kao što su NO, HOCl, H₂O₂. Ovi oksidansi štite ljude od neposredne smrti uzrokovanih infekcijama, ali oni također uzrokuju oksidativne štete i mutacije DNA. Antioksidansi mogu utjecati na funkcije membrana koje reguliraju flukonazolnu osjetljivost. Bakterije i kvasci pokazali su otpornost na djelovanje azola zbog modifikacije vanjske membrane. Kombinacija antioksidansa i triazola povećava inhibitorne aktivnosti flukonazola kod osjetljivih izolata. Interakcija fenolnih antioksidansa s membranskim fosfolipidima mogla bi utjecati na molekularnu organizaciju i promicanje prolaza lijeka u membrane dvosloja te može povećati *in vitro* antimikrobnu aktivnost flukonazola. Spoj **73** pokazao je najbolju antifungalnu aktivnost protiv *Candida albicans*. Spojevi **67**, **68**, **72**, **73** i **85** pokazali su dobru antifungalnu aktivnost protiv *C. Krusei* slično kao i flukonazol. Samo spoj **85** ima *p*-fluorobenzilni supstituent na položaju 1 koji pokazuje najbolje rezultate djelovanja prema svim *Candida* sojevima i razinu LP. Gotovo svi 5-nitro supstituirani derivati **68**, **73**, **78** i **83** pokazuju bolju antimikrobnu aktivnost i inhibiciju LP nego drugi spojevi. Gotovo niti jedan piperidinski derivat nije pokazao značajnu aktivnost protiv bakterija ili gljivica, osim spojeva **83** i **84** koji imaju 5-nitro i 5,6-diklor supstituente. Rezultati pokazuju da kada su nitro supstituent ili dva atoma klora supstituenti na 5-i/ili 6-položaju benzimidazolske jezgre uz *p*-fluorofenilpiperazinski ili *N*-metilpiperazinski supstituent, antifungalna aktivnost protiv *Candida* vrste je posebno poboljšana. Spojevi **67**, **68**, **73** i **79** pokazuju dobru i antifungalnu i antioksidacijsku aktivnost.



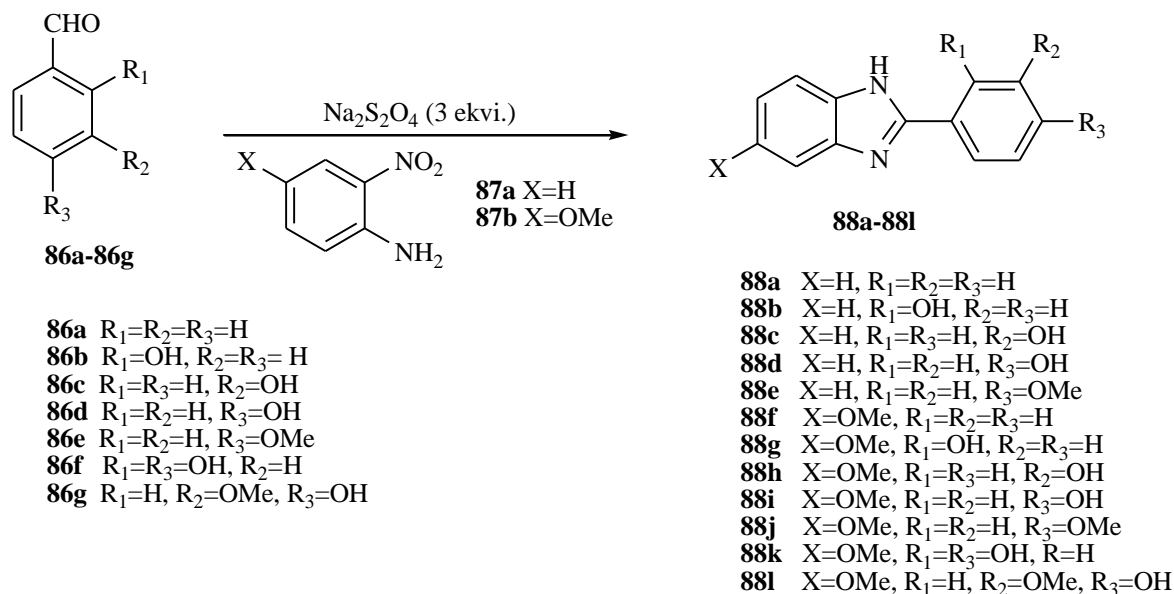
Slika 22. Sintetizirani spojevi **68-84** i **85**

Tablica 3.

	R ₁	R ₂		R ₁	R ₂
65	<i>N</i> -metilpiperazin	5(6)-H	75	<i>o</i> -metokisfenilpiperazin	5(6)-H
66	<i>N</i> -metilpiperazin	5(6)-CH ₃	76	<i>o</i> -metokisfenilpiperazin	5(6)-CH ₃
67	<i>N</i> -metilpiperazin	5(6)-Cl	77	<i>o</i> -metokisfenilpiperazin	5(6)-Cl
68	<i>N</i> -metilpiperazin	5(6)-NO ₂	78	<i>o</i> -metokisfenilpiperazin	5(6)-NO ₂
69	<i>N</i> -metilpiperazin	5(6)-diklor	79	<i>o</i> -metokisfenilpiperazin	5(6)-diklor
70	<i>p</i> -fluorfenilpiperazin	5(6)-H	80	piperidin	5(6)-H
71	<i>p</i> -fluorfenilpiperazin	5(6)-CH ₃	81	piperidin	5(6)-CH ₃
72	<i>p</i> -fluorfenilpiperazin	5(6)-Cl	82	piperidin	5(6)-Cl
73	<i>p</i> -fluorfenilpiperazin	5(6)-NO ₂	83	piperidin	5(6)-NO ₂
74	<i>p</i> -fluorfenilpiperazin	5(6)-diklor	84	piperidin	5(6)-diklor
			85	<i>N</i> -metilpiperazin	5(6)-Cl

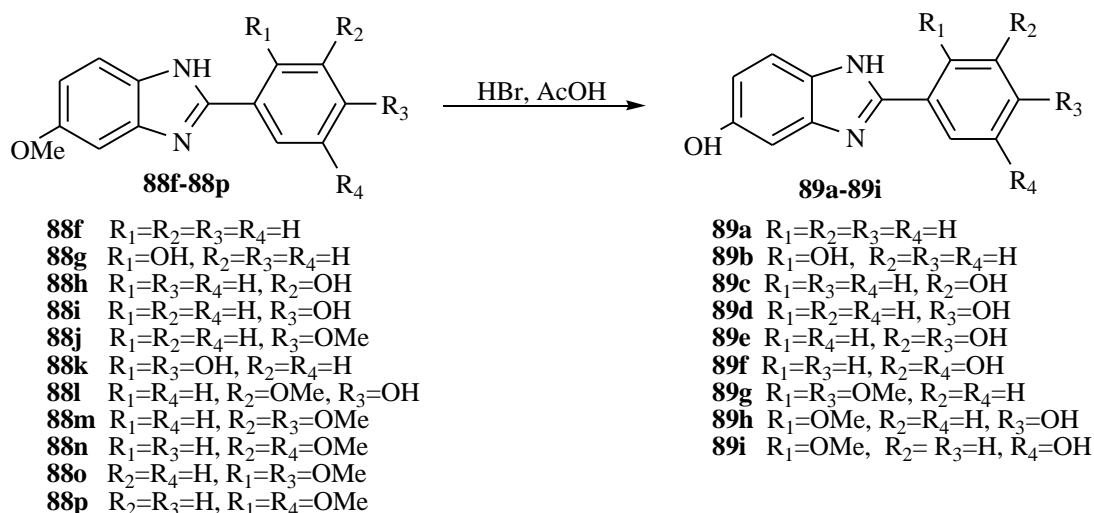
Spoj **85** koji je 1-*p*-flourobenzilni analog nesupstituiranom spoju **67**, ima bolje antifungalno djelovanje protiv *Candida* sojeva. Antimikrobna aktivnost benzimidazolnih derivata je poboljšana *NI*-supstitucijom a poboljšana je i antifungalna i antioksidacijska aktivnost. Piperidinski derivati **81** (109%) i **84** (106%) povećali su razinu lipidne peroksidacije, dok su drugi, poput spojeva **80** (12%), **82** (21%), te **83** (38%), pokazali slabu inhibiciju LP pri koncentraciji 10⁻³M. Spojevi **67**, **68**, **73** i **79** pokazali su najveću inhibiciju peroksidacije lipida u rasponu od 50-57%, a ove inhibicije su blizu inhibicije BHT (65%), jednog dobro poznatog klasičnog antioksidacijskog spoja koji je korišten za usporedbu s derivatima benzimidazola. Sposobnost vezanja superoksidnih anionskih radikala ovih spojeva ispitana je pomoću sustava ksantin/ksantin-oksidade. *p*-Fluorofenil- i *o*-metoksifenilpiperazinski derivati pokazali su slabi inhibicijski učinak na superoksidni radikal, dok su *N*-metilpiperazinski i piperidinski derivati pokazali umjereni inhibicijski učinak na superoksidni radikal. Sposobnost vezanja superoksidnih aniona spojeva **68**, **69** i **82** ovisi o njihovoj koncentraciji, a imaju slične inhibicijske učinke formiranja superoksidnih aniona 88%, 93% i 70% pri koncentraciji 1 mM. Spojevi **65**, **67**, **72**, **80** i **81** pokazali su vrlo ograničene inhibitorske učinke na formiranje superoksid aniona u rasponu od 6-25% pri koncentraciji od 1 mM. Spojevi **66**, **74**, **75**, **78**, **79** i **83** pokazali su interakciju sa stabilnim slobodnim radikalom DPPH.²⁴

Supstituirani 2-arilbenzimidazoli **88a-88l** su sintetizirani iz raznih supstituiranih benzaldehida i *o*-nitroanilina (ili 4-metoksi-2-nitroanilina) u prisutnosti $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ prema Yangovom postupku (Shema 1).

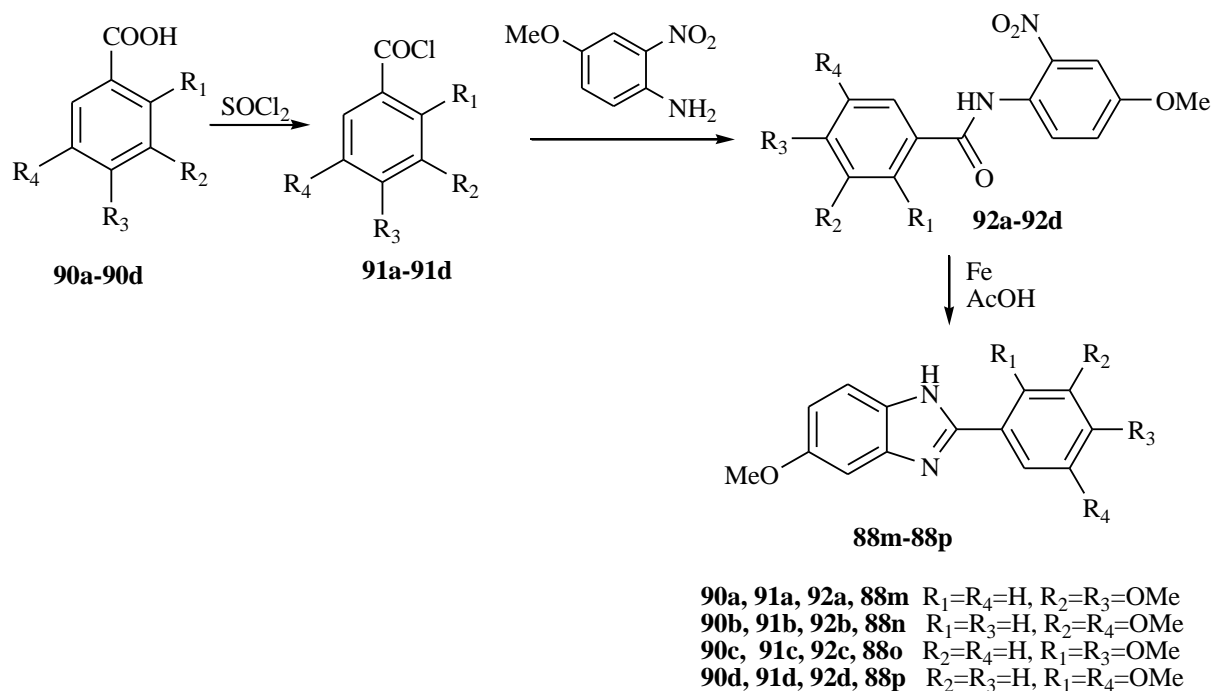


Shema 1. Sinteza spojeva **88a-88l**

Serijski derivati 2-arilbenzimidazola **88a-88e** priređena je u svrhu ispitivanja antioksidativne i antibakterijske aktivnosti. Rezultati dobiveni biološkim ispitivanjima su pokazali da derivat s hidroksilnom skupinom na 5-položaju benzimidazolnog prstena ima usporedivo ili čak i bolje antioksidativno djelovanje u odnosu na standardni antioksidans *tert*-butilhidrokinon (TBHQ). Spoj **89h** koji je pokazao najveću aktivnost $\text{OH}\cdot$ vezivanja *in vitro* značajno je reducirao 2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihidroklorid (AAPH) te izazvao unutarstanični oksidativni stres i staničnu smrt induciranu vodik-peroksidom.



Shema 2. Sinteza spojeva **89a-89i**

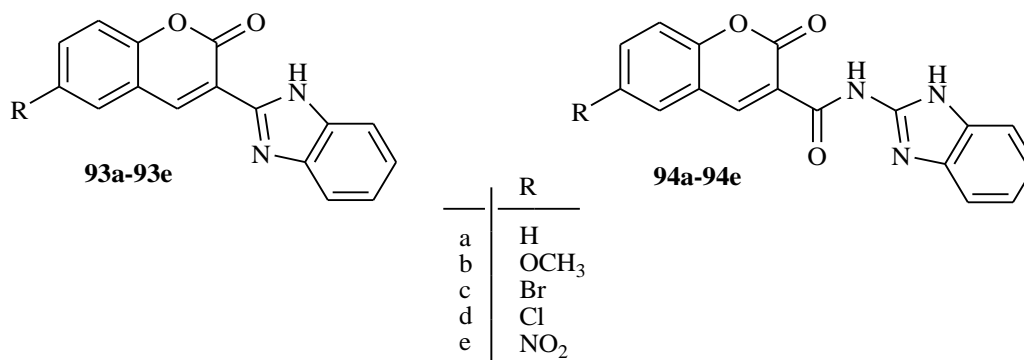


Shema 3. Sinteza spojeva 88m-88p

Osim toga, ovi spojevi imaju umjereno dobre selektivne inhibitorne aktivnosti prema *Staphylococcus aureus* sojevima bakterija u koncentracijama koje nisu citotoksične. Sintetski put pripreve supstituiranih 2-arilbenzimidazola **88m-88p** je prikazan na Shemi 3. Odgovarajući benzoil-kloridi **91a-91d** se priređuju iz benzojevih kiselina, a zatim reagiraju s 4-metoksi-2-nitroanilinom kako bi se priredili odgovarajući *N*-(4-metoksi-2-nitrofenil)-benzimididi **92a-92d**. Ovi benzamidi reduciraju se pomoću željeznog praha, a zatim cikliziraju kako bi se dobili 2-arilbenzimidazoli **88m-88p**. 5-hidroksi-2-fenil-benzimidazoli **89a-89i** dobiveni su metiliranjem odgovarajućih benzimidazola **88f-88p** u prisutnosti bromovodične kiseline Shema 2.²⁵

Budući da su upalni procesi važni indikatori mnogih patoloških stanja poput reumatoidnog artritisa, osteoartritisa i Alzheimerove bolesti, a kronične upale mogu aktivirati i druge upalne procese, njihova kontrola je vrlo bitna. Za kontrolu različitih kroničnih upalnih stanja uspješno se koriste nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAIDs), ali je njihova glavna mana gastrična netolerancija koja se manifestira u obliku krvarenja ili čireva. S obzirom na svoju raznoliku biološku aktivnost, kumarini su proučavani kao alternativa postojećim protuupalnim lijekovima te je utvrđeno da se protuupalna aktivnost povećava uvođenjem aromatske skupine direktno ili preko amidne poveznice u položaj 3 kumarinske jezgre.

Pogodna aromatska skupina je 2-benzimidazolni supstituent koji se nalazi u strukturi mnogih dostupnih lijekova za čireve. Stoga su sintetizirani derivati 6-supstituiranih kumarina kojima je u položaj 3 uveden 2-benzimidazolni supstituent i ispitana je njihova protuupalna i antioksidativna aktivnost sa smanjenom gastro-toksičnošću. Za dobru protuupalnu aktivnost potrebna je direktna supstitucija benzimidazola na kumarinsku jezgru kao i supstitucija kumarina elektron-odvlačećim skupinama (-Cl ili -Br). Dobra antioksidativna aktivnost utvrđena je kod derivata s amidnom poveznicom i elektron-odvlačećim skupinama na supstituiranom kumarinskom derivatu. Na Slici 23. prikazani su derivati koji su pokazali najbolju protuupalnu i antioksidativnu aktivnost, dobru oralnu bioraspoloživost i apsorpciju te maksimalnu sigurnost za želučanu sluznicu i induciranje antioksidativnog stresa.²⁶

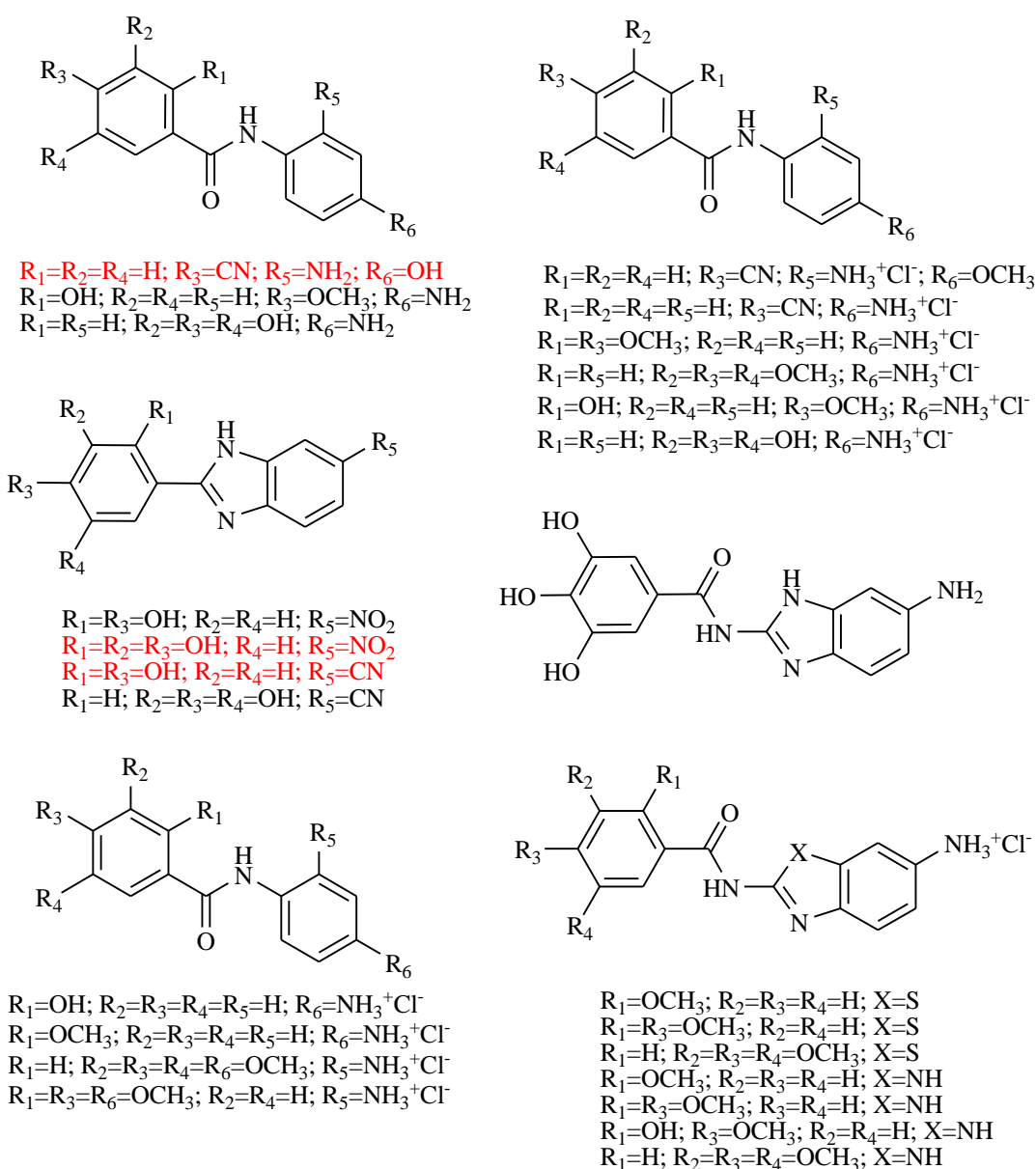


Slika 23. 2-benzimidazolni derivati kumarina

3. Rezultati i rasprava

3.1. Cilj rada

U ovom radu priređeni su potencijalno biološki aktivni hidroksi supstituirani amino derivati benzamida, 2-benzimidazolil supstituiranih benzamida, derivati 2-benzimidazola te hidrokloridne soli benzamida, 2-benzimidazolil i 2-benzotiazolil supstituiranih benzamida. Strukture priređenih spojeva, prikazane na Slici 24, potvrđene su ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom. Reakcijom redukcije iz nitro supstituiranih prekursora, priređeni su amino supstituirani derivati fenola **7**, **8** i benzimidazola **45**. Uklanjanjem zaštitnih metoksi skupina priređeni su hidroksi derivati amino supstituiranih fenola **11**, **21** i **22** i benzimidazola **40**, **41** i **46**.

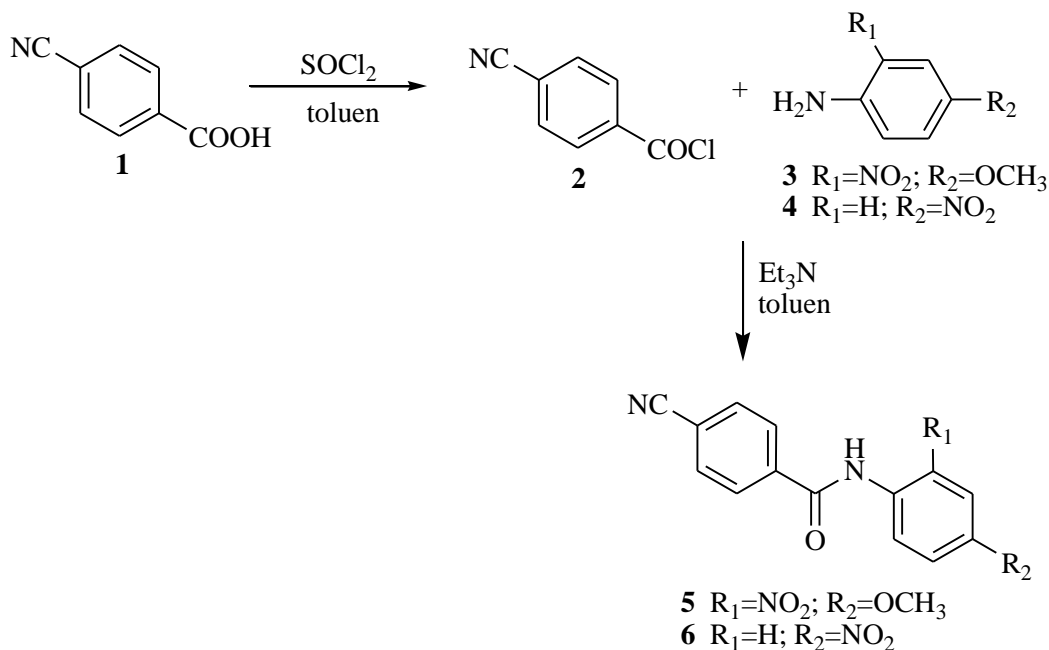


Slika 24. Strukture ciljnih molekula

Reakcijom protoniranja amino supstituiranih derivata dobivene su hidrokloridne soli benzamida **9**, **10**, **23**, **24**, **25**, **26**, **52**, **53**, **54** i **55**, 2-benzimidazolil supstituiranih benzamida **47**, **64**, **65** i **66** i 2-benzotiazolil supstituiranih benzamida **61**, **62** i **63**. Provedena je spektroskopska karakterizacija korištenjem UV/Vis spektroskopije matičnih otopina odabranih spojeva u metanolu, provedene su pH titracije i odabranim spojevima ispitana je antioksidativna aktivnost korištenjem DPPH i FRAP metode.

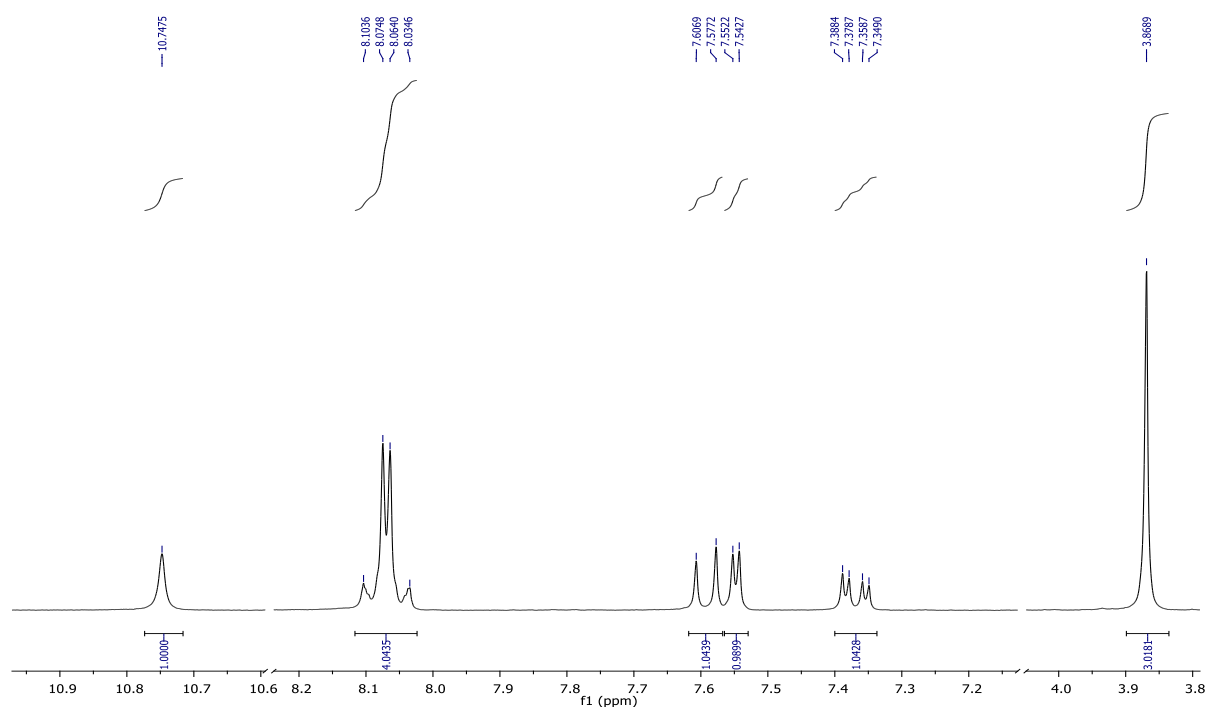
3.2. Sinteza ciljanih spojeva

Priprava *p*-cijanobenzoil-klorida **2** (89,3%) provedena je u apsolutnom toluenu uz dodatak suviška SOCl_2 iz *p*-cijanokarboksilne kiseline **1** prema Shemi 4.



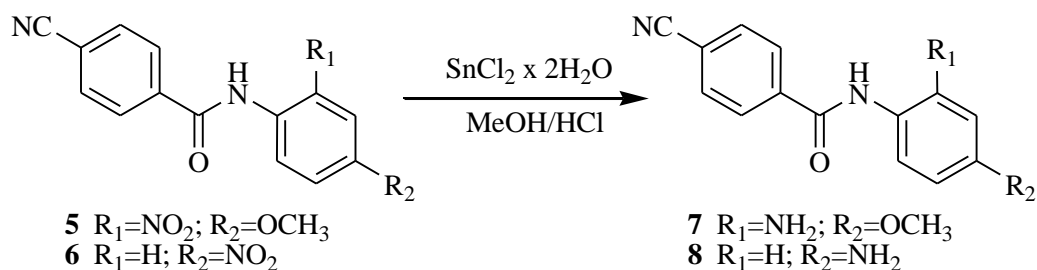
Shema 4.

Reakcije kondenzacije *p*-cijanobenzoil-klorida **2** s odgovarajućim benzaminima **3** i **4** provedene su u apsolutnom toluenu uz dodatak trietilamina u suvišku. *p*-cijano-*N*-(4-metoksi-2-nitrofenil)benzamid **5** i *p*-cijano-*N*-(4-nitrofenil)benzamid **6** sintetizirani su u iskorištenjima 40,6% i 53,5%. Slika 25 pokazuje ^1H NMR spektar spoja *p*-cijano-*N*-(4-metoksi-2-nitrofenil)benzamid **5**. U alifatskom dijelu spektra može se uočiti signal na 3,87 ppm koji odgovara protonima OCH_3 zaštitne skupine. U području od 8,12 ppm do 7,37 ppm nalazi se odgovarajući broj signala aromatskih protona. U nezasjenjenom dijelu spektra na 10,75 ppm nalazi se signal protona amidne veze.



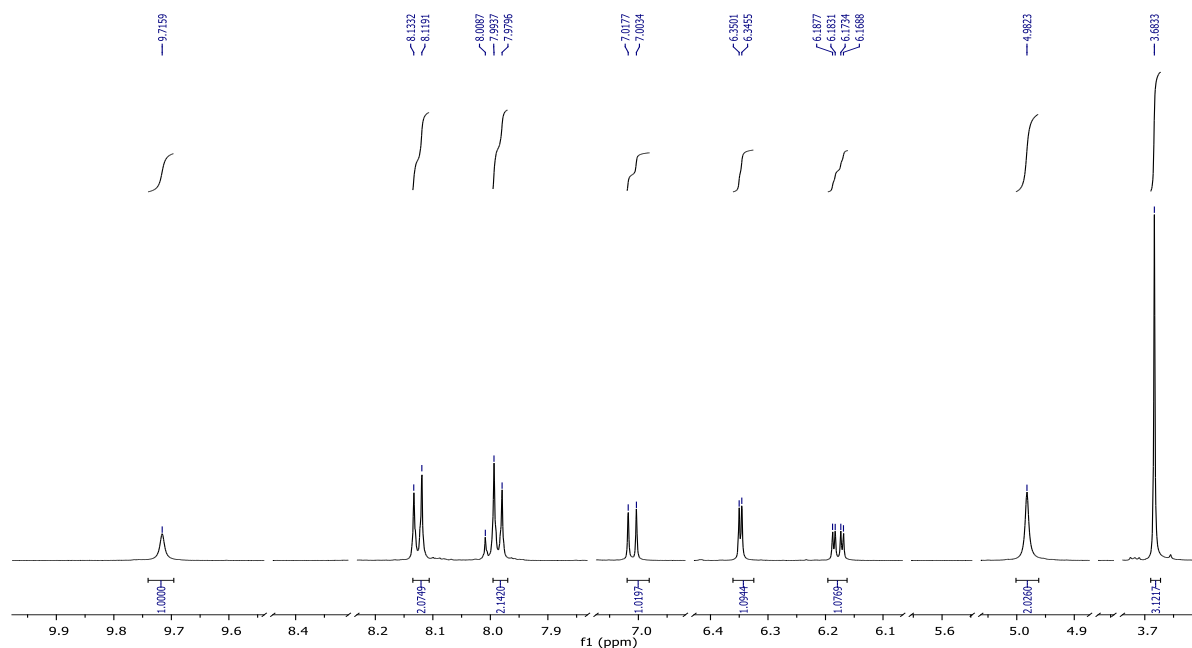
Slika 25. ^1H NMR spektar spoja *p*-cijano-*N*-(4-metoksi-2-nitrofenil)benzamid **5**

Iz nitro supstituiranih amida **5** i **6** provedena je reakcija redukcije s $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ u smjesi metanola i klorovodične kiseline pri čemu su dobiveni amino supstituirani amidi **7** i **8** u iskorištenjima 92,9% i 41,3%.

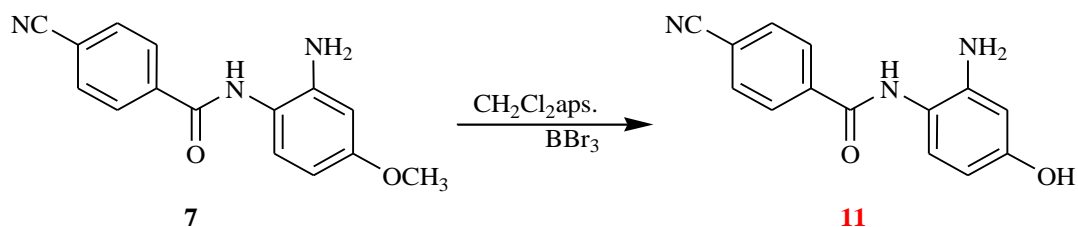


Shema 5.

Strukture dobivenih spojeva potvrđene su korištenjem ^1H i ^{13}C NMR spektroskopije. Na Slici 26 prikazan je ^1H NMR spektar spoja *p*-cijano-*N*-(4-metoksi-2-aminofenil)benzamida **7**. U nezasjenjenom dijelu spektra vidljiv je signal amidne veze na 9,72 ppm. U području od 8,13 ppm do 6,18 ppm može se uočiti sedam protona aromatskog dijela molekule. U odnosu na spektar nitro supstituiranog amida vidljivi su protoni amino skupine čije je signal intenziteta dva protona prisutan na 4,98 ppm. Signal protona metoksi skupine prisutan je na 3,68 ppm.

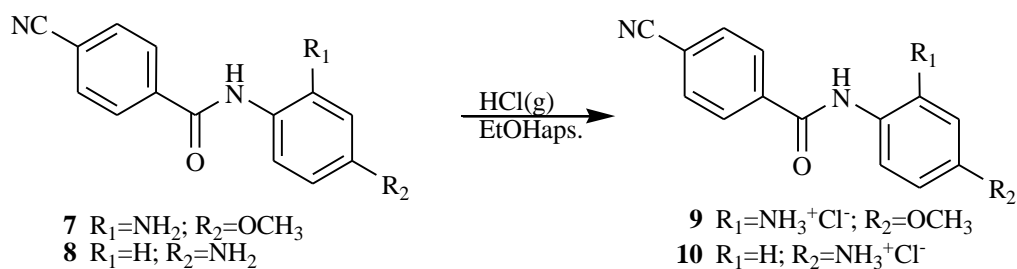
Slika 26. ^1H NMR Spektar spoja *p*-cijano-*N*-(4-metoksi-2-aminofenil)benzamida **7**

Slijedeći korak u pripravi hidroksi supstituiranih derivata bio je uklanjanje zaštitne metoksi skupine prema Shemi 2. U reakciji metoksi supstituiranog amida **7** s BBr_3 u apsolutnom diklormetanu na -78°C u atmosferi argona, spoj *p*-cijano-*N*-(4-hidroksi-2-aminofenil)benzamid **11** nije uspješno izoliran.



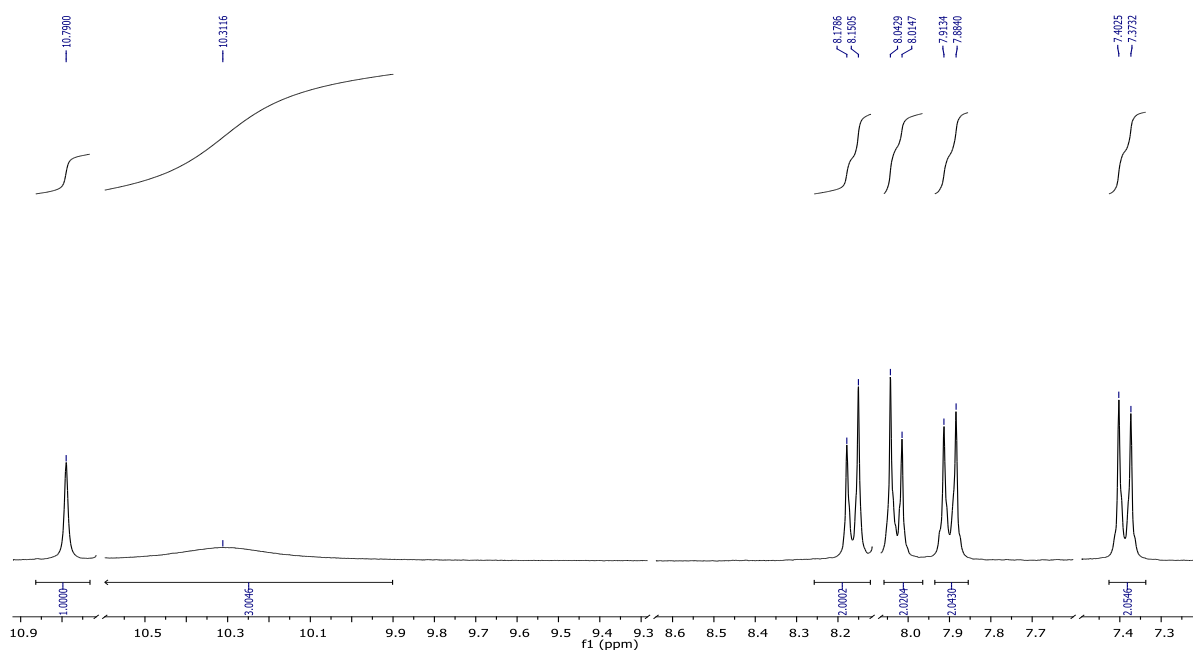
Shema 6.

Reakcijom protoniranja amino supstituiranih amida **7** i **8** u apsolutnom etanolu zasićenom sa HCl -om priređene su hidrokloridne soli **9** i **10** u iskorištenjima 51,1% i 74,3%.



Shema 7.

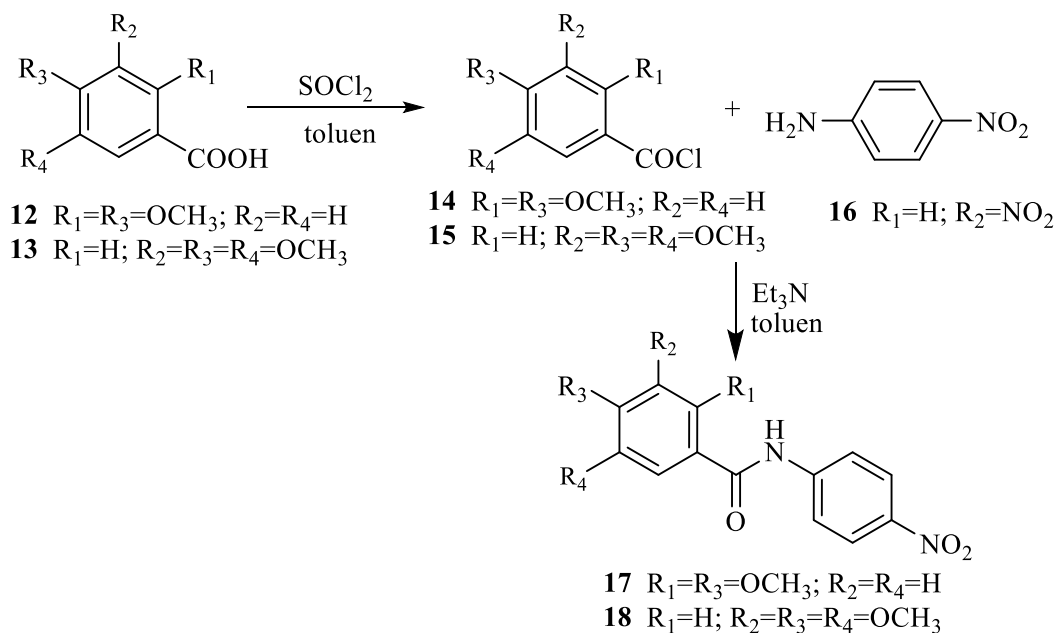
Na Slici 27 prikazan je ^1H NMR spektar *p*-cijano-*N*-(4-aminofenil)benzamid-hidroklorida **10**.



Slika 27. ^1H NMR spektar spoja **10**

Signal protona amidne veze nalazi se 10,79 ppm, dok široki singlet intenziteta tri protona na 10,31 ppm odgovara protoniranoj amino skupini. U području od 8,16 ppm do 7,39 ppm nalazi se odgovarajući broj signala aromatskih protona.

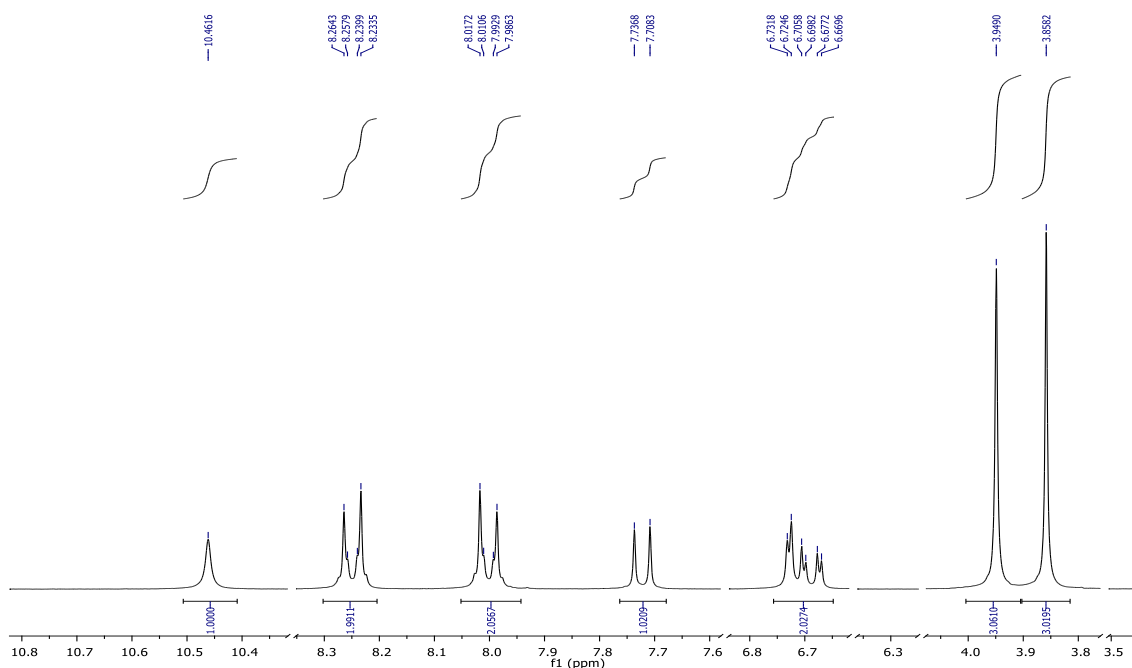
Priprava metoksi supstituiranih benzoil-klorida **14** (83,9%), **15** (89,9%) provedena je u apsolutnom toluenu uz dodatak suviška SOCl_2 iz metoksi supstituiranih karboksilnih kiselina **12**, **13** prema Shemi 8.^{27,28}



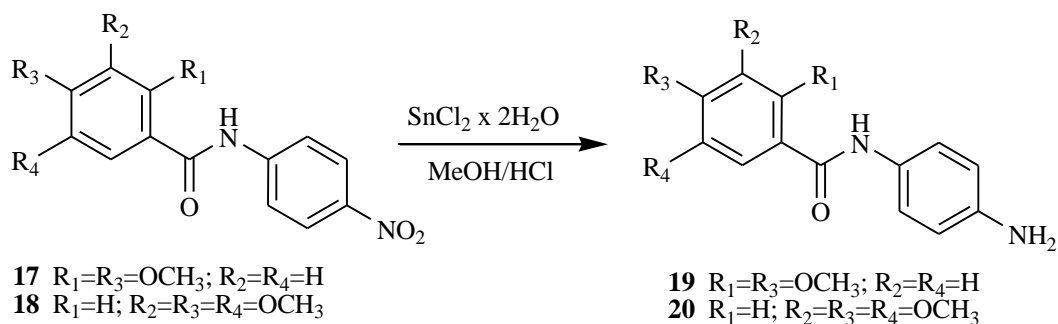
Shema 8.

Reakcije kondenzacije *p*-nitroanilina **16** s odgovarajućim metoksi supstituiranim benzoil-kloridima **14** i **15** provedene su u apsolutnom toluenu uz dodatak trietilamina u suvišku²⁹ te su benzamidi **17** i **18** sintetizirani su u iskorištenjima 62,7% i 59,5%.

Slika 28 prikazuje ¹H NMR spektar 2,4-dimetoksi-*N*-(4-nitrofenil)benzamid **17**. U alifatskom djelu spektra mogu se uočiti signali na 3,95 ppm i 3,86 koji odgovaraju protonima OCH₃ zaštitne skupine. U području od 8,24 ppm do 6,65 ppm nalazi se odgovarajući broj signala aromatskih protona. U nezasjenjenom dijelu spektra nalazi se signal protona amidne veze.

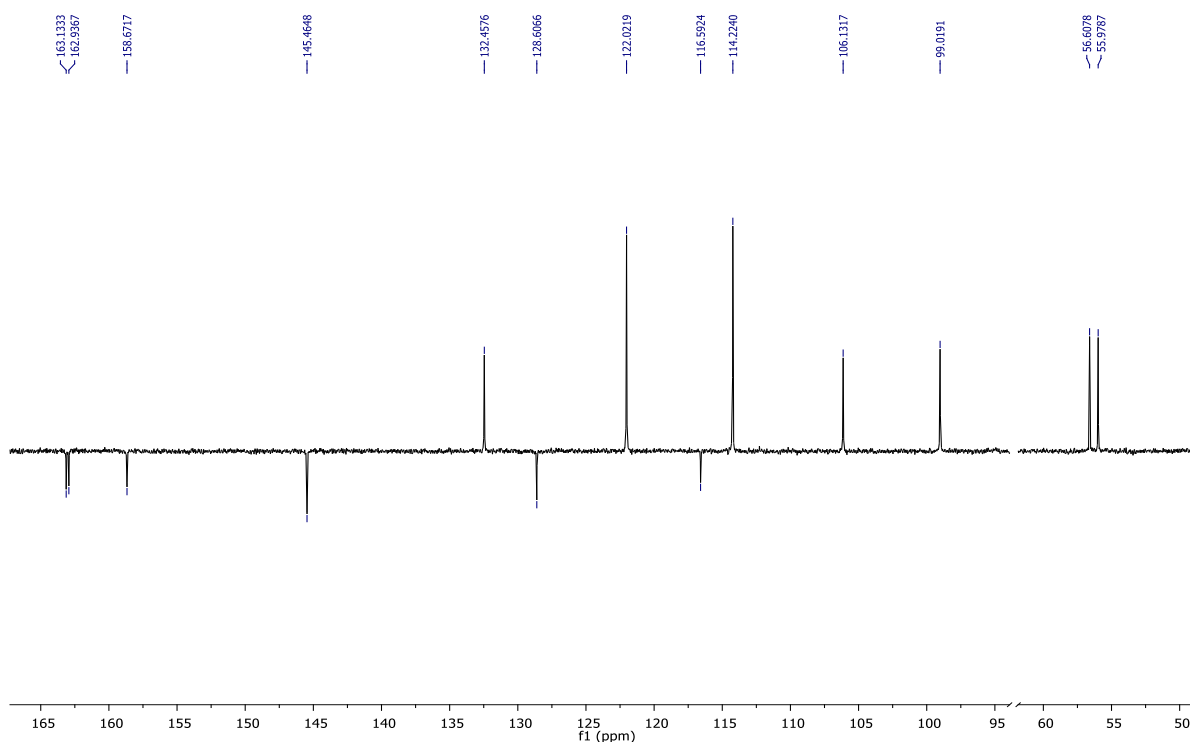
Slika 28. ¹H NMR spektar 2,4-dimetoksi-*N*-(4-nitrofenil)benzamid **17**

Nitro supstituirani metoksi derivati **17** i **18** reduciraju se sa $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ u smjesi metanola i klorovodične kiseline pri čemu su dobiveni odgovarajući amino supstituirani metoksi derivati **19** i **20** u iskorištenjima 77,5% i 45,3%.

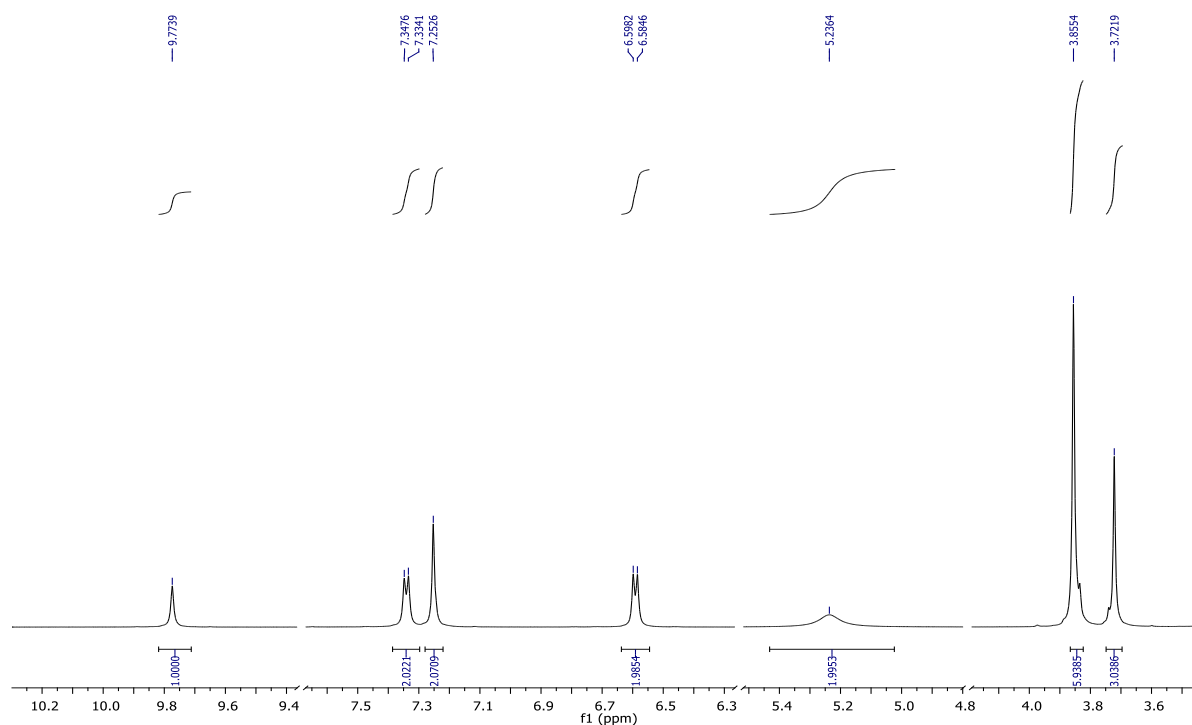


Shema 9.

Strukture dobivenih spojeva potvrđene su ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom. Na Slici 29 prikazan je ^{13}C NMR spektar spoja **19** u kojem se može vidjeti odgovarajući broj signala kvaternih i aromatskih CH ugljikovih atoma te signali metoksi skupina na 56,60 i 55,97 ppm.



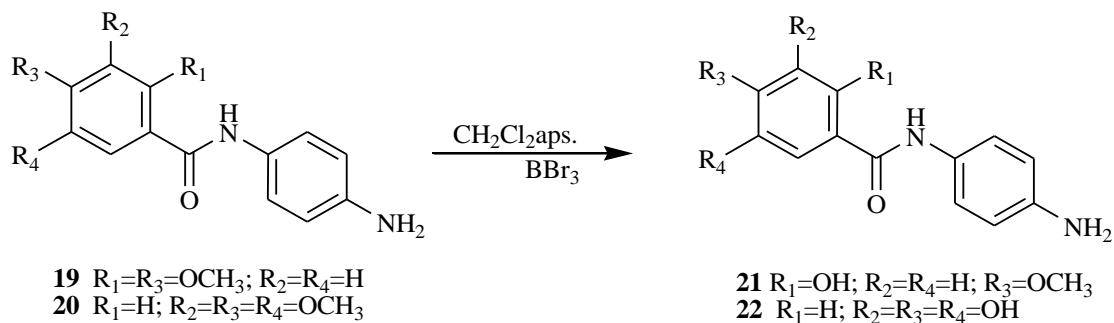
Slika 29. ^{13}C NMR spektar 2,4-dimetoksi-N-(4-aminofenil)benzamida **19**



Slika 30. $^1\text{H NMR}$ 3,4,5-trimetoksi-*N*-(4-aminofenil)benzamida **20**

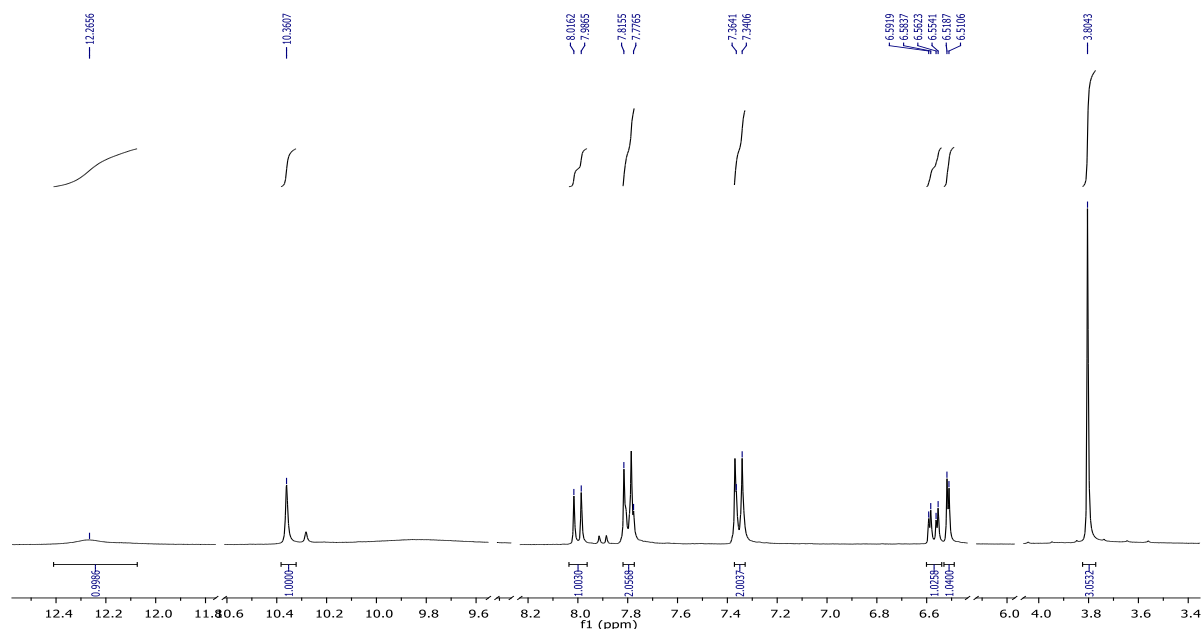
Na Slici 30 prikazan je $^1\text{H NMR}$ 3,4,5-trimetoksi-*N*-(4-aminofenil)benzamida **20**. U odnosu na spektar nitro supstituiranog amida vidljivi su protoni amino skupine čiji je signal prisutan na 5,24 ppm. Signal protona dvije metoksi skupine uočavaju se na 3,86 ppm i na 3,73. U aromatskom području prisutni su signali odgovarajućeg broja aromatskih protona dok se u nezasićenom dijelu spektra vidi proton amidne veze na 9,77 ppm.

Uklanjanje zaštitnih skupina s amino supstituiranih benzamida u svrhu pripreve hidroksi supstituiranih derivata, provedeno je prema već opisanom postupku iz spojeva **19** i **20**.



Shema 10.

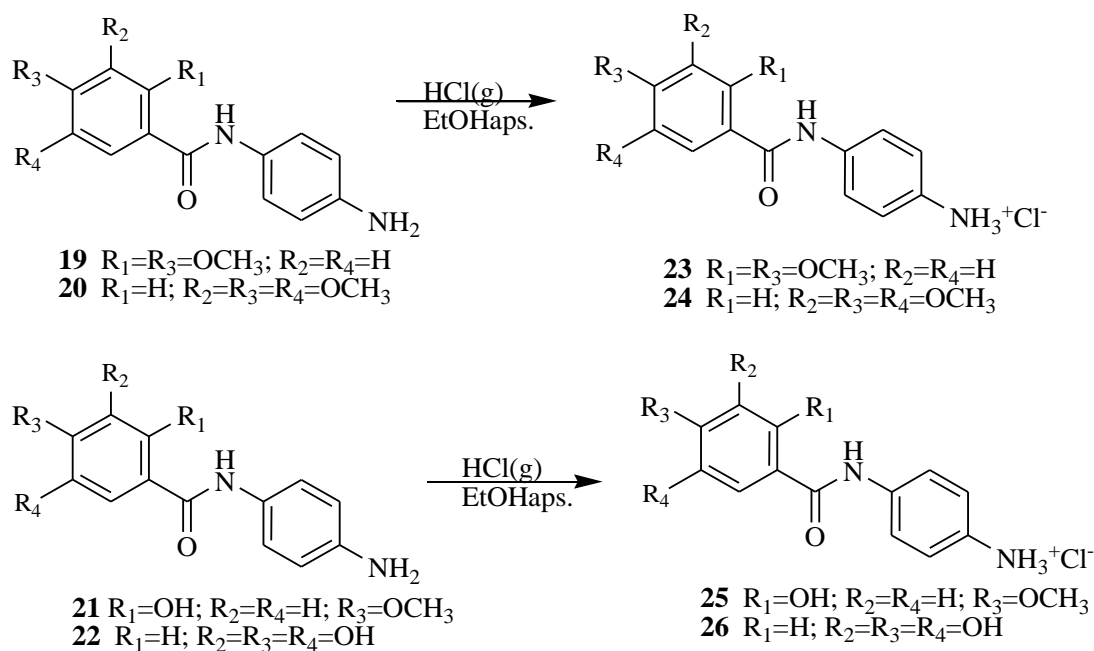
Uklanjanje metoksi zaštitnih skupina uspješno je provedeno te su produkti **21** i **22** izolirani u iskorištenjima od 42,1% i 61,2% a njihove su strukture potvrđene ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom.



Slika 31. ^1H NMR 2-hidroksi-4-metoksi-N-(4aminofenil)benzamida **21**

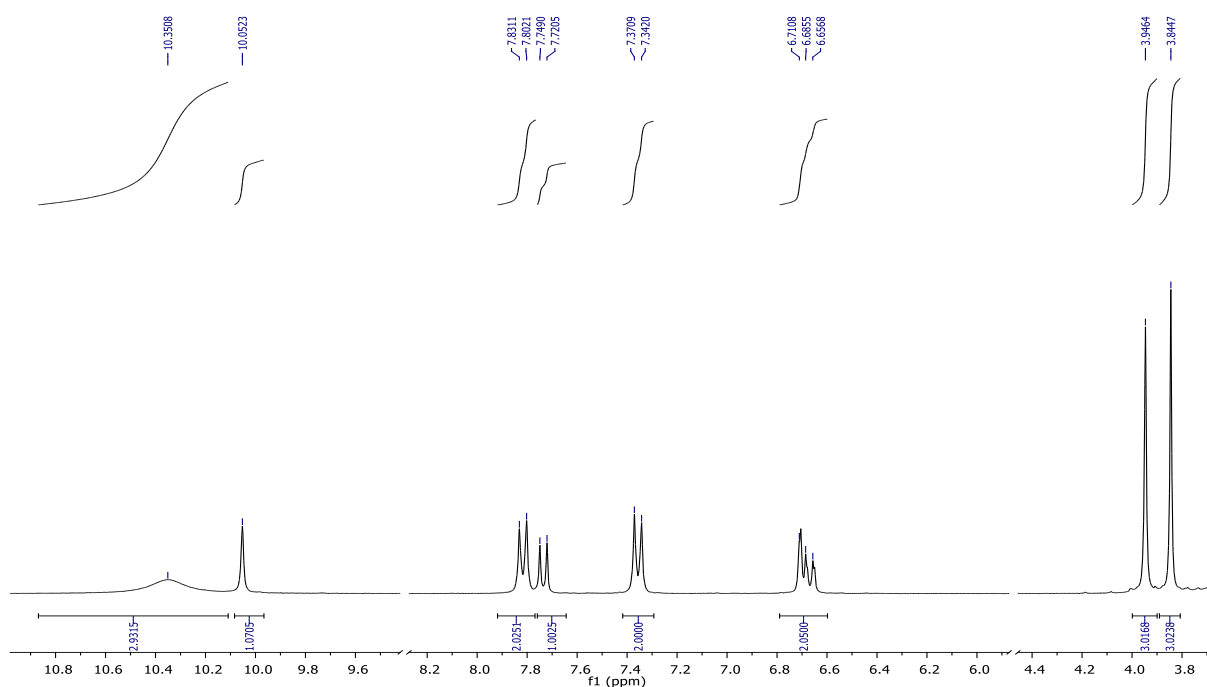
U strukturi spoja 2-hidroksi-4-metoksi-N-(4aminofenil)benzamida **21** uspješno je uklonjena samo zaštitna skupina u položaju 2. Na 3,80 ppm može se uočiti signal koji odgovara protonima jedne metoksi skupine, što je potvrda pretpostavke da je ovom sintetskom metodom uspješno uklonjena samo jedna zaštitna skupina. U području od 8,00 ppm do 6,51 ppm mogu se uočiti karakteristični signali aromatskih protona. Signal OH skupine nalazi se na 12,27 ppm, signal na 10,36 ppm pripada protonu amidne veze, a signal na 9,82 ppm odgovara protonima amino skupine.

Nakon toga provedena je reakcija protoniranja amino supstituiranih benzamida **19**, **20**, **21** i **22** u apsolutnom etanolu zasićenom sa HCl-om pri čemu su dobivene hidrkloridne soli **23**, **24**, **25** i **26** u iskorištenjima 41,7%, 63,7%, 68,1% i 35,9%.

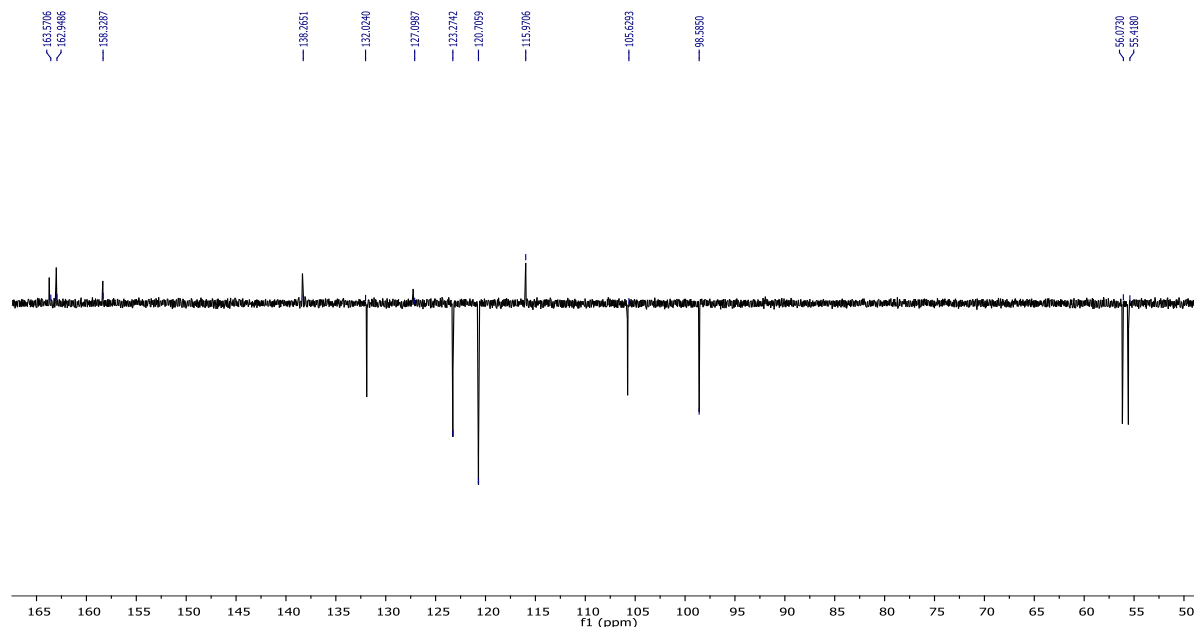


Shema 11.

Na Slici 32 prikazan je ^1H NMR 2,4-dimetoksi-*N*-(4-aminofenil)benzamid-hidroklorida **23**. Široki singlet na 10,26 ppm pripada protonima amino protonirane skupine, singlet na 10,05 ppm pripada protonu amidne veze, a u području od 7,82 ppm do 6,67 ppm nalaze se signali aromatskih protona. U alifatskom području spektra nalaze se dva signala koji odgovaraju protonima dviju zaštitnih metoksi skupina.

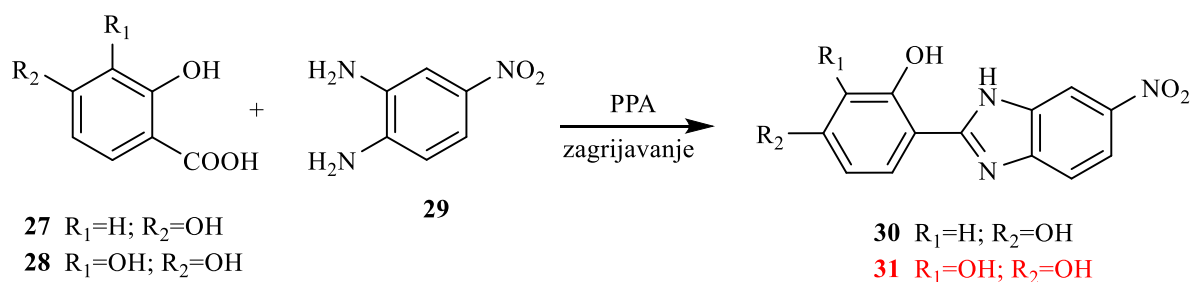
Slika 32. ^1H NMR 2,4-dimetoksi-*N*-(4-aminofenil)benzamid-hidroklorida **23**

Dodatnu potvrdu strukture dobivenog 2,4-dimetoksi-*N*-(4-aminofenil)benzamid-hidroklorida **23** dao je ^{13}C NMR prikazan na Slici 33 u kojem se može uočiti odgovarajući broj signala kvaternih i aromatskih CH ugljikovih atoma te signali metoksi skupina na 56,07 ppm i 55,42 ppm.



Slika 33. ^{13}C NMR 2,4-dimetoksi-*N*-(4-aminofenil)benzamid-hidroklorida **23**

Reakcijom kondenzacije odgovarajuće benzojevih kiselina **27** i **28** i 4-nitro-1,2-fenilendimina **29** uz dodatak PPA priređen je 5(6)-nitro-2-(2,4-dihidroksifenil)benzimidazol **30** kao jedan od ciljanih hidroksi derivata nitro supstituiranih benzimidazola u iskorištenju od 69,9% kao smjesa tautomera, dok spoj **31** nije uspješno izolirani ovom sintetskom metodom.

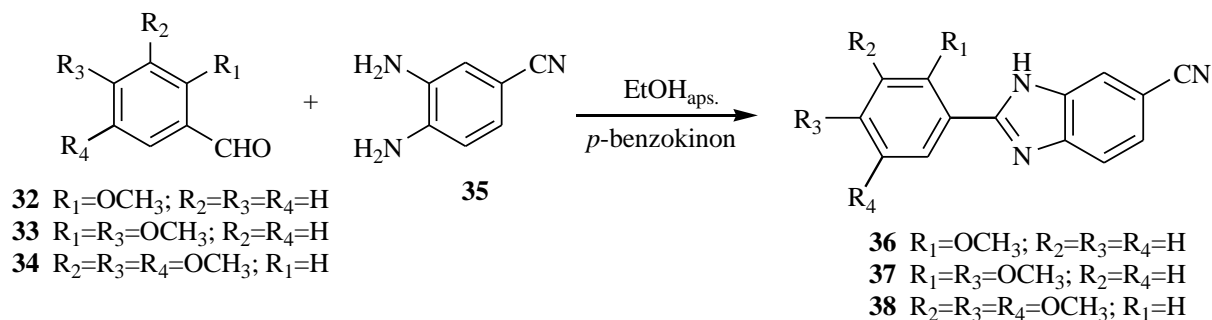


Shema 12.

Struktura novopriređenog spoja potvrđena je korištenjem ^1H NMR spektroskopije.

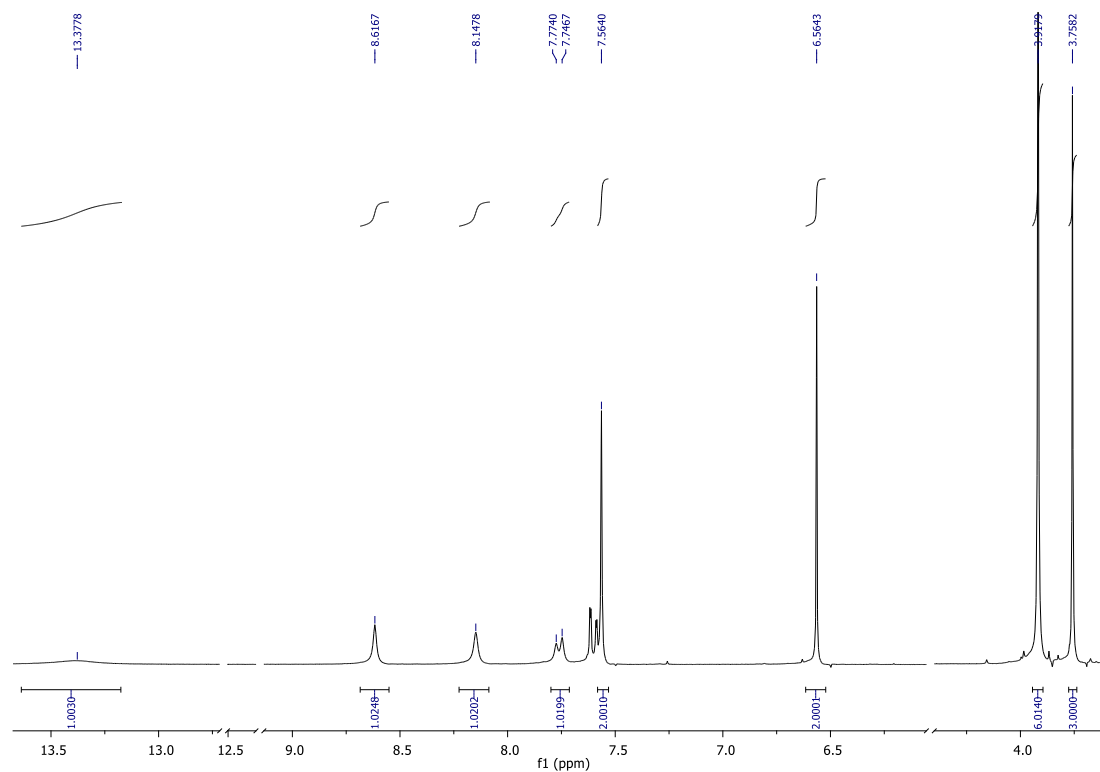
Reakcije kondenzacije odgovarajućeg metoksi supstituiranog benzaldehida **32-34** i 4-cijano-1,2-fenilendimina **29** provedene su u apsolutnom etanolu uz dodatak *p*-benzokinona prema

Shemi 13.³⁰ Benzimidazoli **36**, **37** i **38** sintetizirani su u iskorištenjima od 53,9%, 74,7% i 39,7%.



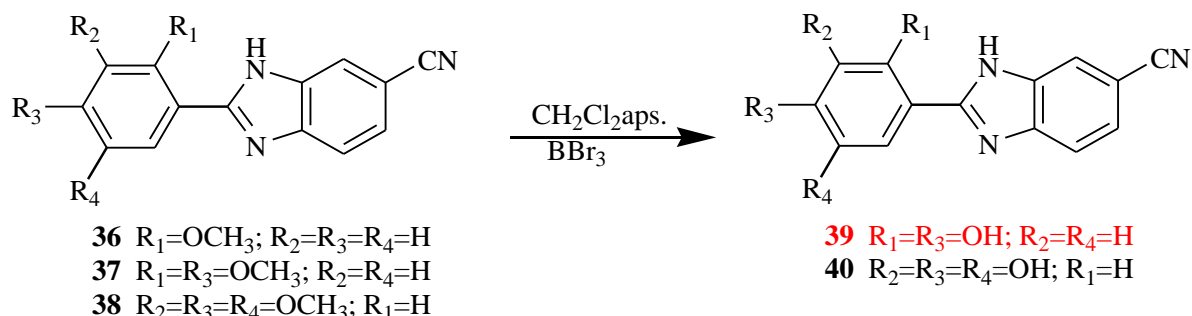
Shema 13.

Slika 34 prikazuje ¹H NMR spektar 5(6)-cijano-2-(2,3,4-trimetoksiifenil)benzimidazola **38**. U alifatskom dijelu spektra može se uočiti signal na 3,76 ppm koji odgovara protonima zaštitne OCH₃ skupine. Na 3,92 ppm nalazi se signal intenziteta šest protona koji odgovara protonima dvije zaštitne OCH₃ skupine. U području od 8,62 ppm do 7,56 ppm nalazi se odgovarajući broj signala aromatskih protona. U nezasjenjenom dijelu spektra na 13,38 ppm nalazi se proton amidne veze.



Slika 34. ¹H NM 5(6)-cijano-2-(2,3,4-trimetoksiifenil)benzimidazola **38**.

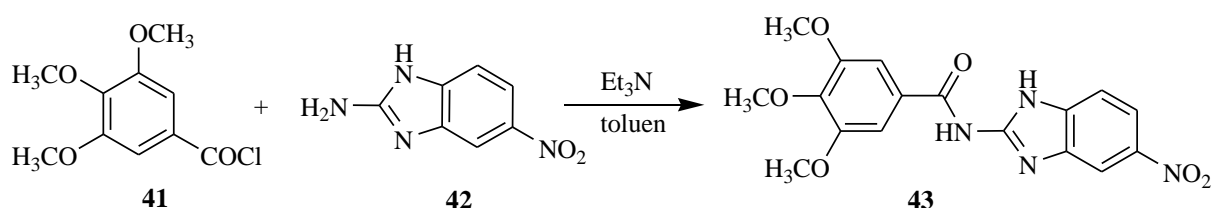
Slijedeći stupanj u sintezi bilo je uklanjanje zaštitne skupine u svrhu sinteze hidroksi supstituiranih derivata. Amidi **37** i **38** otopljeni su u apsolutnom diklormetanu, ohlađeni na -78°C te je u atmosferi argona dodan reagens BBr_3 . Metoksi zaštitne skupine uspješno su uklonjene te je dobiven produkt **40** u iskorištenju od 57,8% dok spoj **39** nije uspješno izoliran.



Shema 14.

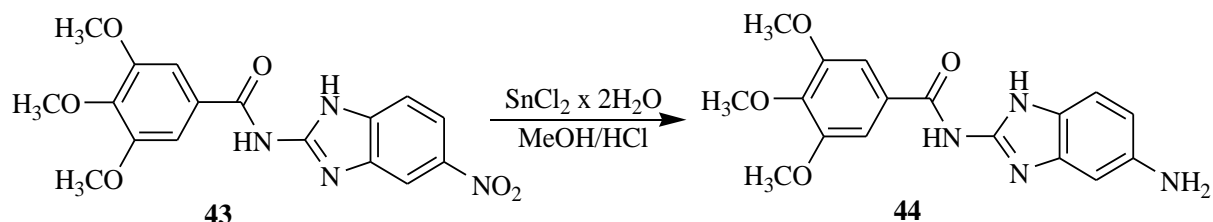
Struktura novo priređenog spoja potvrđena je korištenjem ^1H NMR spektroskopije.

Reakcijom kondenzacije odgovarajućeg metoksi supstituiranog benzoil-klorida **41** s 2-amino-5-nitrobenzimidazolom **42** u apsolutom toluenu, uz dodatak trietilamina priređen je 3,4,5-trimetoksi-*N*-[5(6)-nitrobenzimidazol-2-il]benzamid **43** u iskorištenju od 59,6%.



Shema 15.

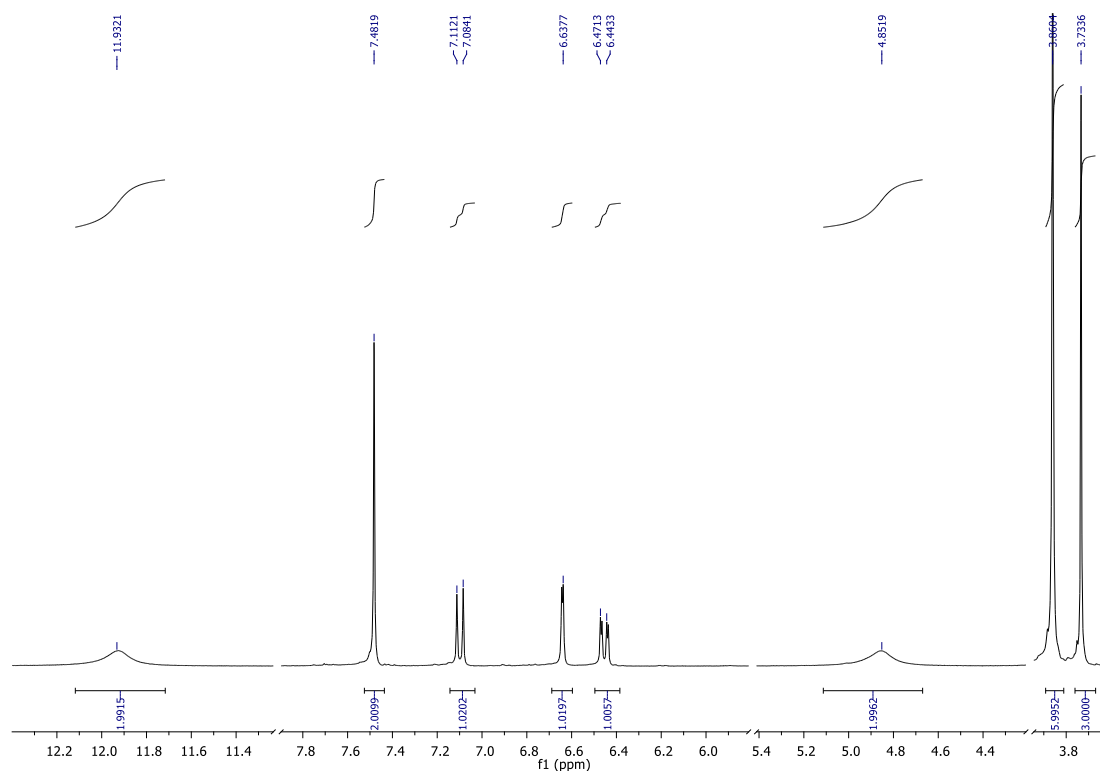
Nitro supstituirani metoksi amid **43** podvrgnut je redukciji s $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}^{31}$ u smjesi metanola i klorovodične kiseline pri čemu je dobiven odgovarajući amino supstituirani metoksi amid **44**, u iskorištenju 90,1% prema Shemi 16.



Shema 16.

Struktura dobivenog spoja potvrđena je korištenjem ^1H i ^{13}C NMR spektroskopije. Na Slici 35 prikazani je ^1H NMR spektar 3,4,5-trimetoksi-*N*-[5(6)-aminobenzimidazol-2-il]benzamida **44**.

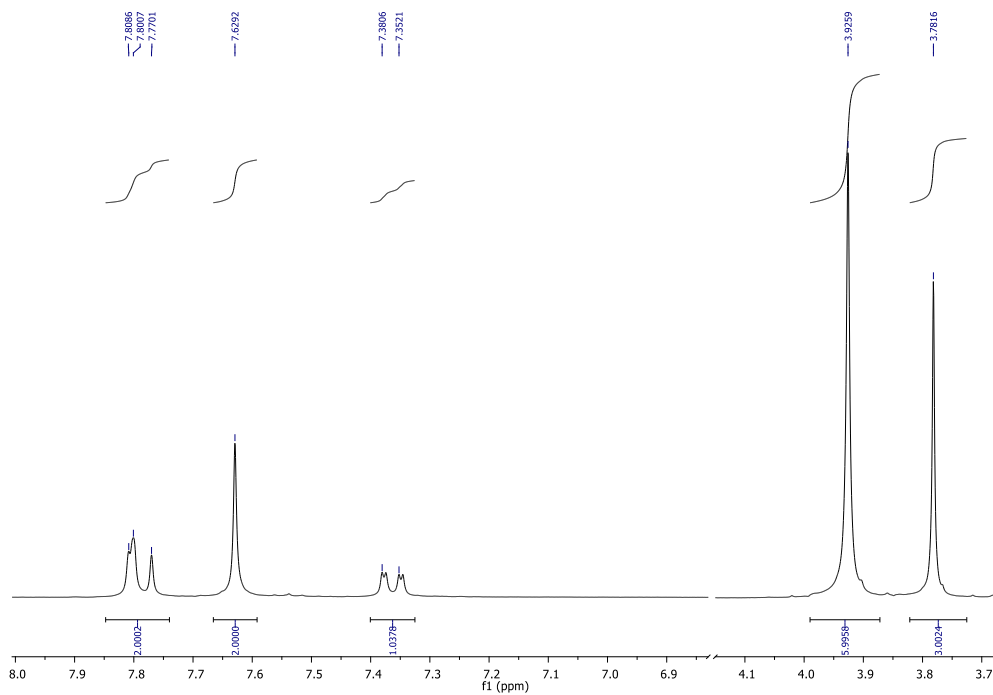
Signal NH skupine benzimidazola i NH skupine amidne veze nalaze se na 11,93 ppm. U području od 7,48 ppm do 6,46 ppm nalaze se signali aromatskih protona a na 3,86 ppm i 3,73 ppm signali protona tri metoksi skupine. U odnosu na spektar nitro supstituiranog amida pojavljuje se signal na 4,85 ppm koji odgovara intenzitetu dva protona amino skupine.



Slika 35. ^1H NMR spektar 3,4,5-trimetoksi-*N*-[5(6)-aminobenzimidazol-2-il]benzamida **44**.

Slijedeći stupanj u sintezi bilo je uklanjanje zaštitne skupine u svrhu sinteze hidroksi supstituiranih derivata.³² Amidi **44** otopljen je u apsolutnom diklormetanu, ohlađeni na $-78\text{ }^\circ\text{C}$ te je u atmosferi argona dodan reagens BBr_3 . Spoj **45** nije uspješno izoliran.

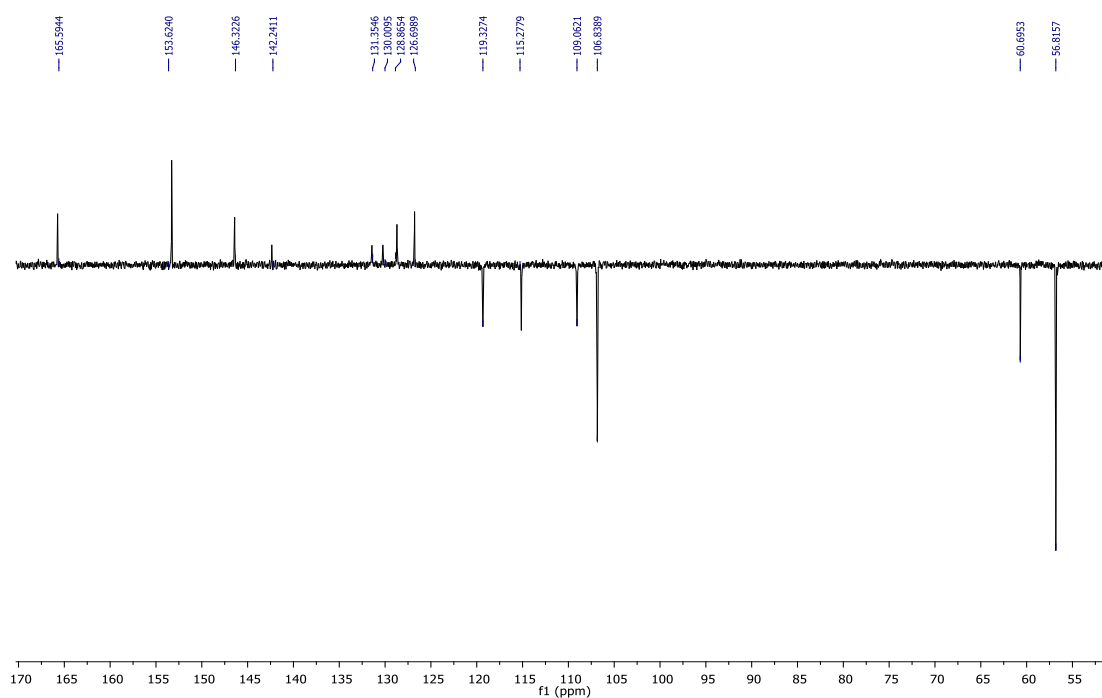
Amino supstituirani benzamid **44** protonira se prema već opisanom postupku pri čemu je dobiven 3,4,5-trimetoksi-*N*-[5(6)-aminobenzimidazol-2-il]benzamid-hidroklorid **46** u iskorištenju od 90,9%. Spektar spoja **46** prikazan je na Slici 36.



Slika 36. ^1H NMR 3,4,5-trimetoksi-N-[5(6)-aminobenzimidazol-2-il]benzamid-hidroklorida

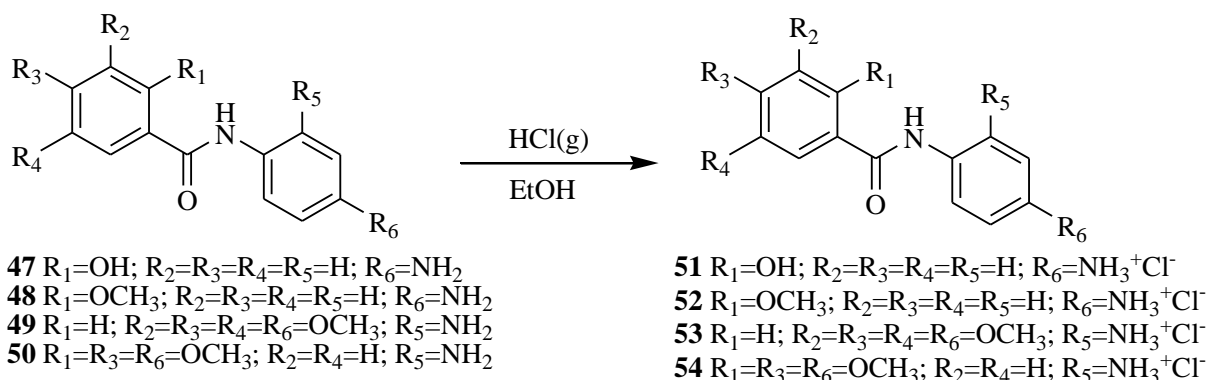
46

Dodatnu potvrdu strukture spoja **46** dao je ^{13}C NMR spektar prikazan na Slici 37 u kojem se može uočiti odgovarajući broj signala kvaternih i aromatskih CH ugljikovih atoma te signali metoksi skupina na 60,69 ppm i 56,81 ppm koji odgovara signalu za dvije metoksi skupine.



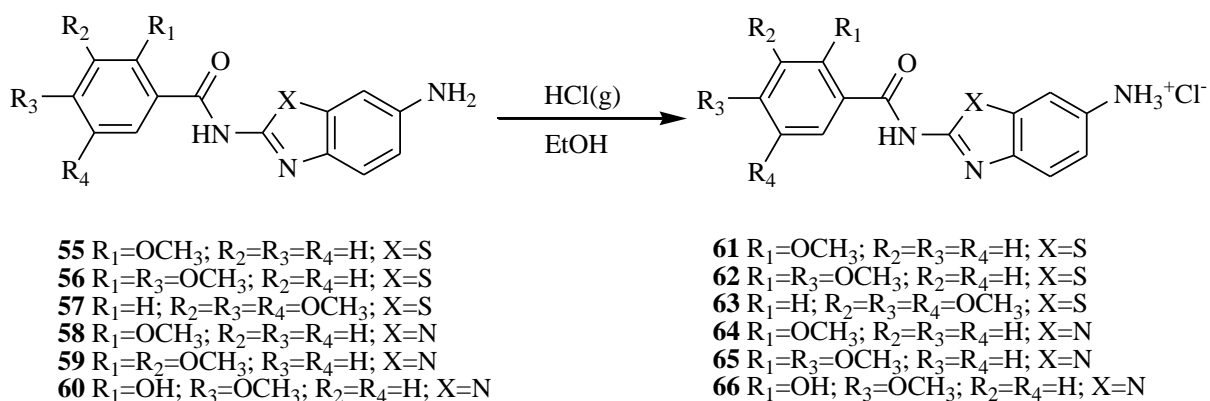
Slika 37. ^{13}C NMR spektar spoja **46**.

Sinteza hidrokloridnih soli benzamida **51**, **52**, **53** i **54**, metoksi supstituiranih benzotiazola **61**, **62** i **63** i benzimidazola hidroklorida **64**, **65** i **66** provedena je u apsolutnom etanolu zasićenom sa HCl-om.



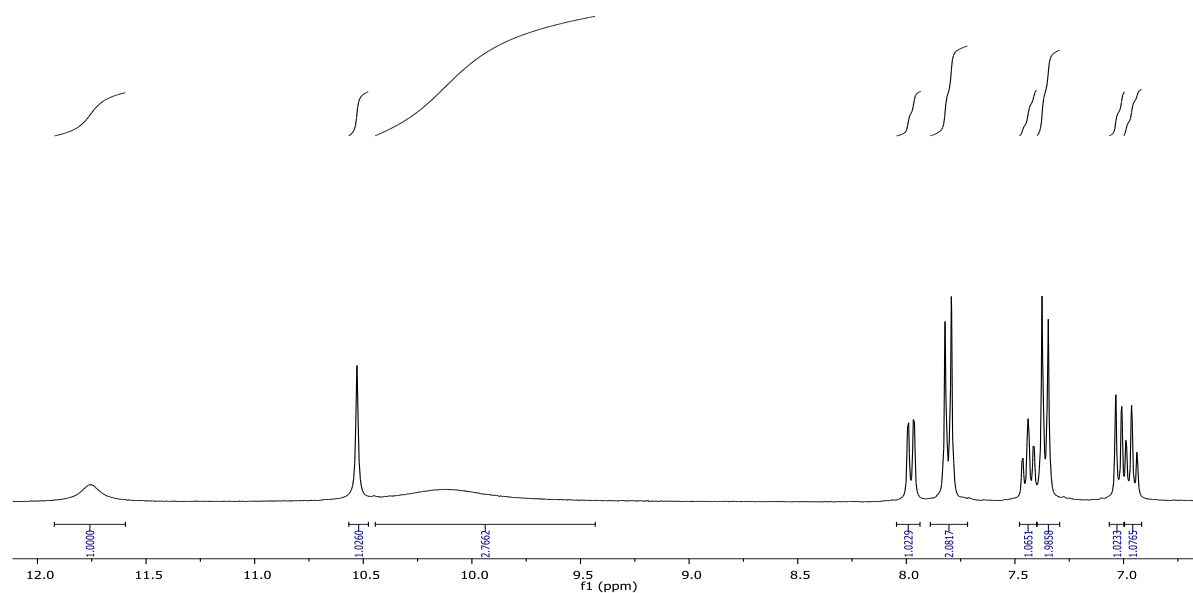
Shema 17.

Hidrokloridi benzamida **51**, **52**, **53** i **54** priređeni su s iskorištenjem 74,7%, 75,8%, 58,6% i 23,8%. Hidrokloridi benzotiazola **61**, **62**, i **63** dobiveni su u vrlo visokim iskorištenjima 93,1%, 93,9% i 87,1%. Hidrokloridi benzimidazola **64**, **65**, i **66** dobiveni su u iskorištenjima 85,0%, 48,4% i 59,0%.



Shema 18.

Njihove strukture potvrđene su korištenjem 1H i ^{13}C NMR spektroskopije. Na Slici 38 prikazan je 1H NMR spektar 2-hidroksi-*N*-(4-aminofenil)benzamid-hidroklorida **51**.



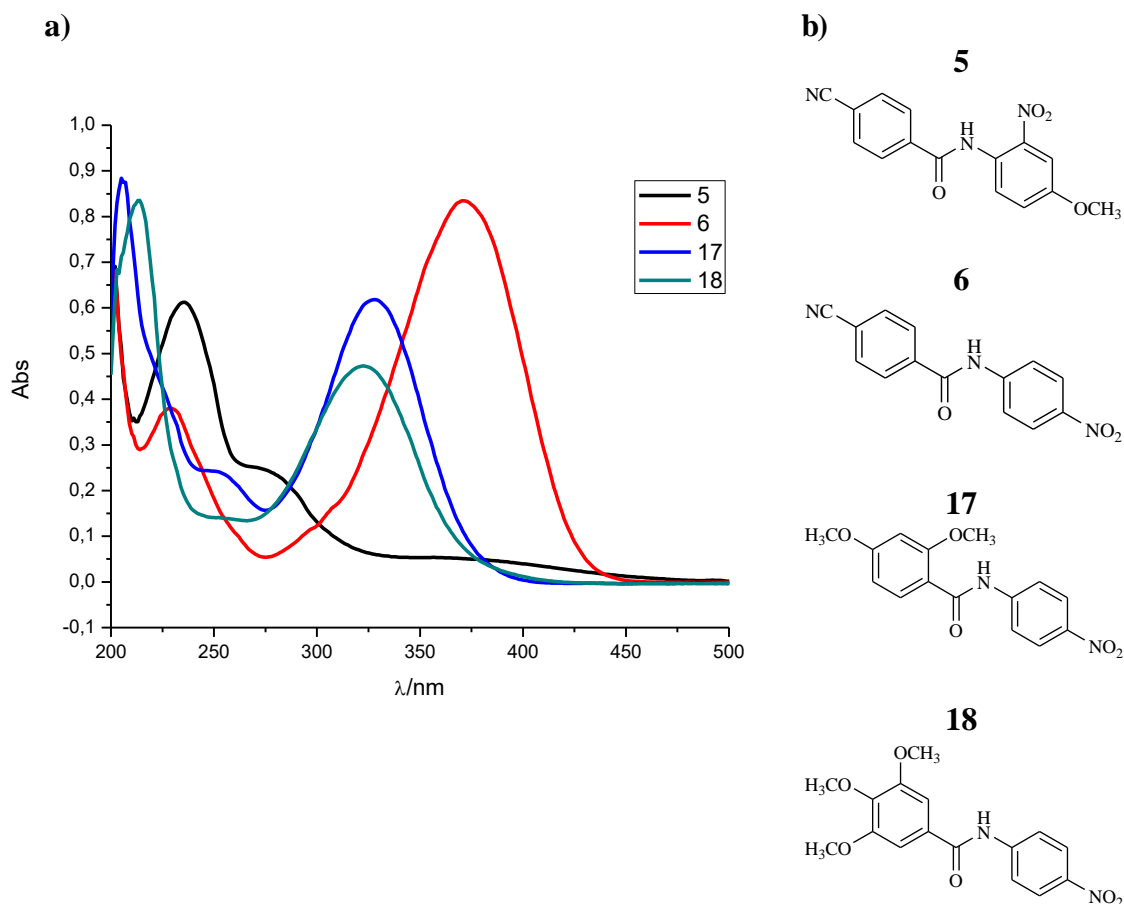
Slika 38. ^1H NMR spektar 2-hidroksi-N-(4-aminofenil)benzamid-hidroklorida **51**

U nezasjenjenom dijelu spektra na 11,75 ppm nalazi se signal protona hidroksi skupine, a na 10,53 ppm nalazi se signal protona amidne veze. Na 10,14 ppm nalazi se široki singlet koji odgovara NH₃⁺Cl⁻ skupini. U području od 7,98 ppm do 6,96 ppm nalazi se odgovarajući broj signala aromatskih protona.

3.3. Spektroskopska karakterizacija UV/Vis spektroskopijom

3.3.1. Kvantitativni UV/Vis spektri

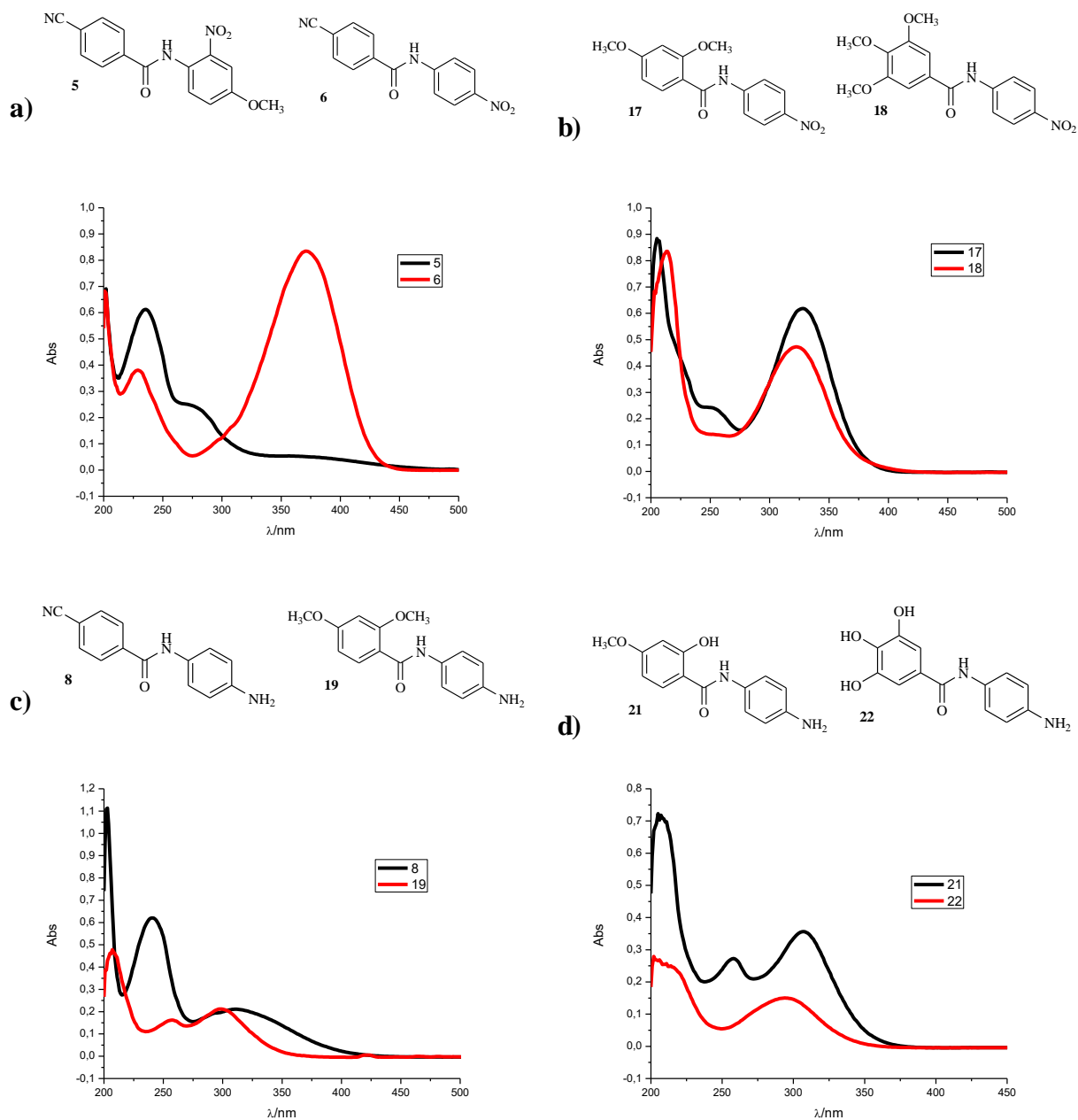
UV/Vis apsorpcijski spektri svih odabranih metoksi- i hidroksi- supstituiranih derivata snimljeni su pri istoj koncentraciji od 2×10^{-5} mol/dm³ u metanolu. Usporedni apsorpcijski spektri nitro supstituiranih derivata **5**, **6**, **17** i **18** snimljeni pri danjoj koncentraciji u metanolu prikazani su na Slici 39.



Slika 39. a) Apsorpcijski spektar spojeva **5**, **6**, **17** i **18** u metanolu b) strukture spojeva

Iz prikazanog spektra može se zaključiti da najveći intenzitet apsorpcije pokazuje cijano supstituirani derivat, *p*-cijano-*N*-(4-nitrofenil)benzamid **6**, s maksimumom apsorpcije na 370 nm koji ujedno pokazuje najizraženiji hiperkromni pomak intenziteta apsorpcije i batokromni pomak maksimuma apsorpcije u odnosu na ostale ispitane spojeve. Dimetoksi supstituirani derivat **17** pokazuje jedan izraženi maksimum apsorpcije na 327 nm. Slični batokromni pomak za ~5 nm maksimuma apsorpcije u odnosu na spoj **17** pokazuje 3,4,5-trimetoksi-*N*-(4-

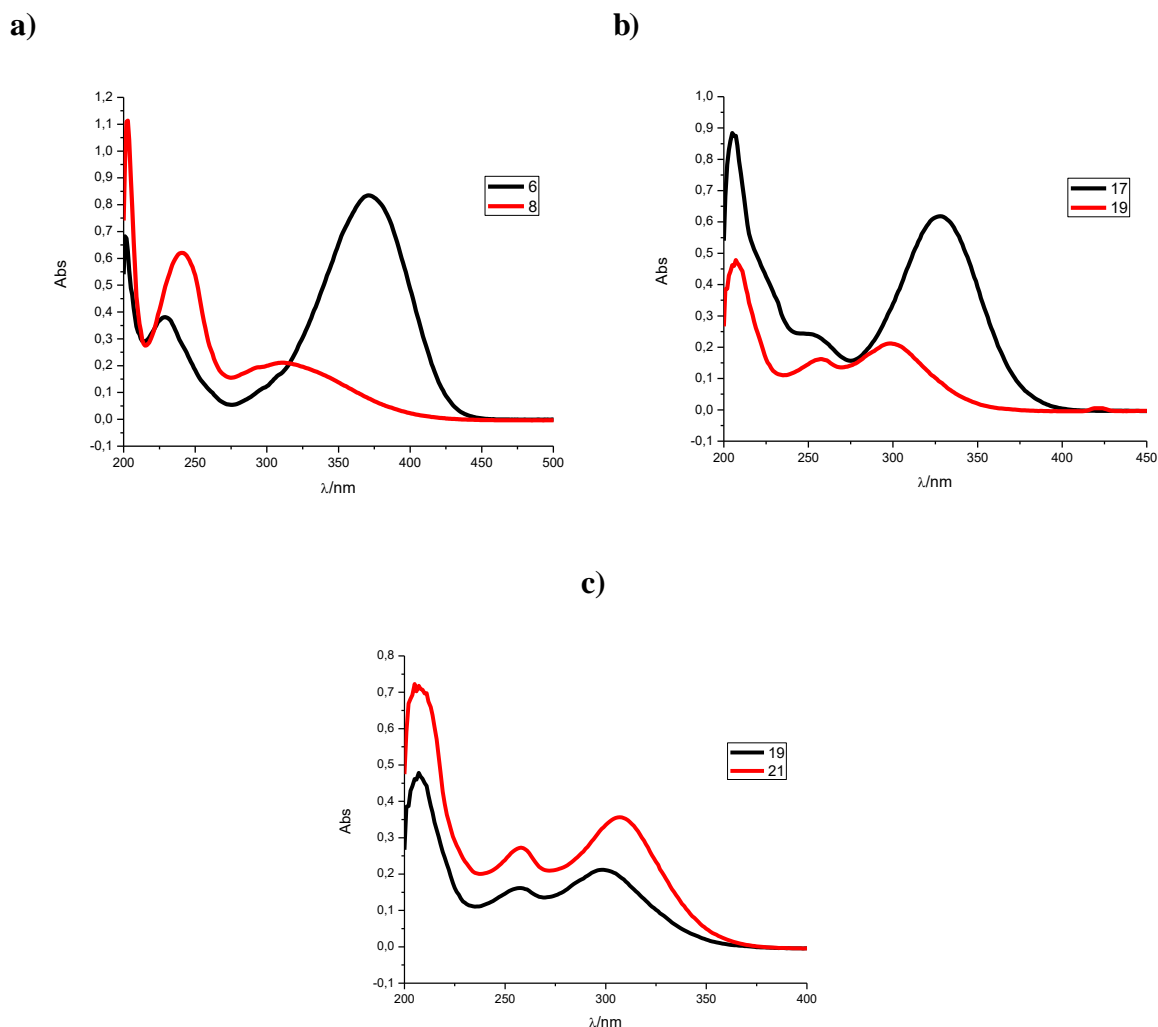
nitrofenil)benzamid **18**. *p*-cijano-*N*-(4-metoksi-2-nitrofenil)benzamid **5** pokazuje izraženi hipsokromni pomak u odnosu na ostale ispitane spojeve čiji je maksimum apsorpcije na 235 nm.



Slika 40. Usporedni UV/Vis apsorpcijski spektri u metanolu: a) cijano derivata, b) metoksi derivata, c) amino derivata i d) hidroksi derivata

- a) Uspoređivanjem spektara spojeva **5** i **6** možemo zaključiti da prisustvo metoksi skupine u spoju **5** uzrokuje hipsokromni pomak maksimuma apsorpcije te hipokromni pomak intenziteta apsorpcije.
- b) Uspoređivanjem spektara spojeva **17** i **18** možemo zaključiti da intenzitet apsorpcije dimetoksi supstituiranog derivata **17** pokazuje blagi hiperkromni i batokromni pomak u odnosu na trimetoksi supstituirani derivat **18**.
- c) Uspoređivanjem spektara spojeva **8** i **19** možemo zaključiti da prisustvo cijano skupine kod spoja **8** uzrokuje batokromni pomak i hiperkromni pomak intenziteta apsorpcije oko 250 nm.
- d) Uspoređivanjem spektara spojeva **21** i **22** možemo zaključiti da prisustvo metoksi skupine u spoju **21** pokazuje snažan hiperkromni i blagi batokromni pomak u odnosu na spoj **22** kod kojeg su prisutne samo hidroksi skupine.

Na Slici 41 prikazani su UV apsorpcijski spektri spojeva **6**, **8**, **17**, **19** i **21**.



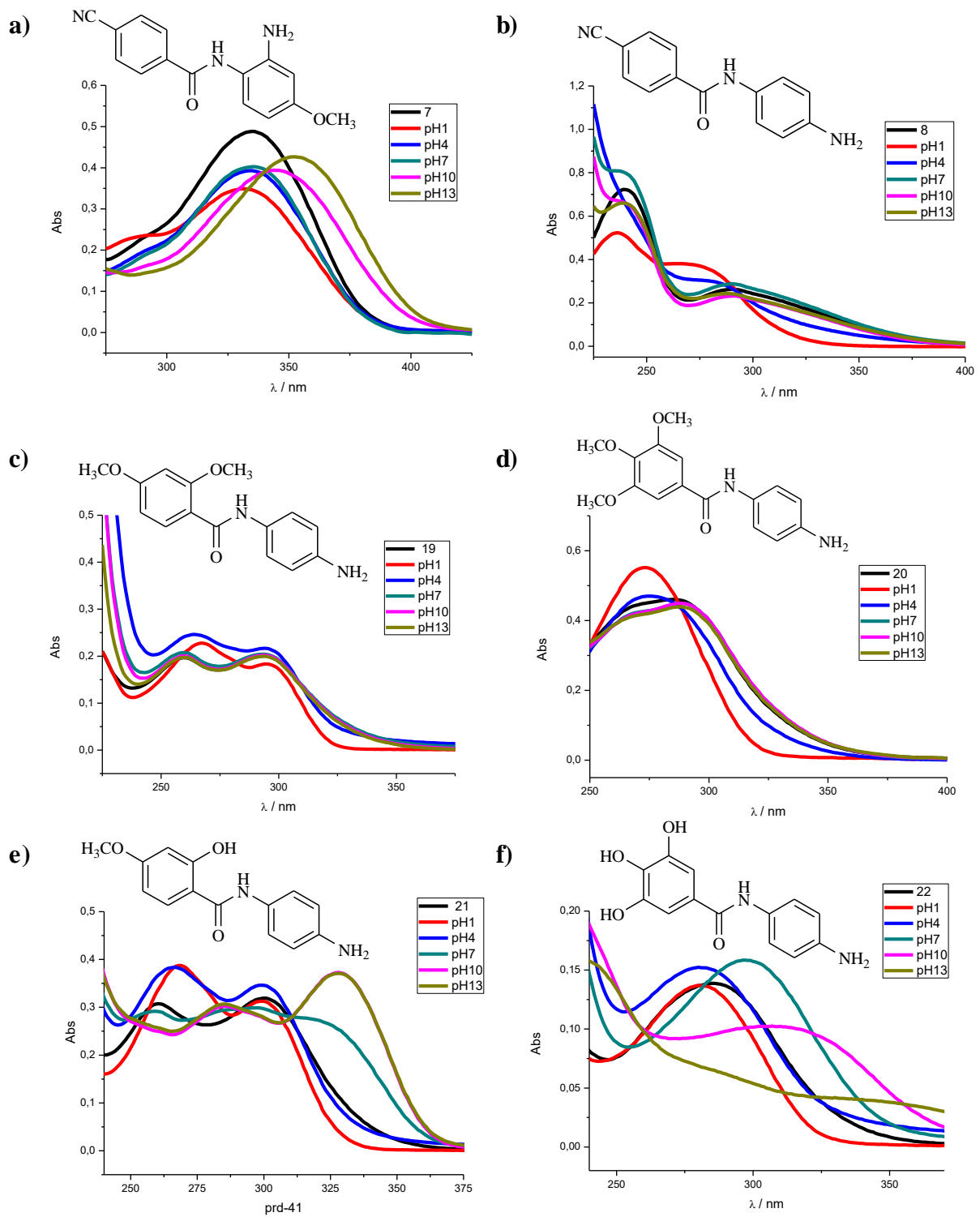
Slika 41. Usporedni UV/Vis apsorpcijski spektri spojeva a) **6** i **8** b) **17** i **19** c) **19** i **21**

- a) Uspoređivanjem spektara spojeva **6** i **8** možemo zaključiti da prisustvo nitro skupine spoja **6** uzrokuje izraženi batokromni i hiperkromni pomak u odnosu na amino skupinu spoja **8**.
- b) Uspoređivanjem spektara spojeva **17** i **19** možemo zaključiti da intenzitet apsorbancije spoja **19** zbog prisustva NH₂ skupine pokazuje značajan hipokromni pomak te izraženi hipsokromni pomak maksimuma apsorbancije u odnosu na spoj **17**.
- c) Uspoređivanjem spektara spojeva **19** i **21** možemo zaključiti da prisustvo OH skupine spoja **21** uzrokuje blagi hiperkromni i batokromni pomak u odnosu na spoj **19**.

3.3.2. Utjecaj pH na spektroskopska svojstva spojeva **7, 8, 19, 20, 21** i **22**

Kako bi se ispitala mogućnost primjene spojeva **7, 8, 19, 20, 21** i **22** kao optičkih pH senzora, ispitana je promjena njihovih spektroskopskih svojstava ovisno o vrijednosti pH otopine korištenjem UV/Vis spektroskopije. Snimljeni su apsorpcijski spektri ispitivanih spojeva u otopinama univerzalnog pufera i metanola različitih vrijednosti pH. Kiselo bazna svojstva u otopinama univerzalnog pufera različitih vrijednosti pH prikazana su na Slici 42.

Iz dobivenih rezultata može se uočiti značajna promjena spektroskopskih svojstava ispitivanih spojeva kod različitih vrijednosti pH. Iz apsorpcijskih spektara odabranih spojeva vidljivo je da promjenom pH vrijednosti pufera dolazi do značajne promjene u intenzitetu apsorbancije i pomaka maksimuma apsorbancije. U apsorpcijskom spektru spoja **7** pri pH 1 dolazi do izrazito g hipokromnog pomaka intenziteta apsorbancije, a porastom pH na 13 dolazi do batokromnog pomaka maksimuma apsorbancije na 351 nm. U apsorpcijskom spektru spoja **8** pri pH 1 pojavljuju se dva maksimuma apsorbancije na 235 nm i 265 nm. U lužnatom mediju dolazi do blagog hipokromnog pomaka maksimuma apsorbancije. Iz apsorpcijskih spektara spojeva **19** i **20** vidljivo je da u kiselom mediju dolazi do hipsokromnog pomaka. Iz spektra spoja **21** vidljivo je da u kiselom mediju dolazi do hipsokromnog pomaka dok u lužnatom mediju dolazi do hiperkromnog pomaka intenziteta apsorbancije i izraženog batokromnog pomaka maksimuma apsorbancije na 328 nm. Iz apsorpcijskog spektra spoja **22** najizraženiji hiperkromni i batokromni pomak intenziteta apsorbancije pojavljuje se u neutralnom mediju (pH=7). U lužnatom mediju dolazi do značajnog pada intenziteta apsorbancije.

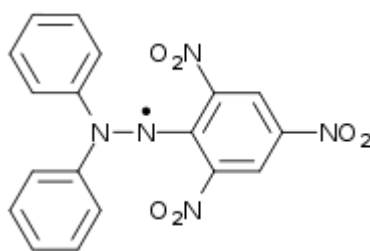


Slika 42. Apsorpcijski spektri spoja a) 7, b) 8, c) 19, d) 20, e) 21 i f) 22 u otopinama univerzalnog pufera različitih vrijednosti pH

3.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti

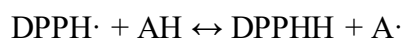
3.4.1. DPPH metoda

Antioksidansi su molekule koje kontroliraju odnos između stanja reduciranja ili oksidiranja u biološkom sustavu te ako su prisutne u niskim koncentracijama, u usporedbi s koncentracijama oksidativnog supstrata, značajno zadržavaju ili priječe oksidaciju tog supstrata. Takve molekule onemogućuju stvaranje novih slobodnih radikala u organizmu ili uništavaju u organizmu već stvorene radikale. Male organske molekule oksidansa djeluju kao "čistači" slobodnih radikala, odnosno pretvaraju nezasićene molekule radikala u zasićene, odnosno inaktivne oblike koji nisu opasni za normalno funkcioniranje organizma. Prema podrijetlu ih možemo podijeliti na prirodne i sintetske antioksidanse. Najznačajniji prirodni antioksidansi su vitamin C (askorbinska kiselina), vitamin E (tokoferol), fenolni spojevi, dok je najjači prirodni antioksidans astaksantin. Antioksidativna svojstva odabranih spojeva određena su DPPH metodom, odnosno metodom gašenja DPPH• radikala doniranim atomom vodika od strane potencijalnog antioksidansa. Metoda DPPH (engl. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) je metoda "hvatanja" slobodnih DPPH radikala. Metoda se zasniva na sposobnosti stabilnog slobodnog radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH•) da reagira s vodik donorom. DPPH je dušikov radikal koji na jednom atomu dušikovog mosta sadrži nespareni elektron (Slika 43).

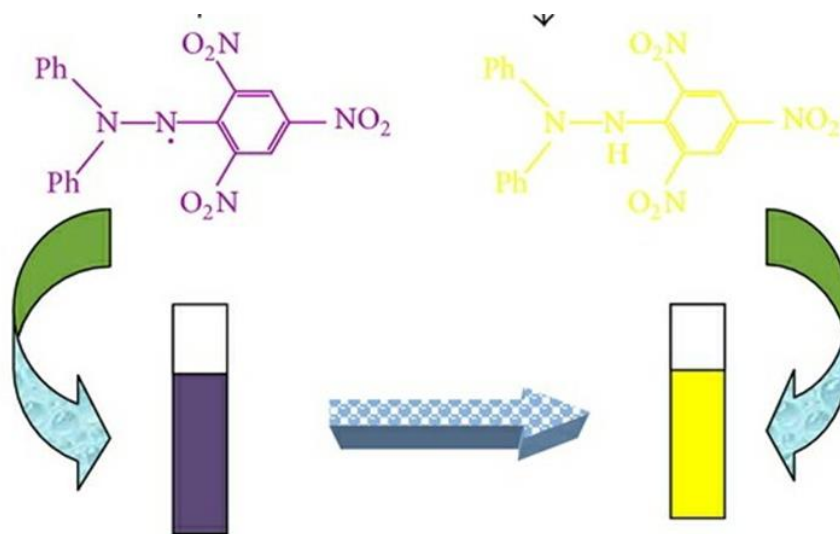


Slika 43. Struktura 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH•)

Mehanizam reakcije se zasniva na donaciji atoma vodika DPPH•radikalu od strane antioksidansa (AH). Tad nastaje DPPHH, a antioksidans postaje radikal (A•).



DPPH intenzivno apsorbira u vidljivom dijelu spektra pri valnoj duljini od 517 nm. Kad prijeđe u DPPH oblik dolazi do smanjenja apsorpcije, a kao posljedica njegove redukcije s antioksidansom dolazi do promjene boje iz intenzivno ljubičaste u žutu (Slika 44).



Slika 44. Promjena boje otopine pri doniranju vodikovog atoma sa strane antioksidansa DPPH• radikalu

Reakcija se prati spektrofotometrijski pri 517 nm. Nakon 30 minuta mjerenja očita se apsorbanca te se računa postotak inhibicije radikala prema Izrazu 1.

$$\% \text{ inhibicije DPPH}\cdot = \frac{(A_{C(0)} - A_{A(t)})}{A_{C(0)}} \cdot 100 \quad (1)$$

Gdje je

$A_{C(0)}$ = apsorbanca kontrole (otopina DPPH• radikala) kod $t = 0$ minuta

$A_{A(t)}$ = apsorbanca reakcijske smjese nakon $t = 30$ minuta.

Mjerenje se izvodi korištenjem višekanalnog čitača mikrotitarskih pločica (ELISA, bio-tek instruments inc.) s automatskim miješanjem i snimanjem podataka na računalu. U 100 μL otopine spojeva različitih koncentracija dodano je 100 μL DPPH ($c_{\text{DPPH}} = 100 \mu\text{mol/mL}$) i ostavljeno je 30 minuta na tamnom mjestu na sobnoj temperaturi. Koncentracija DPPH je ista u svakom uzorku i iznosi 100 $\mu\text{mol/mL}$. Promjena apsorbanca očitana je na ELISA čitaču na 517nm. 96%-tni etanol uzet je kao slijepa proba. Za odabrane spojeve izračunata je IC_{50} vrijednost, odnosno koncentracija antioksidansa koja uzrokuje 50% inhibicije DPPH. Niža vrijednost IC_{50} predstavlja veću efikasnost antioksidansa.

Postotak inhibicije DPPH radikala računa se prema Izrazu 1. Sva mjerenja rađena su u triplikatu.³³ Rezultati dobiveni ispitivanjem antioksidativne aktivnosti odabranih spojeva prikazani su u Tablici 4 a kao standard korišten je BHT (2,6-bis(1,1-dimetiltili)-4-metilfenol).

Tablica 4. Rezultati inhibicije DPPH/ μM spojeva pri koncentraciji od 100 μM *

Spoj	DPPH/ μM	Spoj	DPPH/ μM
9	18,12 \pm 0,28	46	8,06 \pm 0,03
10	30,73 \pm 8,1	51	22,25 \pm 0,9
21	24,0 \pm 1,5	52	30,02 \pm 4,1
22	16,85 \pm 0,1	53	30,45 \pm 2,1
23	18,4 \pm 3,1	61	11,95 \pm 1,1
24	26,56 \pm 1,8	62	4,0 \pm 0,04
25	10,81 \pm 3,3	63	1,46 \pm 0,5
26	12,93 \pm 1,9	64	9,85 \pm 0,003
43	Pri 0,005M 3,3%	65	13,28 \pm 0,8
44	10,7 \pm 0,23	66	29,5 \pm 0,1
BHT	25 \pm 4.2		

*rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da najizraženiju antioksidativnu aktivnost pokazuju metoksi supstituirane hidrokloridne soli benzotiazola **62** i **63**. Uvođenje metoksi skupine u strukturu amino protoniranog benzamida **9** utjecalo je na bolju aktivnost u odnosu na analog **10**. Trihidroksi supstituirani benzamid **22** te hidroksi supstituirane hidrokloridne soli **25**, **26** i **51** pokazali su izraženiju aktivnost u odnosu na metoksi supstituirane analoge.

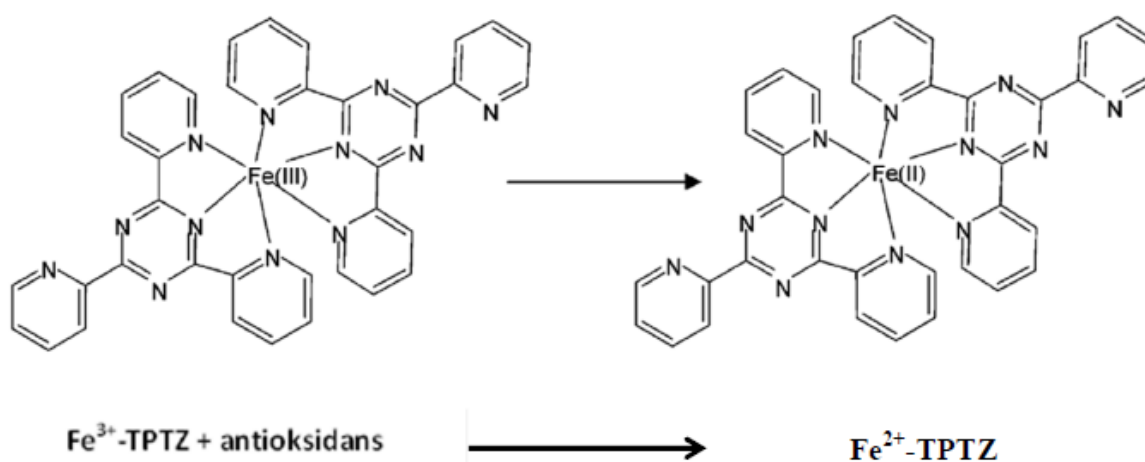
3.4.2. FRAP metoda

Mehanizam FRAP (*Ferric Reducing/Antioxidant Power*) metode temelji se na prijenosu elektrona, a kompleks željeza s 2,4,6-tripiridil-s-triazinom– Fe(III)(TPTZ)₂Cl₃ koristi se kao oksidans.³⁴

Redukcijom žuto obojenog kompleksa Fe(III)-TPTZ u Fe(II) u prisutnosti antioksidansa i pri niskom pH, reakcijska smjesa mijenja boju u plavo čiji je maksimum apsorbancije na valnoj duljini 593 nm.

Pri nižim pH vrijednostima smanjuje se ionizacijski potencijal koji omogućava prijenos elektrona, a ujedno će se povećati redoks potencijal, koji će dodatno omogućiti pomak reakcije u smjeru prijenosa elektrona.

Redoks potencijal reakcije $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ iznosi 0,77 V i svi spojevi s nižim redoks potencijalom, ulazit će u reakciju redukcije željeza te tako doprinijeti konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta.



Slika 45. Mehanizam djelovanja FRAP reakcije

Kod mjerenja aktivnosti FRAP metodom 50 μL uzorka pomiješano je sa 950 μL prethodno pripremljenog FRAP reagensa te je mjerena apsorbancija na 593 nm nakon točno 4 min. FRAP reagens se priprema miješanjem acetatnog pufera (300 mM, pH 3,6), otopine TPTZ (10 mM u 40 mM kloridnoj kiselini) te željezo (II) klorida (20 mM) u omjeru 10:1:1.

Za pripremu baždarnog pravca korišten je željezo-sulfat ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) (0-1000 μM):

$$y = 0,0009x, R^2 = 0,9941$$

Rezultati su izraženi u milimolima željezo sulfata po milimolu spoja ($\text{mmol Fe}^{2+}/\text{mmol spoja}$). Kao standard korišten je BHT (2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol).

Tablica 5. Rezultati redukcije Fe(III) u Fe(II).

Spoj	FRAP mmol(Fe ²⁺)/mmol (snoja)	Spoj	FRAP mmol(Fe ²⁺)/mmol (snoja)
9	989,11±85,02	46	267,44±1,4
10	1763,47±32,66	51	2328,80±118,03
21	1530,69±35,87	52	2307,42±63,87
22	3259,93±85,51	53	1763,47±219,52
23	1905,99±87,57	61	214,25±3,4
24	1677,96±93,2	62	244,17±3,0
25	2174,40±99,85	63	241,31±1,6
26	4856,15±70,18	64	267,23±5,0
43	89,69±6,2	65	259,14±0,6
44	1102,54±14,1	66	304,29±6,4
BHT	28.00±2.30		

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da najveću antioksidativnu aktivnost posjeduju trihidroksi supstituirani amino benzamid **22** te trihidroksi supstituirani hidrokloridna sol benzamida **26**. Kod hidrokloridnih soli benzotiazolil- i benzimidazolil-2-karboksamida ne opaža se utjecaj broja metoksi i hidroksilnih skupina na antioksidativnu aktivnost.

Ovim ispitivanjem potvrđena je **potencijalna antioksidativna aktivnost** svih ispitivanih spojeva, posebno onih amino supstituiranih te njihovih hidrokloridnih soli.

4. Eksperimentalni dio

4.1. Opće napomene

Tališta priređenih spojeva određena su na SMP11 Bibby te Kofler Mikroheiztisch aparatu i nisu korigirana.

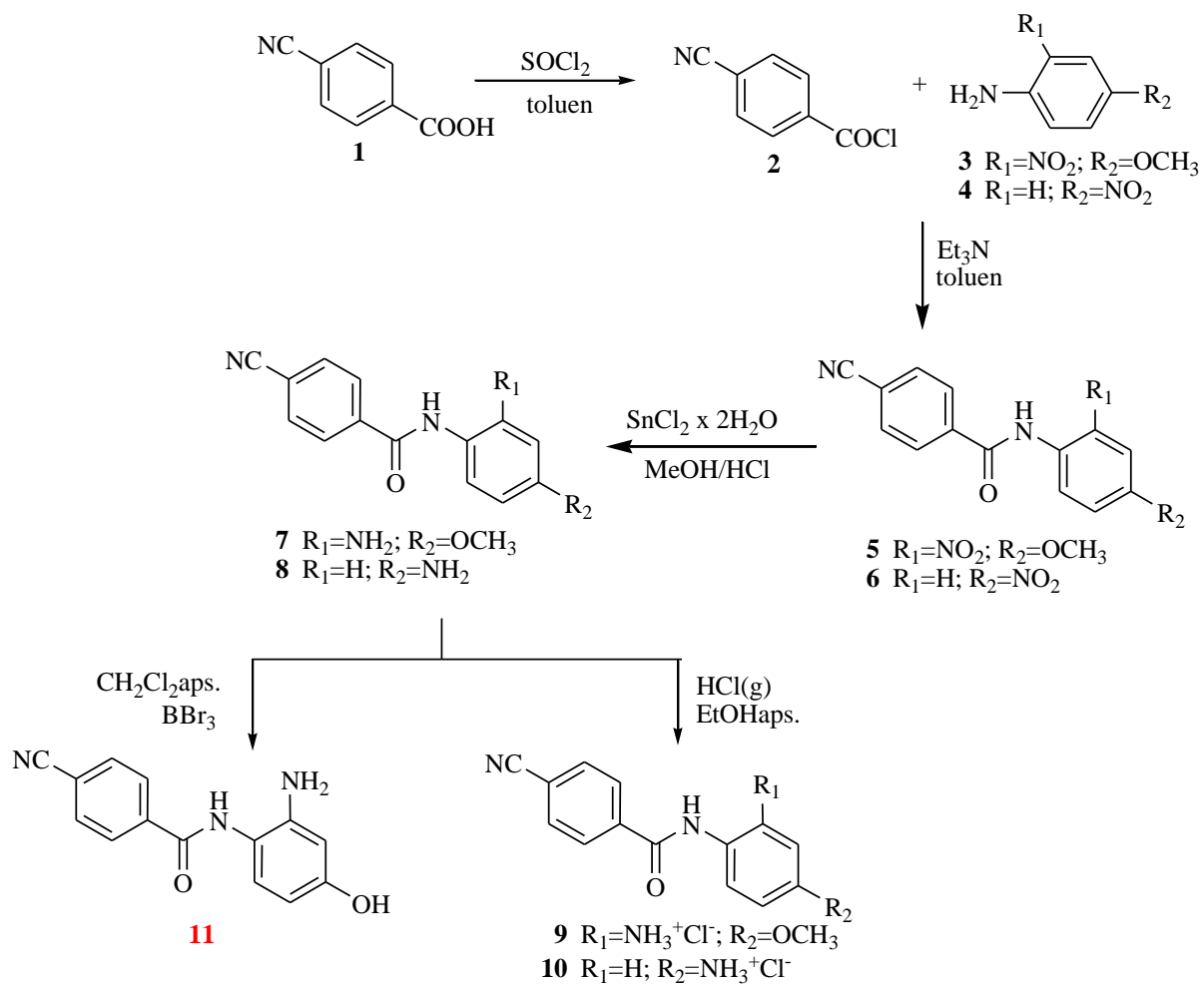
UV spektri snimljeni su na spektrofotometru Varian Cary 50, a korištena je kvarcna kiveta promjera 1 cm i volumena 3 cm³.

¹H i ¹³C NMR spektri snimljeni su na spektrometrima Bruker AV600 i Bruker AV300. ¹H NMR spektri snimani su pri 300 i 600 MHz, dok su ¹³C 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.

Kromatografska odjeljivanja provedena su na kolonama punjenim silikagelom 0,063 – 0,2 nm (Kemika, Merck).

Reakcije su provedene uobičajenim sintetskim metodama. Svi spojevi su rutinski provjeravani tankoslojnom kromatografijom (TLC) koristeći ploče presvučene silikagelom Merck 60F-254 te detektirani pod UV svjetlom (254 nm).

4.2. Sinteza cijano supstituiranih derivata benzamida



Shema 19.

4.2.1. Priprava *p*-cijano-benzoil-klorida **2**

Iz 2,000 g (13,60 mmol) **1** u apsolutnom toluenu (30 ml) doda se 1,45 ml tionil-klorida (20,40 mmol) i reakcijska smjesa se zagrijava na temperaturi vrenja 19 sati. Nakon hlađenja otapalo se ukloni destilacijom pod sniženim tlakom te se dobiveni produkt ispere nekoliko puta s apsolutnim toluenom te se otapalo ponovo ukloni destilacijom pod sniženim tlakom. Dobiveno je 2,010 g (89,3%) uljastog produkta.

4.2.2. Opći postupak pripreve metoksi supstituiranih benzamida

Otopini odgovarajućeg benzoil-klorida u apsolutnom toluenu doda se odgovarajući amin i trietilamin te se reakcijska smjesa zagrijava na temperaturi vrenja preko noći. Nakon hlađenja dobiveni produkt se profiltrira, ispere razrijeđenom vodenom otopinom HCl te prekrizalizira iz smjese metanola i acetona.

Priprava *p*-cijano-*N*-(4-metoksi-2-nitrofenil)benzamida **5**

Iz 0,700 g (4,20 mmol) **2** i 0,706 g (4,20 mmol) **3** u apsolutnom toluenu (20 ml) uz dodatak 0,82 ml trietilamina (5,88 mmol) nakon prekrizalizacije dobiveno je 0,510 g (40,6%) narančastog kristaliničnog produkta. T.t. 190-193 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO) (δ/ppm): 10,75 (s, 1H, NH_{amid}), 8,07 (d, 4H, H_{arom.}), 7,59 (d, 1H, *J* = 8,91 Hz, H_{arom.}), 7,55 (d, 1H, *J* = 2,85 Hz, H_{arom.}), 7,37 (dd, 1H, *J*₁ = 8,91, *J*₂ = 2,91 Hz, H_{arom.}), 3,87 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) (δ/ppm): 164,57, 157,37, 144,92, 138,05, 133,17 (2C), 128,91 (2C), 128,84, 123,89, 120,54, 118,69, 114,80, 109,85, 56,56.

Priprava *p*-cijano-*N*-(4-nitrofenil)benzamida **6**

Iz 0,700 g (4,20 mmol) **2** i 0,584 g (4,20 mmol) **4** u apsolutnom toluenu (20 ml) uz dodatak 0,82 ml trietilamina (5,88 mmol) nakon prekrizalizacije dobiveno je 0,605 g (53,5%) žutog praškastog produkta. T.t. 95-98 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO) (δ/ppm): 11,02 (s, 1H, NH_{amid}), 8,29 (d, 2H, *J* = 9,21 Hz, H_{arom.}), 8,14 (d, 2H, *J* = 8,46 Hz, H_{arom.}), 8,08 – 8,05 (d, 4H, *J* = 9,18 Hz, H_{arom.}); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) (δ/ppm): 165,41, 145,46, 143,26, 138,69, 133,02 (2C), 129,24 (2C), 125,30 (2C), 120,51 (2C), 118,68, 114,81.

4.2.3. Opći postupak pripreve metoksi i amino supstituiranih benzamida

Odgovarajući metoksi supstituirani amid suspendira se u prethodno pripremljenoj otopini SnCl₂·2H₂O u smjesi koncentrirane HCl:metanol 1:1. Reakcijska smjesa se zagrijava na

temperaturi vrenja 1 sat. Nakon hlađenja otapalo se ukloni destilacijom pod sniženim tlakom. Dobiveni produkt se suspendira u malo destilirane vode, zaluži s 20%-tnom otopinom NaOH do pH = 14, a nastali talog se profiltrira i dobro ispere s vodom.

Priprava *p*-cijano-*N*-(4-metoksi-2-aminofenil)benzamida 7

Iz 0,600 g (2,02 mmol) **5** i 3,780 g (16,76 mmol) SnCl₂×2H₂O u 7,0 ml HCl i 7,0 ml metanola dobiveno je 0,501 g (92,9%) bež praškastog produkta. T.t.>300 °C.

¹H NMR (600 MHz, DMSO) (δ/ppm): 9,72 (s, 1H, NH_{amid}), 8,13 (d, 2H, *J* = 8,46 Hz, H_{arom.}), 7,99 (d, 2H, *J* = 8,46 Hz, H_{arom.}), 7,01 (d, 1H, *J* = 8,58 Hz, H_{arom.}), 6,35 (d, 1H *J* = 2,76 Hz, H_{arom.}), 6,18 (dd, 1H, *J*₁ = 8,58, *J*₂ = 2,76 Hz, H_{arom.}), 4,98 (s, 2H, NH₂), 3,68 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) (δ/ppm): 164,62, 158,91, 145,27, 139,30, 132,75 (2C), 129,07 (2C), 118,88, 116,27, 113,99, 102,29, 100,99, 55,31.

Priprava *p*-cijano-*N*-(4-aminofenil)benzamida 8

Iz 0,300 g (1,23 mmol) **6** i 2,100 g (9,32 mmol) SnCl₂×2H₂O u 4,0 ml HCl i 4,0 ml metanola dobiveno je 0,110 g (41,3%) žuto-smeđeg praškastog produkta. T.t. 245-250 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO) (δ/ppm): 9,97 (šs, 1H, NH_{amid}), 8,11 (d, 2H, *J* = 8,31 Hz, H_{arom.}), 7,97 (d, 2H, *J* = 8,34 Hz, H_{arom.}), 7,41 (d, 2H, *J* = 8,67 Hz, H_{arom.}), 6,55 (d, 2H, *J* = 8,70 Hz, H_{arom.}), 4,96 (s, 2H, NH₂); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) (δ/ppm): 163,57, 145,94, 139,94, 132,76 (2C), 128,83 (2C), 128,39, 122,74 (2C), 118,88, 114,11 (2C), 113,78.

4.2.4. Opći postupak pripreve hidrokloridnih soli

Odgovarajućem amino supstituiranom benzamidu doda se apsolutni etanol zasićen HCl-om i reakcijska smjesa se miješa na sobnoj temperaturi 24 sata. Reakcijskoj smjesi se zatim doda dietileter te se profiltrira. Dobiveni talog se ispere nekoliko puta s dietileterom.

Priprava *p*-cijano-*N*-(4-metoksi-2-aminofenil)benzamid-hidroklorida 9

Iz 0,050 g (1,87 mmol) **7** u apsolutnom etanolu (5,0 ml) zasićenom HCl-om dobiveno je 0,029 g (51,1%) svijetlosivog praškastog produkta. T.t. 296-299 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO) (δ/ppm): 10,49 (s, 1H, NH_{amid}), 8,23 (d, 2H, *J* = 8,28 Hz, H_{arom.}), 8,03 (d, 2H, *J* = 8,28 Hz, H_{arom.}), 7,39 (d, 1H, *J* = 8,85 Hz, H_{arom.}), 6,94 (s, 1H, H_{arom.}), 6,88 (d, 1H, *J* = 8,85 Hz, H_{arom.}), 3,78 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) (δ/ppm): 164,87, 158,18, 146,90, 138,41, 133,73, 132,70 (2C), 129,14 (2C), 129,05, 128,61, 122,48, 118,79 (2C), 114,33, 55,95.

Priprava *p*-cijano-*N*-(4-aminofenil)benzamid-hidroklorida 10

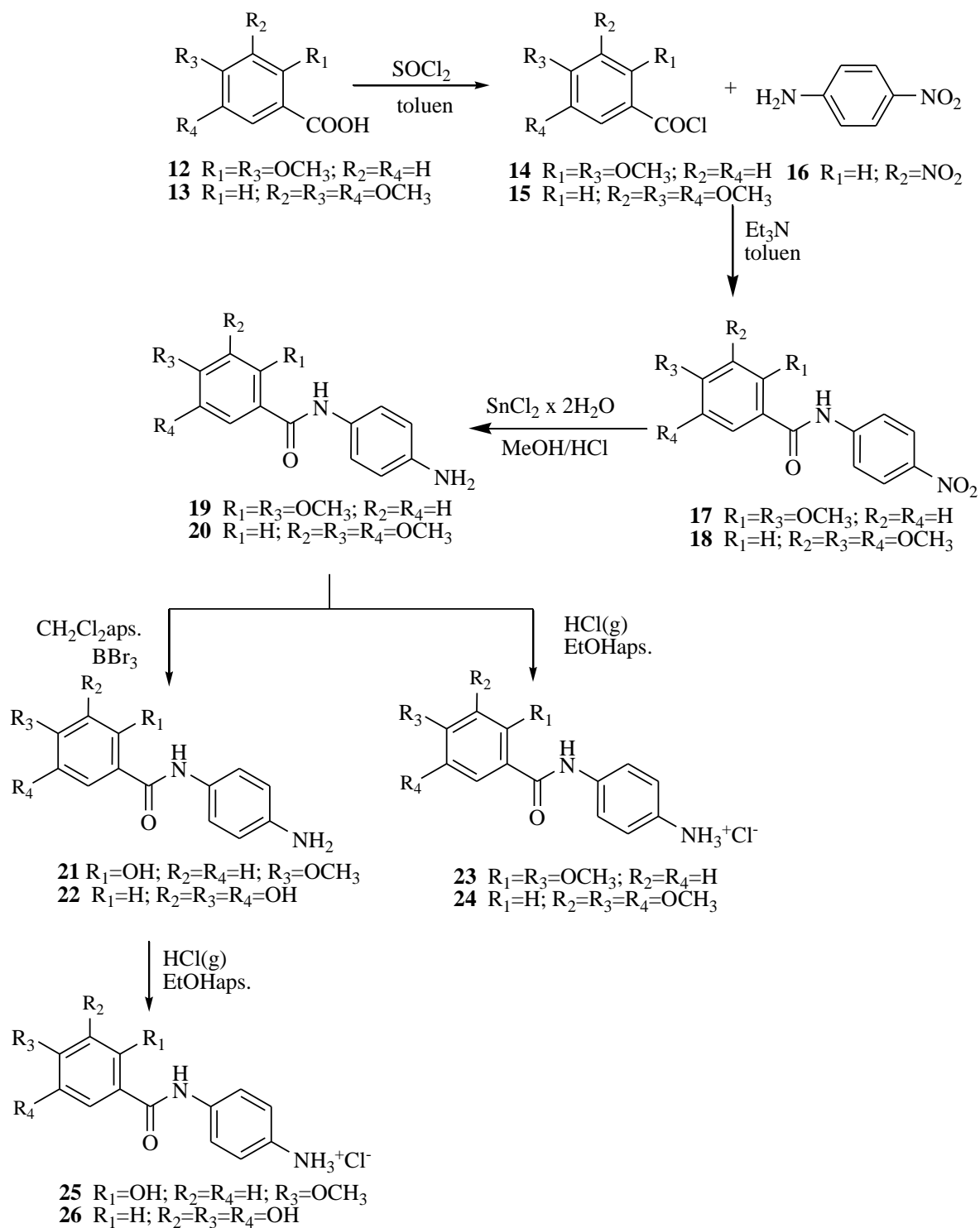
Iz 0,084 g (3,54 mmol) **8** u apsolutnom etanolu (5,0 ml) zasićenom HCl-om dobiveno je 0,072 g (74,3%) svijetlosmeđeg produkta. T.t. >300 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO) (δ/ppm): 10,79 (s, 1H, NH_{amid}), 10,31 (šs, 3H; NH₃⁺Cl⁻), 8,16 (d, 2H, *J* = 8,43 Hz, H_{arom.}), 8,01 (d, 2H, *J* = 8,46 Hz, H_{arom.}), 7,90 (d, 2H, *J* = 8,82 Hz, H_{arom.}), 7,39 (d, 2H, *J* = 8,79 Hz, H_{arom.}); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) (δ/ppm): 164,70, 139,05, 138,59, 132,91 (2C), 129,14 (2C), 128,44, 123,77 (2C), 121,94 (2C), 118,77, 114,41.

Pokušaj priprave *p*-cijano-*N*-(4-hidroksi-2-aminofenil)benzamida 11

Metoksi supstituirani amid **7** (0,405 g, 1,52 mmol) otopi se u apsolutnom diklormetanu (20 ml) i ohladi se na -78 °C. U reakcijsku smjesu upuhuje se argon te se nakon 15 minuta doda BBr₃ (4,50 ml, 4,55 mmol). Reakcijska smjesa miješa se 48 sati na sobnoj temperaturi. Reakcija se prekida dodatkom metanola i vode. Vodeni sloj se ekstrahira s etil-acetatom, nakon čega se otapalo ukloni destilacijom pod sniženim tlakom. Željeni produkt nije uspješno izoliran ovom metodom.

4.3. Sinteza metoksi supstituiranih benzamida



Shema 20.

4.3.1. Opći postupak pripreve metoksi supstituiranih benzoil-klorida

Otopini odgovarajuće kiseline u apsolutnom toluenu doda se tionil-klorid i reakcijska smjesa se zagrijava na temperaturi vrenja. Nakon hlađenja otapalo se ukloni destilacijom pod sniženim tlakom te se dobiveni produkt ispere nekoliko puta s apsolutnim toluenom i ponovo upari do suha.

Priprava 2,4-dimetoksi-benzoil-klorida 14

Iz 2,000 g (10,97 mmol) **12** i 1,20 ml tionil-klorida (16,46 mmol) u apsolutnom toluenu (28 ml) nakon zagrijavanja na temperaturi vrenja 19 sati dobiveno je 1,850 g (83,9%) bijelog kristaliničnog produkta.

Priprava 3,4,5-trimetoksi-benzoil-klorida 15

Iz 2,000 g (9,43 mmol) **13** i 2,0 ml tionil-klorida (28,27 mmol) u apsolutnom toluenu (28 ml) nakon zagrijavanja na temperaturi vrenja 19 sati dobiveno je 1,95 g (89,7%) bež kristaliničnog produkta.

4.3.2. Opći postupak pripreve metoksi supstituiranih benzamida

Otopini benzoil-klorida u apsolutnom toluenu doda se odgovarajući amin i trietilamin te se reakcijska smjesa zagrijava na temperaturi vrenja 24 sata. Nakon hlađenja dobiveni produkt se profiltrira, ispere razrijeđenom vodenom otopinom HCl-a te prekrizalizira iz smjese metanola i acetona.

Priprava 2,4-dimetoksi-*N*-(4-nitrofenil)benzamida 17

Iz 0,700 g (3,49 mmol) **14** i 0,483 g (3,49 mmol) **16** u apsolutnom toluenu (20 ml) uz dodatak 0,68 ml trietilamina (4,98 mmol) nakon prekrizalizacije dobiveno je 0,661 g (62,7%) svijetložutog kristaliničnog produkta. T.t. 187-190 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) (δ /ppm): 10,46 (s, 1H, NH_{amid}), 8,24 (d, 2H, $J = 9,24$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 8,01 (d, 2H, $J = 9,27$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,72 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,73 (d, 1H, $J = 2,16$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,65 (dd, 1H, $J_1 = 8,58$ Hz, $J_2 = 2,28$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 3,95 (s, 3H, OCH_3), 3,86 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) (δ /ppm): 164,72, 163,83, 158,99, 145,72, 142,53, 132,45, 125,36 (2C), 119,87 (2C), 116,15, 106,33, 99,07, 56,67, 55,88.

Priprava 3,4,5-trimetoksi-*N*-(4-nitrofenil)benzamida 18

Iz 0,700 g (3,04 mmol) **15** i 0,420 g (3,04 mmol) **16** u apsolutnom toluenu (20 ml) uz dodatak 0,59 ml trietilamina (4,26 mmol) nakon prekrizalizacije dobiveno je 0,600 g (59,5%) žutog praškastog produkta. T.t. 192-195 °C.

^1H NMR (600 MHz, DMSO) (δ /ppm): 10,66 (s, 1H, NH_{amid}), 8,28 (d, 2H, $J = 9,24$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 8,04 (d, 2H, $J = 9,30$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,30 (s, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 3,88 (s, 6H, OCH_3), 3,75 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) (δ /ppm): 166,11, 152,49 (2C), 145,90, 142,93, 140,90, 129,76, 125,25 (2C), 120,45 (2C), 106,08 (2C), 60,63, 56,63 (2C).

4.3.3. Opći postupak priprave metoksi supstituiranih amino benzamida

Odgovarajući metoksi supstituirani amid suspendira se u prethodno pripremljenoj otopini $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ u smjesi koncentrirane HCl:metanol 1:1. Reakcijska smjesa se zagrijava na temperaturi vrenja 1 sat. Nakon hlađenja otapalo se ukloni destilacijom pod sniženim tlakom. Dobiveni produkt se suspendira u malo destilirane vode, zaluži s 20%-tnom otopinom NaOH do pH = 14, a nastali talog se profiltrira te ispere s vodom.

Priprava 2,4-dimetoksi-*N*-(4-aminofenil)benzamida 19

Iz 0,265 g (0,87 mmol) **17** i 1,630 g (7,28 mmol) $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ u 3,0 ml HCl i 3,0 ml metanola dobiveno je 0,185 g (77,5%) svijetlosivog praškastog produkta. T.t. 179-183 °C.

^1H NMR (600 MHz, DMSO) (δ /ppm): 9,54 (s, 1H, NH_{amid}), 7,78 (d, 1H, $J = 8,58$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,35 (d, 2H, $J = 8,70$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,68 (d, 1H, $J = 2,22$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,65 (dd, 1H, $J_1 = 8,64$, $J_2 = 2,28$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,54 (d, 2H, $J = 8,70$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 4,88 (s, 2H, NH_2), 3,95 (s, 3H, OCH_3), 3,83 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) (δ /ppm): 163,13, 162,64, 158,67, 145,46, 132,46, 128,61, 122,02 (2C), 116,59, 114,22 (2C), 106,13, 99,02, 56,61, 55,98.

Priprava 3,4,5-trimetoksi-*N*-(4-aminofenil)benzamida 20

Iz 0,400 g (1,20 mmol) **18** i 2,250 g (10,0 mmol) $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ u 4,25 ml HCl i 4,25 ml metanola dobiveno je 0,165 g (45,3%) bijelog praškastog produkta. T.t. 205-209 °C.

^1H NMR (600 MHz, DMSO) (δ /ppm): 9,77 (s, 1H, NH_{amid}), 7,34 (d, 2H, $J = 8,10$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,25 (s, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,59 (d, 2H, $J = 8,16$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 5,24 (s, 2H, NH_2), 3,86 (s, 6H, OCH_3), 3,73 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO) (δ /ppm): 164,08, 152,52 (2C), 144,17, 139,92, 130,33, 128,47, 122,54 (2C), 114,21 (2C), 105,02 (2C), 60,06, 56,02 (2C).

4.3.4. Opći postupak pripreve hidroksi supstituiranih benzamida

Odgovarajući metoksi supstituirani amid otopi se u apsolutnom diklormetanu. Reakcijska smjesa ohladi se na $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. U reakcijsku smjesu upuhuje se argon te se nakon 15 minuta doda BBr_3 . Reakcijska smjesa miješa se na sobnoj temperaturi 48 sati, nakon čega se reakcija prekida dodatkom metanola i vode. Vodeni sloj se ekstrahira s etil-acetatom a nakon sušenja na MgSO_4 se otapalo ukloni destilacijom pod sniženim tlakom.

Priprava 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-(4aminofenil)benzamida 21

Iz 0,295 g (1,08 mmol) **19** i 6,5 ml BBr_3 (6,48 mmol) u apsolutnom diklormetanu (20 ml) dobiveno je 0,115 g (42,1%) sivo-bijelog praškastog produkta. T.t. $294\text{--}296\text{ }^{\circ}\text{C}$.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) (δ/ppm): 12,27 (s, 1H, OH), 10,36 (s, 1H, NH_{amid}), 9,82 (šs, 2H, NH_2), 8,00 (d, 1H, $J = 8,91\text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,80 (d, 2H, $J = 8,85\text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,35 (d, 2H, $J = 8,79\text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,57 (dd, 1H, $J_1 = 8,88$, $J_2 = 2,46\text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,51 (d, 1H, $J = 2,43\text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 3,80 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) (δ/ppm): 167,67, 164,36, 161,99, 138,09, 130,75, 128,13, 123,71 (2C), 122,68 (2C), 109,43, 106,87, 101,78, 55,94.

Priprava 3,4,5-trihidroksi-*N*-(4aminofenil)benzamida 22

Iz 0,408 g (1,35 mmol) **20** i 12,15 ml BBr_3 (12,15 mmol) u apsolutnom diklormetanu (20 ml) dobiveno je 0,215 g (61,2%) bež praškastog produkta. T.t. $170\text{--}174\text{ }^{\circ}\text{C}$.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) (δ/ppm): 10,08 (s, 1H, OH), 9,96 (s, 1H, NH_{amid}), 8,84 (šs, 1H, OH), 7,91 (s, 1H, OH), 7,83 (t, 2H, $J = 9,72\text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,32 (d, 2H, $J = 8,73\text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,96 (s, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 5,53 (šs, 2H, NH_2); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) (δ/ppm): 166,25, 145,98 (2C), 139,97, 137,47, 126,53, 125,05, 123,79 (2C), 121,52 (2C), 107,73 (2C).

4.3.5. Opći postupak pripreve hidrokloridnih soli

Odgovarajućem amino supstituiranom benzamidu doda se apsolutni etanol zasićen HCl-om i reakcijska smjesa se miješa na sobnoj temperaturi 24 sata. Reakcijskoj smjesi se zatim doda dietil-eter te se profiltrira. Dobiveni talog se ispere s dietil-eterom.

Priprava 2,4-dimetoksi-*N*-(4-aminofenil)benzamid-hidroklorida 23

Iz 0,076 g (0,28 mmol) **19** u apsolutnom etanolu (5,0 ml) zasićenom HCl-om dobiveno je 0,036 g (41,7%) bijelog praškastog produkta. T.t. $232\text{--}237\text{ }^{\circ}\text{C}$.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) (δ/ppm): 10,26 (šs, 3H, NH_3^+Cl^-), 10,05 (s, 1H, NH_{amid}), 7,82 (d, 2H, $J = 8,70\text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,73 (d, 1H, $J = 8,55\text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,36 (d, 2H, $J = 8,67\text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,71

(s, 1H, H_{arom.}), 6,67 (d, $J = 8,61$ Hz, 1H, H_{arom.}), 3,95 (s, 3H, OCH₃), 3,84 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO) (δ /ppm): 163,57, 162,95, 158,33, 138,27, 132,02, 127,10, 123,27 (2C), 120,71 (2C), 115,97, 105,63, 98,58, 56,07, 55,42.

Priprava 3,4,5-trimetoksi-*N*-(4-aminofenil)benzamid-hidroklorida 24

Iz 0,077 g, (0,25 mmol) **20** u apsolutnom etanolu (5,0 ml) zasićenom sa HCl-om dobiveno je 0,055 g (63,7%) bijelog praškastog produkta. T.t. 277-282 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO) (δ /ppm): 10,37 (s, 1H, NH_{amid}), 10,04 (šs, 3H, NH₃⁺Cl⁻), 7,86 (d, 2H, $J = 8,82$ Hz, H_{arom.}), 7,36 (d, 2H, $J = 8,82$ Hz, H_{arom.}), 7,31 (s, 2H, H_{arom.}), 3,88 (s, 6H, OCH₃), 3,74 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO) (δ /ppm): 164,99, 152,60 (2C), 140,51, 138,49, 129,64 (2C), 123,10 (2C), 121,66 (2C), 105,35 (2C), 60,07, 56,14 (2C).

Priprava 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-(4aminofenil)benzamid-hidroklorida 25

Iz 0,080 g, (0,32 mmol) **21** u apsolutnom etanolu (5,0 ml) zasićenom sa HCl-om dobiveno je 0,062 g (68,1%) bijelog praškastog produkta. T.t. 280-285 °C.

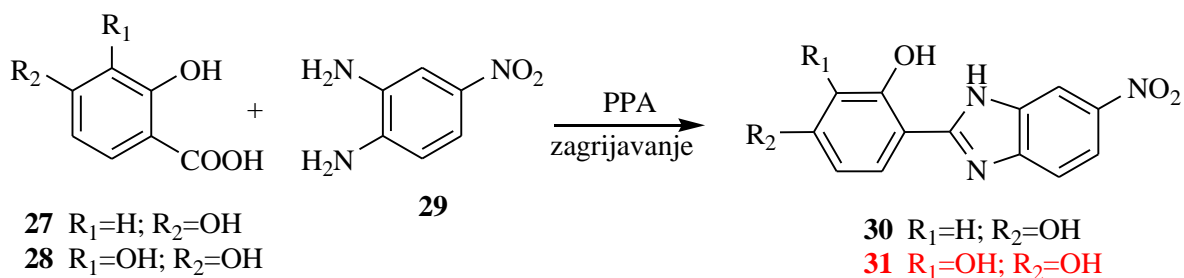
¹H NMR (300 MHz, DMSO) (δ /ppm): 12,29 (s, 1H, OH), 10,37 (s, 1H, NH_{amid}), 9,95 (šs, 3H, NH₃⁺Cl⁻), 8,01 (d, 1H, $J = 8,88$ Hz, H_{arom.}), 7,80 (d, 2H, $J = 8,82$ Hz, H_{arom.}), 7,35 (d, 2H, $J = 8,82$ Hz, H_{arom.}), 6,57 (dd, 1H, $J_1 = 8,86$, $J_2 = 2,47$ Hz, H_{arom.}), 6,52 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz, H_{arom.}), 3,80 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) (δ /ppm): 167,49, 164,26, 162,09, 137,87, 130,75, 128,30, 123,47 (2C), 122,66 (2C), 109,34, 106,54, 101,67, 55,93.

Priprava 3,4,5-trihidroksi-*N*-(4aminofenil)benzamid-hidroklorida 26

Iz 0,100 g, (0,38 mmol) **22** u apsolutnom etanolu (5,0 ml) zasićenom sa HCl-om dobiveno je 0,041 g (35,9%) sivog praškastog produkta. T.t. 287-292 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO) (δ /ppm): 10,17 (šs, 1H, OH), 10,07 (s, 3H, NH_{amid}, OH), 9,15 (šs, 3H, NH₃⁺Cl⁻), 7,85 (d, 2H, $J = 8,76$ Hz, H_{arom.}), 7,32 (d, 2H, $J = 8,73$ Hz, H_{arom.}), 6,96 (s, 2H, H_{arom.}); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) (δ /ppm): 166,15, 146,00 (2C), 139,74, 137,42, 126,95, 125,11, 123,72 (2C), 121,49 (2C), 107,77 (2C).

4.4. Sinteza hidroksi supstituiranih nitro derivata 2-benzimidazola



Shema 21.

Opći postupak pripreve hidroksi derivata nitro supstituiranih benzimidazola

Odgovarajućoj benzojevoj kiselini doda se 4-nitro-1,2-fenilendiamin i polifosforna kiselina te se reakcijska smjesa zagrijava 2 sata na 180 °C. Reakcijska smjesa se izlije na led, zaluži s amonijakom i ekstrahira s etil-acetatom. Nakon sušenja, etil-acetat se upari pod sniženim tlakom.

Priprava 5(6)-nitro-2-(2,4-dihidroksifenil)benzimidazola 30

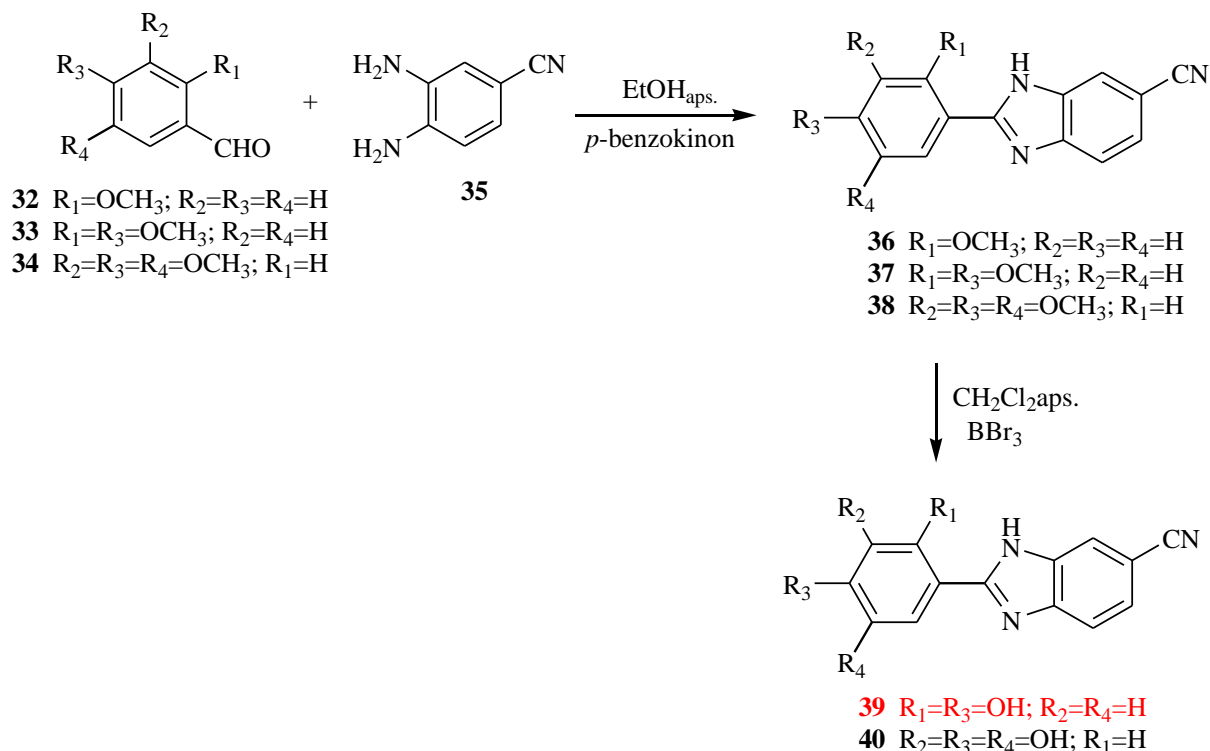
Iz 0,368 g (2,39 mmol) **27**, 0,366 g (2,39 mmol) **29** i polifosforne kiseline dobiveno je 0,045 g (69,9%) maslinasto-zelenog praškastog produkta. T.t. > 300 °C.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) (δ /ppm): 13,33 (d, 1H, $J = 39,45$ Hz, $\text{NH}_{\text{benzimidazol}}$), 13,21 (d, 1H, $J = 39,45$ Hz, $\text{NH}_{\text{benzimidazol}}$), 12,37 (d, 1H, $J = 29,46$ Hz, OH), 12,28 (d, 1H, $J = 29,46$ Hz, OH), 10,18 (s, 2H, OH), 8,53 (s, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 8,39 (s, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 8,13 (d, 2H, $J = 8,91$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,98 (šs, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,81-7,70 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,49 (dd, 2H, $J_1 = 8,58$ Hz, $J_2 = 2,19$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,44 (d, $J = 2,04$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$).

Pokušaj pripreve 5(6)-nitro-2-(2,3,4-trihidroksifenil)benzimidazola 31

Iz 1,000 g (5,88 mmol) **28**, 0,900 g (5,88 mmol) **29** i polifosforne kiseline dobivena je smjesa iz koje željeni produkt nije uspješno izoliran.

4.5. Sinteza cijano supstituiranih hidroksi derivata 2-benzimidazola



Shema 22.

4.5.1. Opći postupak pripreve metoksi derivata cijano supstituiranih benzimidazola

Otopini odgovarajućeg aldehida i 4-cijano-1,2-fenilendiamina **35** u apsolutnom etanolu doda se *p*-benzokinon te se reakcijska smjesa zagrijava na temperaturi vrenja 4 sata. Nakon hlađenja dobiveni talog se profiltrira.

Priprava 5(6)-cijano-2-(2-metoksifenil)benzimidazola **36**

Iz 0,500 g (3,67 mmol) **32**, 0,489 g (3,67 mmol) **35** i 0,400 g (3,67 mmol) *p*-benzokinona u apsolutnom etanolu (20 ml) dobiveno je 0,494 g (53,9%) tamnoljubičastog praškastog produkta. T.t. 182-187 °C.

1H NMR (300 MHz, DMSO) (δ /ppm): 12,57 (s, 1H, $H_{benzimidazol}$), 8,62 (s, 1H, $H_{arom.}$), 8,35 (d, 1H, $J = 9,45$ Hz, $H_{arom.}$), 7,79 (d, 1H, $J = 8,34$ Hz, $H_{arom.}$), 7,59 (dd, 1H, $J_1 = 8,32$, $J_2 = 1,42$ Hz, $H_{arom.}$), 7,53 (d, 1H, $J = 6,96$ Hz, $H_{arom.}$), 7,28 (d, 1H, $J = 8,22$ Hz, $H_{arom.}$), 7,15 (t, 1H, $J = 7,53$ Hz, $H_{arom.}$), 4,05 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) (δ /ppm): 157,57, 150,20 (2C), 132,75, 130,55, 125,79, 121,48, 120,62 (2C), 117,52, 116,11 (2C), 112,74, 104,12, 56,38.

Priprava 5(6)-cijano-2-(2,4-dimetoksifenil)benzimidazola 37

Iz 0,400 g (2,41 mmol) **32**, 0,321 g (2,41 mmol) **35** i 0,260 g (2,41 mmol) *p*-benzokinona u apsolutnom etanolu (15 ml) dobiveno je 0,502 g (74,7%) sivo-bež praškastog produkta. T.t. 211-215 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO) (δ/ppm): 12,37 (s, 1H, NH_{benzimidazol}), 8,61 (s, 1H, H_{arom.}), 8,28 (d, 1H, *J* = 8,64 Hz, H_{arom.}), 7,74 (d, 1H, *J* = 8,31 Hz, H_{arom.}), 7,55 (dd, 1H, *J*₁ = 8,31, *J*₂ = 1,50 Hz, H_{arom.}), 6,79 (d, 1H, *J* = 2,22 Hz, H_{arom.}), 6,75 (dd, 1H, *J*₁ = 8,70, *J*₂ = 2,31 Hz, H_{arom.}), 4,05 (s, 3H, OCH₃), 3,88 (s, 3H, OCH₃).

Priprava 5(6)-cijano-2-(2,3,4-trimetoksiifenil)benzimidazola 38

Iz 0,400 g (2,04 mmol) **33**, 0,271 g (2,04 mmol) **35** i 0,220 g (2,04 mmol) *p*-benzokinona u apsolutnom etanolu (15 ml) dobiveno je 0,250 g (39,7%) tamnoljubičastog praškastog produkta. T.t. 211-215 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO) (δ/ppm): 13,38 (s, 1H, NH_{benzimidazol}), 8,62 (s, 1H, H_{arom.}), 8,15 (s, 1H, H_{arom.}), 7,76 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz, H_{arom.}), 7,60 (dd, 1H, *J*₁ = 8,34, *J*₂ = 8,34, H_{arom.}), 7,56 (s, 2H, H_{arom.}), 3,92 (s, 6H, OCH₃), 3,76 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO) (δ/ppm): 153,28 (2C), 149,72, 125,66, 124,34 (2C), 119,99 (2C), 115,63 (2C), 104,44 (2C), 103,91 (2C), 60,15 (2C), 56,12.

4.5.2. Opći postupak priprave hidroksi derivata cijano supstituiranih benzimidazola

Odgovarajući metoksi supstituirani benzimidazol otopi se u apsolutnom diklormetanu. Reakcijska smjesa ohladi se na -78 °C. U reakcijsku smjesu upuhuje se argon te se nakon 15 minuta doda BBr₃. Nakon toga se reakcijska smjesa miješa na sobnoj temperaturi 24 sata. Reakcija se prekida dodatkom metanola i vode. Nakon odvajanja slojeva, vodeni sloj se profiltrira.

Pokušaj priprave 5(6)-cijano-2-(2,4-dihidroksifenil)benzimidazola 39

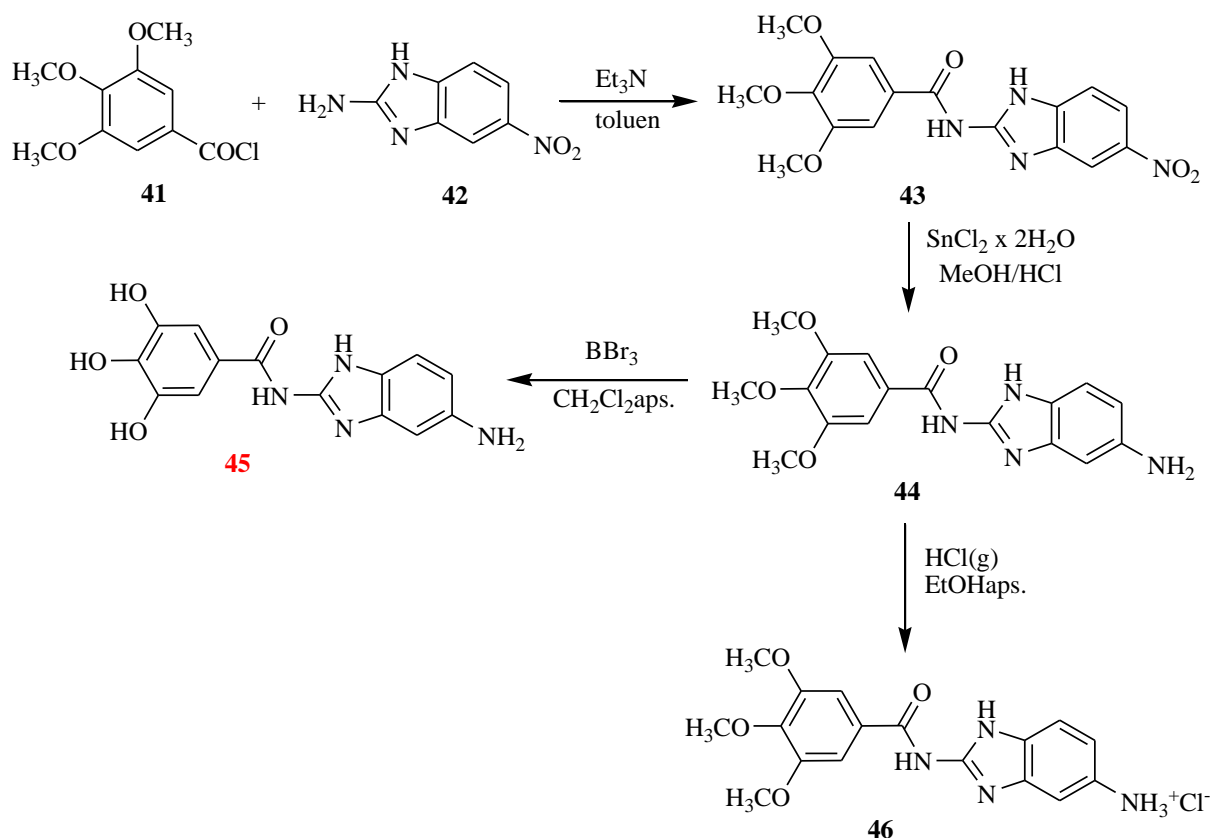
Iz 0,300 g (1,07 mmol) **37** i 6,45 ml BBr₃ (6,45 mmol) u apsolutnom diklormetanu (20 ml) dobivena je smjesa iz koje produkt nije uspješno izoliran.

Priprava 5(6)-cijano-2-(2,3,4-trihidroksifenil)benzimidazola 40

Iz 0,200 g (0,67 mmol) **38** i 5,82 ml BBr₃ (5,82 mmol) u apsolutnom diklormetanu (20 ml) dobiveno je 0,100 g (57,8%) plavo-sivog praškastog produkta. T.t. >300 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO) (δ/ppm): 9,24 (šs, 3H, OH), 8,26 (s, 1H, H_{arom.}), 7,89 (d, 1H, *J* = 8,97 Hz, H_{arom.}), 7,85 (d, 1H, *J* = 8,88, H_{arom.}), 7,23 (s, 2H, H_{arom.}).

4.6. Sinteza hidroksi supstituiranih derivata benzimidazola



Shema 23.

Priprava 3,4,5-trimetoksi-N-[5(6)-nitrobenzimidazol-2-il]benzamida 43

Otopini 3,4,5-trimetoksi benzoil-klorida (3,160 g, 13,70 mmol) **41** u apsolutnom toluenu (70 ml) doda se 2,440 g (13,70 mmol) 2-amino-5(6)-nitrobenzimidazola **42** i 2,67 ml (19,18 mmol) trietilamina te se reakcijska smjesa zagrijava na temperaturi vrenja 48 sati. Nakon hlađenja dobiveni produkt se profiltrira, ispere razrijeđenom vodenom otopinom HCl te prekrizalizira iz smjese etanola i DMF-a. Dobiveno je 3,040 g (59,6%) bež praškastog produkta. T.t. 235-240 °C.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) (δ/ppm): 12,89 (s, 1H, $\text{NH}_{\text{benzimidazol}}$), 12,34 (s, 1H, NH_{amid}), 8,38 (s, 1H, H_{arom}), 8,09 (dd, $J_1 = 8,8$, $J_2 = 2,3$ Hz, 1H, H_{arom}), 7,65 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H, H_{arom}), 7,52 (s, 2H, H_{arom}), 3,90 (s, 6H, OCH_3), 3,76 (s, 3H, OCH_3).

Priprava 3,4,5-trimetoksi-N-[5(6)-aminobenzimidazol-2-il]benzamida 44

1,000 g (2,68 mmol) spoja **43** suspendira se u prethodno pripremljenoj otopini 5,000 g (22,29 mmol) $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ u smjesi koncentrirane HCl (9,5 ml) i metanola (9,5 ml).

Reakcijska smjesa se zagrijava na temperaturi vrenja pola sata. Nakon hlađenja metanol i HCl se uklone destilacijom pod sniženim tlakom, reakcijska smjesa se zaluži s vodenom otopinom NaOH te se ekstrahira etil-acetatom. Dobiveno je 0,828 g (90,1%) svijetlozelenog produkta. T.t. 198-201 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) (δ /ppm): 11,93 (s, 2H, NH_{amid} , $\text{NH}_{\text{benzimidazol}}$), 7,48 (s, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,10 (d, 1H, $J = 8,40$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,64 (s, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,46 (d, 1H, $J = 8,40$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 4,85 (s, 2H, NH_2), 3,86 (s, 6H, OCH_3), 3,73 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) (δ /ppm): 152,93 (2C), 149,34, 144,89 (2C), 140,78, 131,25, 113,79, 110,72, 106,09 (2C), 97,32, 60,55, 56,38 (2C).

Pokušaj priprave 3,4,5-trihidroksi-*N*-[5(6)-aminobenzimidazol-2-il]benzamida 45

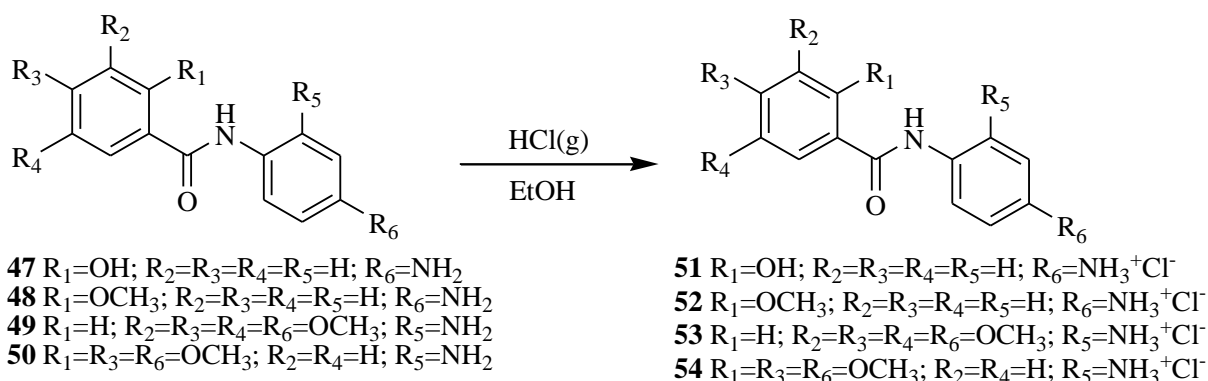
0,262 g (0,77 mmol) metoksi supstituiranog amida **44** otopi se u 50 ml apsolutnog diklormetana. Reakcijska smjesa ohladi se na -78 °C. U reakcijsku smjesu upuhuje se argon te se nakon 15 minuta doda 6,9 ml (6,89 mmol) BBr_3 . Nakon toga se reakcijska smjesa miješa na sobnoj temperaturi 24 sata. Reakcija se prekida dodatkom metanola i vode. Vodeni sloj se profiltrira. Ovom metodom nije uspješno izoliran produkt.

Priprava 3,4,5-trimetoksi-*N*-[5(6)-aminobenzimidazol-2-il]benzamid-hidroklorida 46

Amino supstituiranom benzamidu 0,080 g (0,23 mmol) **45** doda se 5 ml apsolutnog etanola zasićenog HCl-om i reakcijska smjesa se miješa na sobnoj temperaturi 24 sata. Reakcijskoj smjesi se zatim doda dietileter te se profiltrira. Dobiveni talog se ispere tri puta dietileterom i ponovo profiltrira. Dobiveno je 0,080 g (90,9%) bež praškastog produkta. T.t. >250 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) (δ /ppm): 9,51 (šs, 4H, NH_{amid} , NH_3^+Cl^-), 7,79 (s, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,77 (d, 2H, $J = 8,76$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,63 (s, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,37 (d, 1H, $J = 8,55$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 3,93 (s, 6H, OCH_3), 3,78 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) (δ /ppm): 165,59, 153,62 (2C), 146,32, 142,24, 131,35, 130,01, 128,87, 126,70, 119,33, 115,28, 109,06, 106,84 (2C), 60,70, 56,82 (2C).

4.7. Sinteza hidrokloridnih soli benzamida



Shema 24.

Opći postupak pripreve hidrokloridnih soli benzamida

Odgovarajućem amino supstituiranom benzamidu doda se apsolutni etanol zasićen HCl-om i reakcijska smjesa se miješa na sobnoj temperaturi 24 sata. Reakcijskoj smjesi se zatim doda dietileter te se profiltrira. Dobiveni talog se ispere tri puta dietileterom i ponovo profiltrira.

Priprava 2-hidroksi-*N*-(4-aminofenil)benzamid-hidroklorida **51**

0,060 g, (0,26 mmol) **47** u apsolutnom etanolu (5,0 ml) zasićenom HCl-om miješa se na sobnoj temperaturi 24 sata. Dobiveno 0,052 g (74,7%) smeđeg praškastog produkta. T.t. 258-260 °C. 1H NMR (300 MHz, DMSO) (δ /ppm): 11,75 (s, 1H, OH), 10,53 (s, 1H, NH_{amid}), 10,14 (šs, 3H, $NH_3^+Cl^-$), 7,98 (d, 1H, $J = 7,86$ Hz, $H_{arom.}$), 7,81 (d, 2H, $J = 8,79$ Hz, $H_{arom.}$), 7,44 (t, 1H, $J = 7,73$ Hz, $H_{arom.}$), 7,36 (d, 2H, $J = 8,79$ Hz, $H_{arom.}$), 7,02 (d, 1H, $J = 8,19$ Hz, $H_{arom.}$), 6,96 (t, 1H, $J = 7,54$ Hz, $H_{arom.}$); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) (δ /ppm): 166,71, 158,82, 138,09, 134,06, 129,67, 128,34, 123,68 (2C), 122,11 (2C), 119,63, 117,99, 117,45.

Priprava 2-metoksi-*N*-(4-aminofenil)benzamid-hidroklorida **52**

0,047 g, (0,19 mmol) **48** u apsolutnom etanolu (5,0 ml) zasićenom HCl-om miješa se na sobnoj temperaturi 24 sata. Dobiveno 0,041 g (75,8%) rozo-sivog praškastog produkta. T.t. 236-240 °C.

1H NMR (300 MHz, DMSO) (δ /ppm): 10,27 (s, 1H, NH_{amid}), 10,13 (šs, 3H, $NH_3^+Cl^-$), 7,83 (d, 2H, $J = 8,79$ Hz, $H_{arom.}$), 7,62 (dd, 1H, $J_1 = 7,39$, $J_2 = 1,64$ Hz, $H_{arom.}$), 7,51 (t, 1H, $J = 7,87$ Hz, $H_{arom.}$), 7,34 (d, 2H, $J = 8,79$ Hz, $H_{arom.}$), 7,18 (d, 1H, $J = 8,28$ Hz, $H_{arom.}$), 7,07 (t, 1H, $J = 7,44$

Hz, $H_{\text{arom.}}$), 3,89 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) (δ /ppm): 164,69, 156,47, 138,26, 132,21, 129,62, 127,44, 124,54, 123,06, 120,71 (2C), 120,50 (2C), 112,03, 55,89.

Priprava 3,4,5-trimetoksi-*N*-(4-metoksi-2-aminofenil)benzamid-hidroklorida 53

0,040 g, (0,12 mmol) **49** u apsolutnom etanolu (5,0 ml) zasićenom HCl-om miješa se na sobnoj temperaturi 24 sata. Dobiveno 0,026 g (58,6%) bijelog praškastog produkta. T.t. 200-205 °C.

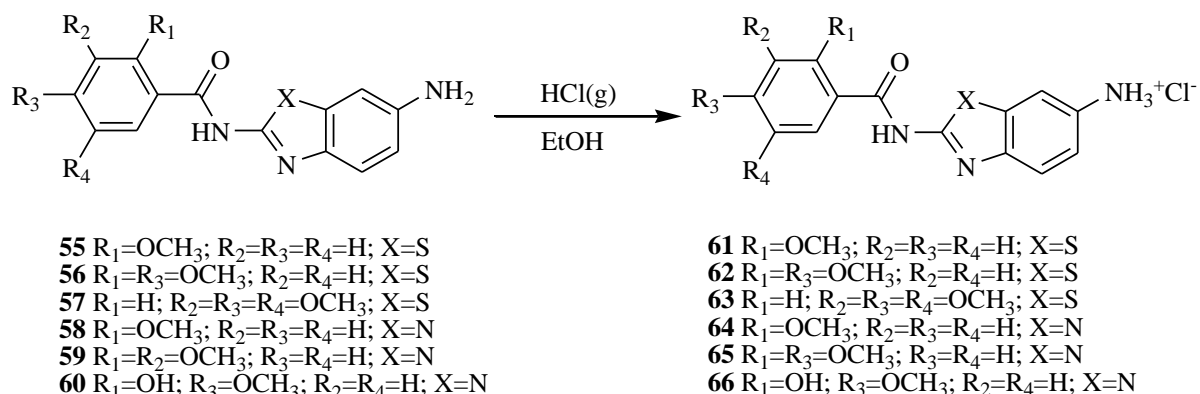
¹H NMR (300 MHz, DMSO) (δ /ppm): 10,30 (s, 1H, NH_{amid}), 8,69 (šs, 3H, NH₃⁺Cl⁻), 7,47 (s, 2H, $H_{\text{arom.}}$), 7,43 (d, 1H, $J = 8,85$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 6,99 (d, 1H, $J = 2,43$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 6,87 (dd, 1H, $J_1 = 8,76$, $J_2 = 2,34$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 3,88 (s, 6H, OCH₃), 3,78 (s, 3H, OCH₃), 3,73 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) (δ /ppm): 165,56 (2C), 157,97 (2C), 153,03 (2C), 129,42 (2C), 128,98, 107,95, 106,16, 106,04 (2C), 60,72, 56,61 (2C), 55,82.

Priprava 2,4-dimetoksi-*N*-(4-metoksi-2-aminofenil)benzamid-hidroklorida 54

0,030 g, (0,09 mmol) **50** u apsolutnom etanolu (5,0 ml) zasićenom HCl-om miješa se na sobnoj temperaturi 24 sata. Dobiveno 0,008 g (23,8%) bijelog praškastog produkta. T.t. 183-187 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO) (δ /ppm): 14,20 (šs, 1H, NH_{amid}), 8,16 (d, 1H, $J = 9,39$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7,71 (d, 1H, $J = 8,94$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7,24 (d, 1H, $J = 2,19$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7,15 (dd, 1H, $J_1 = 8,94$, $J_2 = 2,34$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 6,98 – 6,86 (m, 2H, $H_{\text{arom.}}$), 4,09 (s, 3H, OCH₃), 3,93 (s, 3H, OCH₃), 3,88 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) (δ /ppm): 165,22, 159,86, 158,20, 146,24, 132,82, 131,58, 126,12, 115,57, 115,10, 107,85, 104,21, 99,55, 96,66, 56,99, 56,50, 56,29.

4.8. Sinteza metoksi supstituiranih benzimidazola- i benzotiazola- hidroklorida



Shema 25.

Opći postupak pripreve hidrokloriranih soli benzamida

Odgovarajućem amino supstituiranom benzamidu doda se apsolutni etanol zasićen HCl-om i reakcijska smjesa se miješa na sobnoj temperaturi 24 sata. Reakcijskoj smjesi se zatim doda dietileter te se profiltrira. Dobiveni talog se ispere tri puta dietileterom i ponovo profiltrira.

Priprava 2-metoksi-N-(6-aminobenzotiazol-2-il)benzamid hidroklorida **61**

0,045 g, (0,15 mmol) **55** u apsolutnom etanolu (5,0 ml) zasićenom sa HCl-om miješa se na sobnoj temperaturi 24 sata. Dobiveno je 0,047 g (93,1%) bež praškastog produkta. T.t. = 259-263 °C.

1H NMR (300 MHz, DMSO) (δ /ppm): 12,16 (s, 1H, NH_{amid}), 10,53 (šs, 3H, $NH_3^+Cl^-$), 8,09 (s, 1H, $H_{arom.}$), 7,87 (d, 1H, $J = 8,61$ Hz, $H_{arom.}$), 7,77 (d, 1H, $J = 6,84$ Hz, $H_{arom.}$), 7,61 (t, 1H, $J = 7,50$ Hz, $H_{arom.}$), 7,50 (d, 1H, $J = 8,37$ Hz, $H_{arom.}$), 7,25 (d, 1H, $J = 8,37$ Hz, $H_{arom.}$), 7,13 (t, 1H, $J = 7,38$ Hz, $H_{arom.}$), 3,96 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) (δ /ppm): 165,55, 159,44, 157,72, 148,40, 134,57, 133,01, 130,87, 127,76, 121,95 (2C), 121,35, 121,31, 116,94, 112,81, 56,63.

Priprava 2,4-dimetoksi-N-(6-aminobenzotiazol-2-il)benzamid hidroklorida **62**

0,046 g, (0,14 mmol) **56** u apsolutnom etanolu (5,0 ml) zasićenom HCl-om miješa se na sobnoj temperaturi 24 sata. Dobiveno je 0,048 g (93,9%) bež praškastog produkta. T.t. = 263-267 °C.

1H NMR (300 MHz, DMSO) (δ /ppm): 11,68 (s, 1H, NH_{amid}), 10,50 (šs, 3H, $NH_3^+Cl^-$), 8,08 (d, 1H, $J = 1,88$ Hz, $H_{arom.}$), 7,87 (dd, 2H, $J_1 = 8,59, J_2 = 3,45$ Hz, $H_{arom.}$), 7,48 (dd, 1H, $J_1 = 8,58$ Hz, $J_2 = 2,00$ Hz, $H_{arom.}$), 6,80 – 6,67 (m, 2H, $H_{arom.}$), 4,02 (s, 3H, OCH_3), 3,88 (s, 3H, OCH_3);

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO) (δ /ppm): 164,41, 163,82, 159,34, 158,96, 148,04, 132,69, 132,57, 127,18, 121,62, 121,17, 116,70, 112,59, 106,50, 98,74, 56,51, 55,76.

Priprava 3,4,5-trimetoksi-*N*-(6-aminobenzotiazol-2-il)benzamid-hidroklorida 63

0,050 g, (0,15 mmol) **57** u apsolutnom etanolu (5,0 ml) zasićenom sa HCl-om miješa se na sobnoj temperaturi 24 sata. Dobiveno je 0,048 g (87,1%) smeđeg praškastog produkta. T.t. 249-253 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) (δ /ppm): 13,05 (s, 1H, NH_{amid}), 10,58 (šs, 3H, NH_3^+Cl^-), 8,10 (s, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,87 (d, 1H, $J = 8,25$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,54 (s, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,50 (d, $J = 8,20$ Hz, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 3,89 (s, 6H, OCH_3), 3,76 (s, 3H, OCH_3).

Priprava 2-metoksi-*N*-[5(6)-aminobenzimidazol-2-il]benzamid-hidroklorida 64

0,025 g, (0,08 mmol) **58** u apsolutnom etanolu (5,0 ml) zasićenom sa HCl-om miješa se na sobnoj temperaturi 24 sata. Dobiveno 0,024 g (85,0%) sivo-rozog praškasto produkta. T.t. 148-152 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) (δ /ppm): 12,03 (s, 2H, $\text{NH}_{\text{benzimidazol}}$, NH_{amid}), 9,82 (šs, 3H, NH_3^+Cl^-), 7,92 (dd, 1H, $J_1 = 7,72$, $J_2 = 1,69$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,75 – 7,62 (m, 3H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,31 (d, 2H, $J = 8,16$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,18 (t, 1H, $J = 7,57$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 4,05 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) (δ /ppm): 164,95, 157,88, 145,74, 135,17, 133,17, 131,19, 131,06, 129,65, 121,50, 120,81, 118,01, 115,11, 113,02, 107,73, 56,80.

Priprava 2,4-dimetoksi-*N*-[5(6)-aminobenzimidazol-2-il]benzamid-hidroklorida 65

0,040 g, (0,15 mmol) **59** u apsolutnom etanolu (5,0 ml) zasićenom sa HCl-om miješa se na sobnoj temperaturi 24 sata. Dobiveno 0,022 g (48,4%) rozog praškastog produkta. T.t. >250 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) (δ /ppm): 9,62 (šs, 3H, NH_3^+Cl^-), 7,75 (d, 1H, $J = 8,37$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,73 (d, 1H, $J = 1,92$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,61 (s, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,54 (d, 1H, $J = 7,88$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,31 (dd, 1H, $J_1 = 8,61$ Hz, $J_2 = 1,77$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,02 (d, 1H, $J = 7,88$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 3,92 (s, 3H, OCH_3), 3,78 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO) (δ /ppm): 165,84, 153,28, 146,77, 142,26, 132,18, 130,93, 128,58, 127,01, 122,14, 118,83, 115,15, 108,85, 106,84 (2C), 60,69, 58,65.

Priprava 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-[5(6)-aminobenzimidazol-2-il]benzamid hidroklorida 66

0,080 g, (0,27 mmol) **60** u apsolutnom etanolu (5,0 ml) zasićenom sa HCl-om miješa se na sobnoj temperaturi 24 sata. Dobiveno je 0,053 g (59,0%) maslinastozelenog praškastog produkta. T.t. 283-288 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) (δ/ppm): 10,64 (šs, 4H, OH, NH_3^+Cl^-), 7,98 (d, 1H, $J = 9,12$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,67 (d, 1H, $J = 8,34$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,66 (d, 1H, $J = 2,04$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,34 (dd, 1H, $J_1 = 8,59$, $J_2 = 1,87$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,11-6,58 (s, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 3,81 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) (δ/ppm): 164,17, 161,37, 159,20, 133,33, 131,79, 127,20, 118,02, 113,74, 106,36, 100,99, 99,60, 56,49, 55,46.

5. Zaključak

- U ovom radu priređeni su slijedeći spojevi: *p*-cijano-*N*-(4-metoksi-2-nitrofenil)benzamid **5**, *p*-cijano-*N*-(4-nitrofenil)benzamid **6**, *p*-cijano-*N*-(4-metoksi-2-aminofenil)benzamid **7**, *p*-cijano-*N*-(4-aminofenil)benzamid **8**, *p*-cijano-*N*-(4-metoksi-2-aminofenil)benzamid-hidroklorid **9**, *p*-cijano-*N*-(4-aminofenil)benzamid-hidroklorid **10**, 2,4-dimetoksi-*N*-(4-nitrofenil)benzamid **17**, 3,4,5-trimetoksi-*N*-(4-nitrofenil)benzamid **18**, 2,4-dimetoksi-*N*-(4-aminofenil)benzamid **19**, 3,4,5-trimetoksi-*N*-(4-aminofenil)benzamid **20**, 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-(4-aminofenil)benzamid **21**, 3,4,5-trihidroksi-*N*-(4-aminofenil)benzamid **22**, 2,4-dimetoksi-*N*-(4-aminofenil)benzamid-hidroklorid **23**, 3,4,5-trimetoksi-*N*-(4-aminofenil)benzamid-hidroklorid **24**, 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-(4-aminofenil)benzamid-hidroklorid **25**, 3,4,5-trihidroksi-*N*-(4-aminofenil)benzamid-hidroklorid **26**, 5(6)-nitro-2-(2,4-dihidroksifenil)benzimidazol **30**, 5(6)-cijano-2-(2-metoksifenil)benzimidazol **36**, 5(6)-cijano-2-(2,4-dimetoksifenil)benzimidazol **37**, 5(6)-cijano-2-(2,3,4-trimetoksiifenil)benzimidazol **38**, 5(6)-cijano-2-(2,3,4-trihidroksifenil)benzimidazol **40**, 3,4,5-trimetoksi-*N*-[5(6)-nitrobenzimidazol-2-il]benzamid **43**, 3,4,5-trimetoksi-*N*-[5(6)-aminobenzimidazol-2-il]benzamid **44**, 3,4,5-trimetoksi-*N*-[5(6)-aminobenzimidazol-2-il]benzamid-hidroklorid **46**, 2-hidroksi-*N*-(4-aminofenil)benzamid-hidroklorid **51**, 2-metoksi-*N*-(4-aminofenil)benzamid-hidroklorid **52**, 3,4,5-trimetoksi-*N*-(4-metoksi-2-aminofenil)benzamid-hidroklorid **53**, 2,4-dimetoksi-*N*-(4-metoksi-2-aminofenil)benzamid-hidroklorid **54**, 2-metoksi-*N*-(6-aminobenzotiazol-2-il)benzamid-hidroklorid **61**, 2,4-dimetoksi-*N*-(6-aminobenzotiazol-2-il)benzamid-hidroklorid **62**, 3,4,5-trimetoksi-*N*-(6-aminobenzotiazol-2-il)benzamid-hidroklorid **63**, 2-metoksi-*N*-[5(6)-aminobenzimidazol-2-il]benzamid-hidroklorid **64**, 2,4-dimetoksi-*N*-[5(6)-aminobenzimidazol-2-il]benzamid-hidroklorid **65**, 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-[5(6)-aminobenzimidazol-2-il]benzamid-hidroklorid **66**.
- Amidi **5**, **6**, **17**, **18** priređeni su kondenzacijom aromatskih amina **3**, **4** i **16** s odgovarajućim benzoil-kloridima **2**, **14**, **15**.
- Spoj **30** dobiven je direktnom kondenzacijom benzojeve kiseline **27** i 4-nitro-1,2-fenilendimina **29**.
- Spojevi **36**, **37** i **38** dobiveni su iz odgovarajućeg metoksi supstituiranog aldehida **32**, **33**, **34** i 4-cijano-1,2-fenilendimina **35**.
- Reakcijom redukcije sa $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ priređeni su amino supstituirani derivati fenola **7**, **8**, **19**, **20** i benzimidazola **44**.
- Uklanjanjem metoksi zaštitnih skupina s BBr_3 priređeni su hidroksi derivati **21**, **22**, **40**.

- Protoniranjem amino skupina metoksi i hidroksi supstituiranih derivata priređene su hidrokloridne soli **9, 10, 23, 24, 25, 26, 46, 51, 52, 53, 54, 61, 62, 63, 64, 65 i 66**.
- Svim novopriređenim spojevima struktura je potvrđena korištenjem ^1H i ^{13}C NMR i UV/Vis spektroskopije.
- Spektroskopska karakterizacija provedena je korištenjem UV/Vis spektroskopije matičnih otopina ciljanih derivata **5, 6, 7, 8, 17, 18, 19, 20, 21 i 22** u metanolu.
- Iz dobivenih rezultata može se uočiti značajan utjecaj cijano skupine kod spoja **6** koja uzrokuje najizraženiji batokromni pomak.
- Kako bi se ispitala mogućnost primjene spojeva **7, 8, 19, 20, 21 i 22** 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 značajno mijenjaju spektroskopske karakteristike ispitivanih spojeva u ovisnosti o pH vrijednostima otopina te ovi spojevi pokazuju **mogućnost primjene kao pH senzori**.
- Spojevima **9, 10, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 43, 44, 46, 51, 52, 53, 61, 62, 63, 64, 65 i 66** ispitana je i antioksidativna aktivnost korištenjem DPPH i FRAP metode.
- Iz dobivenih rezultata ispitivanja antioksidativne aktivnosti spojevi **62 i 63** pokazali su najizraženiju aktivnost primjenom DPPH metode, dok su spojevi **22 i 26** pokazali najizraženiju antioksidativnu aktivnost primjenom FRAP metode.
- Najboljim antioksidansima pokazali su se spojevi supstituirani amino skupinom te amino protoniranom skupinom.

6. Literatura

1. A. Šverko, *Doktorska disertacija „Povezanost pojavnosti i proširenosti bubrežnog karcinoma i tkivne ekspresije citokroma P450“*, Zagreb, (2011).
2. H. Esterbauer, R. J. Schaur, H. Zollner, *Free Radic Biol Med.* **11** (1991) 81-128.
3. J. P. Kehrer, *Toxicology* **149** (2000) 43-50.
4. M. J. Davies *Biochem Biophys Res Commun* **305** (2003) 761-770.
5. Favier A, Cadet J, Kalyanaraman B, Fontecave M, Pierre JL. *Analysis of free radical in biological systems*. 1 izdanje. Birkhäuser Verlag: Basel 1995.
6. S. G. Rhee, *Science* **312** (2006) 1882–1883.
7. A. A. Hamid, O. O. Aiyelaabge, L. A. Usman, O. M. Ameen, A. Lawal; *Afr. J. of Pure and Appl. Chem.* Vol **4** (2010) 142-151.
8. B. Halliwell, *Annu Rev Nutr.* **16** (1996) 33-50.
9. S. Vertuani, A. Angusti, S. Manfredini, *Curr. Pharm. Des.* **10** (2004) 1677–1694.
10. H. Sies, *Exp. Physiol.* **82** (1997) 291–295.
11. C. Borek Antioxidants and cancer, science and medicine. The baby-boomer’s guide New Canaan connecticus keats publishing, 4: 51-61.
12. R. Hurrell, *J. Nutr.*, **133** (2003) 2973S–2977S.
13. S. Kumar, *Asian J. of Res. in Chem. and Pharm. Sci.* **1** (2014) 27-44.
14. P. Tauler, a. Aguilo, E. Fuentespina, J. A. Tur, A. Pons, *Eur. J. Physiol.* **443** (2002) 791-797.
15. G. Mehta, V. Singh, *Chem. Soc. Rev.* **31** (2002) 324-334.
16. L. Packer, H. J. Tritschler, K. Wessel, *Free Radic. Biol. Med.* **22** (1997) 359-378.
17. M. Koufaki, C. Kiziridi, F. Nikoloudaki, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17** (2007) 4223- 4227.
18. V. Opletalova, *Ceska. Slov. Farm.* **49** (2000) 278-284.
19. H. S. Rho, H. S. Baek, J. W. You, S. J. Kim, M. Kim, D. H. Kim, I. S. Chang, *Bull. Korean Chem. Soc.* **28** (2007) 837-839.
20. E. Marionova, L. Georgiev, I. Totseva, K. Seizova, T. Milkova, *Czech J. Food Sci.* **31** (2013) 5-13.
21. I. M. C. Ienascu, M.N. Stefanut, C. Tanasie, I. M. Popescu, A. Cata, The 5th IEEE International Conference on E-Health and Bioengineering- EHB 2015.
22. S. Choudhary, S. G. Kini, M. Mubeen, *Der Pharma Chemica*, **5** (2013) 213-222.
23. R. Likhar, P. Perumal, N. Kolhe, V. H. Bhaskar, P. Daroi, *Int. J. Curr. Phram. Res.* **7** (2015) 34-37.
24. C. Kus, F. Sözüdönmez, B. Can-Eke, T. Coban, *Z. Naturforsch* **65 c** (2010) 537 – 542.
25. B. Zhou, B. Li, W. Yi, X. Bu, L. Ma, *Bioorg. Med. Chem.* **23** (2013) 3759-3763.

26. R. K. Arora, N. Kaur, Y. Bansal, G. Bansal, *Acta Pharm. Sin. B* 2014 (4) 368.
27. 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.
28. I. Jarak, M. Kralj, L. Šuman, G. Pavlović, J. Drozan, I. Piantanida, M. Žinić, K. Pavelić, G. Karminski-Zamola, *J. Med. Chem.* **48** (2005) 2346–2360.
29. I. Sović, M. Viskić, B. Bertoša, K. Ester, M. Kralj, M. Hranjec, G. Karminski-Zamola, *Monatshefte für Chemie* **146** (2015) 1503-1517.
30. P. Roškarić, *Završni rad Sinteza i spektroskopska karakterizacija novih hidroksi derivata amidino supstituiranog benzimidazola* Zagreb, 2015.
31. N. Perin, L. Uzelac, I. Piantanida, G. Karminski-Zamola, M. Kralj i M. Hranjec, *Bioorg. Med. Chem.* **19** (2011) 6329–6339.
32. I. Boček, *Završni rad Novi hidroksi supstituirani derivati benzamida kao potencijalni antioksidansi*, Zagreb, 2015.
33. a) I. Doulou, C. Kontogiorgis, A. E. Koumbis, E. Evgenidou, D. Hadjipavlou-Litina, K. C. Fylaktakidou, *Eur. J. Med. Chem.* **80** (2014) 145-153; b) T. Kulišić, A. Radonić, V. Katalinić, M. Miloš, *Food Chemistry* **85** (2004) 633–640.
34. I. F. F. Benzie, J. J. Strain, *Methods in Enzymology*, **299** (1999) 15–27.

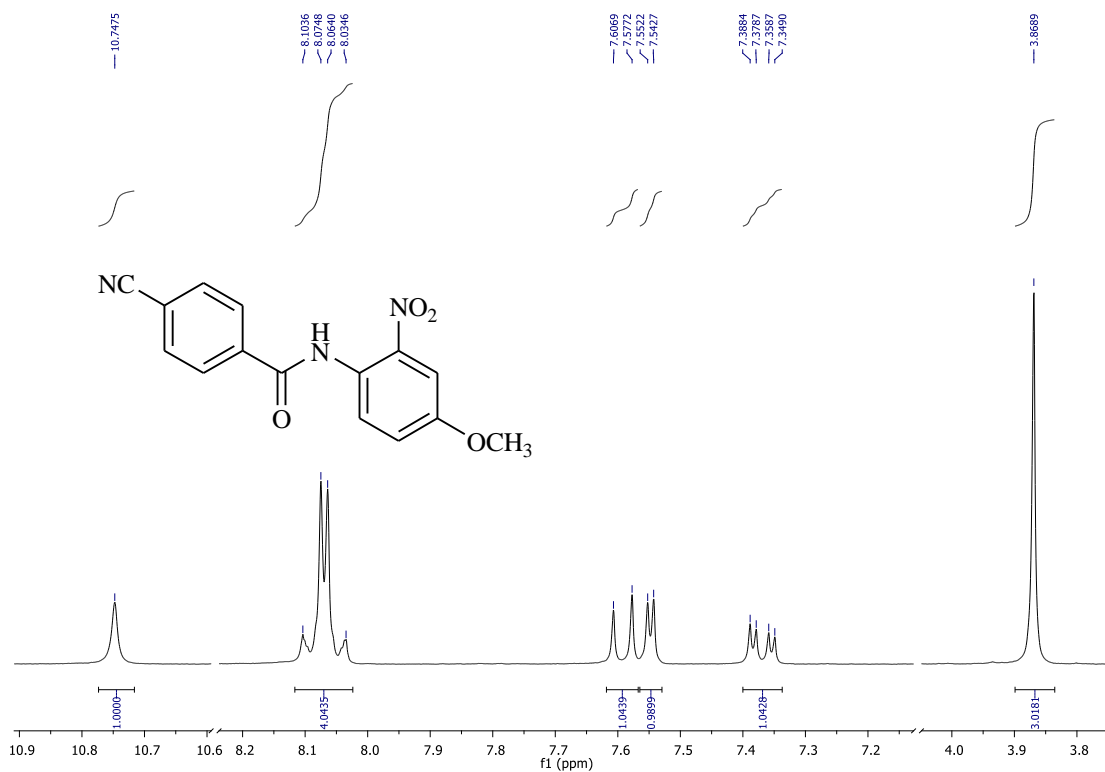
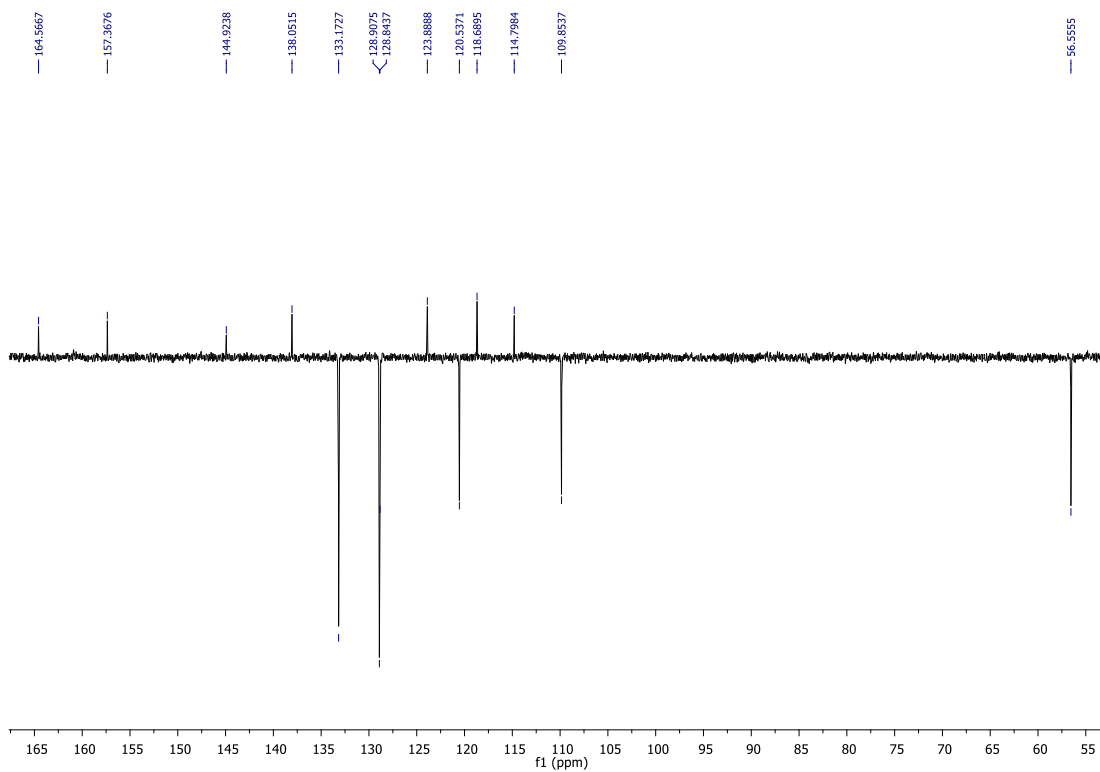
7. Životopis

Petra Roškarić █████ █████ █████ █████ █████ █████ █████ Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja u Prvoj gimnaziji u Varaždinu, 2011. godine upisuje preddiplomski studij Primijenjene kemije na Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. Završni rad iz područja organske kemije *Sinteza i spektroskopska karakterizacija novih hidroksi derivata amidino supstituiranog benzimidazola* pod vodstvom mentorice izv. prof. dr. sc. Marijane Hranjec obranila je 2015. godine i postala sveučilišna prvostupnica primijenjene kemije. Diplomski studij Primijenjene organske kemije upisuje 2015. godine. 2016. godine dobitnica je Dekanove nagrade za zapaženi znanstveni rad *Sinteza, spektroskopska karakterizacija i antioksidativna aktivnost novih hidroksi supstituiranih heteroaromatskih derivata kao potencijalnih senzora za detekciju pH i/ili metalnih kationa u otopinama* izrađen na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Marijane Hranjec. Sudjelovala je na XI. Susretu mladih kemijskih inženjera 2016. godine s posterskim priopćenjem *Novi hidroksi derivati amidino supstituiranih benzimidazola i benzamida kao potencijalni antioksidansi*; na 3. Simpoziju studenata kemičara 2016. godine s usmenim izlaganjem *Sinteza, spektroskopska karakterizacija i antioksidativna aktivnost novih hidroksi supstituiranih heteroaromatskih derivata kao potencijalnih senzora za detekciju pH i/ili metalnih kationa u otopina*; na 25. hrvatskom skupu kemičara i kemijskih inženjera u Poreču s posterskim priopćenjem *Antioksidativna aktivnost heteroaromatskih benamida kao senzora za metalne ione i pH* te na 10th Joint Meeting on Medicinal Chemistry u Dubrovniku s posterskim priopćenjem *Synthesis, antitumor and antioxidative activity of nitro and amino substituted benzimidazole and benzothiazole 2-carboxamides*. 2017. godine prihvaćen je rad za objavljivanje u znanstvenom časopisu *Croatica chemica acta* pod naslovom *Synthesis and antioxidative potency of novel amidino substituted benzimidazole and benzothiazole derivatives*.

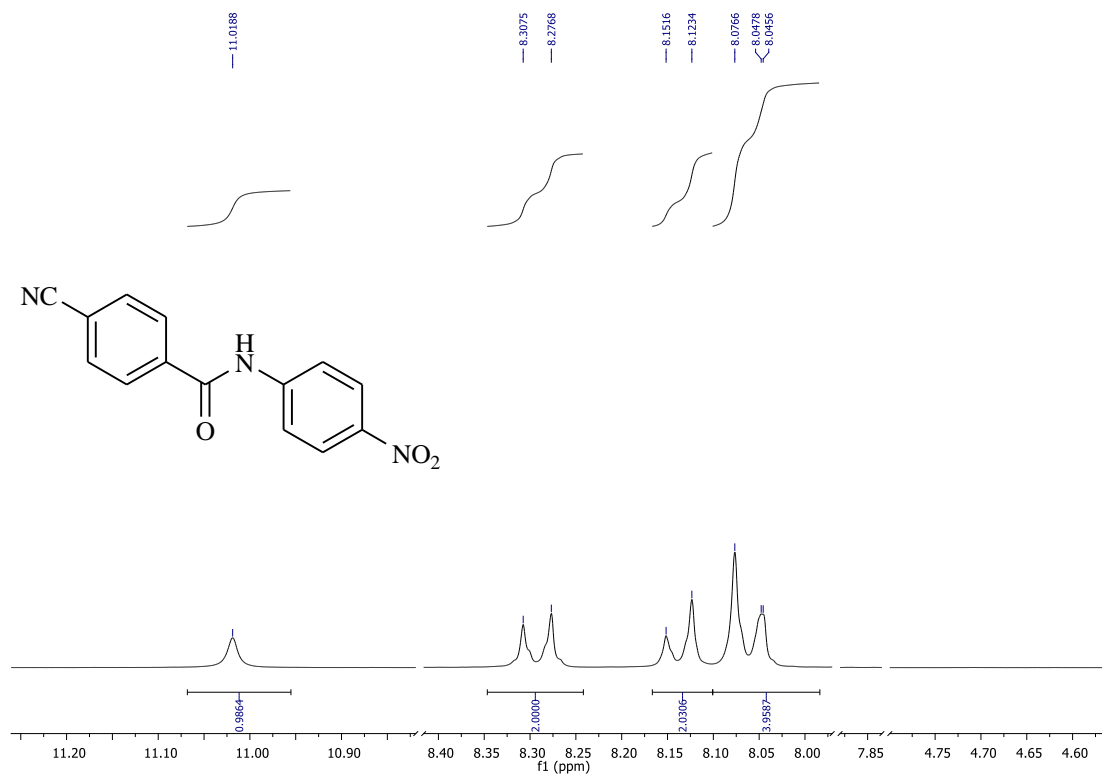
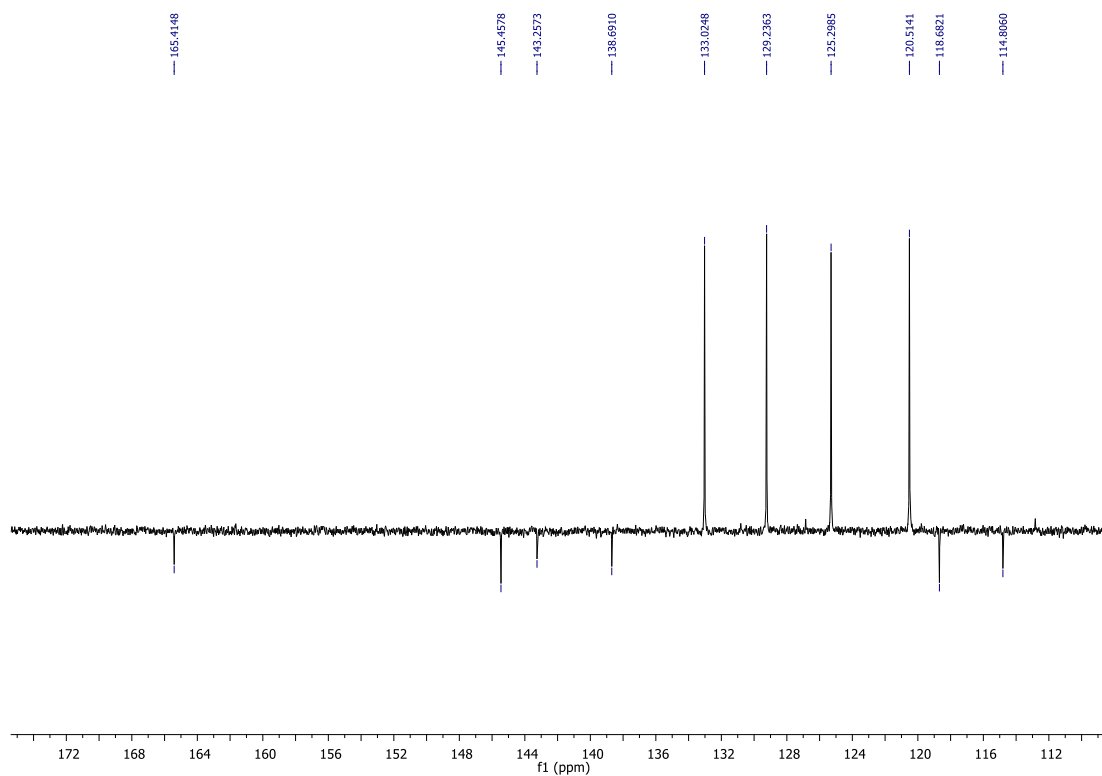
Tijekom diplomskog studija boravila je četiri mjeseca na stručnoj praksi u Toulouse-u, Francuska, u istraživačkom laboratoriju za Agro-industriju u sklopu Instituta National Polytechnique de Toulouse – Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques Et Technologiques (INP-ENSIACET) gdje je sudjelovala na 8th International Student Seminar s usmenim izlaganjem *Comparison of the chemical composition of lavender/lavandin essential oils from different countries*.

8. Prilozi

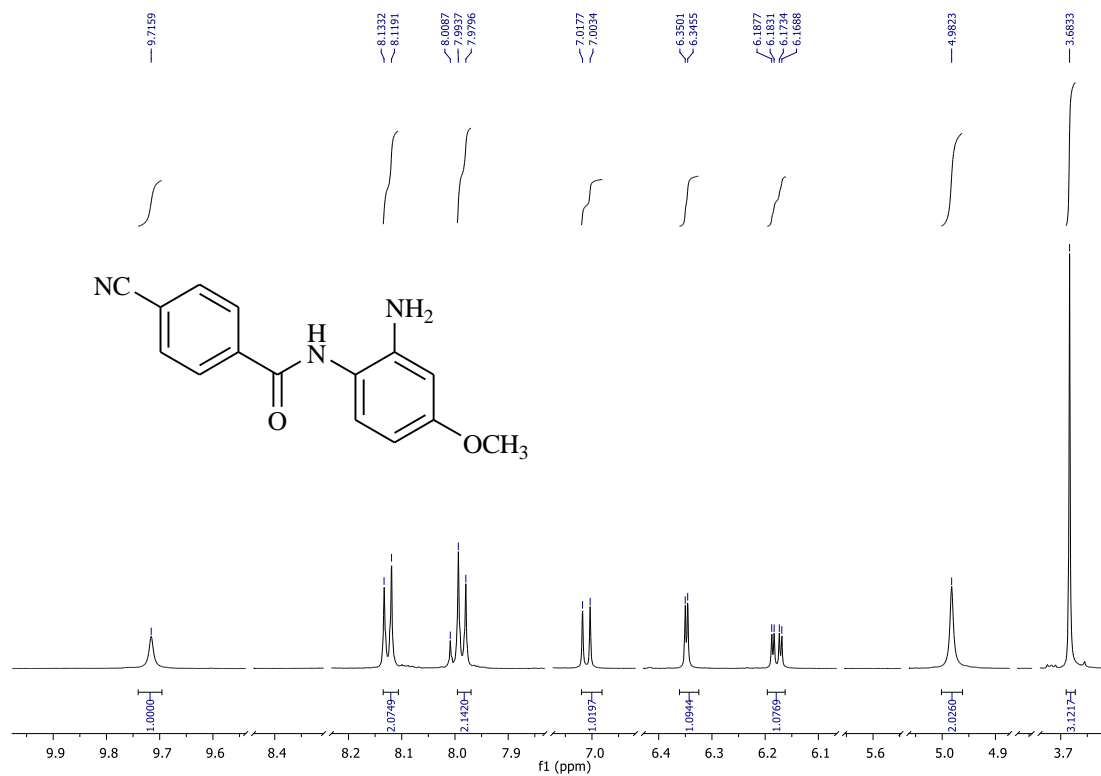
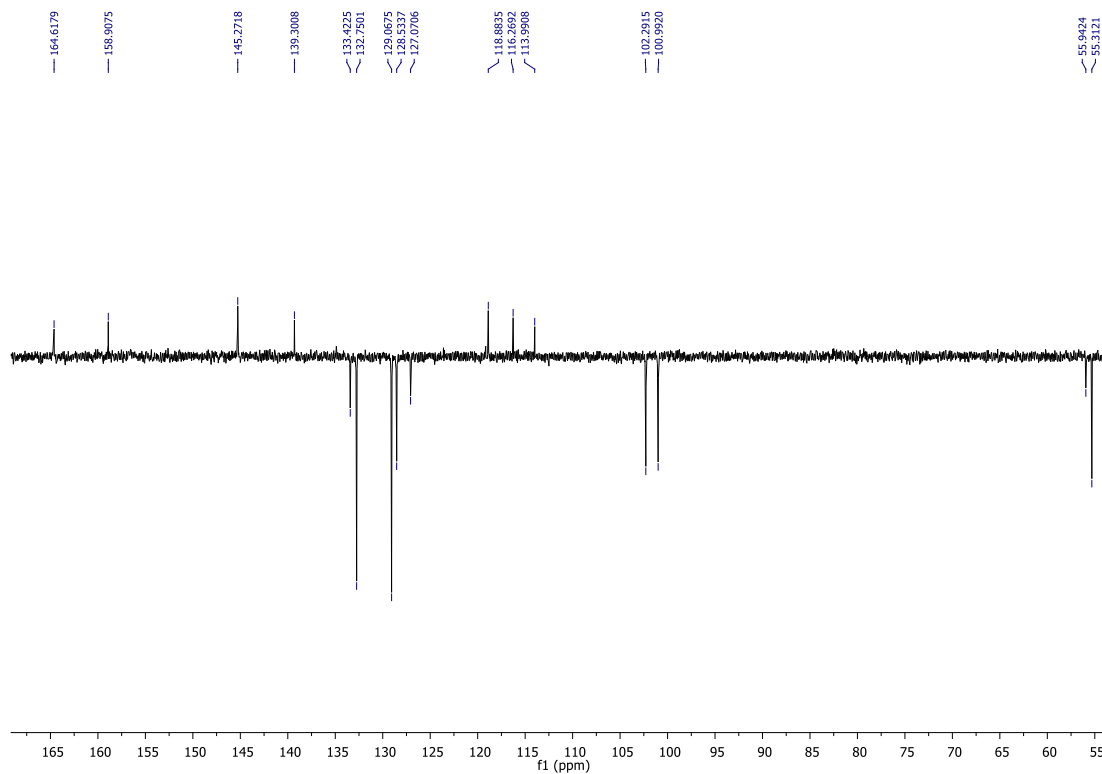
Prilog 1

a) ^1H NMR spektar *p*-cijano-*N*-(4-metoksi-2-nitrofenil)benzamida 5b) ^{13}C NMR spektar *p*-cijano-*N*-(4-metoksi-2-nitrofenil)benzamida 5

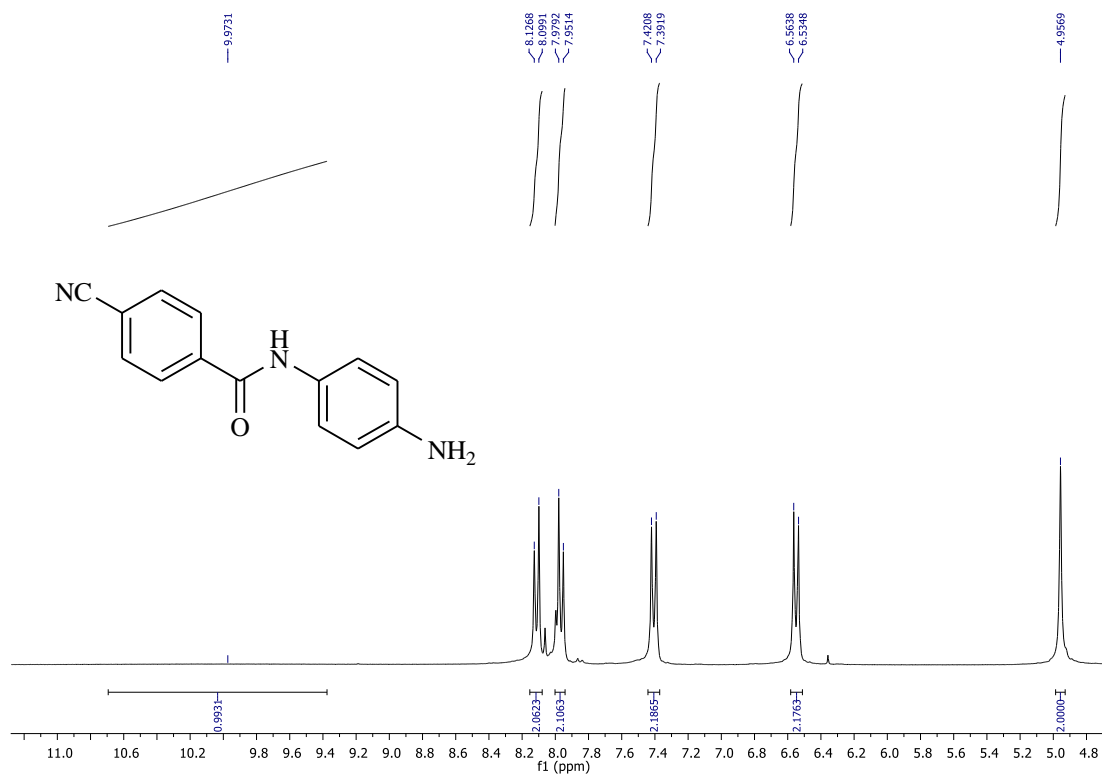
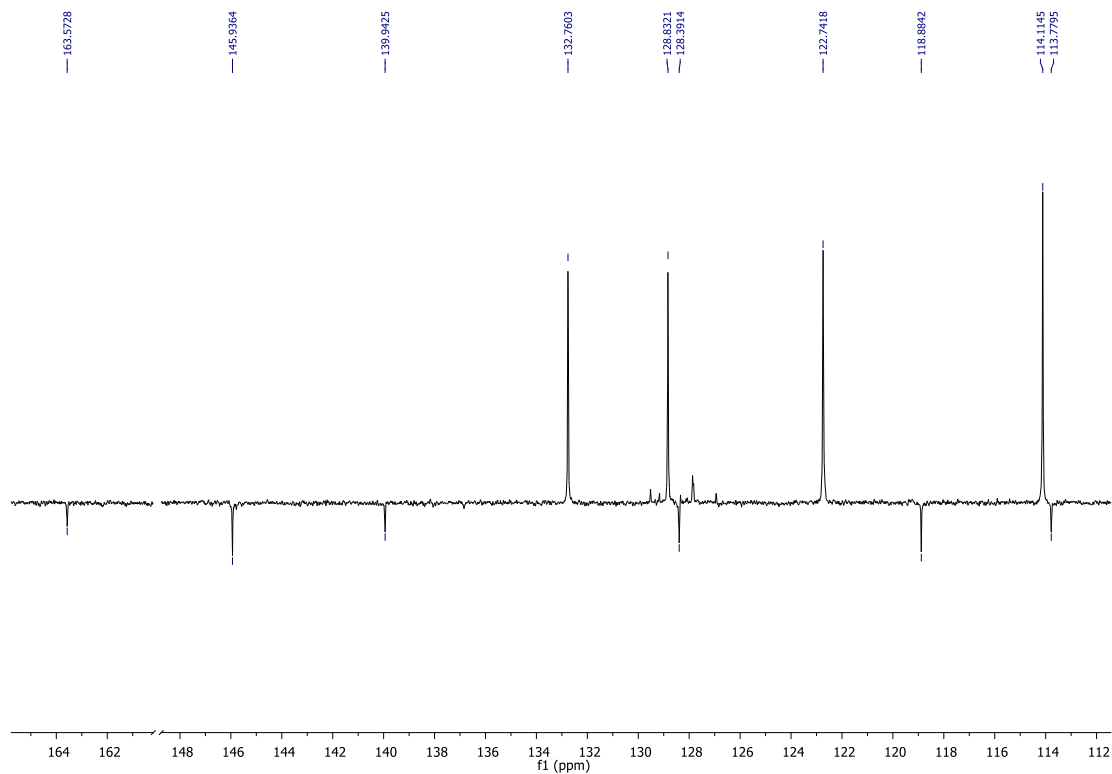
Prilog 2

a) ^1H NMR spektar *p*-cijano-*N*-(4-nitrofenil)benzamida **6**b) ^{13}C NMR spektar *p*-cijano-*N*-(4-nitrofenil)benzamida **6**

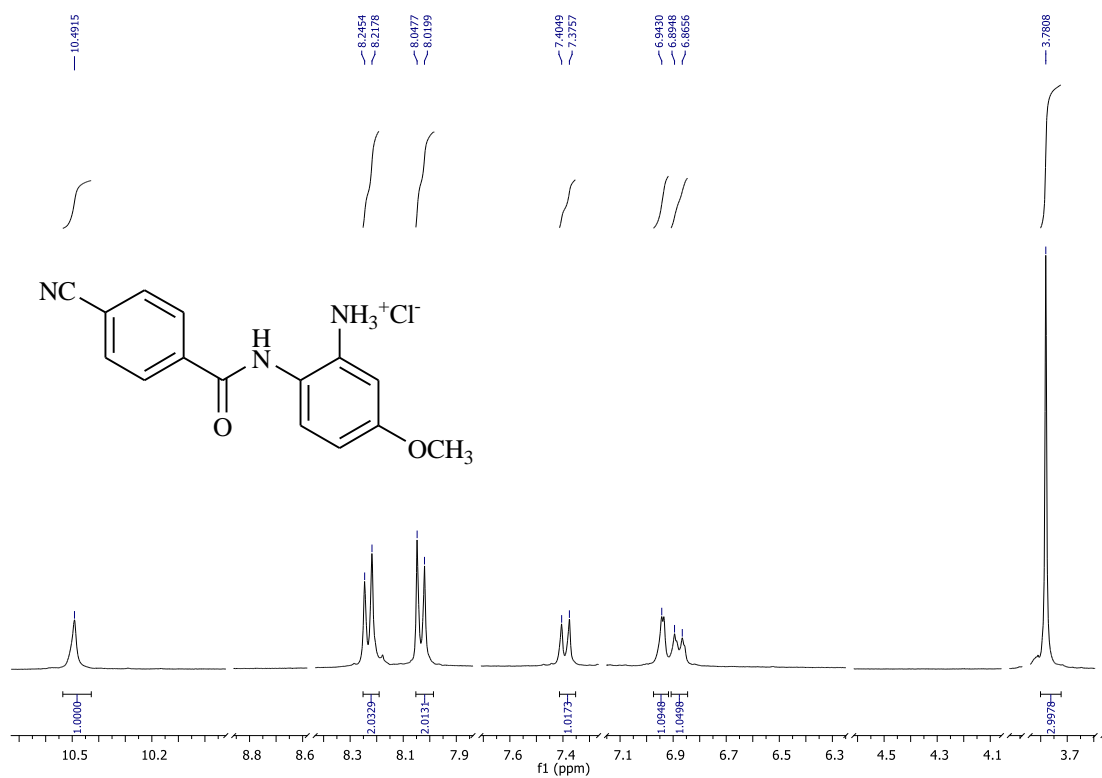
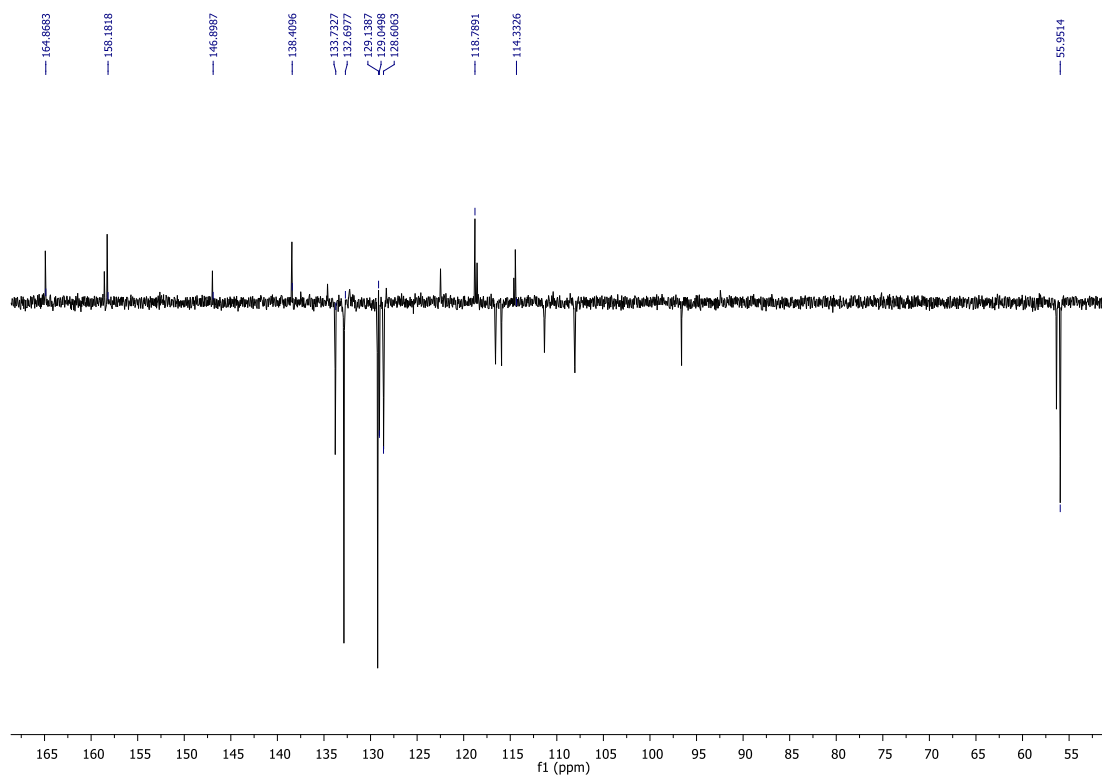
Prilog 3

a) ^1H NMR spektar *p*-cijano-*N*-(4-metoksi-2-amino fenil)benzamida **7**b) ^{13}C NMR spektar *p*-cijano-*N*-(4-metoksi-2-amino fenil)benzamida **7**

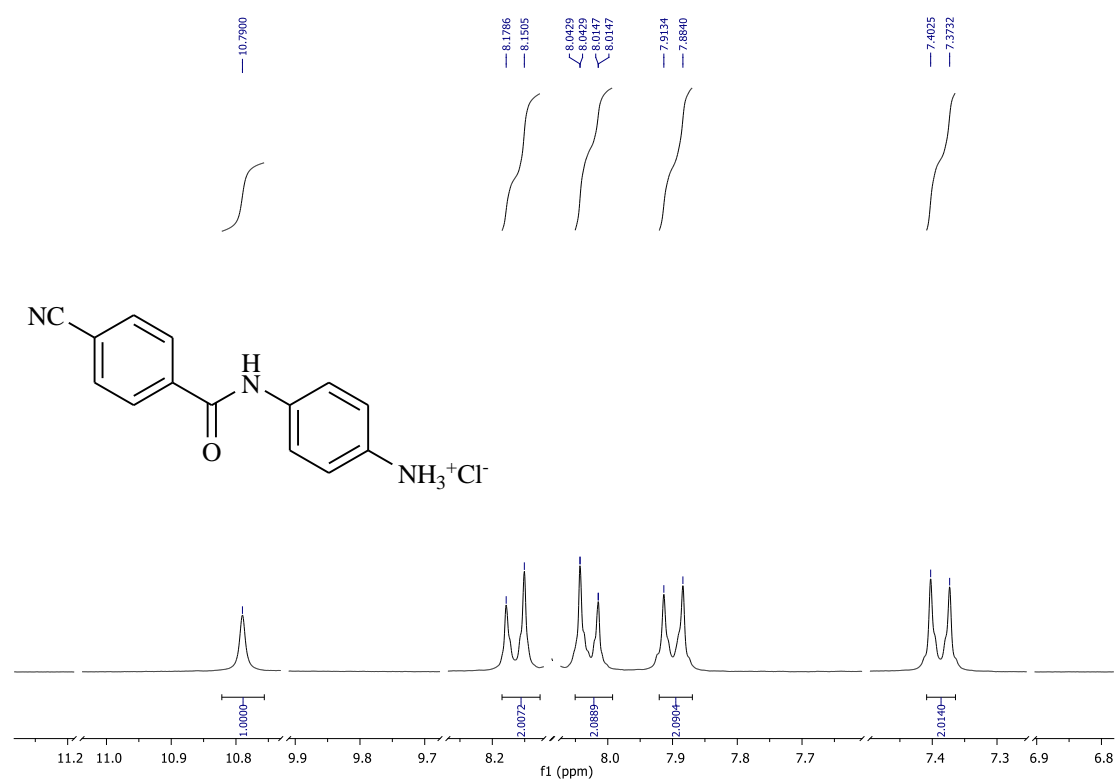
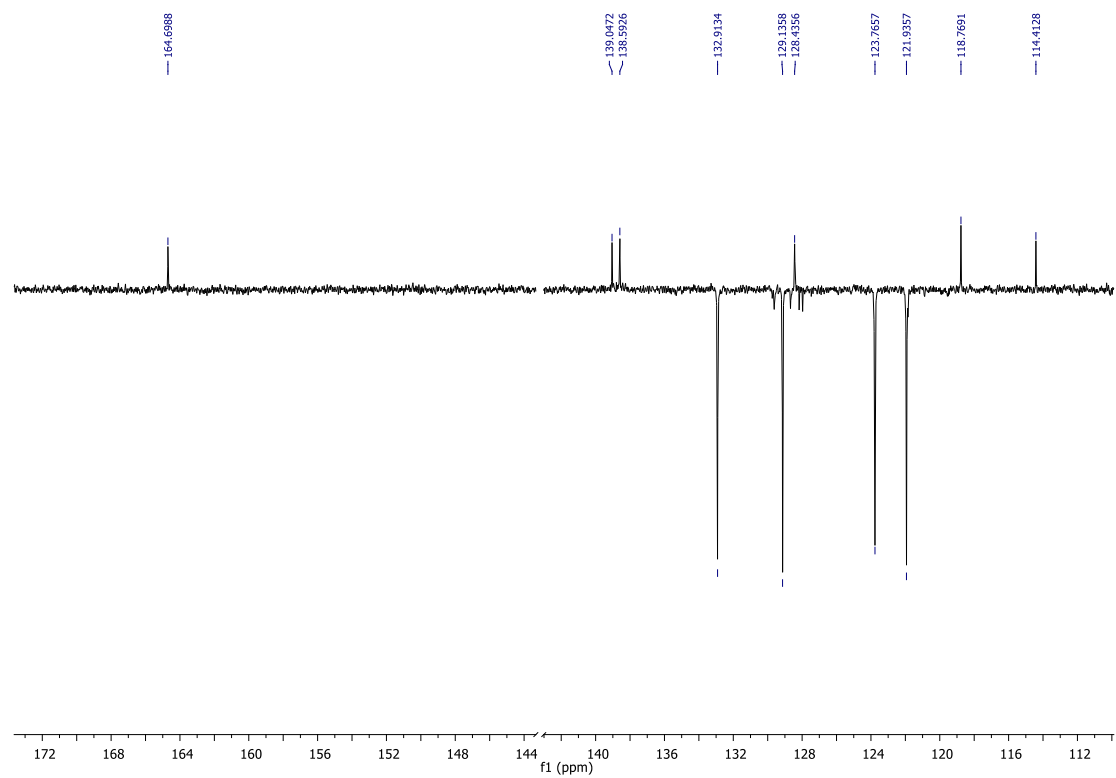
Prilog 4

a) ^1H NMR spektar *p*-cijano-*N*-(4-aminofenil)benzamida **8**b) ^{13}C NMR spektar *p*-cijano-*N*-(4-aminofenil)benzamida **8**

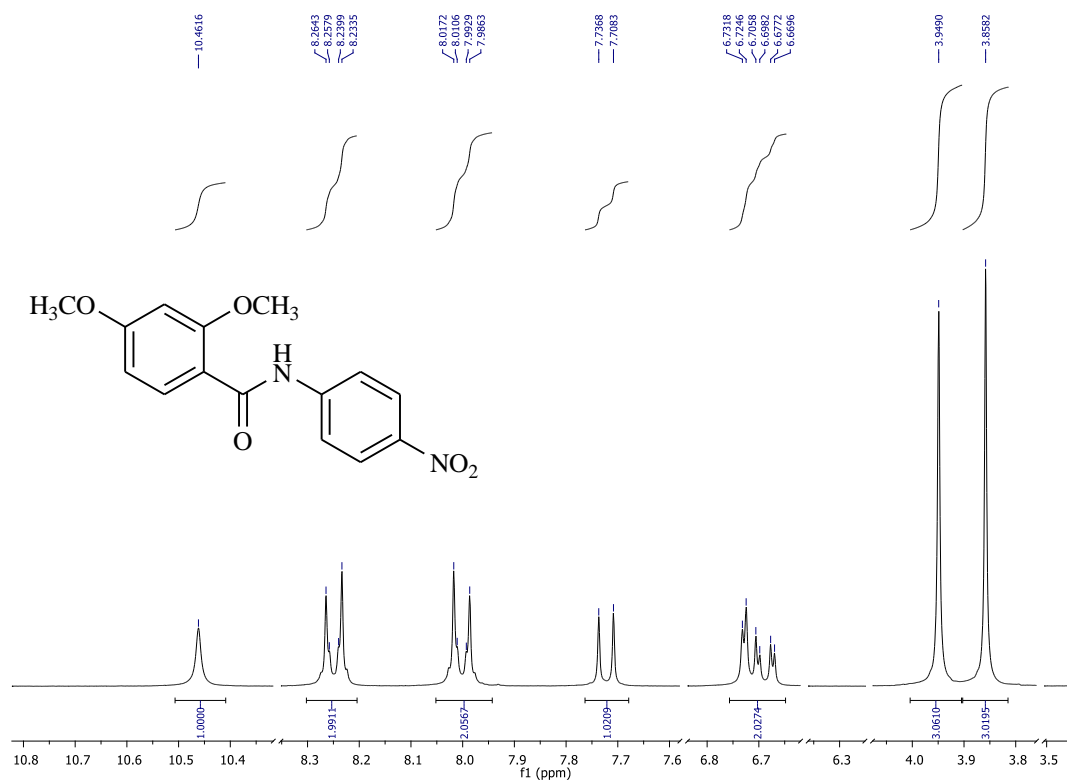
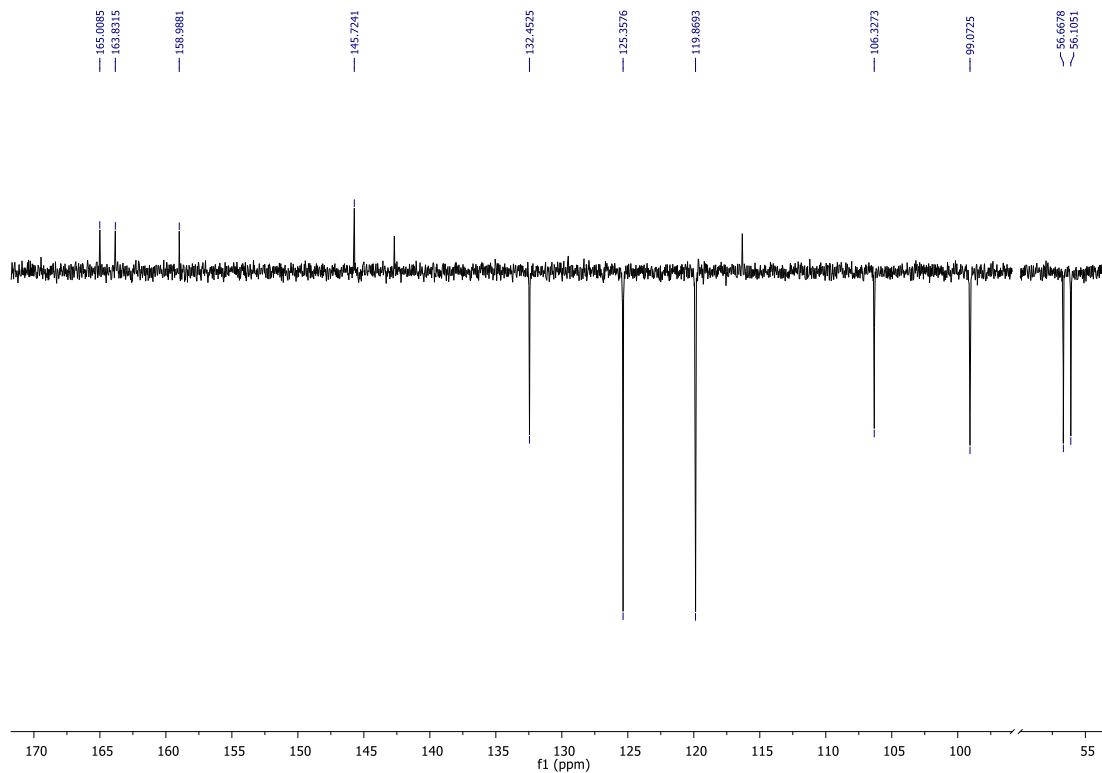
Prilog 5

a) ^1H NMR spektar *p*-cijano-*N*-(4-metoksi-2-amino fenil)benzamid-hidroklorida **9**b) ^{13}C NMR spektar *p*-cijano-*N*-(4-metoksi-2-amino fenil)benzamid-hidroklorida **9**

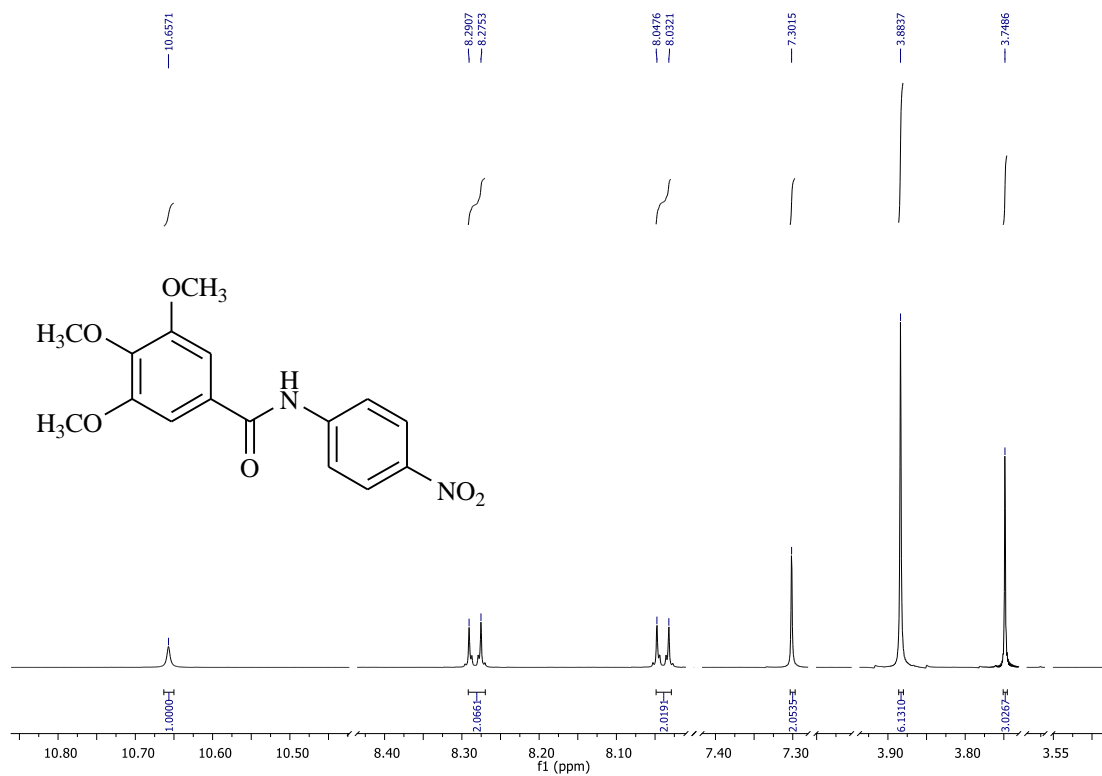
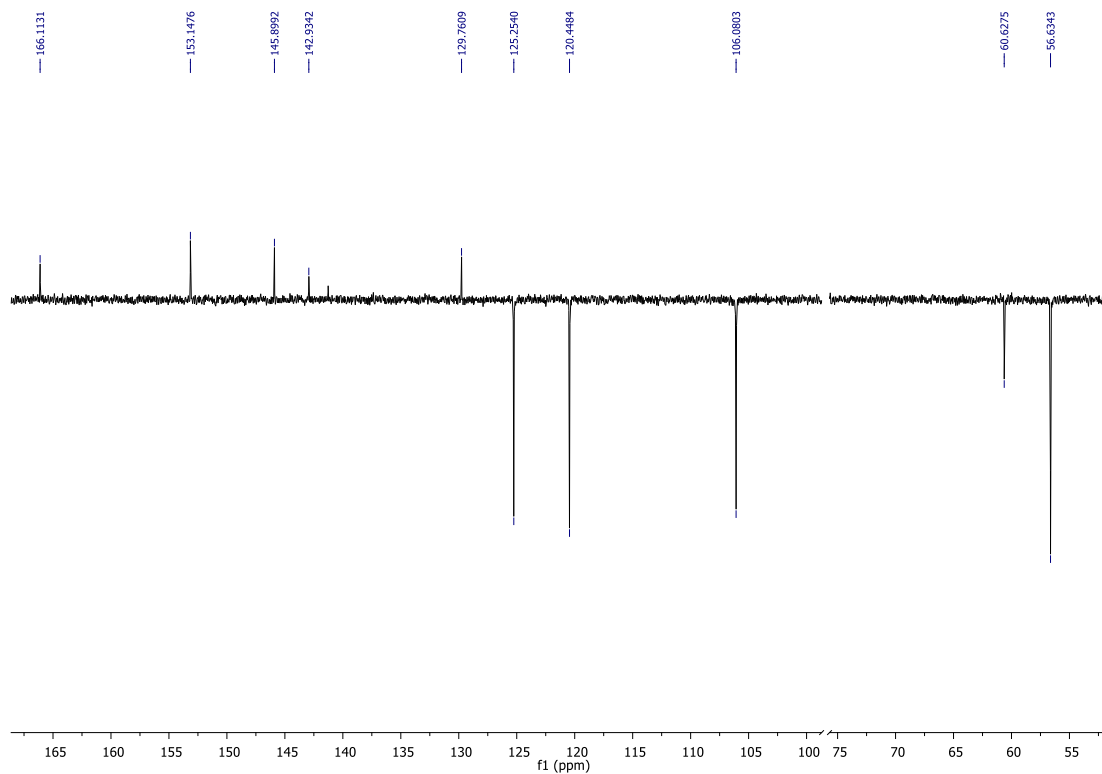
Prilog 6

a) ^1H NMR spektar *p*-cijano-*N*-(4-aminofenil)benzamid-hidroklorida **10**b) ^{13}C NMR spektar *p*-cijano-*N*-(4-aminofenil)benzamid-hidroklorida **10**

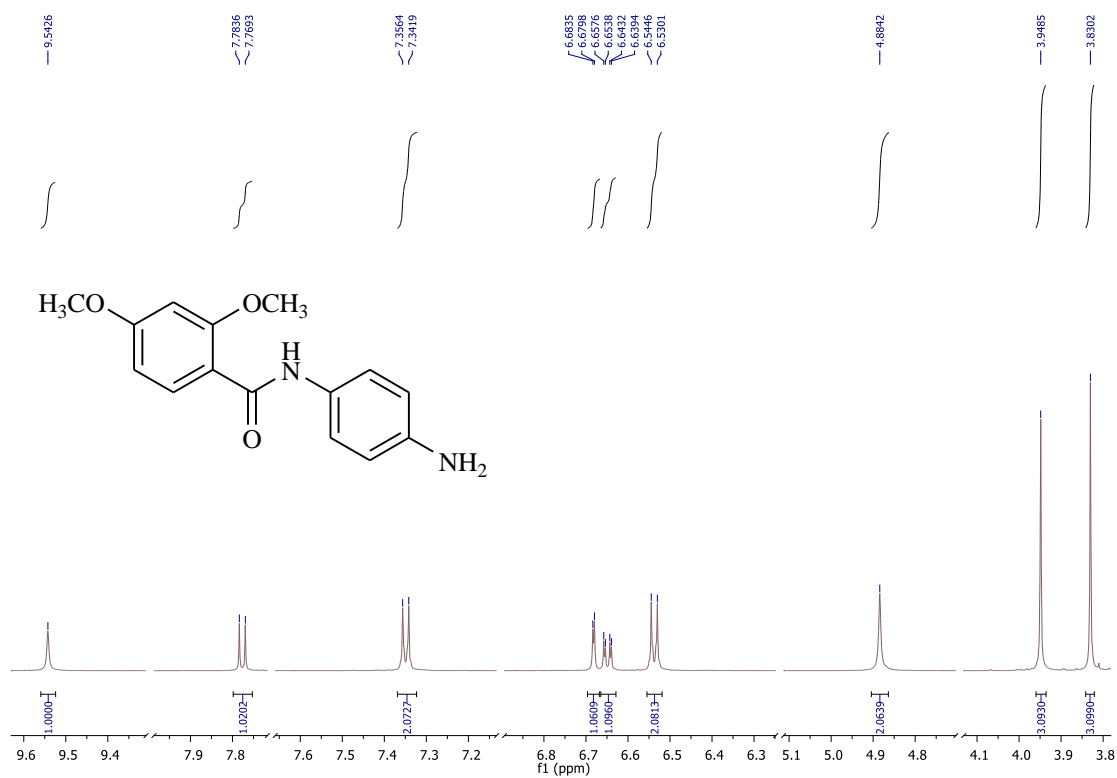
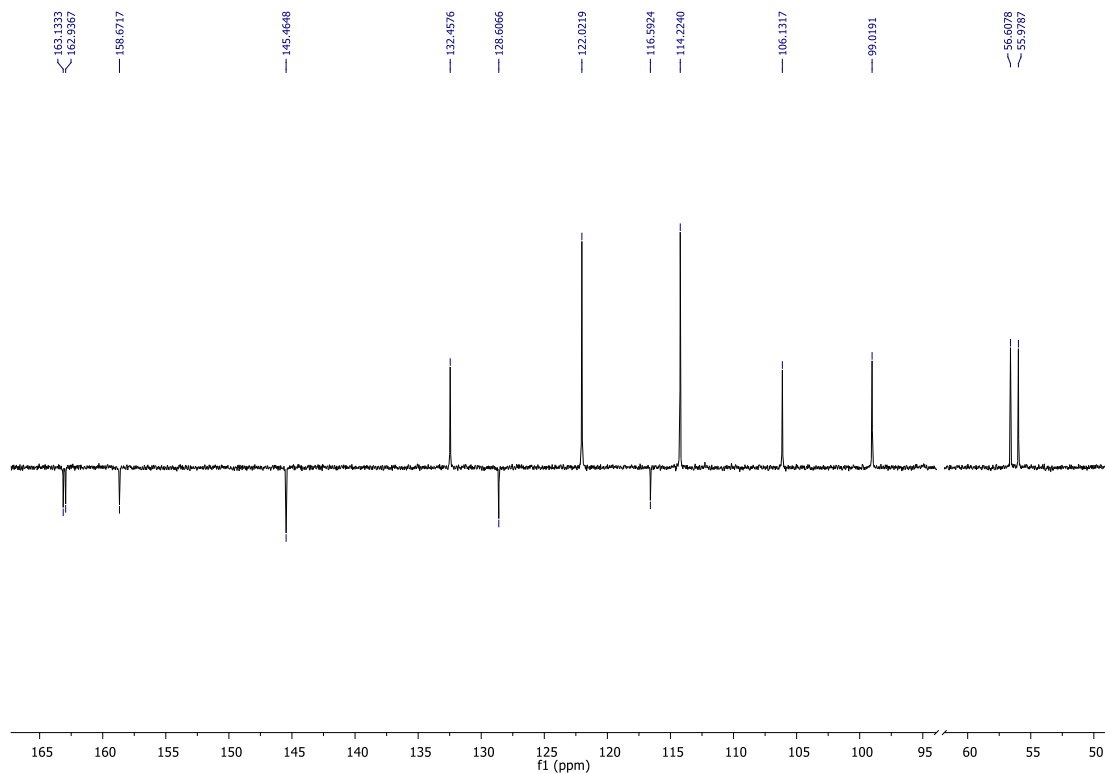
Prilog 7

a) ^1H NMR spektar 2,4-dimetoksi-*N*-(4-nitrofenil)benzamida **17**b) ^{13}C NMR spektar 2,4-dimetoksi-*N*-(4-nitrofenil)benzamida **17**

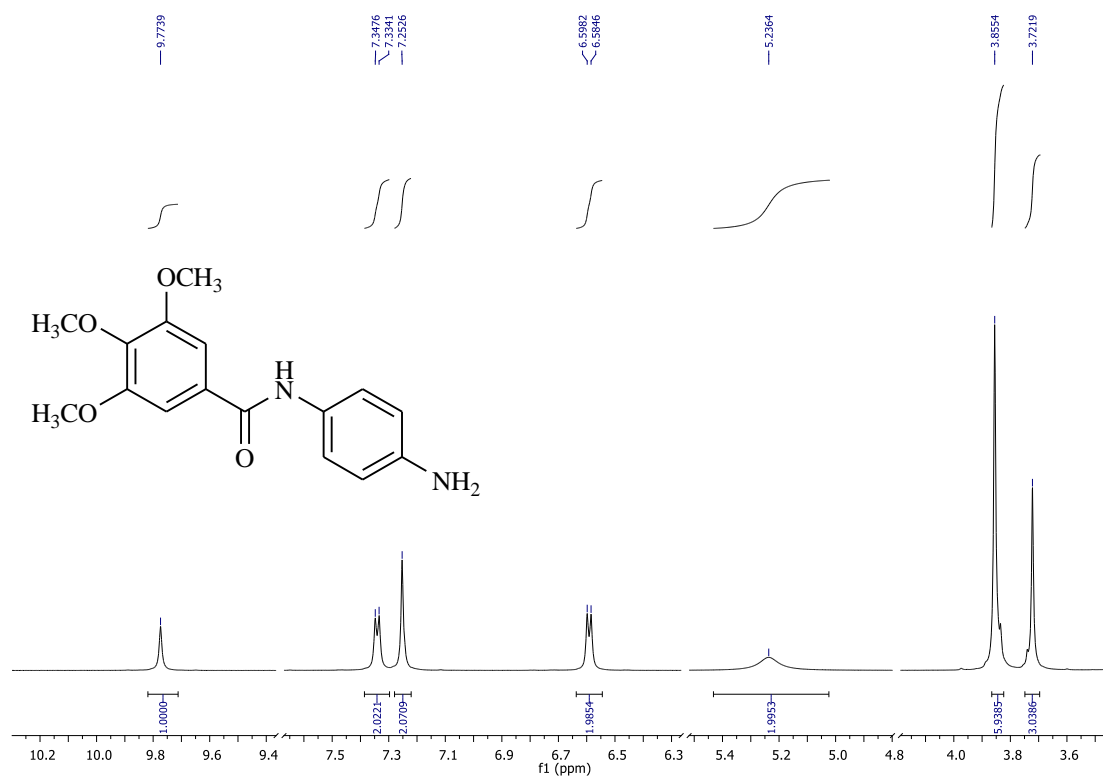
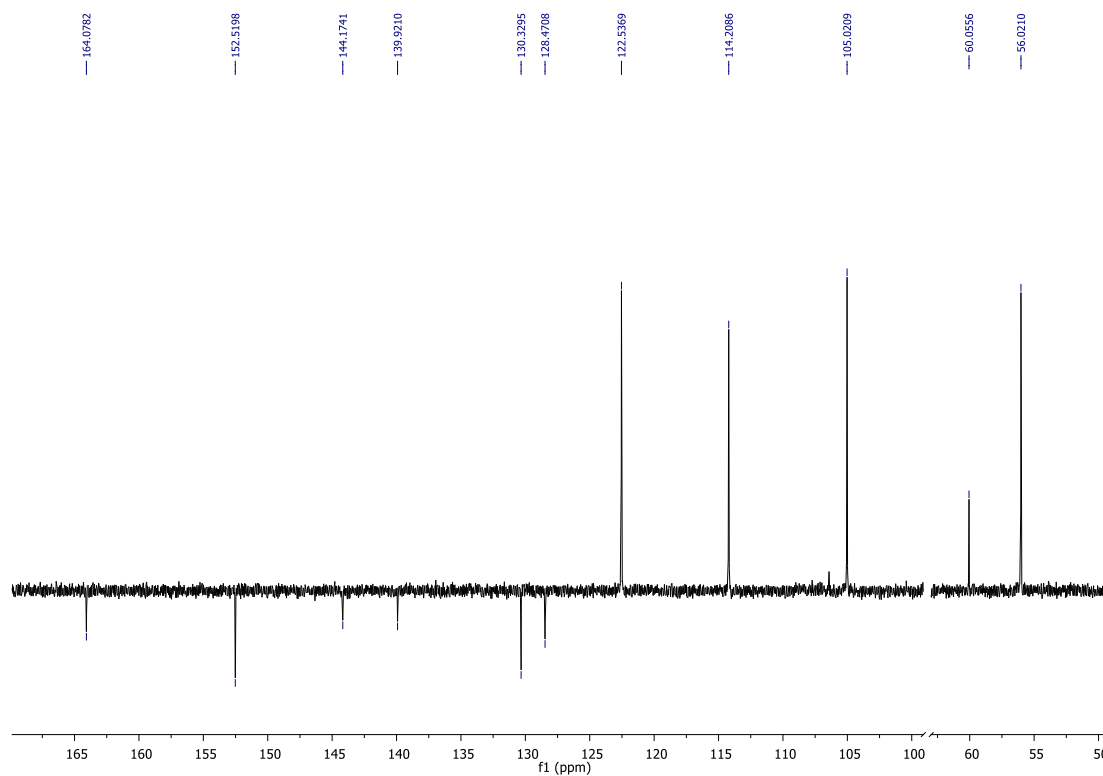
Prilog 8

a) ^1H NMR spektar 3,4,5-trimetoksi-*N*-(4-nitrofenil)benzamida **18**b) ^{13}C NMR spektar 3,4,5-trimetoksi-*N*-(4-nitrofenil)benzamida **18**

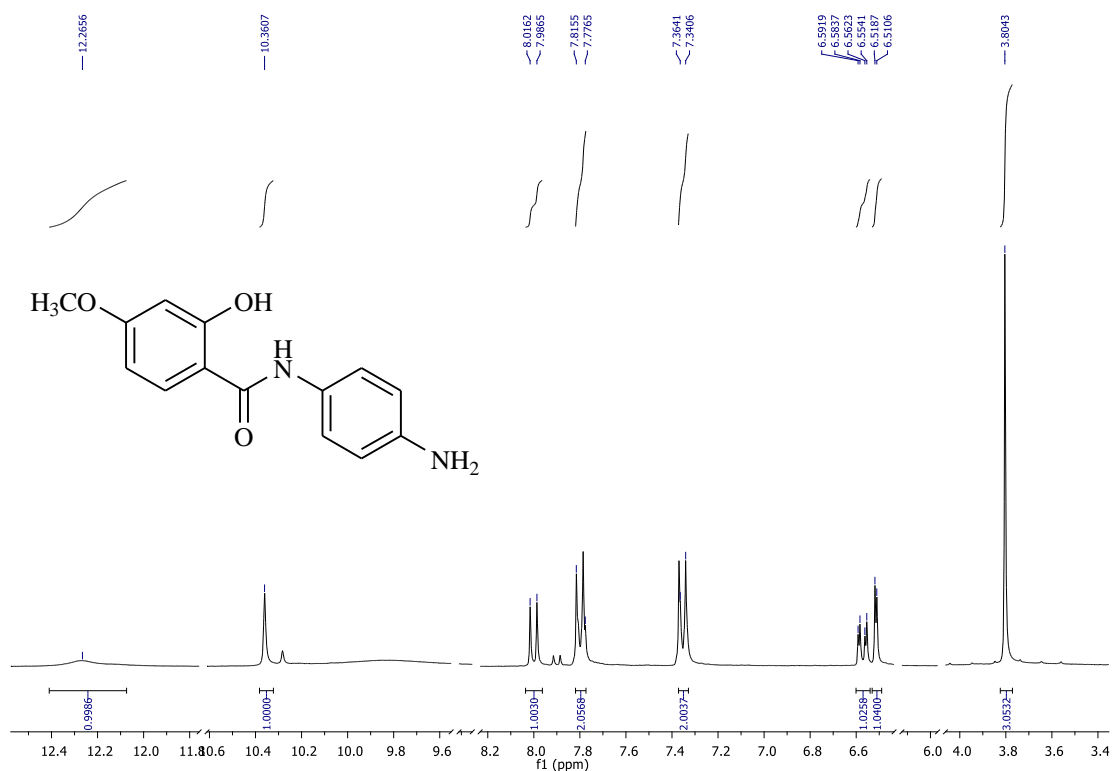
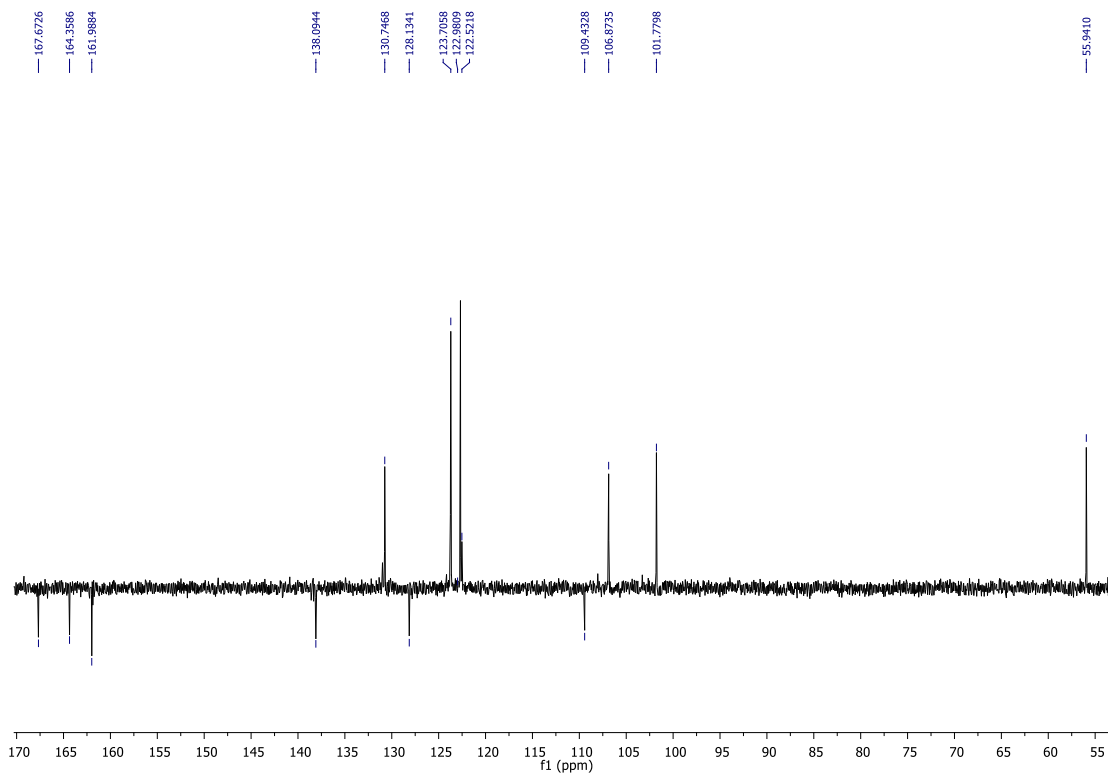
Prilog 9

a) ^1H NMR spektar 2,4-dimetoksi-*N*-(4-amino fenil)benzamida **19**b) ^{13}C NMR spektar 2,4-dimetoksi-*N*-(4-amino fenil)benzamida **19**

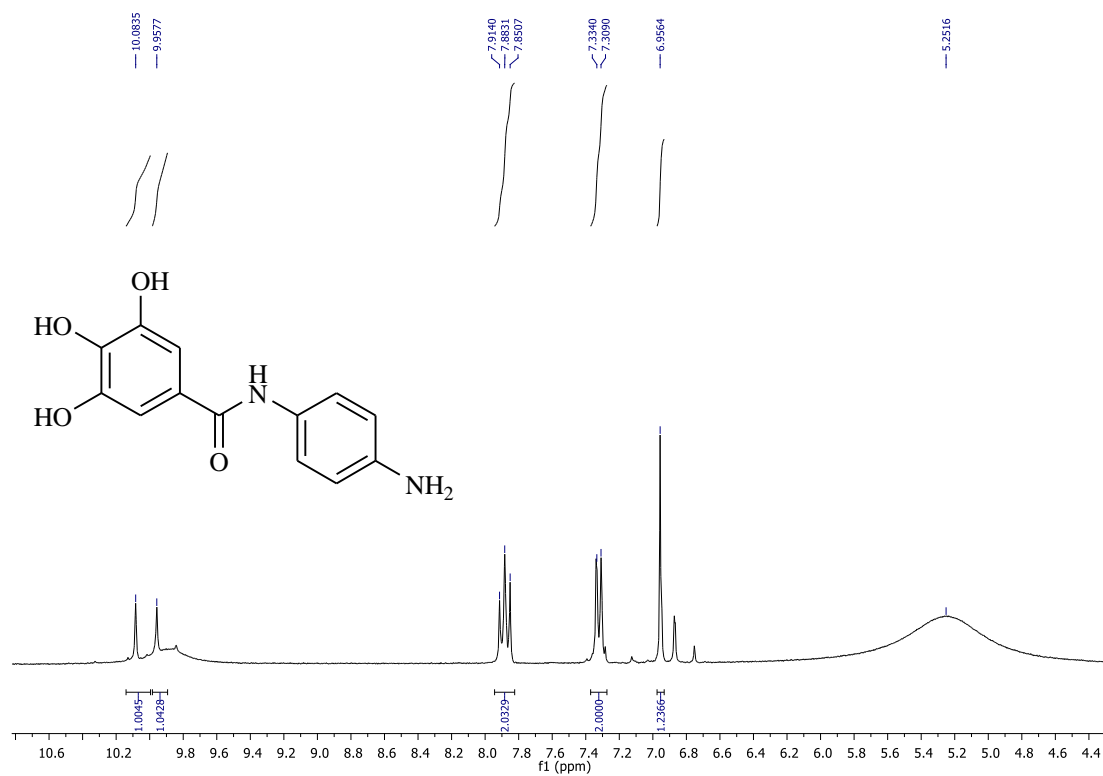
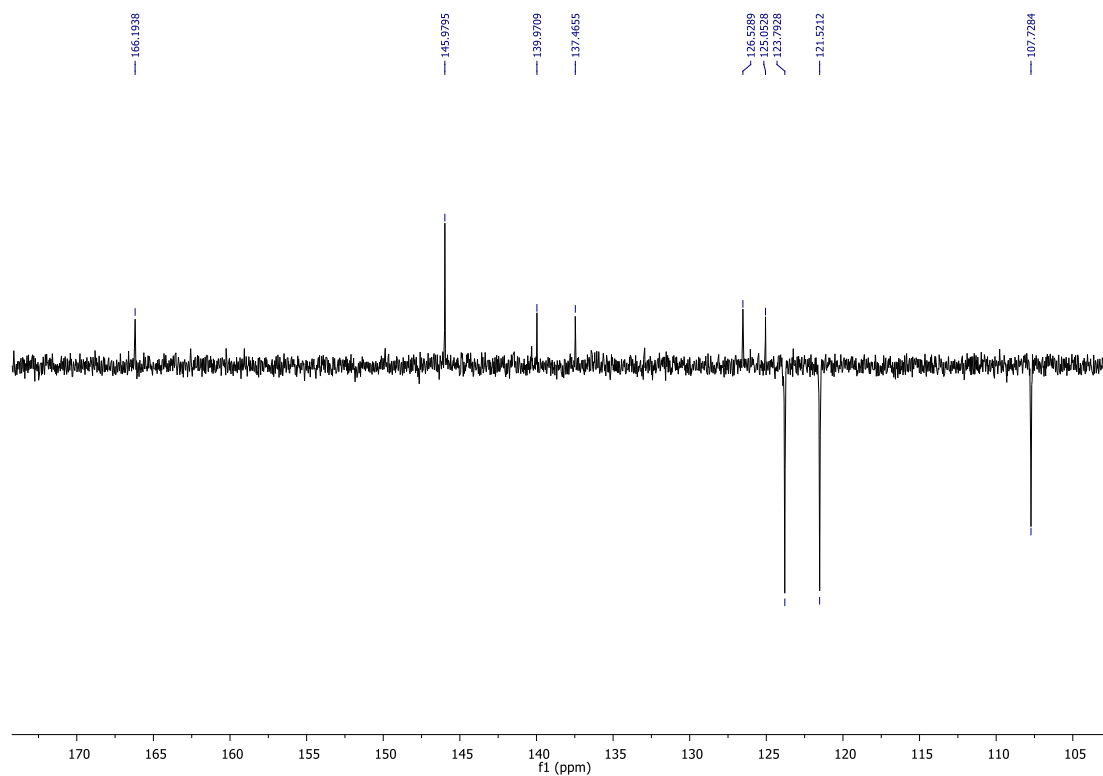
Prilog 10

a) ^1H NMR spektar 3,4,5-trimetoksi-*N*-(4-aminofenil)benzamida **20**b) ^{13}C NMR spektar 3,4,5-trimetoksi-*N*-(4-aminofenil)benzamida **20**

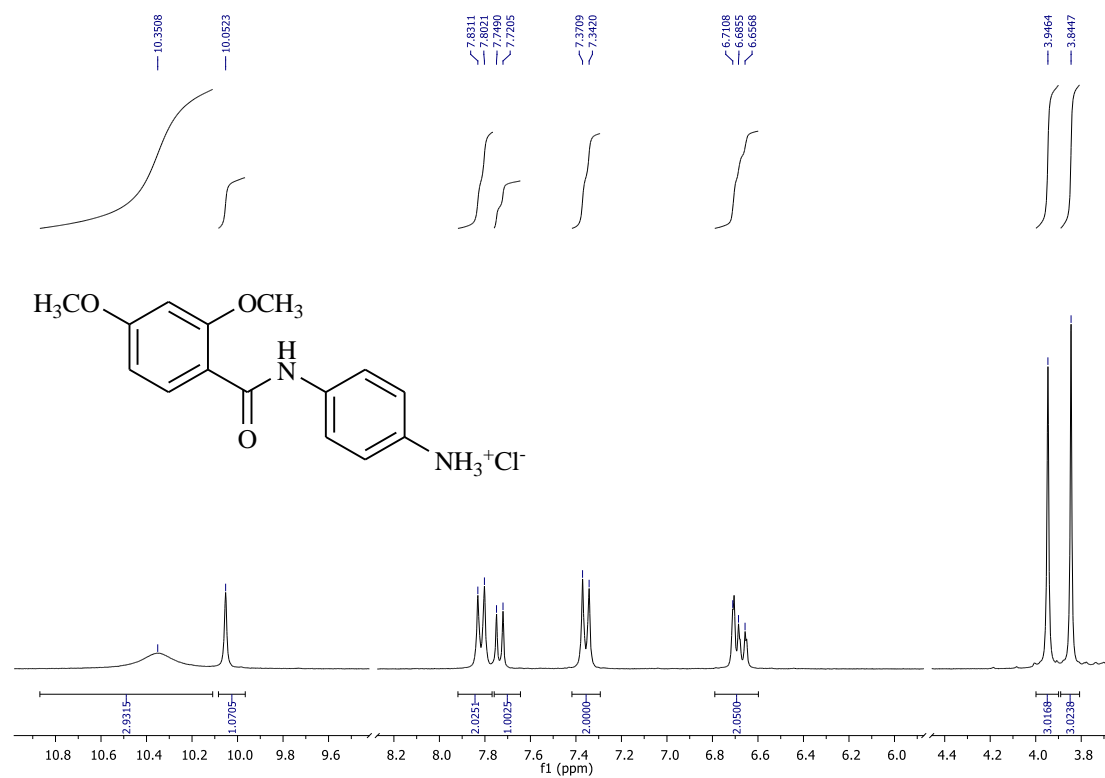
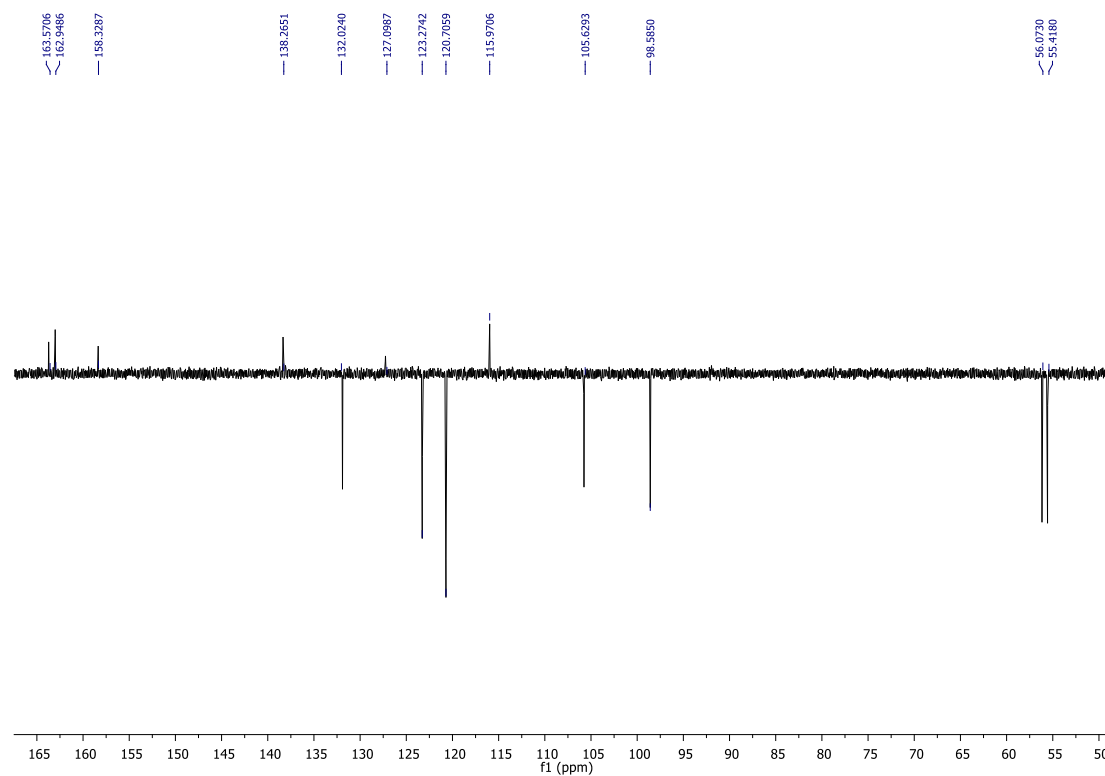
Prilog 11

a) ^1H NMR spektar 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-(4-aminofenil)benzamida **21**b) ^{13}C NMR spektar 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-(4-aminofenil)benzamida **21**

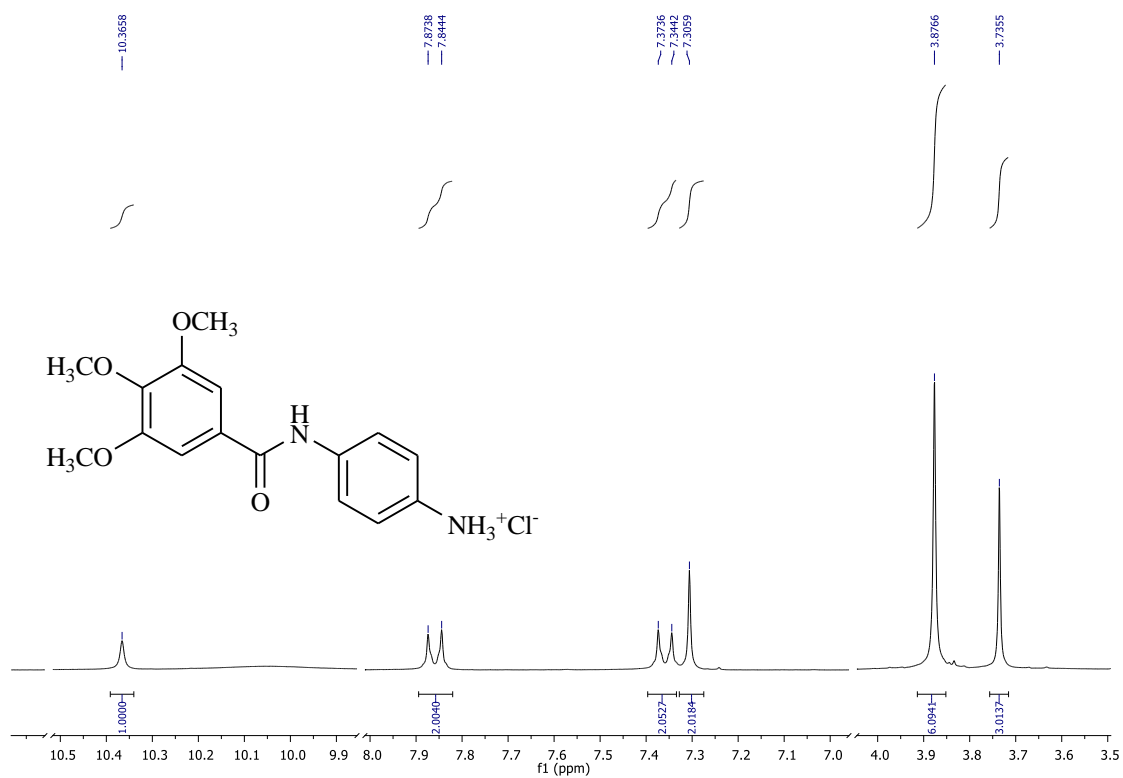
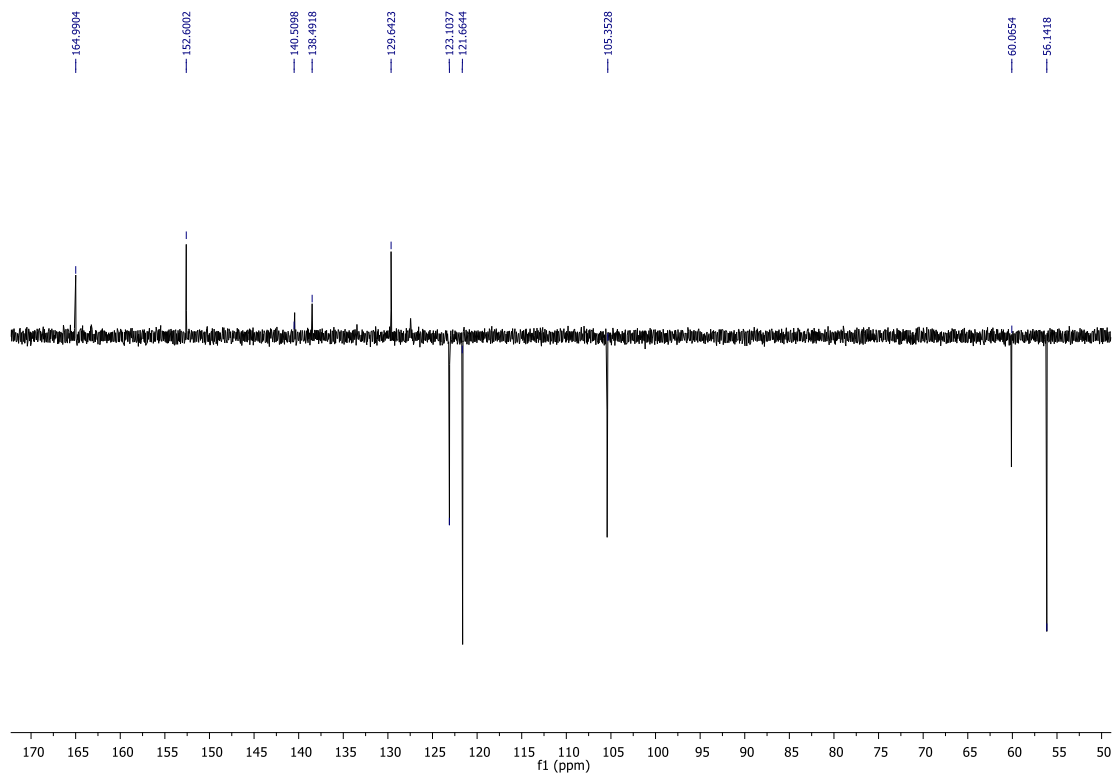
Prilog 12

a) ^1H NMR spektar 3,4,5-trihidroksi-*N*-(4aminofenil)benzamida **22**b) ^{13}C NMR spektar 3,4,5-trihidroksi-*N*-(4aminofenil)benzamidu **22**

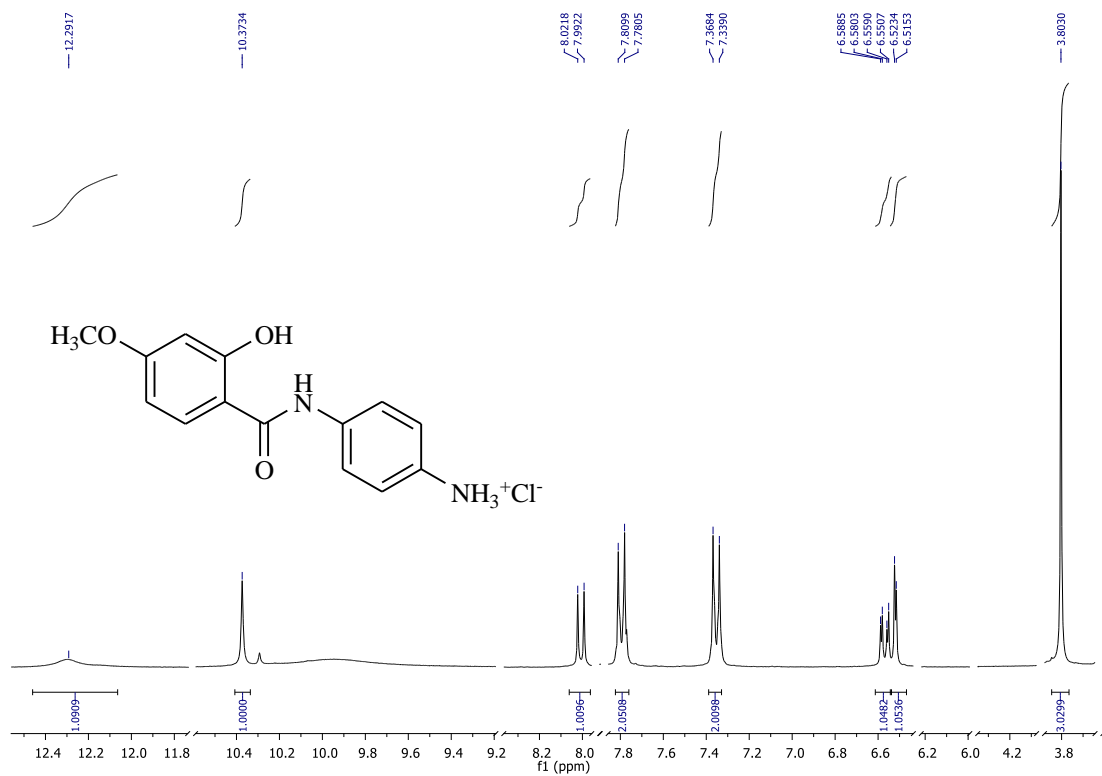
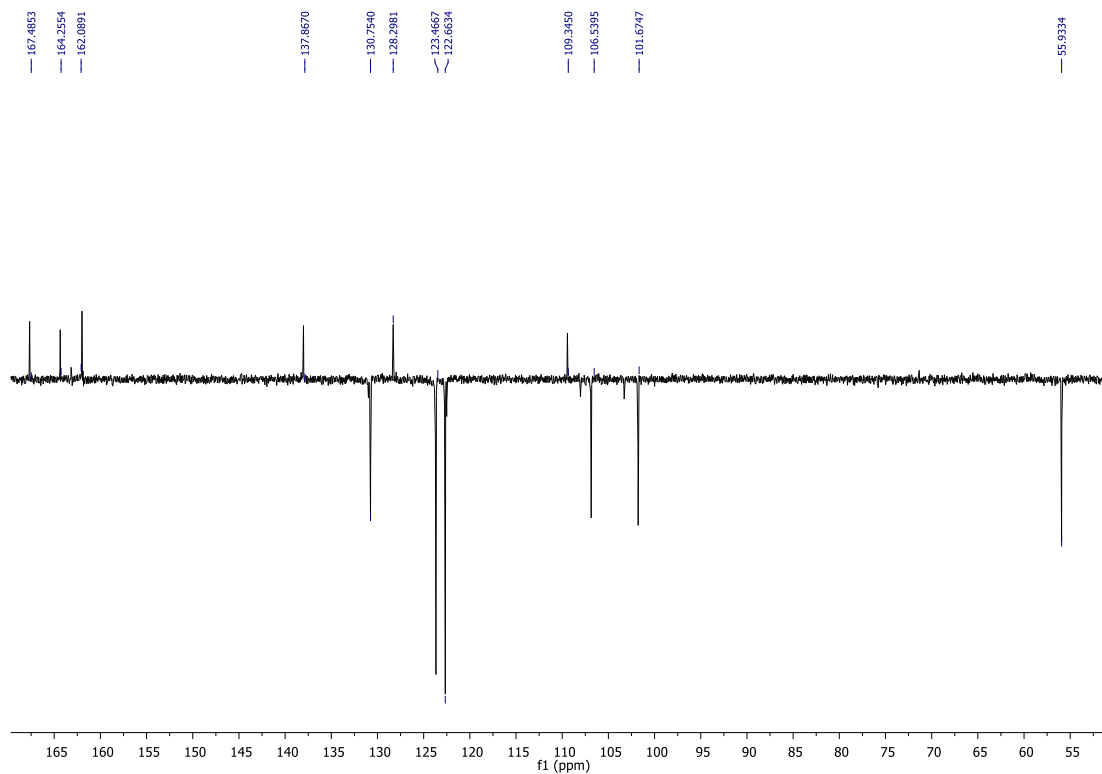
Prilog 13

a) ^1H NMR spektar 2,4-dimetoksi-*N*-(4-amino fenil)benzamid-hidroklorida 23b) ^{13}C NMR spektar 2,4-dimetoksi-*N*-(4-amino fenil)benzamid-hidroklorida 23

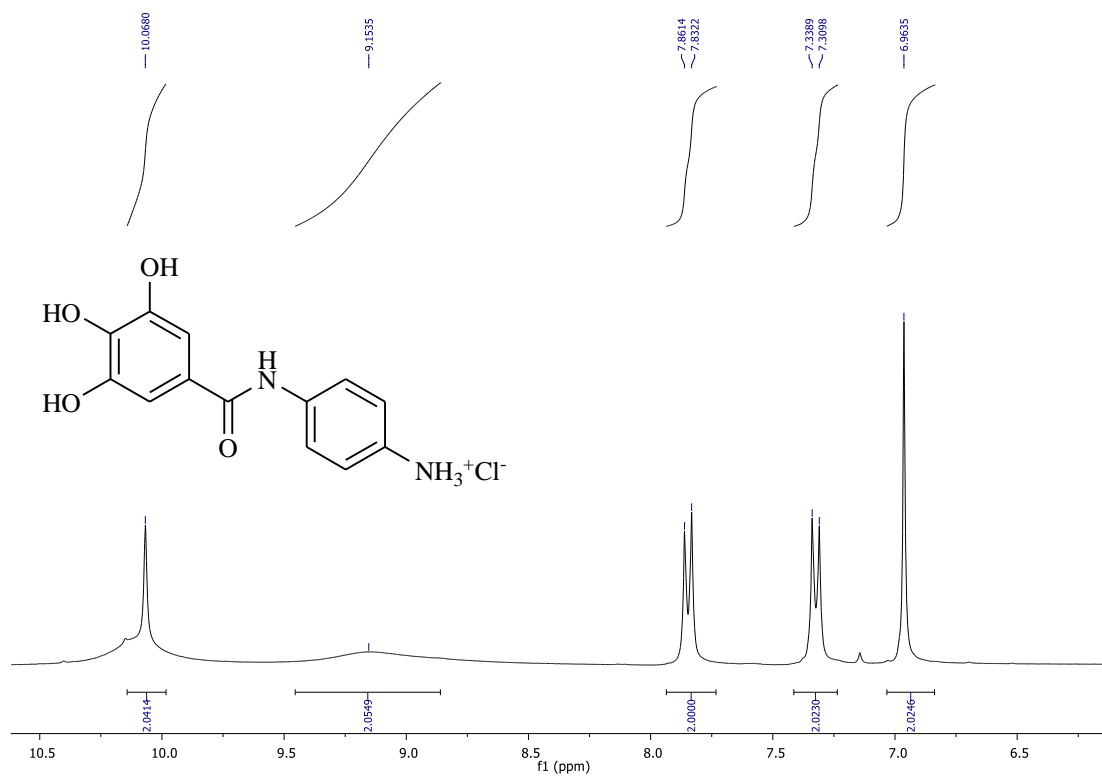
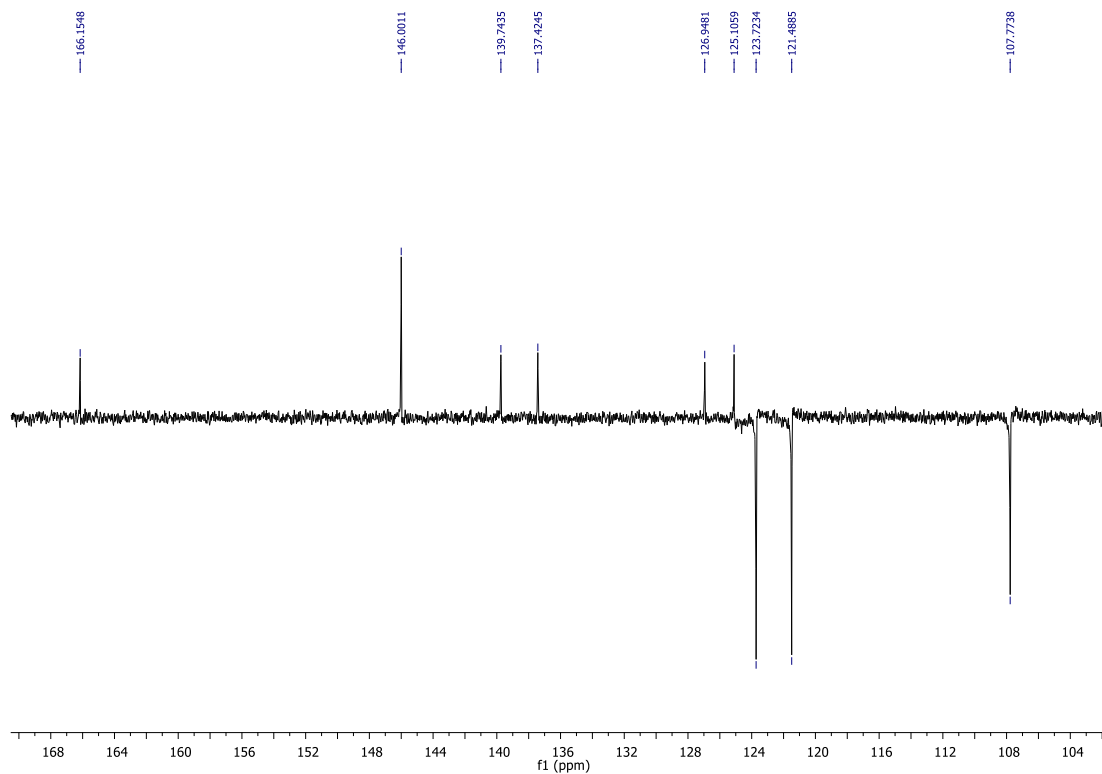
Prilog 14

a) ^1H NMR spektar 3,4,5-trimetoksi-*N*-(4-amino fenil)benzamid-hidroklorida **24**b) ^{13}C NMR spektar 3,4,5-trimetoksi-*N*-(4-amino fenil)benzamid-hidroklorida **24**

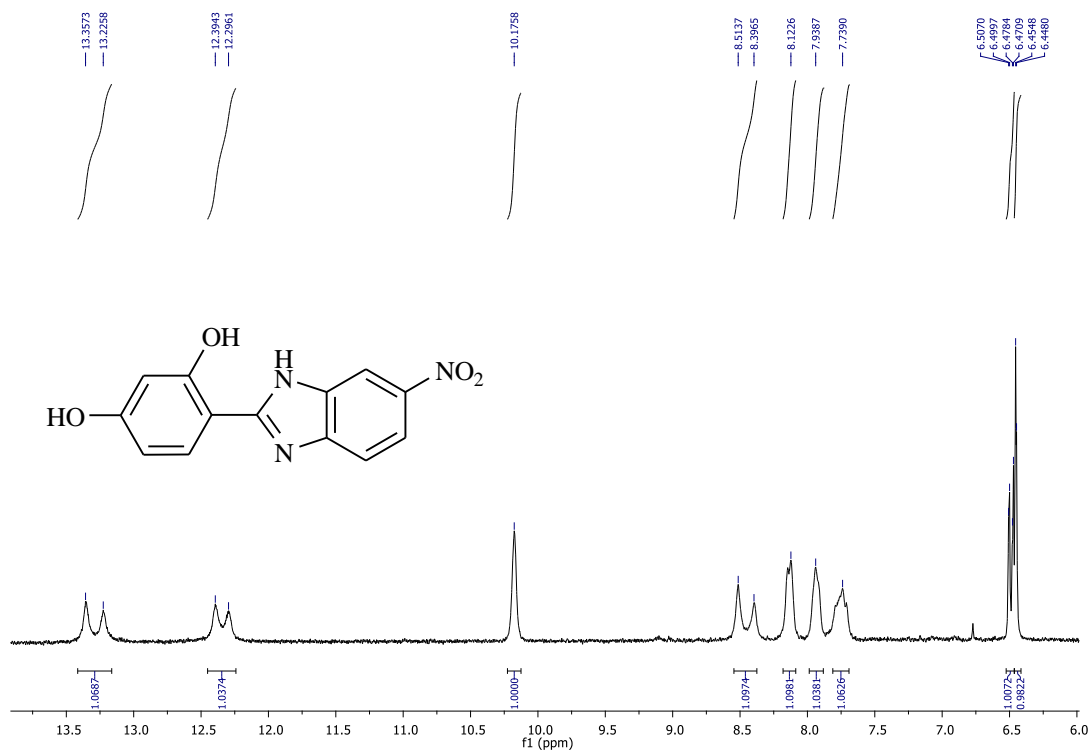
Prilog 15

a) ^1H NMR spektar 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-(4amino fenil)benzamid-hidroklorida **25**b) ^{13}C NMR spektar 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-(4amino fenil)benzamid-hidroklorida **25**

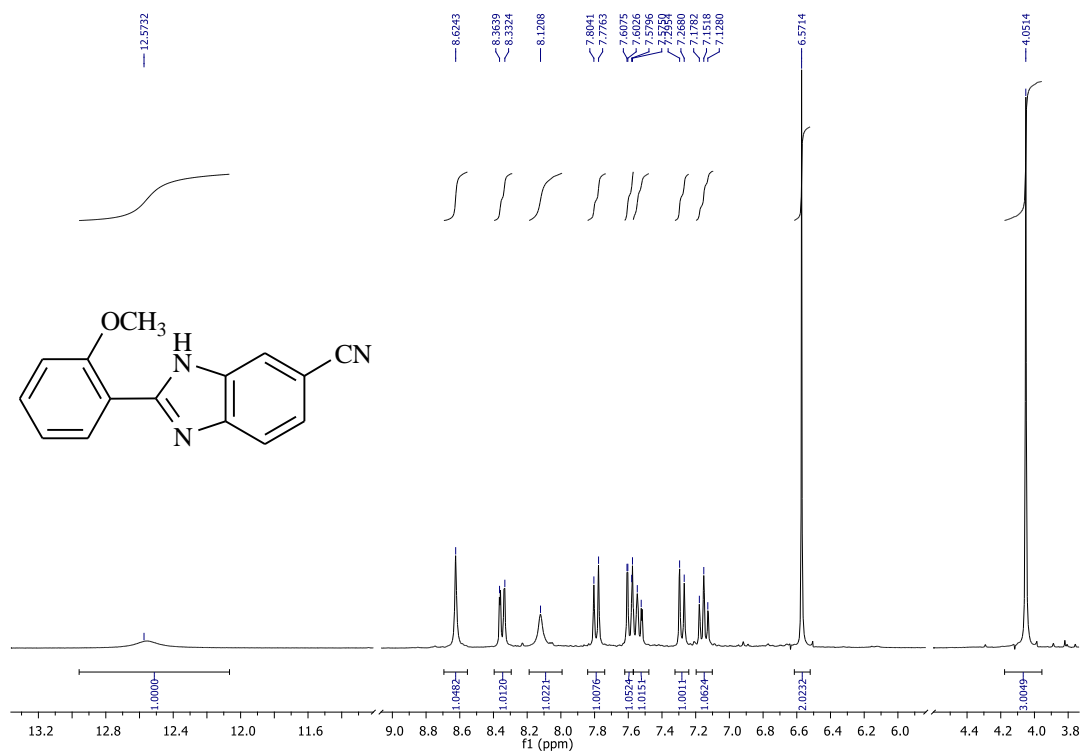
Prilog 16

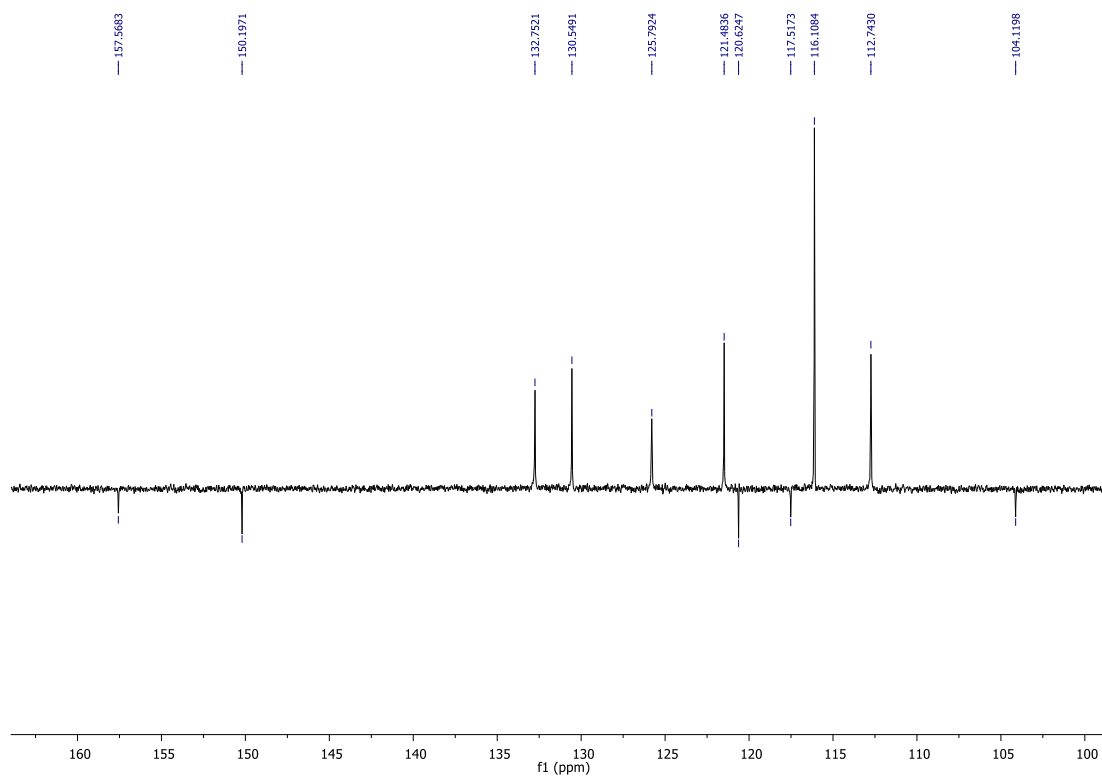
a) ^1H NMR spektar 3,4,5-trihidroksi-*N*-(4aminofenil)benzamid-hidroklorida **26**b) ^{13}C NMR spektar 3,4,5-trihidroksi-*N*-(4aminofenil)benzamid-hidroklorida **26**

Prilog 17

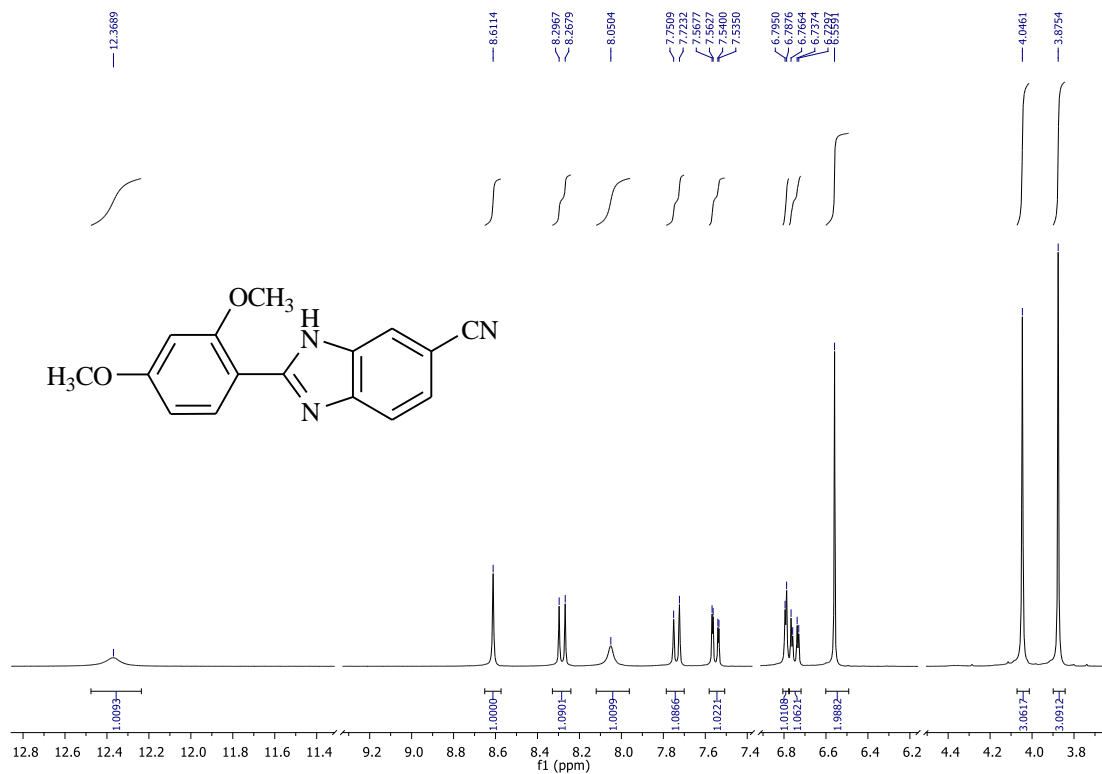
a) ^1H NMR spektar 5(6)-nitro-2-(2,4-dihidroksifenil)benzimidazola **30**

Prilog 18

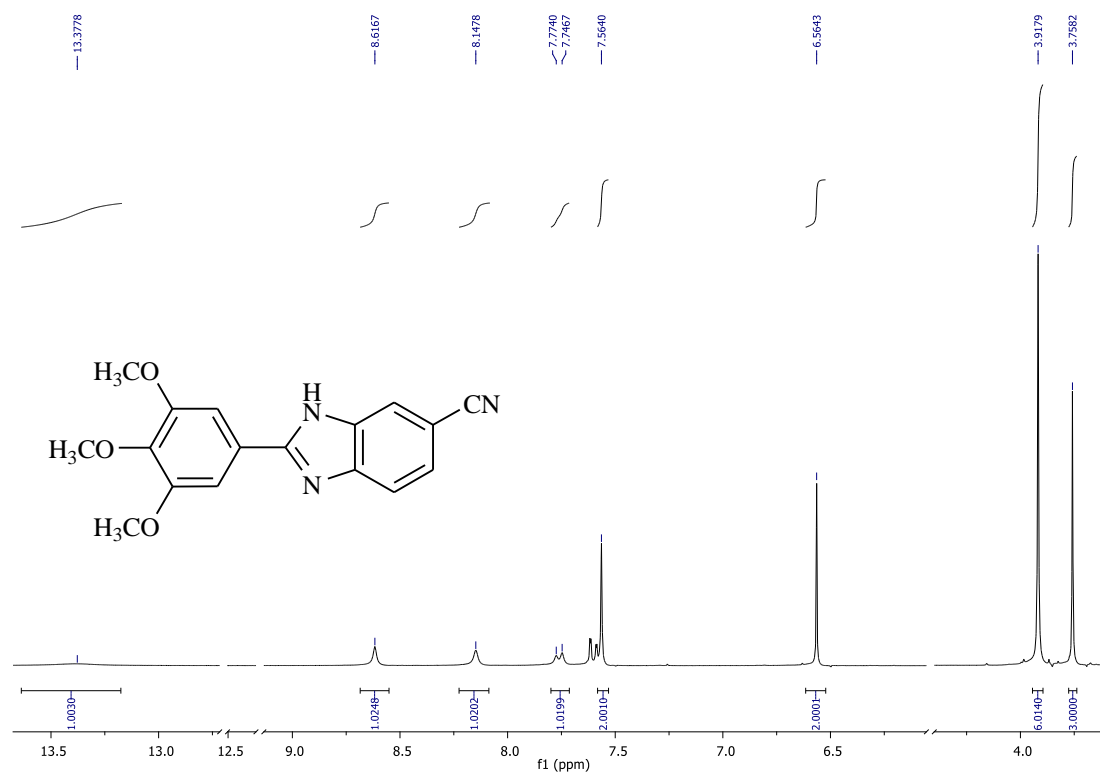
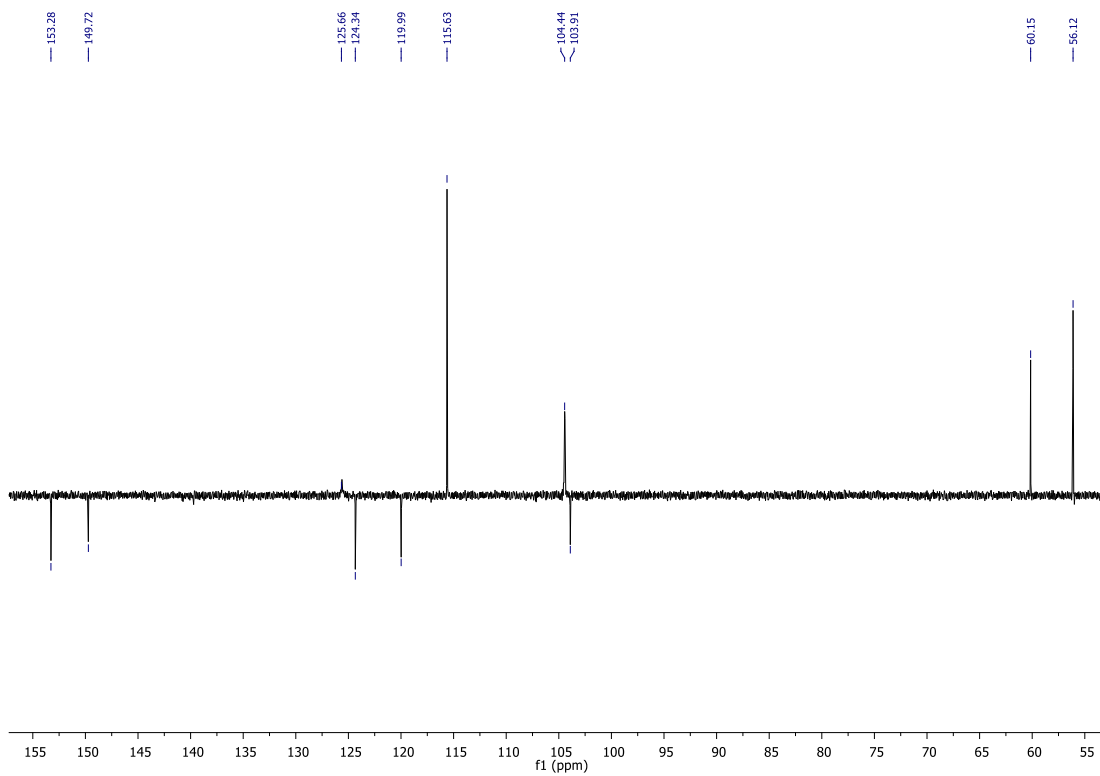
a) ^1H NMR spektar 5(6)-cijano-2-(2-metoksifenil)benzimidazola **36**

b) ^{13}C NMR spektar 5(6)-cijano-2-(2-metoksifenil)benzimidazola **36**

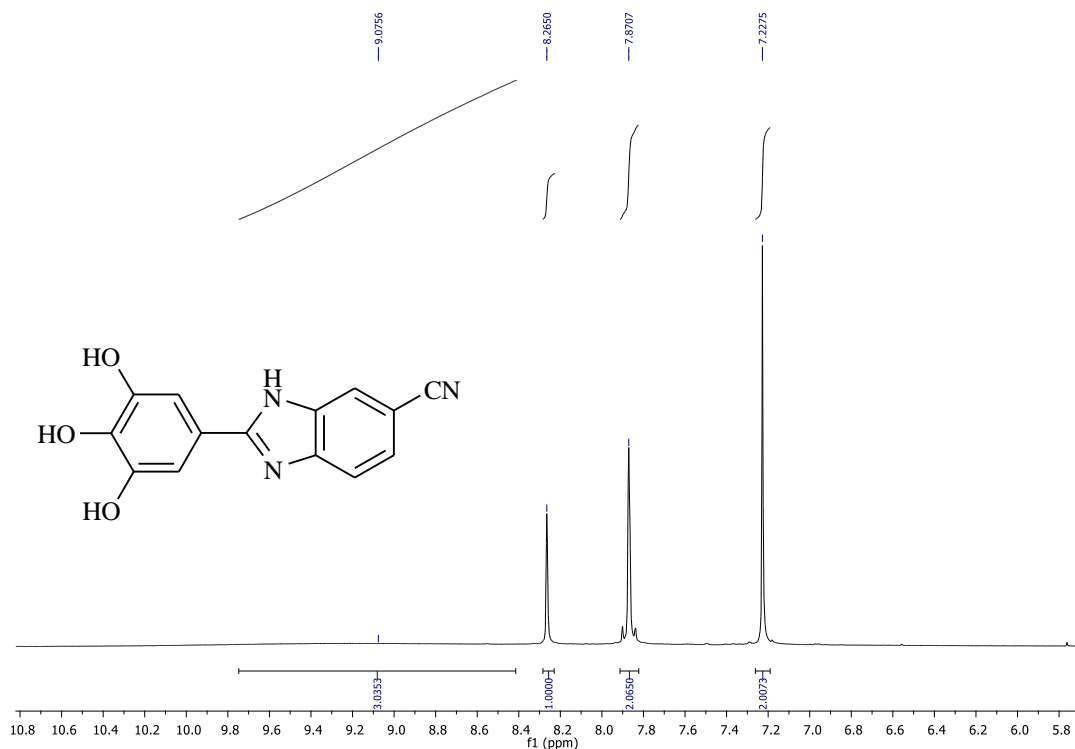
Prilog 19

a) ^1H NMR spektar 5(6)-cijano-2-(2,4-dimetoksifenil)benzimidazola **37**

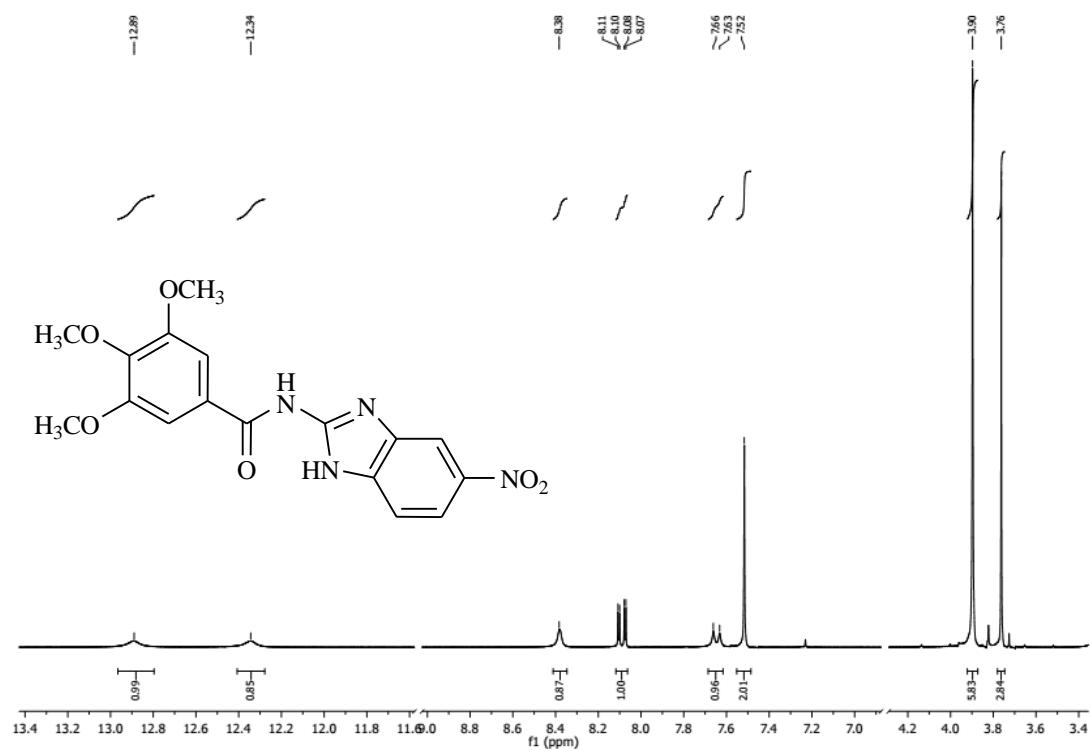
Prilog 20

a) ^1H NMR spektar 5(6)-cijano-2-(2,3,4-trimetoksiifenil)benzimidazola **38**b) ^{13}C NMR spektar 5(6)-cijano-2-(2,3,4-trimetoksiifenil)benzimidazola **38**

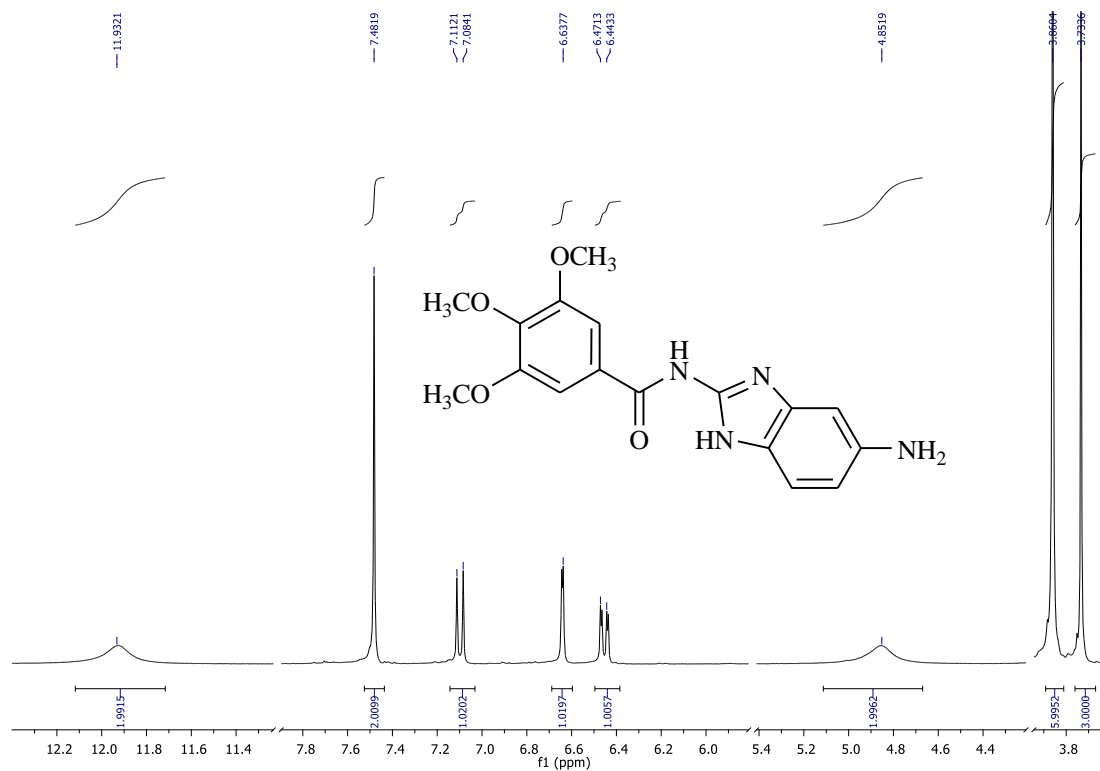
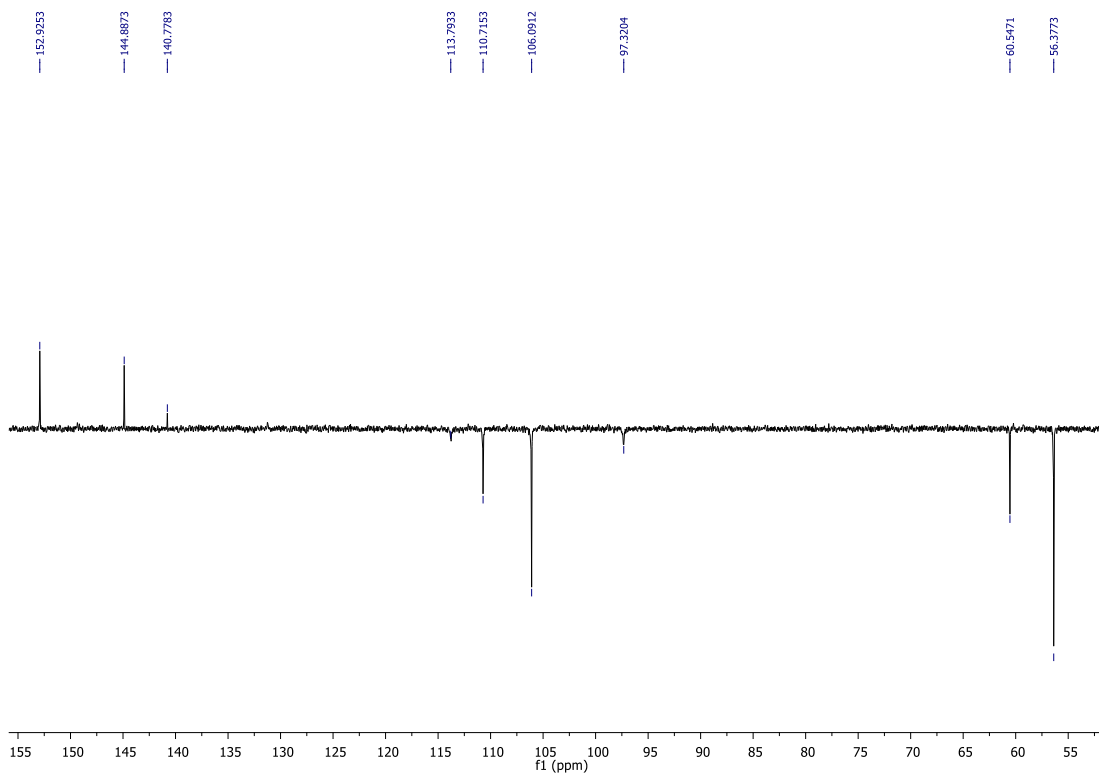
Prilog 21

a) ^1H NMR spektar 5(6)-cijano-2-(2,3,4-trihidroksifenil)benzimidazola **40**

Prilog 22

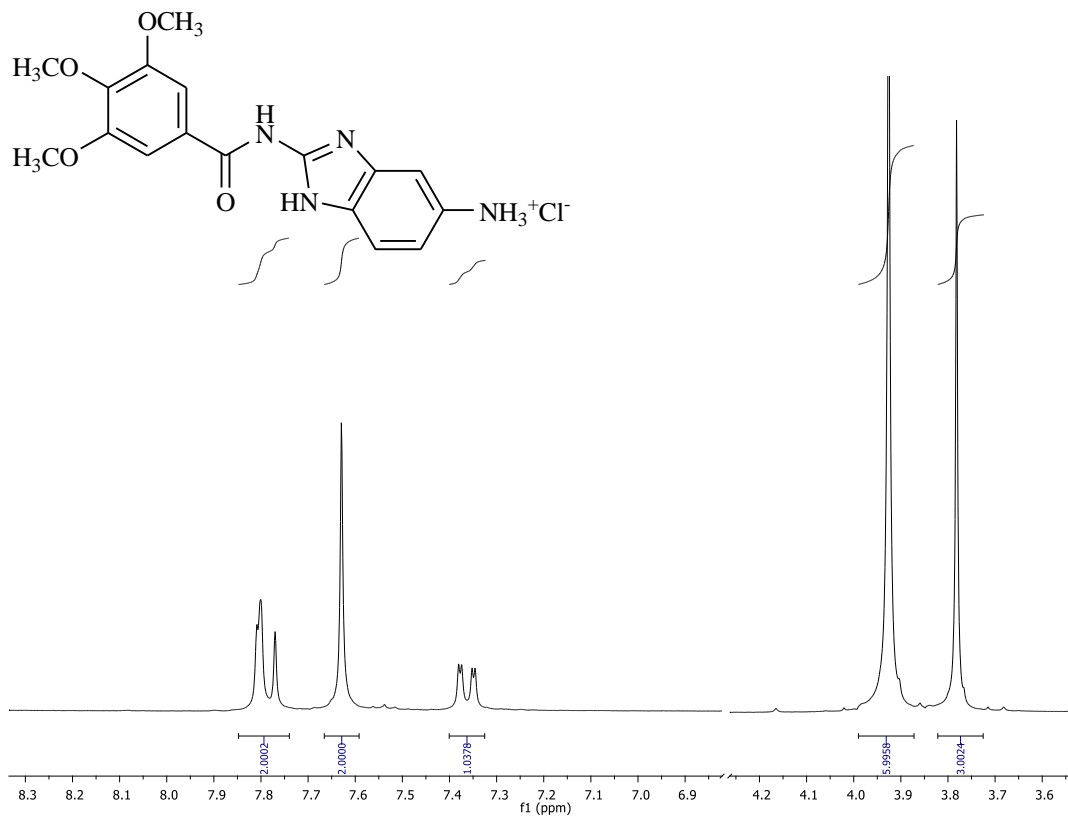
a) ^1H NMR spektar 3,4,5-trimetoksi-*N*-[5(6)-nitrobenzimidazol-2-il]benzamida **43**

Prilog 23

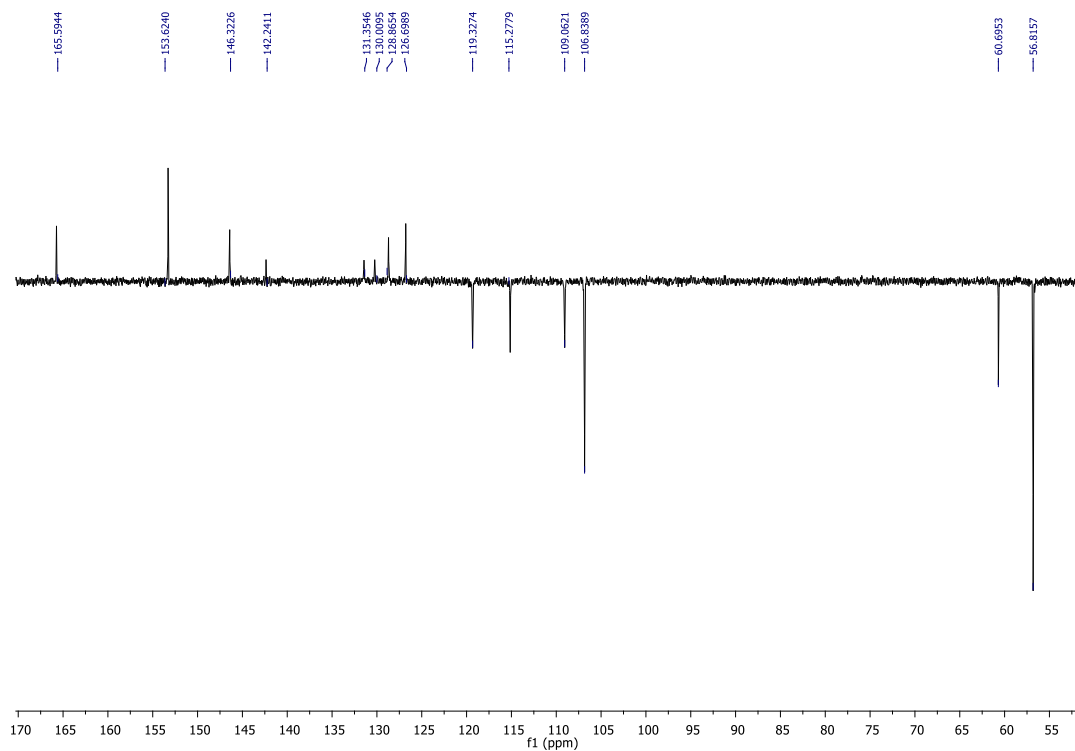
a) ^1H NMR spektar 3,4,5-trimetoksi-*N*-[5(6)-aminobenzimidazol-2-il]benzamida **44**b) ^{13}C NMR spektar 3,4,5-trimetoksi-*N*-[5(6)-aminobenzimidazol-2-il]benzamida **44**

Prilog 24

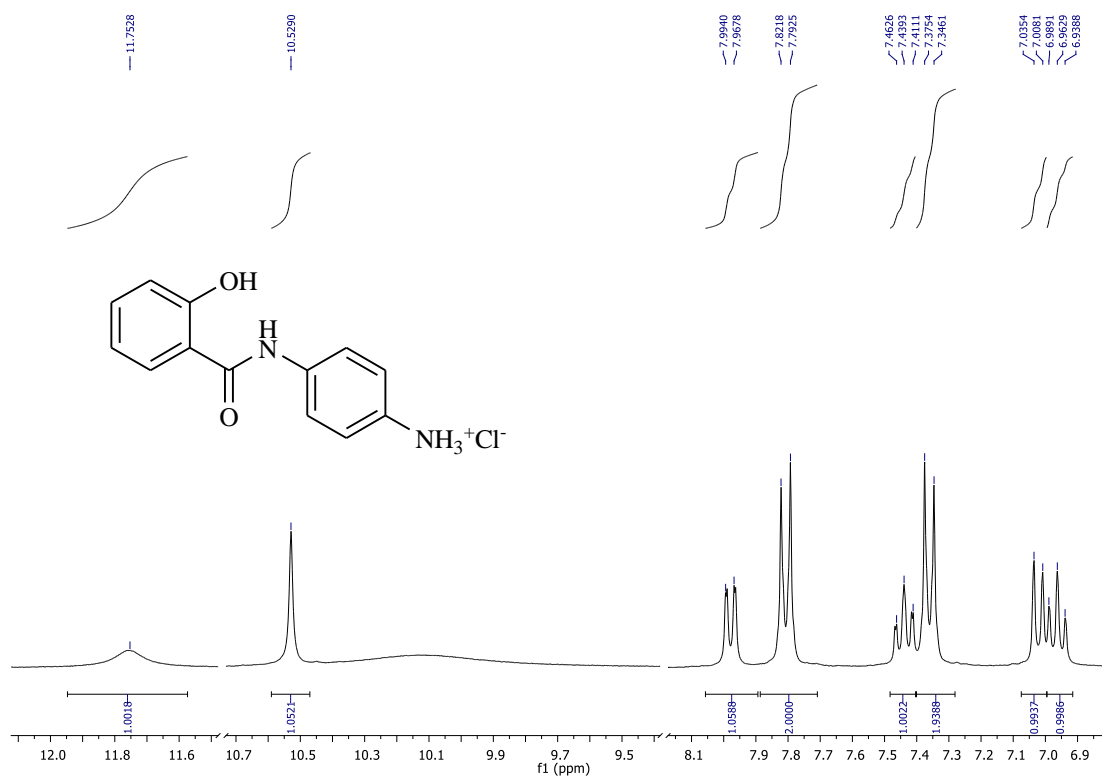
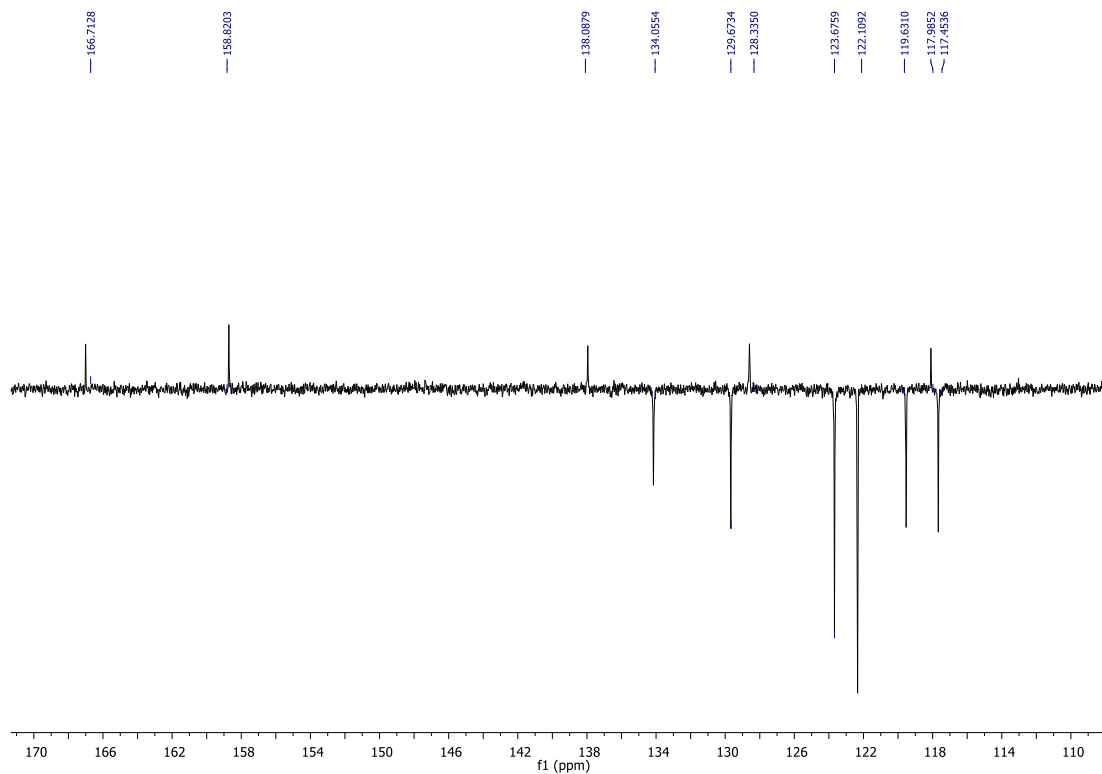
a) ^1H NMR spektar 3,4,5-trimetoksi-*N*-[5(6)-aminobenzimidazol-2-il]benzamid-hidroklorida
46



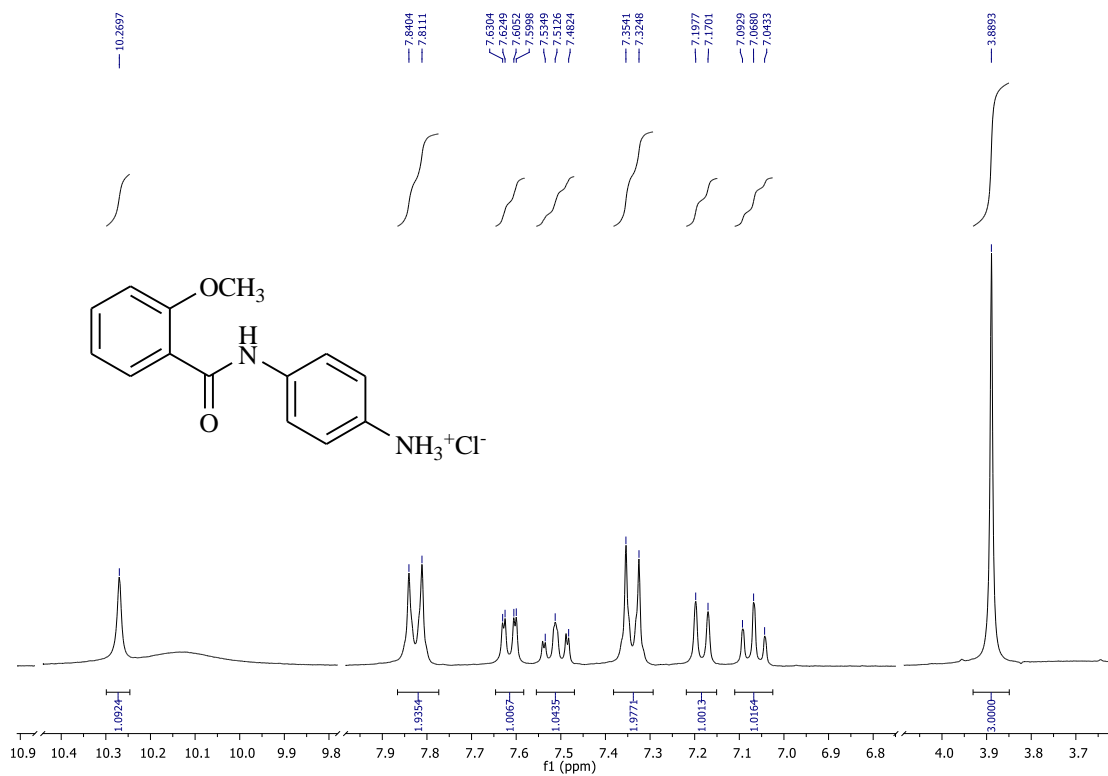
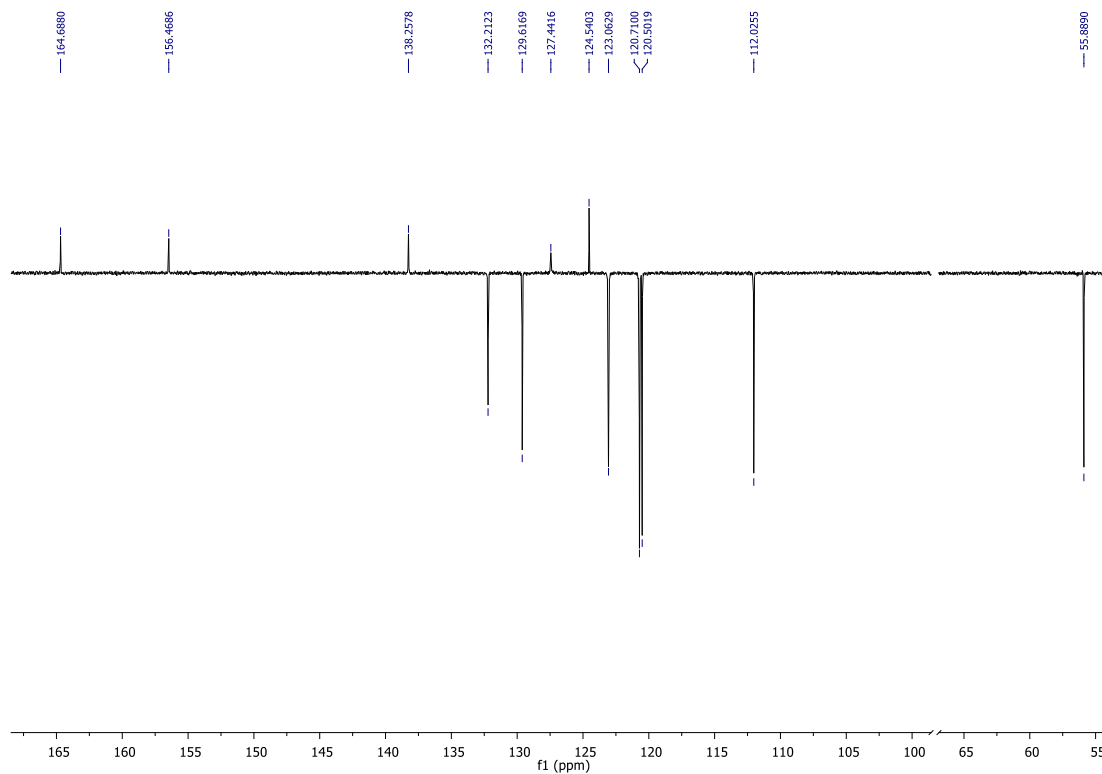
b) ^{13}C NMR spektar 3,4,5-trimetoksi-*N*-[5(6)-aminobenzimidazol-2-il]benzamid-hidroklorida
46



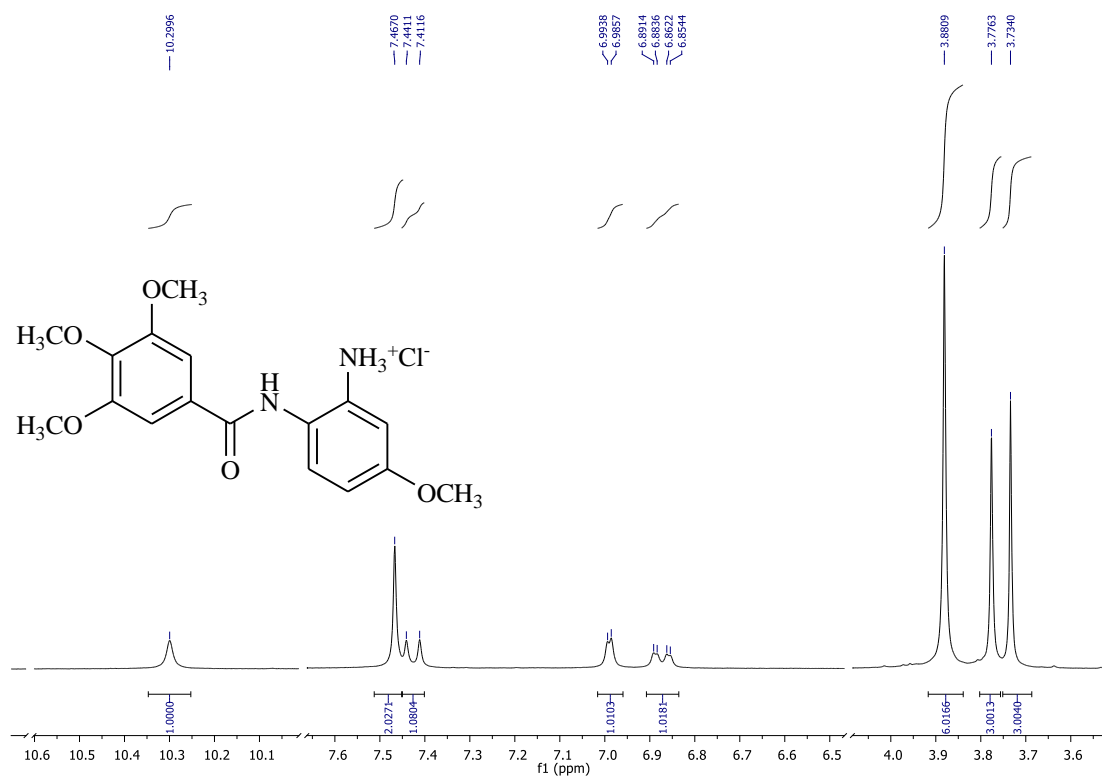
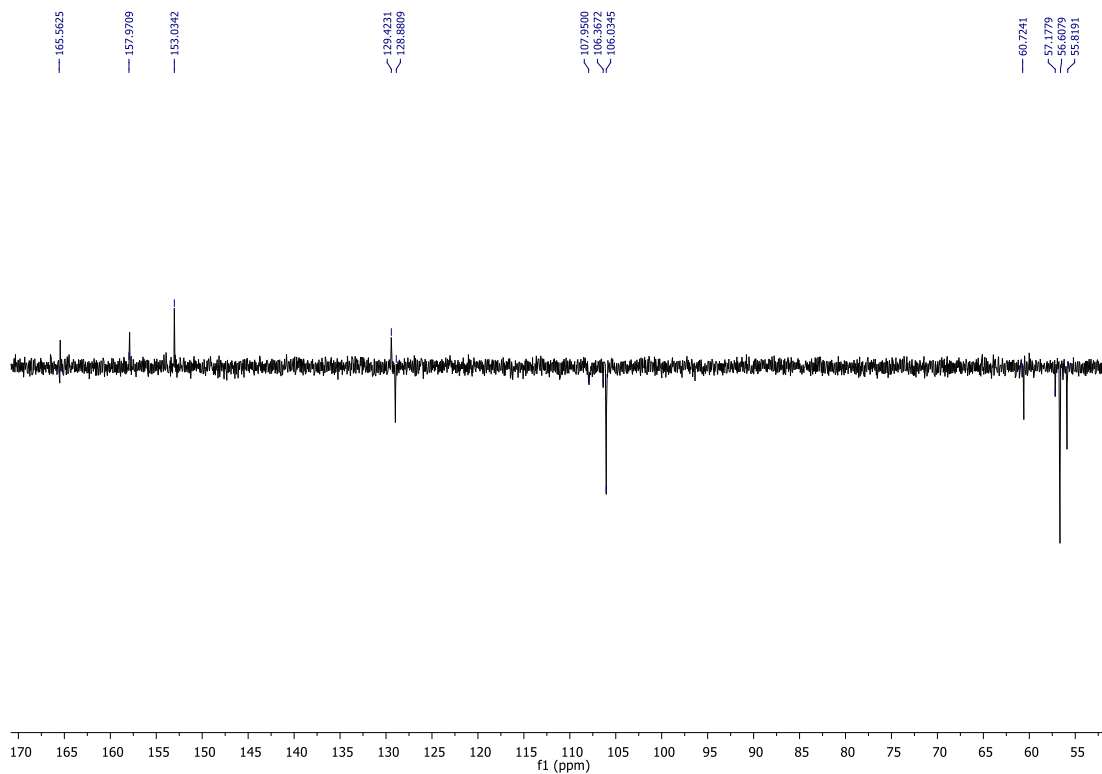
Prilog 25

a) ^1H NMR spektar 2-hidroksi-*N*-(4-amino fenil)benzamid-hidroklorida **51**b) ^{13}C NMR spektar 2-hidroksi-*N*-(4-amino fenil)benzamid-hidroklorida **51**

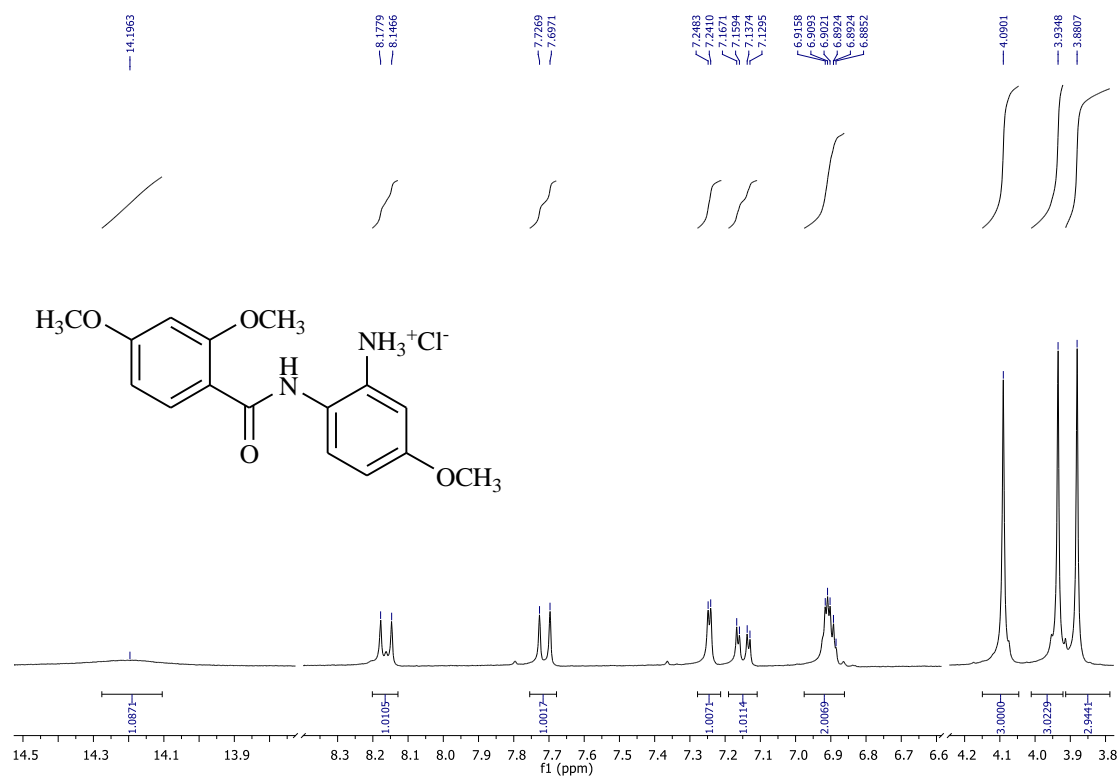
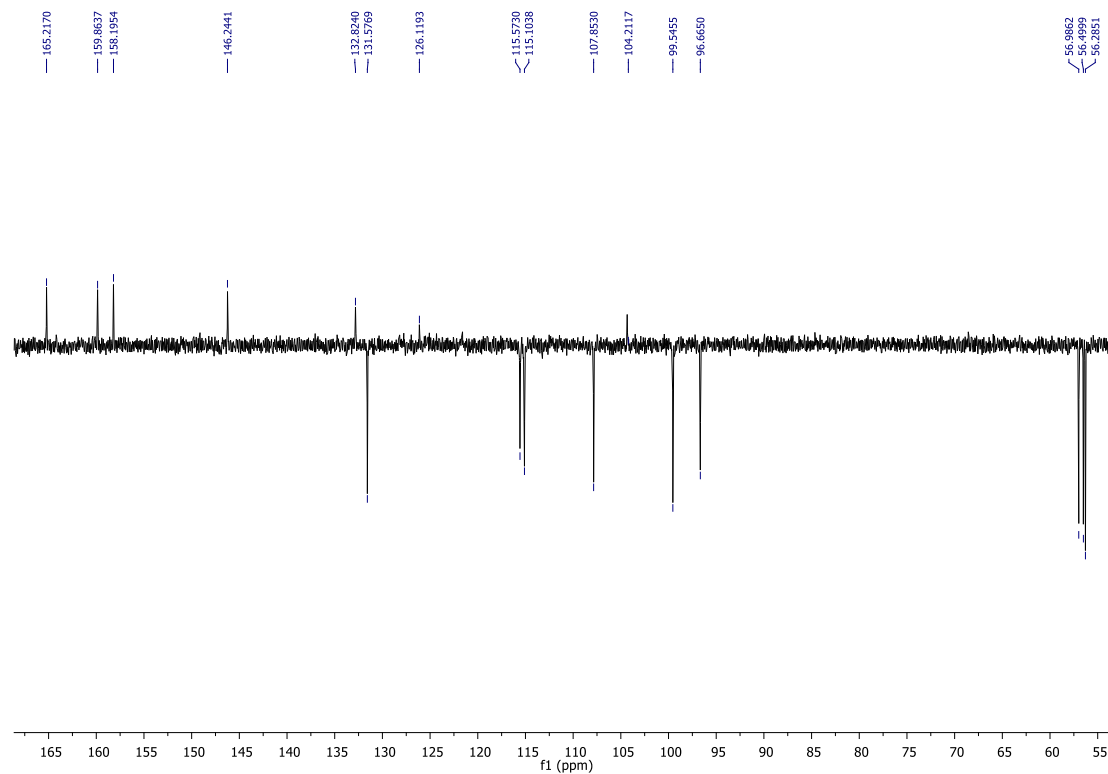
Prilog 26

a) ^1H NMR spektar 2-metoksi-*N*-(4-amino fenil)benzamid-hidroklorida **52**b) ^{13}C NMR spektar 2-metoksi-*N*-(4-amino fenil)benzamid-hidroklorida **52**

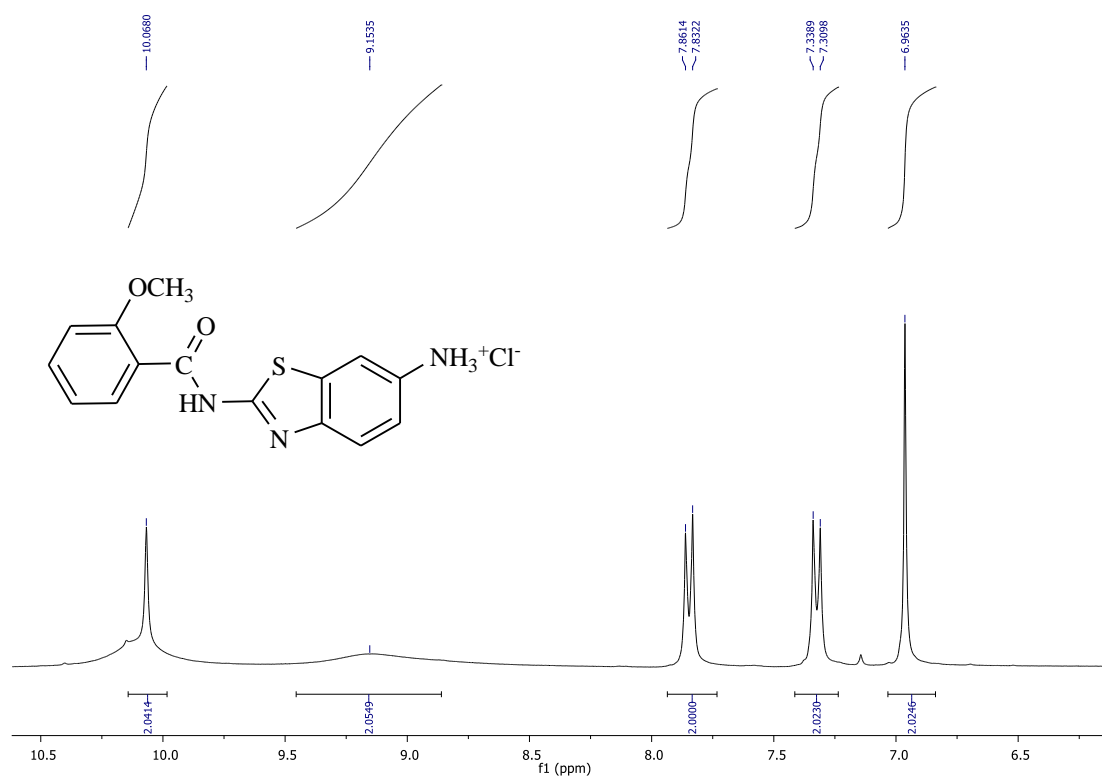
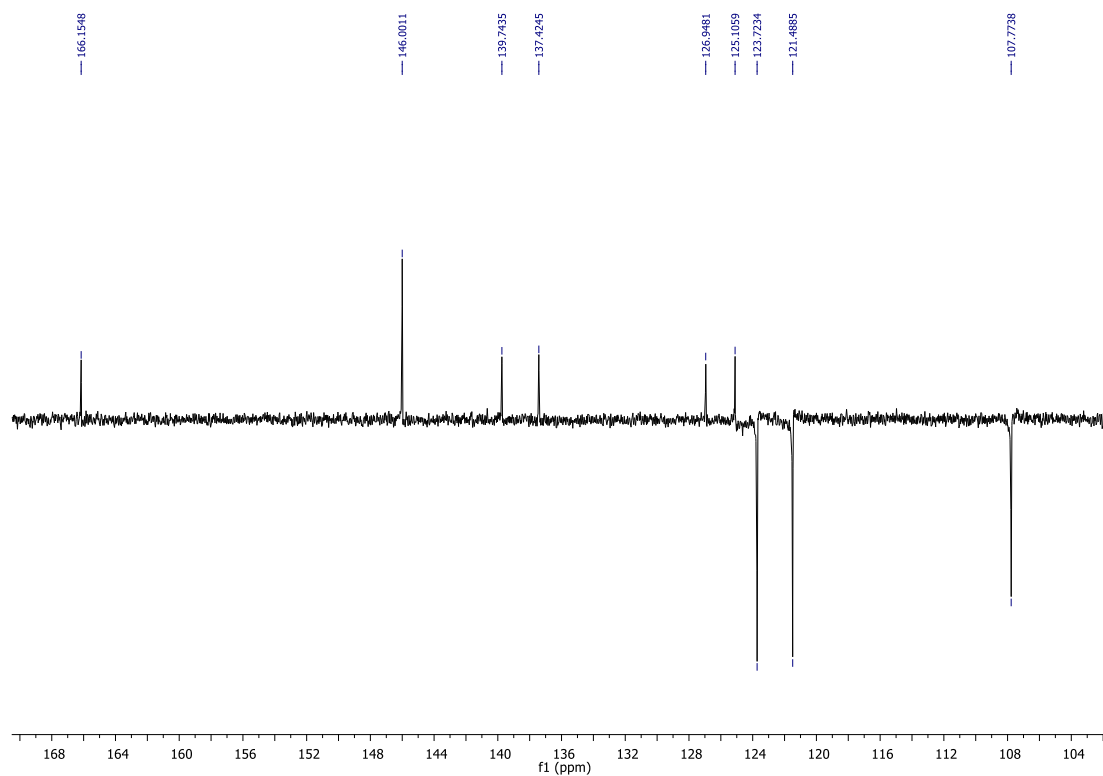
Prilog 27

a) ^1H NMR spektar 3,4,5-trimetoksi-*N*-(4-metoksi-2-amino fenil)benzamid-hidroklorida 53b) ^{13}C NMR spektar 3,4,5-trimetoksi-*N*-(4-metoksi-2-amino fenil)benzamid-hidroklorida 53

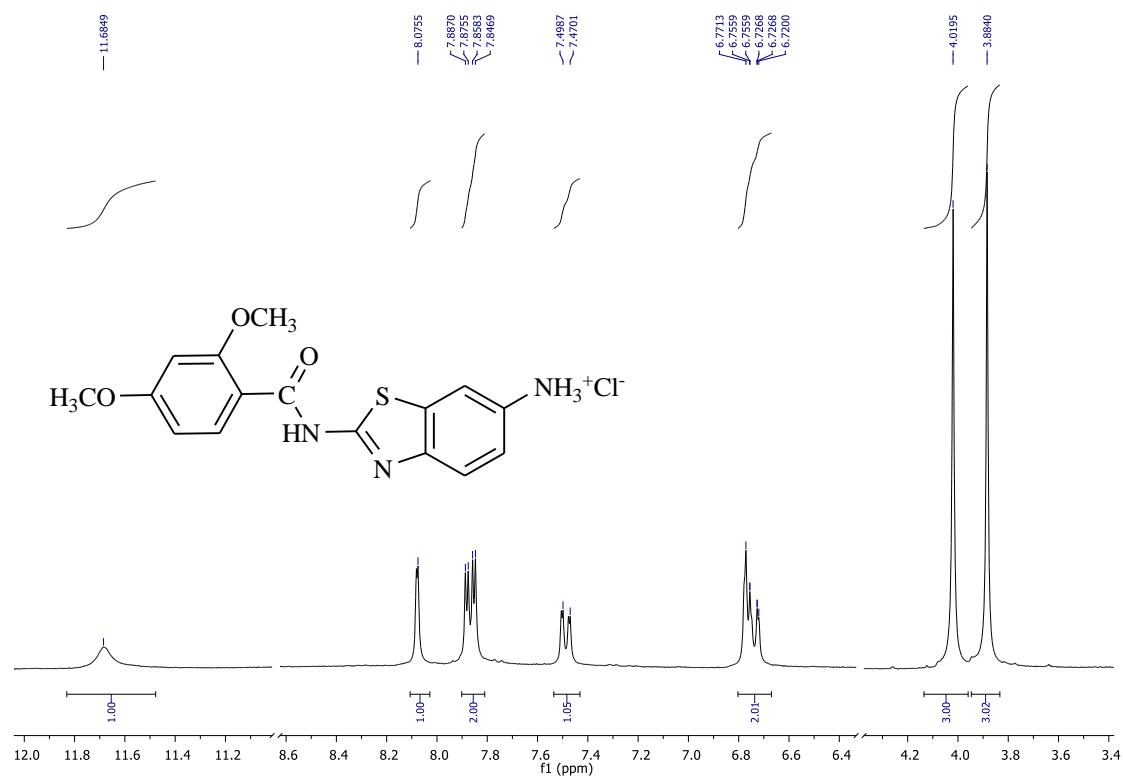
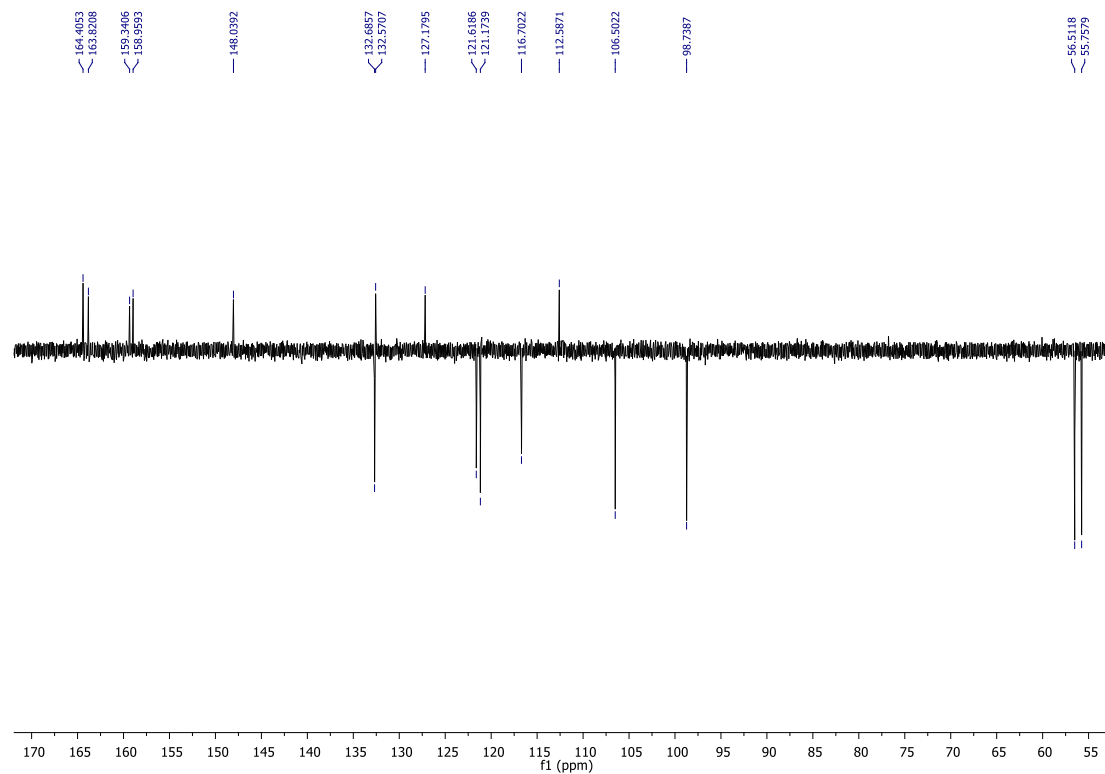
Prilog 28

a) ^1H NMR spektar 2,4-dimetoksi-*N*-(4-metoksi-2-amino fenil)benzamid-hidroklorida **54**b) ^{13}C NMR spektar 2,4-dimetoksi-*N*-(4-metoksi-2-amino fenil)benzamid-hidroklorida **54**

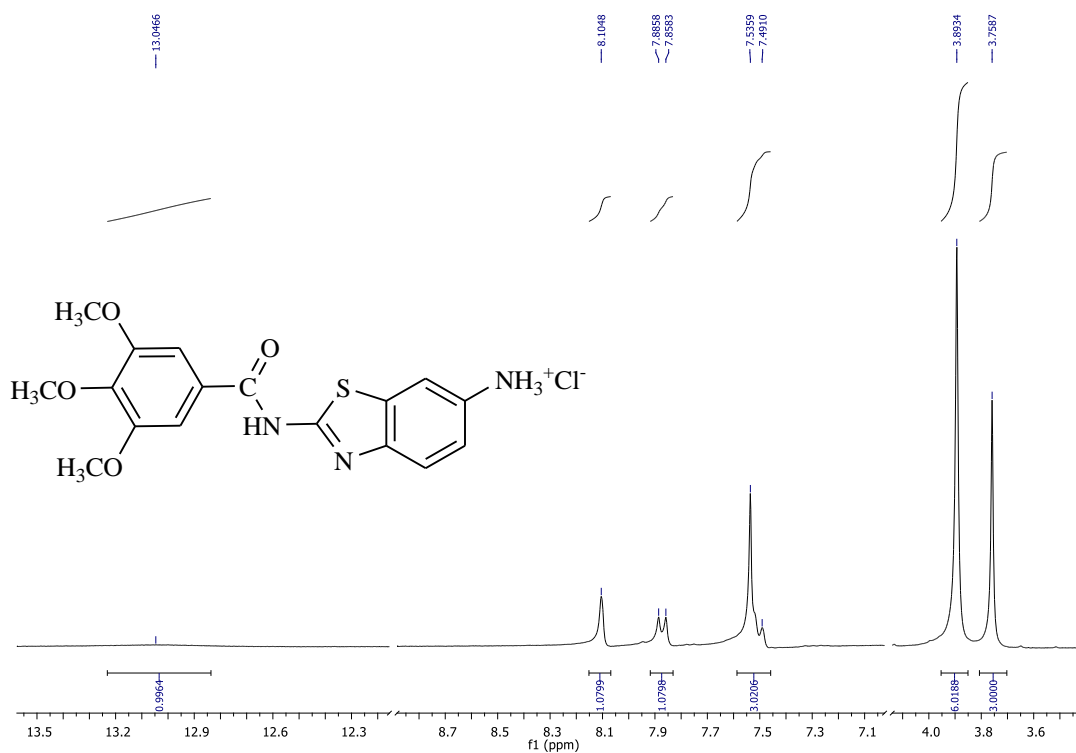
Prilog 29

a) ^1H NMR spektar 2-metoksi-*N*-(6-aminobenzotiazol-2-il)benzamid hidroklorida **61**b) ^{13}C NMR spektar 2-metoksi-*N*-(6-aminobenzotiazol-2-il)benzamid hidroklorida **61**

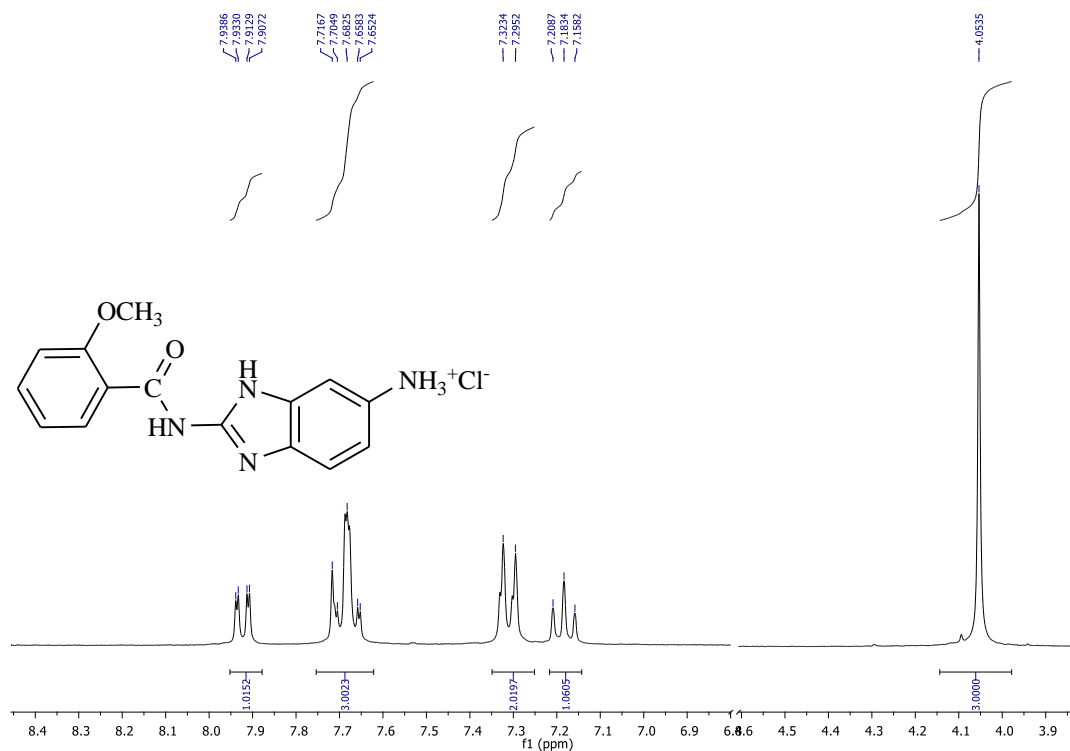
Prilog 30

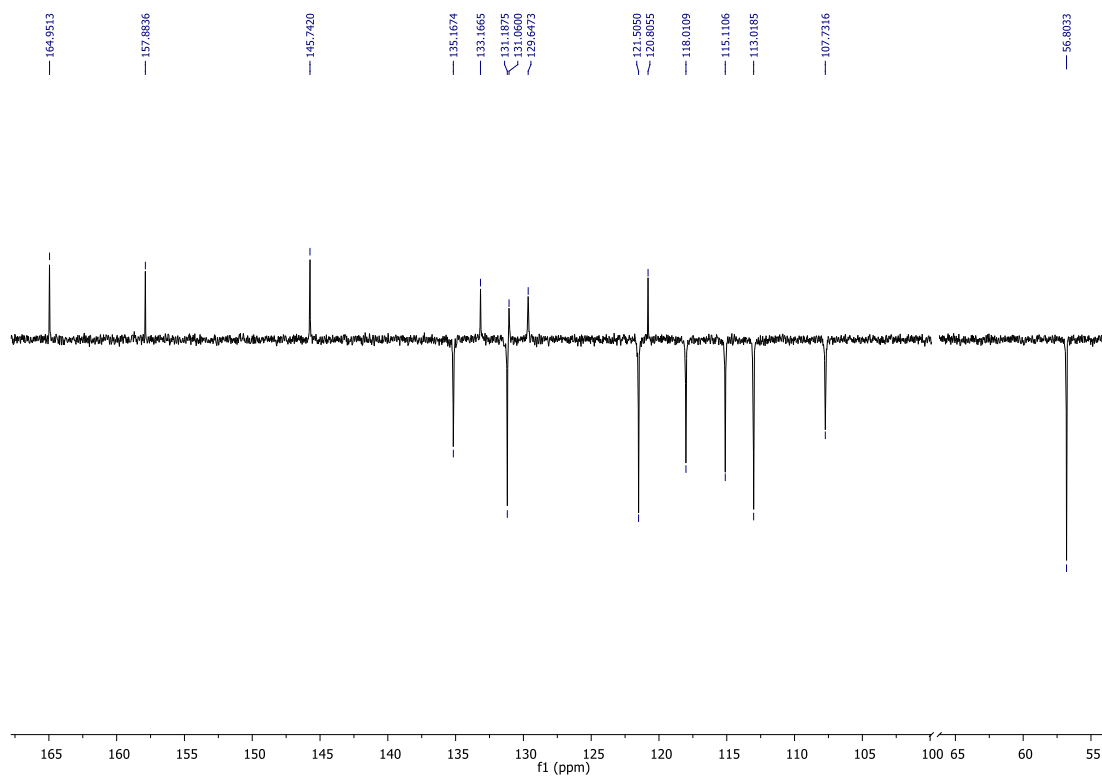
a) ^1H NMR spektar 2,4-dimetoksi-*N*-(6-aminobenzotiazol-2-il)benzamid hidroklorida **62**b) ^{13}C NMR spektar 2,4-dimetoksi-*N*-(6-aminobenzotiazol-2-il)benzamid hidroklorida **62**

Prilog 31

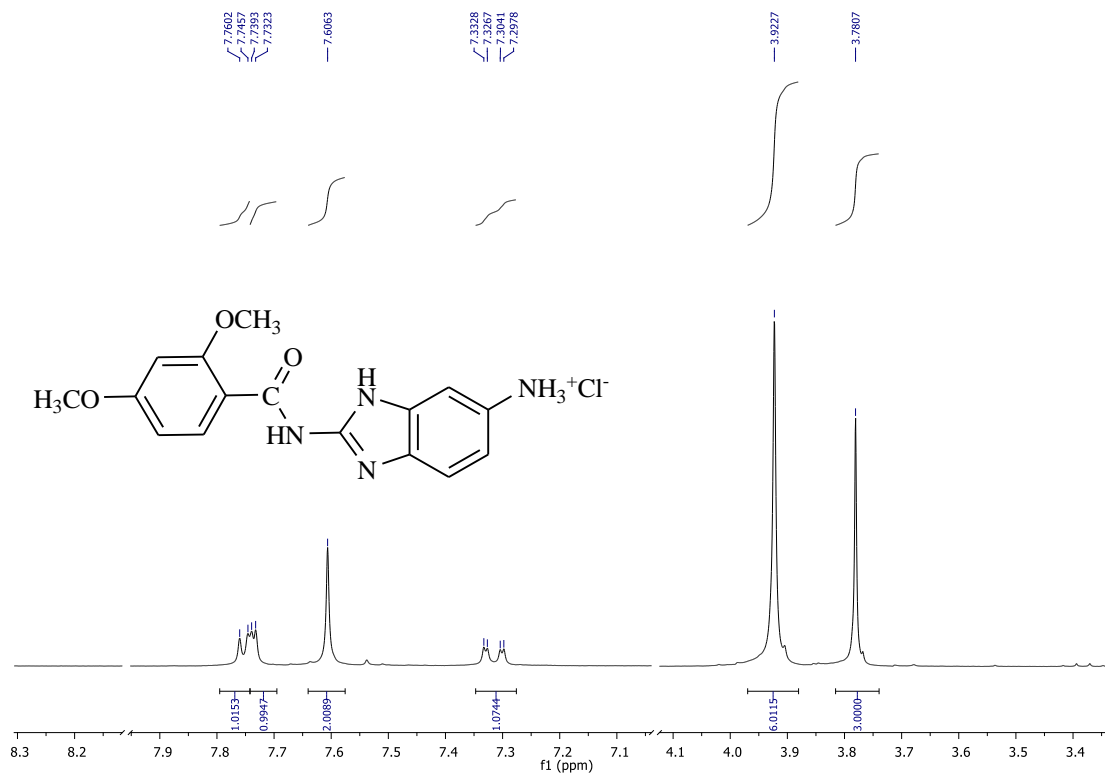
a) ^1H NMR spektar 3,4,5-trimetoksi-*N*-(6-aminobenzotiazol-2-il)benzamid-hidroklorida **63**

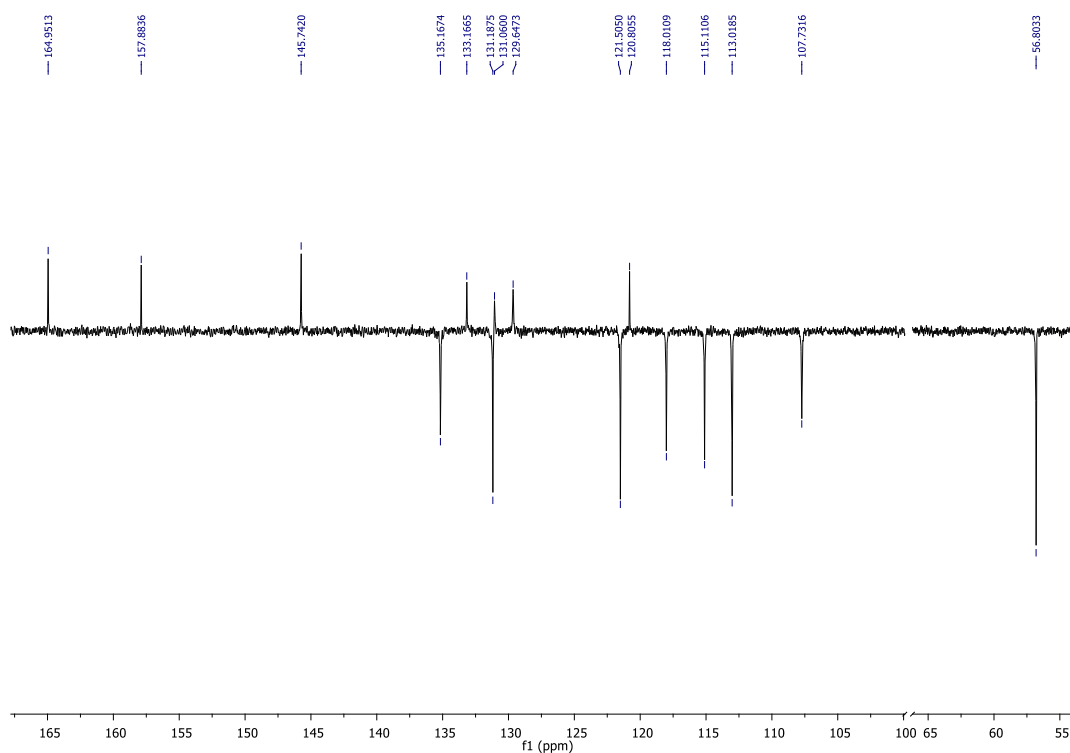
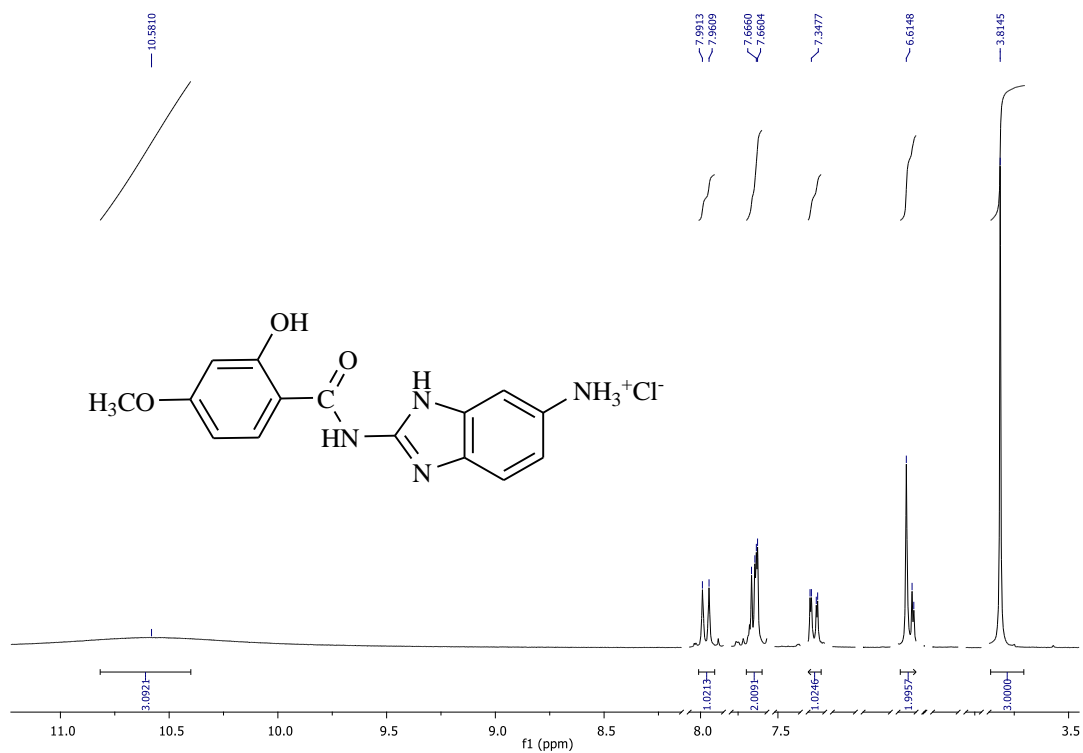
Prilog 32

a) ^1H NMR spektar 2-metoksi-*N*-[5(6)-aminobenzimidazol-2-il]benzamid-hidroklorida **64**

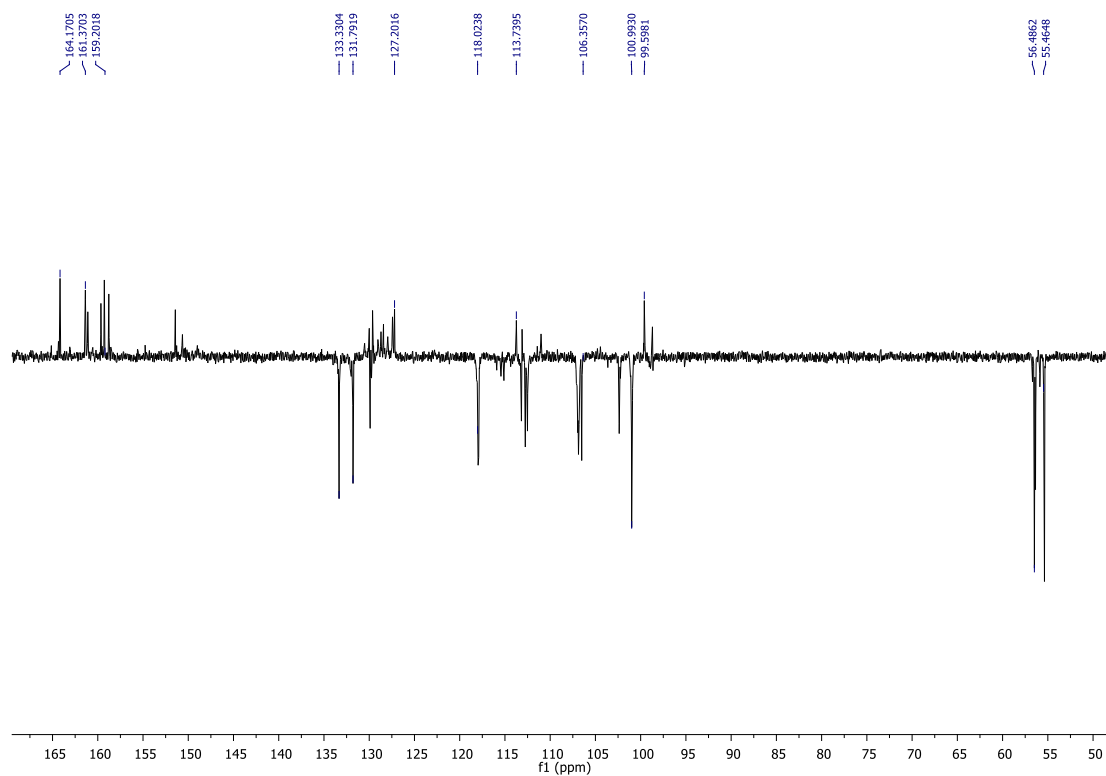
b) ^{13}C NMR spektar 2-metoksi-*N*-[5(6)-aminobenzimidazol-2-il]benzamid-hidroklorida **64**

Prilog 33

a) ^1H NMR spektar 2,4-dimetoksi-*N*-[5(6)-aminobenzimidazol-2-il]benzamid-hidroklorida **65**

b) ^{13}C NMR spektar 2,4-dimetoksi-*N*-[5(6)-aminobenzimidazol-2-il]benzamid-hidroklorida **65****Prilog 34**a) ^1H NMR spektar 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-[5(6)-aminobenzimidazol-2-il]benzamid hidroklorida **66**

b) ^{13}C NMR spektar 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-[5(6)-aminobenzimidazol-2-il]benzamid hidroklorida **66**



POPIS SIMBOLA I KRATICE

UV/Vis – ultraljubičasta spektroskopija

NMR – nuklearna magnetska rezonancija

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

ABS – apsorbancija

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

RNK – ribonukleinska kiselina

LPO – lipidna peroksidacija

ROS – reaktivne kisikove čestice

NO• – dušični oksid

NO₂• – dušični dioksid

O₂^{-•} – superoksidni anion

O₃ – ozon

OH• – hidroksilni radikal

ONOO⁻ – peroksinitrit