

Sinteza i strukturna karakterizacija novih amino supstituiranih pentacikličkih derivata benzimidazola

Bobanović, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:529687>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Kristina Bobanović

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Kristina Bobanović

**Sinteza i strukturna karakterizacija novih
amino supstituiranih pentacikličkih derivata benzimidazola**

DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva: Izv. prof. dr. sc. Marijana Hranjec, FKIT

Doc. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević, FKIT

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

Zagreb, srpanj 2015.

Zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Marijani Hranjec na predloženoj temi, uloženom vremenu, stručnim savjetima, te razumijevanju i pomoći pruženoj tijekom izrade i pisanja diplomskog rada.

Također se zahvaljujem znanstvenoj novakinji dr. sc. Nataši Perin na ukazanom strpljenju, savjetima i stručnom vodstvu tijekom izrade eksperimentalnog dijela, te na velikoj pomoći tijekom izrade i pisanja diplomskog rada.

Najveća zahvala mojoj obitelji i prijateljima za razumijevanje i potporu tijekom cijelog školovanja.

SAŽETAK

U okviru ovog rada provedena je sinteza i spektroskopska karakterizacija novih amino i diamino 6-*N*-supstituiranih, 3,6-*N,N*-disupstituiranih i 3-*N*-supstituiranih derivata 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola. Novi spojevi priređeni su klasičnim reakcijama organske sinteze i reakcijama potpomognutim mikrovalnim zračenjem.

Aciklički derivati benzimidazola **5**, **16** i **26** priređeni su reakcijom kondenzacije odgovarajućih halogeno supstituiranih benzo[*b*]tiofen-2-karbaldehida **4**, **15**, **25** i 2-cijanometilbenzimidazola **3**. Halogeno i dihalogeno supstituirani derivati 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **7**, **18** i **27**, kao glavni prekursori za sintezu ciljanih produkata, priređeni su termičkom ciklizacijom spojeva **5**, **16** i **26**.

Konačni produkti 6-amino supstituirani **8–11**, 3,6-diamino supstituirani **19–22** i 3-amino supstituirani derivati 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **28–31** priređeni su nekataliziranom aminacijom potpomognutom mikrovalnim zračenjem iz prekursora **7**, **18** i **27** s odgovarajućim aminima. Strukture priređenih spojeva potvrđene su ^1H i ^{13}C NMR i UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom te HPLC/MS spektrometrijom.

Priređenim derivatima dodatno su ispitane su spektroskopske karakteristike korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije. Kako bi se ispitala mogućnost primjene spojeva **10**, **21** i **30** kao optičkih pH senzora, ispitana je i promjena njihovih spektroskopskih svojstava ovisno o vrijednosti pH otopine korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije.

Ključne riječi: amino supstituirani 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazoli, ^1H i ^{13}C NMR, UV/Vis i fluorimetrijska spektroskopija

SUMMARY

This work presents the synthesis and spectroscopic characterization of novel amino and diamino 6-*N*-substituted, 3,6-*N,N*-disubstituted and 3-*N*-substituted 7-cyanobenzo[*b*]thieno[2,3-*b*]pyrido[1,2-*a*]benzimidazole derivatives. Novel compounds were prepared by classical reactions of organic chemistry and by microwave assisted reactions.

Acyclic benzimidazole derivatives **5**, **16** and **26** were prepared in the reaction of condensation of corresponding benzo[*b*]thiophenyl-2-carbaldehydes **4**, **15**, **25** and 2-cyanomethylbenzimidazole **3**. Halogeno and dihalogeno substituted 7-cyanobenzo[*b*]thieno[2,3-*b*]pyrido[1,2-*a*]benzimidazole derivative **7**, as the main precursor for the synthesis of targeted products, were prepared by thermic cyclization of compounds **5**, **16** i **26**.

Novel 6-amino substituted derivatives **8–11**, 3,6-diamino disubstituted **19–21** and 3-amino substituted 7-cyanobenzo[*b*]thieno[2,3-*b*]pyrido[1,2-*a*]benzimidazole derivatives **28–31** were prepared by microwave assisted amination from precursors **7**, **18** and **27** with corresponding amines. The structures of all prepared compounds were determined by means of ¹H and ¹³C NMR and UV/Vis and fluorimetric spectroscopy and HPLC/MS spectrometry.

In addition, the spectroscopic properties of prepared compounds were studied by UV/Vis and fluorescence spectroscopy. In order to determine the possibility of compounds **10**, **21** and **30** for analytical applications as pH sensors, the changes of their spectroscopic properties depending on the pH value were studied by UV/Vis and fluorescence spectroscopy.

Key words: amino substituted 7-cyanobenzo[*b*]thieno[2,3-*b*]pyrido[1,2-*a*]benzimidazole derivatives, ¹H and ¹³C NMR, UV/Vis and fluorimetric spectroscopy and HPLC/MS spectrometry

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. Općenito o benzimidazolima	4
2.2. Biološke aktivnosti derivata benzimidazola	5
2.2.1. Antihipertenzivni derivati benzimidazola	6
2.2.2. Protuupalni derivati benzimidazola	9
2.2.3. Derivati benzimidazola kao antimikrobni agensi	11
2.2.4. Derivati benzimidazola s antiviralnom aktivnošću	14
2.2.5. Derivati benzimidazola s antioksidativnim djelovanjem	17
2.2.6. Derivati benzimidazola kao antitumorski agensi	18
3. REZULTATI I RASPRAVA	32
3.1. Cilj rada	33
3.2. Sinteza priređenih spojeva	34
3.3. Spektroskopska karakterizacija priređenih spojeva	51
3.3.1. UV/Vis spektroskopija	51
3.3.2. Fluorimetrijska spektroskopija	54
3.3.3. Utjecaj pH na spektroskopska svojstva spojeva 10, 21 i 31	60
4. EKSPERIMENTALNI DIO	63
4.1. Opće napomene	64
4.2. Sinteza 6-amino supstituiranih derivata 7-cijanobenzo[<i>b</i>]tieno[2,3-<i>b</i>] pirido[1,2-<i>a</i>]benzimidazola	65
4.2.1. Priprava 2-cijanometilbenzimidazola 3	66
4.2.2. Priprava 2-(2-benzimidazolil)-3-hidroksi-3-(3-klorbenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)akrilonitrila 5	66
4.2.3. Priprava 7-cijano-6-oksobenzo[<i>b</i>]tieno[2,3- <i>b</i>]pirido[1,2- <i>a</i>]benzimidazola 6	66
4.2.4. Priprava 7-cijano-6-klorbenzo[<i>b</i>]tieno[2,3- <i>b</i>]pirido[1,2- <i>a</i>]benzimidazola 7	67
4.2.5. Opći postupak priprave spojeva 8–11	67
4.3. Sinteza 3,6-diamino supstituiranih derivata 7-cijanobenzo[<i>b</i>]tieno[2,3-<i>b</i>] pirido[1,2-<i>a</i>]benzimidazola	70
4.3.1. Priprava 4-fluorcimetne kiseline 14	71
4.3.2. Priprava 6-fluor-3-klorbenzo[<i>b</i>]tiofen-2-karbonil-klorida 15	71
4.3.3. Priprava 2-(2-benzimidazolil)-3-hidroksi-3-(6-fluor-3-klorbenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)akrilonitrila 16	71
4.3.4. Priprava 7-cijano-3-fluor-6-oksobenzo[<i>b</i>]tieno[2,3- <i>b</i>]pirido[1,2- <i>a</i>]benzimidazola 17 ..	72
4.3.5. Priprava 7-cijano-3-fluor-6-klorbenzo[<i>b</i>]tieno[2,3- <i>b</i>]pirido[1,2- <i>a</i>]benzimidazola 18 ..	72
4.3.6. Opći postupak priprave spojeva 19–22	72
4.4. Sinteza 3-amino supstituiranih derivata 7-cijanobenzo[<i>b</i>]tieno[2,3-<i>b</i>] pirido[1,2-<i>a</i>]benzimidazola	75
4.4.1. Priprava 6-fluor-3-klorbenzo[<i>b</i>]tiofen-2-karbaldehida 25	76
4.4.2. Priprava 2-(2-benzimidazolil)-3-(6-fluor-3-klorbenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)akrilonitrila 26	77
4.4.3. Priprava 7-cijano-3-fluorbenzo[<i>b</i>]tieno[2,3- <i>b</i>]pirido[1,2- <i>a</i>]benzimidazola 27	77
4.4.4. Opći postupak priprave spojeva 28–31	77
5. ZAKLJUČAK	80
6. LITERATURA	83
7. ŽIVOTOPIS	86
8. PRILOZI	88

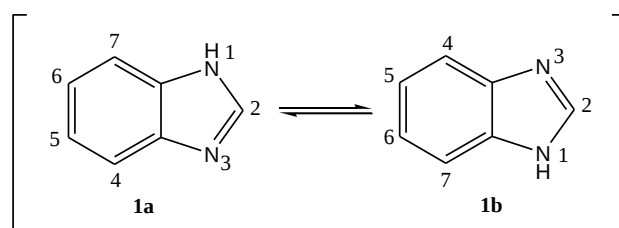
1. UVOD

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 agenasa. 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

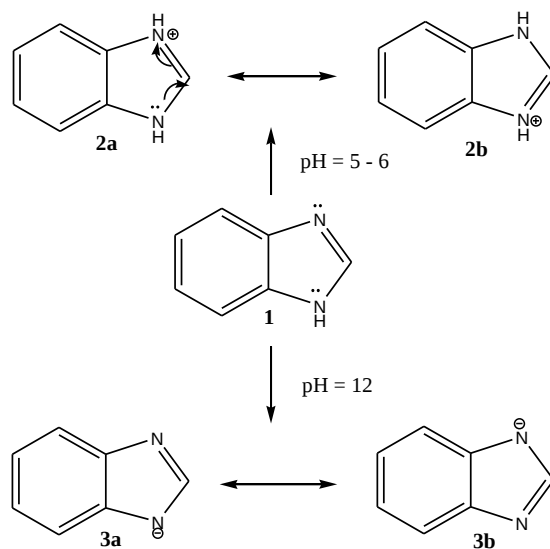
2.1. Općenito o benzimidazolima

Benzimidazoli su heterociklički aromatski spojevi bicikličke strukture koja se sastoji od kondenziranih jezgri benzena i imidazola. Dvije su tautomerne strukture benzimidazola, **1a** i **1b** prikazane na Slici 1:



Slika 1. Tautomerne strukture benzimidazola

U strukturi benzimidazola su dva heterociklička atoma dušika od kojih je jedan N atom piridinskog tipa na kojem je vezan vodikov atom, te se može alkilirati ili acilirati i njegovi su elektroni dio aromatskog sustava, dok je drugi N atom sličan onomu pirola, nije dio aromatskog sustava i može se samo protonirati. U kiselom mediju (pH 5 – 6) taj dušikov atom je protoniran, a u lužnatom mediju (pH 12) se deprotonira što je prikazano na Slici 2¹:



Slika 2. Ponašanje benzimidazolske jezgre u kiselom i lužnatom mediju

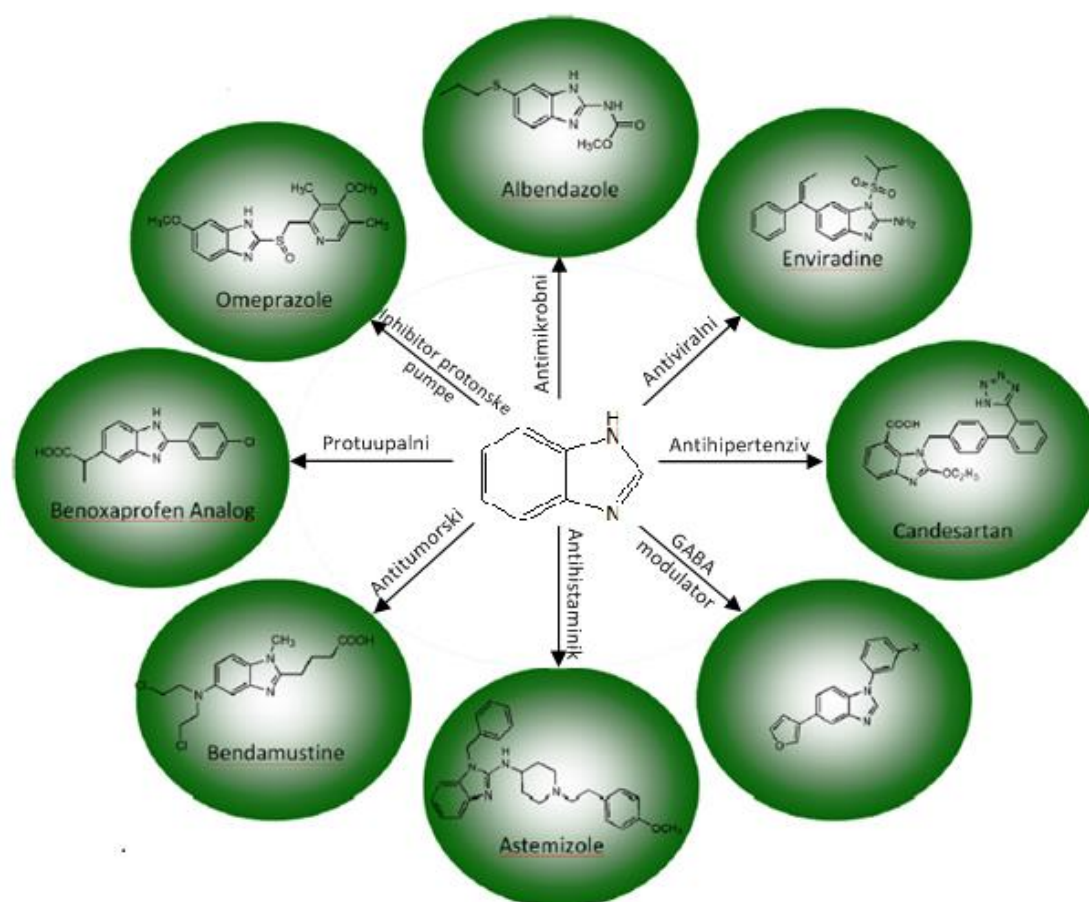
Benzimidazolska jezgra je sastavni dio mnogih bioaktivnih heterocikličkih spojeva koji su od velikog interesa, a tijekom godina postali su neizostavne strukturne jedinice u medicinskoj kemiji, pokazujući raznovrsne biološke aktivnosti i prisutnost u strukturama mnogih terapijskih agenasa kao što su antiparazitici, antikonvulzivi, analgetici, antihistaminici, antihipertenzivi, antiviroci i anti-HIV agensi, antifungicidi, protuupalni lijekovi, antitumorski, inhibitori protonske pumpe, antioksidansi i antikoagulansi².

Benzanulirani benzimidazoli posjeduju visoko konjugirani planarni kromofor, što im omogućava interkaliranje između susjednih parova baza u molekuli DNK, a zbog odličnih spektroskopskih karakteristika i visokog intenziteta fluorescencije, omogućena je potencijalna primjena kondenziranih benzimidazola kao fluorescentnih proba za detekciju biološki važnih molekula DNK ili proteina u biomedicinskoj dijagnostici. Osim navedenih, potencijalnu primjenu nalaze i u drugim područjima kao organska bojila i fluorescentne boje u tekstilnoj industriji i polimerima, u optoelektronici te laserskoj tehnologiji.

2.2. Biološke aktivnosti derivata benzimidazola

Benzimidazolska jezgra je važan strukturni dio mnogih spojeva koji djeluju na mnogobrojne različite biološke mete i pokazuju raznolike farmaceutske karakteristike. Terapijski potencijal prepoznat je još 1944. godine, nagađanjima D. W. Woolleya³ da se benzimidazol može ponašati poput purina. Pet godina kasnije, N. G. Brink⁴ je identificirao 5,6-dimetilenzimidazol kao raspadni produkt vitamina B₁₂ i otkrio da neki njegovi derivati imaju aktivnost sličnu onoj vitamina B₁₂, potaknuvši tako aktivna istraživanja i sinteze mnogobrojnih supstituiranih derivata benzimidazola. Tijekom godina postali su neizostavne strukturne jedinice u medicinskoj kemiji, pokazujući raznovrsne biološke aktivnosti, te su prisutni u strukturama mnogih terapijskih agenasa kao što su antiparazitici, antikonvulzivi, analgetici, antihistaminici, antihipertenzivi, antiviroci, antitumorski agensi, antifungicidi, protuupalni lijekovi, inhibitori protonske pumpe i antikoagulansi² (Slika 3).

Svih sedam pozicija na benzimidazolu mogu biti supstituirane s različitim kemijskim funkcionalnim skupinama, ali većina biološki aktivnih derivata benzimidazola sadrži funkcionalne skupine na položaju 1, 2 i/ili 5 (ili 6)⁵.

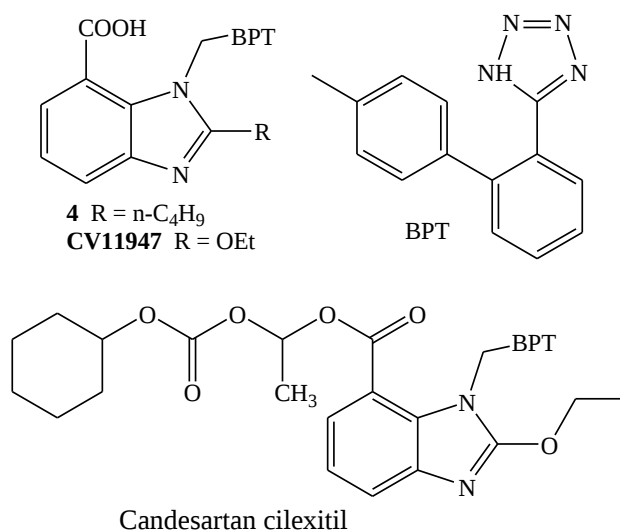


Slika 3. Benzimidazol – multifunkcionalna jezgra u medicinskoj kemiji

2.2.1. Antihipertenzivni derivati benzimidazola

Mnogi derivati benzimidazola se ponašaju kao antihipertenzivi djelujući na reninsko-angiotenzinski sustav (RAS). Dvije su strategije za djelovanje antihipertenzivnih lijekova, a uključuju inhibiciju dvaju enzima renina i angiotenzina ili blokiranje vezanja angiotenzina II na AT₁ receptore.⁶

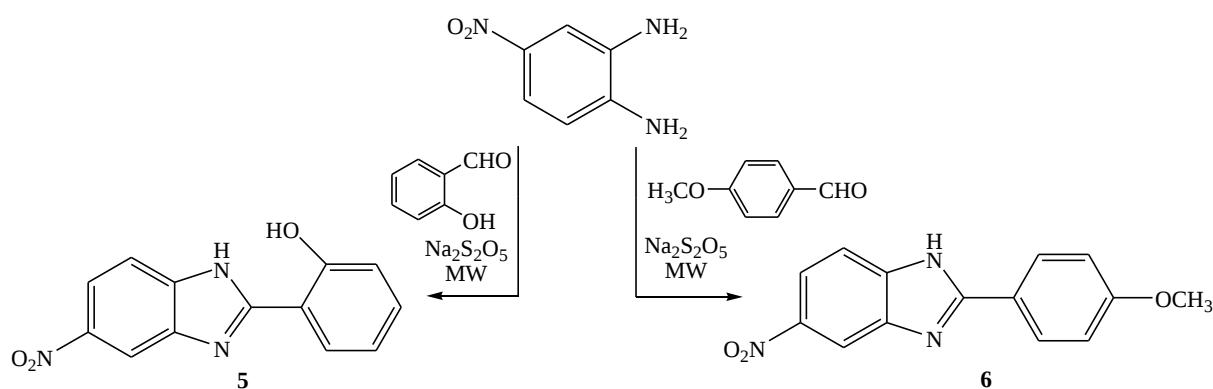
K. Kubo i suradnici⁶ su 1993. godine objavili sintezu 7-karboksilnih derivata 2-butil-benzimidazola **4** kao potencijalnih antagonista AT₁ receptora. Optimizacijom funkcionalnih grupa oko jezgre dobiven je **CV-11974**, spoj koji smanjuje krvni tlak blokiranjem AT₁ receptora nekompetitivnim mehanizmom i sporom disocijacijom s AT₁ receptora. Esterifikacijom 7-karboksilne grupe, dobiven je blokator AT₁ receptora, candesartan cilexetil, lijek s produženim djelovanjem koji je danas komercijalno dostupan.



Slika 4. Strukture derivata benzimidazola s antihipertenzivnim djelovanjem

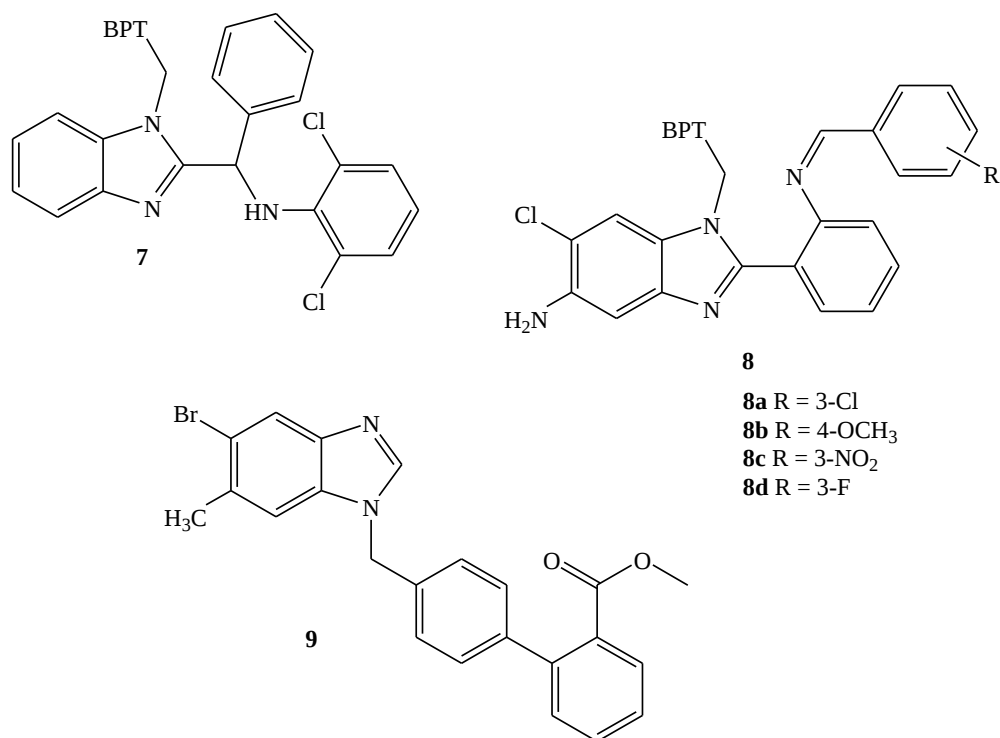
Sintezom brojnih derivata i optimizacijom supstituenata na svim položajima benzimidazolske jezgre, otkriveno je da položaj 4 treba ostati nesupstituiran zbog interakcije atoma N-3 s AT₁ receptorom, na položaju 1 preferirana je bifenilna jezgra za odgovarajuću antihipertenzivnu aktivnost, a funkcionalna skupina optimalne veličine i hidrofilnosti na položaju 5 značajno povećava aktivnost spoja.

Skupina istraživača⁷ objavila je 2006. godine sintezu derivata benzimidazola s fenilnim prstenom supstituiranim na položaju 2 i supstituentima -H, -CH₃, -NO₂, -CF₃ na položajima 5 i 6, te su spojevi testirani za vazodilacijsku aktivnost *in vitro* na aorti štakora. Kao najaktivniji iz serije sintetiziranih spojeva pokazali su se **5** i **6**, s vrijednostima IC₅₀ 0,95 i 1,41 μM (s endotelijem) i 2,01 i 3,61 μM (bez endotelijuma) (Shema 1).



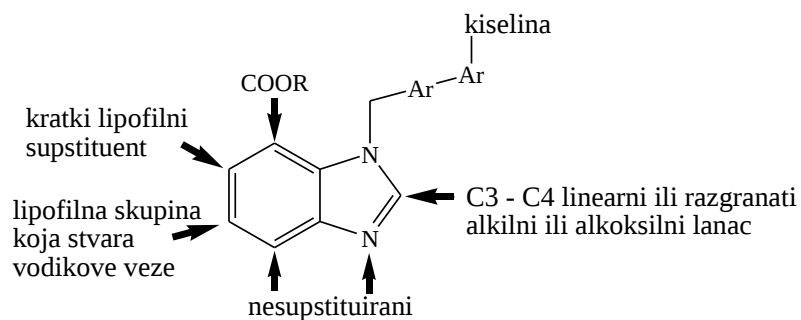
Shema 1. Derivati benzimidazola s fenilnim prstenom s antihipertenzivnim djelovanjem

2010. godine M. C. Sharma i suradnici⁸ sintetizirali su seriju spojeva s različitim supstytutentima na položajima 2, 5 i 6 tetrazolilbifenilnih i karboksibifenilnih supstituiranih benzimidazola. Dobiveni spojevi testirani su na antihipertenzivnu aktivnost korištenjem modela invazivne i neinvazivne hipertenzije inducirane angiotenzinom II i *in vitro* modelom za određivanje vazodilatacijske aktivnosti. Spojevi 7–9 pokazali su najbolju antihipertenzivnu aktivnost, smanjujući arterijski krvni pritisak ekvivalentno losartanu.



Slika 5. Derivati benzimidazola kao potencijalni antagonisti AT₁ receptora

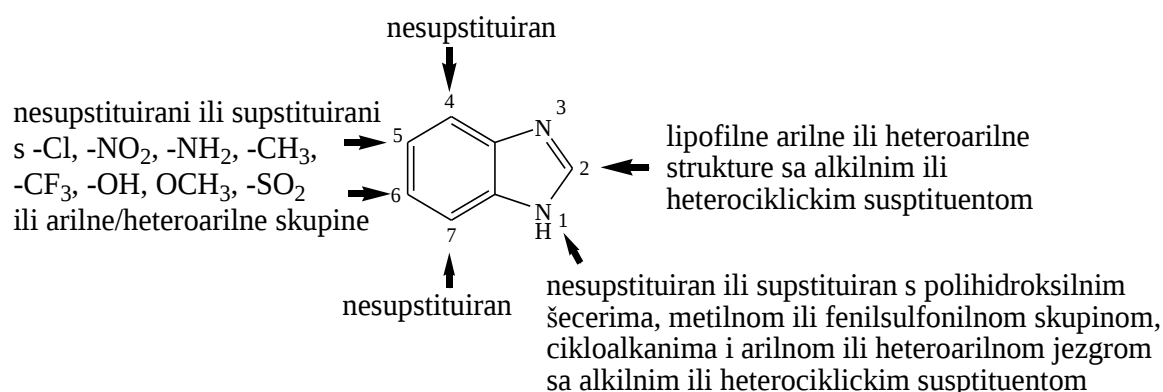
Na temelju dostupne literature strukturne karakteristike derivata benzimidazola kao potencijalnih antagonista AT₁ receptora mogu se sumirati kako je prikazano na Slici 6.



Slika 6. Strukturne karakteristike tipičnog antagonista AT₁ receptora

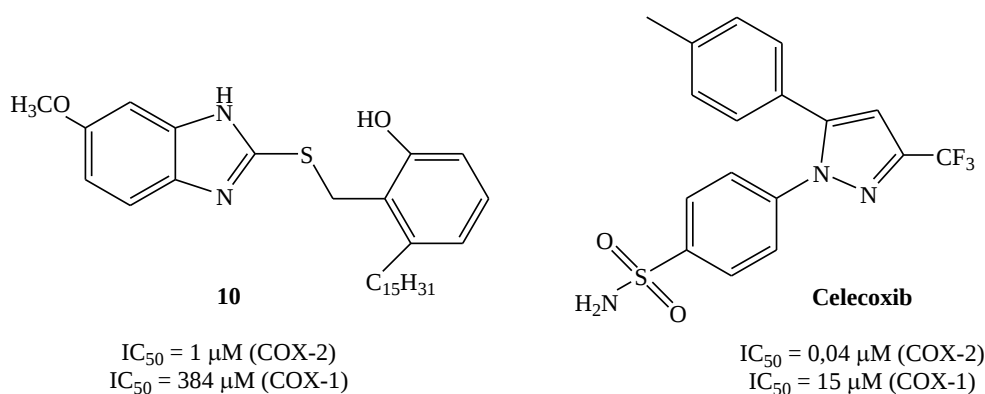
2.2.2. Protuupalni derivati benzimidazola

U zadnjih deset godina velika pažnja usmjerena je u razvoj benzimidazolskih agenasa kao modulatora boli i upale koji djeluju na različite terapijske mete kao što su enzim ciklooksigenaza, TRPV-1 (engl. *transient receptor potential vanilloid-1 ion channels*), kanabinoidni receptori, Bradykinini receptori, specifični citokini i protein aktiviran 5-lipoksigenazom, FLAP (engl. *5-lipoxygenase activating protein*) te koji bi pokazivali odličan terapijski potencijal. Prema dosadašnjim podacima, zaključeno je da benzimidazoli s različitim supstituentima na položajima 1, 2, 5 i 6 pokazuju potencijalni analgetski i protuupalni učinak, a da položaji 4 i 7 trebaju ostati nesupstituirani⁹, kao što je prikazano na Slici 7.



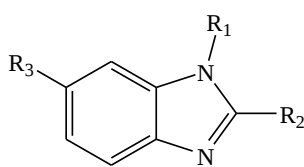
Slika 7. Strukturne karakteristike benzimidazolske jezgre za analgetsku i protuupalnu aktivnost

Ciklooksigenaza 2 ili COX-2 je enzim koji se javlja u organizmu tijekom upalnog procesa, a prostaglandini nastali iz arahidonske kiseline djelovanjem COX-2 uzrokuju upalu. U potrazi za takvim inhibitorom COX-2, kao potencijalni protuupalni agens pokazao se semisintetski derivat anakardične kiseline s benzimidazolskom jezgrom i dugim alkilnim lancem **10** čiju su strukturu objavili R. Paramashivappa i suradnici¹⁰ 2003. godine, a testiranjem aktivnosti, pokazao je odličnu sposobnost inhibicije oba enzima, i to oko 400 puta bolju inhibiciju COX-2 nego COX-1, te 400 puta bolje djelovanje od klinički odobrenog lijeka celecoxiba, inhibitora COX-2.



Slika 8. Struktura derivata benzimidazola, potencijalnog inhibitora enzima COX-2

P. A. Thakurdesai i suradnici¹¹ su objavili sintezu 2,6-disupstituiranih derivata benzimidazola **11**, s funkcionalnim karboksilnim grupama na položaju 2 te elektron-odvlačecim i elektron-donorskim supstituentima na položaju 6. Pokazalo se da je aktivnost značajno ovisna o supstituentima na položaju 6 i povećava se u smjeru Cl > OCH₃ > H > OCH₂CH₃ > NO₂, odnosno da se aktivnost spoja smanjuje s povećanjem udaljenosti između karboksilne skupine i atoma benzimidazola C-2, a benzilni supstituent na položaju N-1 dodatno povećava aktivnost. Svi testirani spojevi pokazali su dobru protuupalnu aktivnost u dozama od 100 mg/kg i višim, te sigurnim za korištenje do doze od 2000 mg/kg.



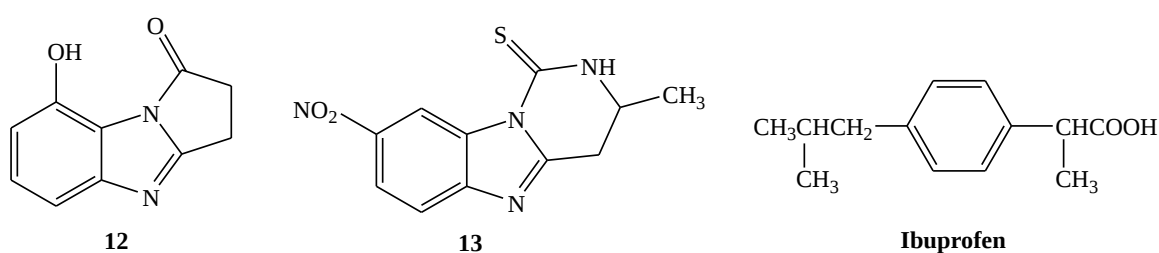
11

- 11a** R₁ = H, R₂ = COOH, R₃ = Cl
11b R₁ = CH₂C₆H₅, R₂ = CH₂COOH, R₃ = H
11c R₁ = CH₂C₆H₅, R₂ = COOH, R₃ = H
11d R₁ = H, R₂ = CH₂COOH, R₃ = H
11e R₁ = H, R₂ = COOH, R₃ = H
11f R₁ = H, R₂ = COOH, R₃ = OCH₃
11g R₁ = H, R₂ = CH₂COOH, R₃ = OCH₂CH₃
11h R₁ = H, R₂ = COOH, R₃ = NO₂

Slika 9. 2, 6-disupstituirani derivati benzimidazola s protuupalnim djelovanjem

Protuupalna aktivnost spojeva proizašla iz različitih supstituenata vezanim na benzimidazolsku jezgru, potakla je mnoge istraživačke skupine na sintezu kondenziranih cikličkih benzimidazolnih spojeva.

Grupa istraživača¹² objavila je 2010. godine sintezu i protuupalnu aktivnost tricikličkih benzimidazolskih derivata, od kojih je analog pirazolo[1,2-*a*]benzimidazola **12** pokazao aktivnost ekvivalentnu ibuprofenu, dok je sličan derivat pirimido[1,6-*a*]benzimidazola **13** pokazao vrlo slabo protuupalno i analgetsko djelovanje.



Slika 10. Kondenzirani derivati benzimidazola s potencijalnom analgetskom i protuupalnom aktivnošću

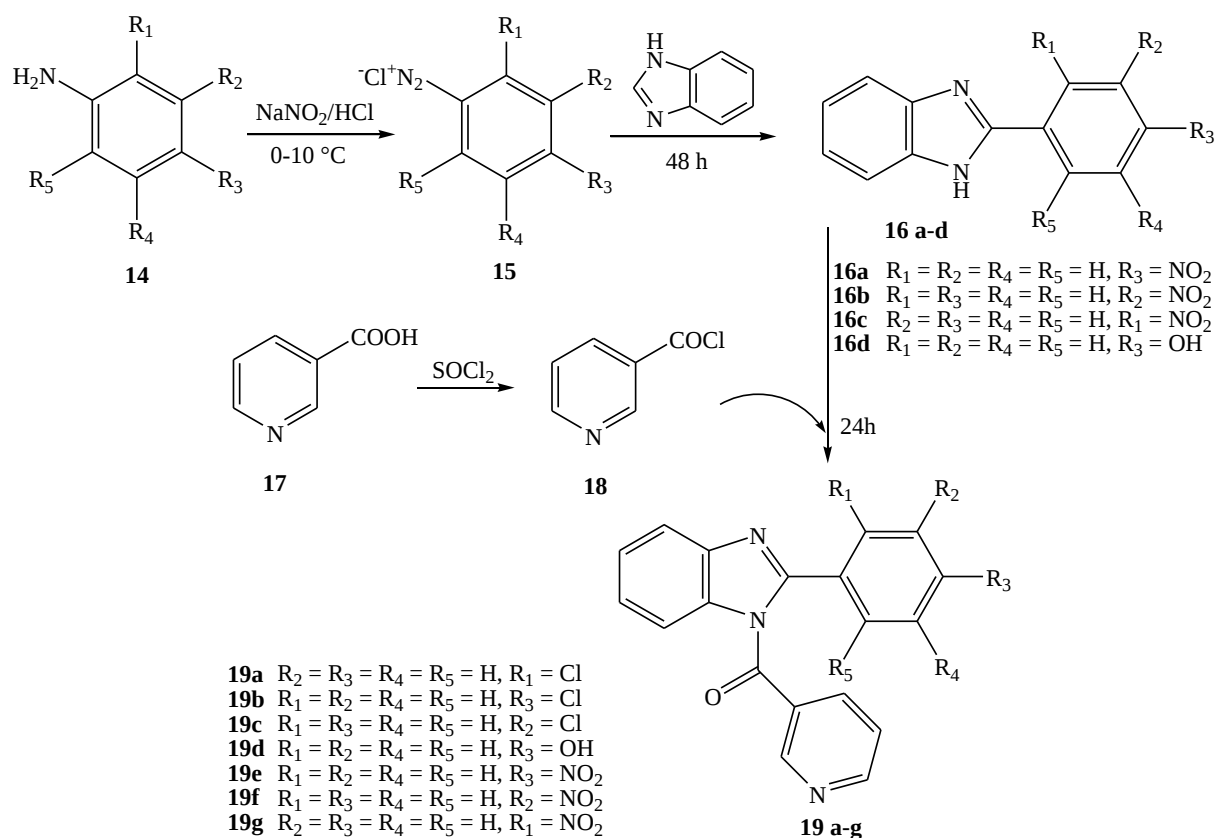
2.2.3. Benzimidazoli kao antimikrobni agensi

Antimikrobni agensi tvore grupu kemijskih entiteta koji djeluju protiv različitih vrsta mikroba uključujući bakterije, protozoe, crve, gljivice i viruse. Benzimidazoli su se pokazali kao obećavajući spojevi u razvoju antibakterijskih lijekova u borbi protiv rezistencije bakterija na β -laktamske antibiotike i makrolide. Povezivanje različitih heterocikličkih jezgri kao što su kromanska, β -laktamska, tiadiazolska i oksadiazolska s benzimidazolskom jezgrom rezultiralo je hibridnim spojevima koji imaju potencijalna antibakterijska i/ili antifungalna svojstva.

Grupa istraživača na čelu s D. Sharmom¹³ objavila je 2009. godine sintezu 2-(fenil supstituiranih)-1*H*-benzimidazola i [2-(fenil supstituiranih)-benzimidazol-1-il]-piridin-3-il-metanona, a navedenim spojevima ispitano je antimikrobno i antifungalno djelovanje. *In vitro*

ispitivanja antimikrobnog djelovanja sintetiziranih spojeva provedena su na Gram-pozitivnim bakterijama *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, Gram-negativnoj *Escherichia coli*, a antifungalna aktivnost na sojevima *Aspergillus niger* i *Candida albicans*, koristeći ciprofloksacin kao kontrolni antibakterijski i fluconazol kao kontrolni antifungalni lijek.

Sinteza i strukture spojeva s potencijalnim antimikrobnim i antifungalnim aktivnostima prikazane su na Shemi 2.

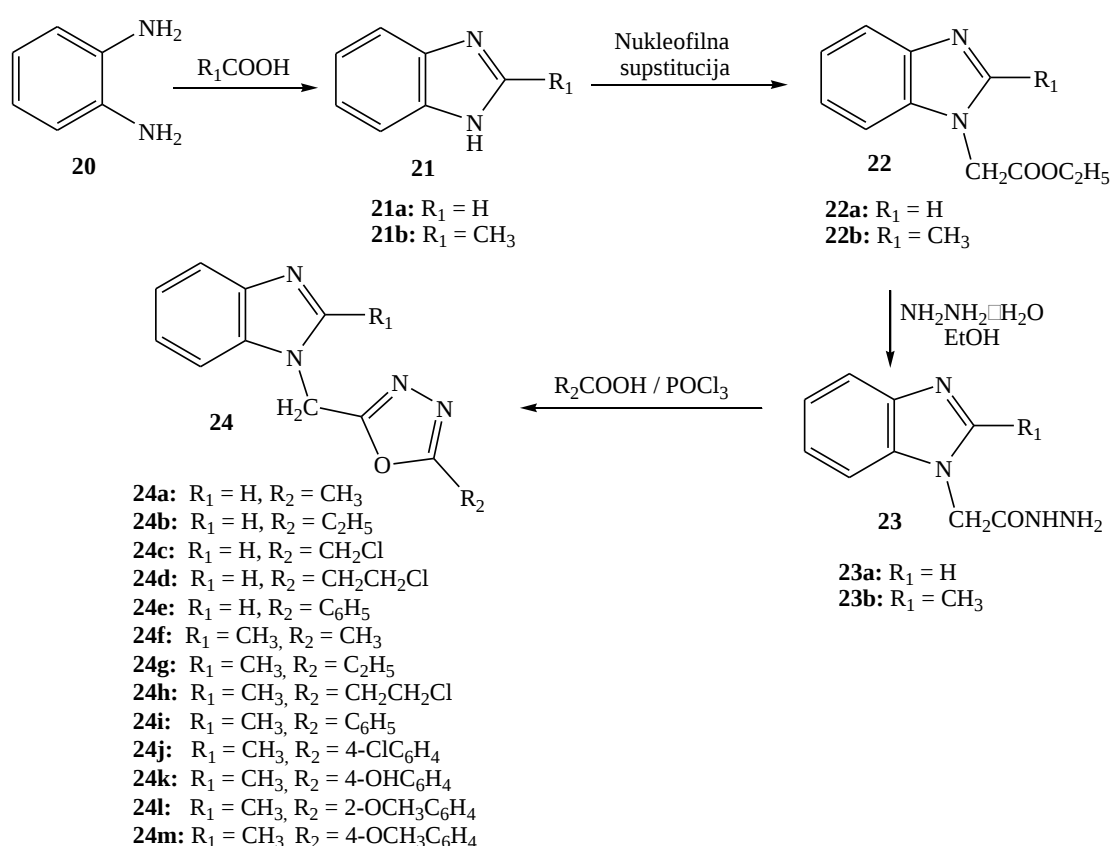


Shema 2. Sinteza i strukture derivata benzimidazola kao potencijalnih antimikrobnih i antifungalnih agenasa

Rezultati su pokazali kako svi sintetizirani spojevi pokazuju bolju antibakterijsku aktivnost u usporedbi s antifungalnom. Među sintetiziranim derivatima benzimidazola, spojevi **19a–19c** su najučinkovitiji agensi protiv *S. aureus*. Za aktivnost protiv *B. subtilis* spojevi **16a** i **16d** su rezultirali najboljom aktivnošću u usporedbi s ostalim sintetiziranim spojevima. Antimikrobn

spektar supstituiranih benzimidazola protiv *E. coli* pokazao je kako su najaktivniji spojevi **19b–19d**. Spojevi s najboljom antibakterijskom aktivnošću su **19–19c**, najbolju antifungalnu aktivnost protiv *C. albicans* su pokazali **19e–19g**, dok su analozi **16a–16c** pokazali najbolju aktivnost protiv *A. niger*.

Iste godine K. F. Ansari i C. Lal¹⁴ objavili su sintezu novih 2-supstituiranih-1-[(5-alkil/aril)-1,3,4-oksadiazol-2-il]metil]-1*H*-benzimidazola prikazanu na Shemi 3, te im je ispitano potencijalno antibakterijsko i antifungalno djelovanje.

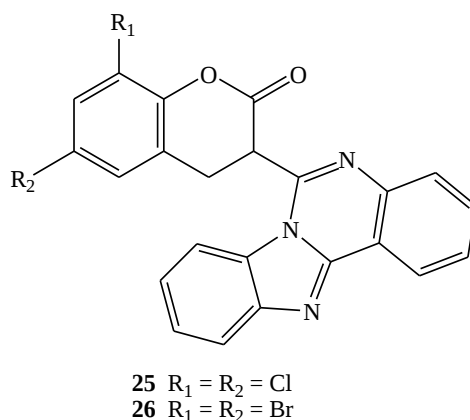


Shema 3. Sinteza oksadiazolnih derivata benzimidazola kao potencijalnih antimikrobnih agenasa

Provedena su *in vitro* ispitivanja antibakterijske aktivnosti sintetiziranih spojeva na Gram pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* i *Streptococcus mutans*, na Gram negativne *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Salmonella typhi*, te na sojeve *Candida albicans* i gljivice *Aspergillus flavus* i *Aspergillus niger* za testiranje antifungalne aktivnosti, a kao referentni lijekovi za usporedbu aktivnosti sintetiziranih spojeva korišteni su antibiotici ciprofloxacina i ampicilina te antifungalni lijek amphotericin B. Svi sintetizirani spojevi pokazali su dobru antibakterijsku aktivnost prema Gram pozitivnim bakterijama,

dobru do umjerenu antifungalnu aktivnost, ali nijedan spoj nije pokazao obećavajuću aktivnost prema Gram negativnim bakterijama. Kao najpotentniji antibakterijski agensi pokazali su se spojevi **24f–24m** a najbolje antifungalno djelovanje pokazao je spoj **24j**, a spojevi sa para-supstituiranim benzenskim prstenom **24j**, **24k** i **24m** bolju aktivnost protiv *C. albicans*. Iz dobivenih rezultata zaključeno je da povećanje broja ugljikovih atoma bočnog lanca na položaju 2 oksadiolnog prstena uzrokuje povećanje intenziteta aktivnosti prema *S. aureus*, *B. subtilis* i *C. albicans*.

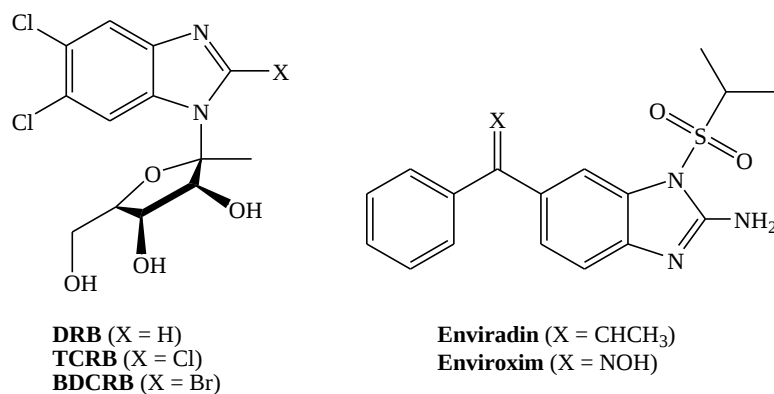
2011. godine B. S. Kuarm i suradnici¹⁵ objavili su sintezu derivata benzimidazo[1,2-*c*]kinazolin-5-il kromena. Potencijalni antibakterijski agens **25** prikazan je na Slici 11, a zamjena kloridne skupine s bromidnom u molekuli **26** rezultirala je antifungalnim djelovanjem.



Slika 11. Derivati benzimidazo[1,2-*c*]kinazolin-5-il kromena

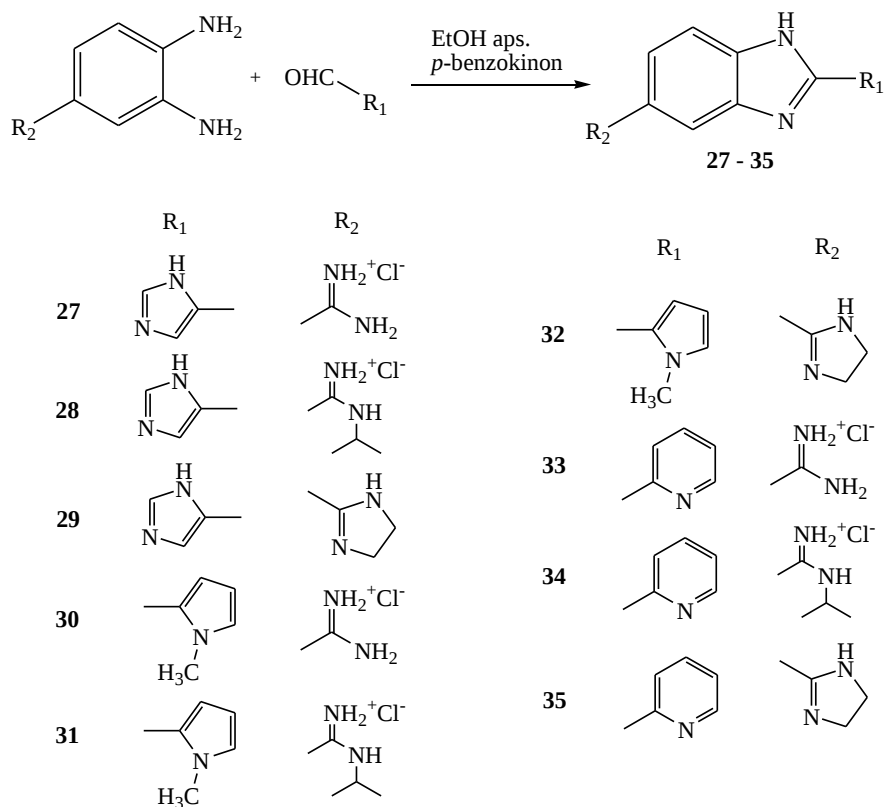
2.2.4. Derivati benzimidazola s antiviralnom aktivnošću

Derivati benzimidazola pokazuju antiviralnu aktivnost djelovanjem na enzime mnogih sojeva virusa, kao što su humani citomegalovirus (HCMV), humani herpes simplex virus (HSV-1), hepatitis B i C (HBV i HCV) te virusa HIV-a. Veliki broj nukleozidnih analoga benzimidazola sintetiziran je sredinom prošlog stoljeća kao selektivni inhibitori HCMV, od kojih je 5,6-dikloro-1-(β-D-ribofuranozil)benzimidazol (**DRB**) pokazao odličnu inhibiciju virusne RNK blokiranjem RNK polimeraze II. Envirodin i enviroksim su nenukleozidni analozi odobreni za kliničku upotrebu 1980-ih godina kao inhibitori RNK virusa.



Slika 12. Nukleozidni i nenukleozidni analozi benzimidazola kao antiviralni agensi

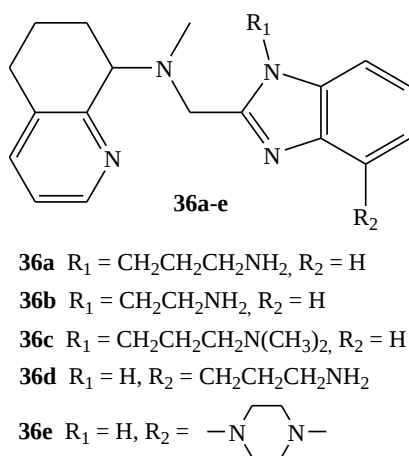
K. Starčević i suradnici¹⁶ sintetizirali su seriju benzimidazolskih derivata s amidinskim supstuentima na položaju C-5 i različitim heterocikličkim supstuentima (piridin, *N*-metil pirol i imidazol) na C-2. Svim sintetiziranim spojevima ispitana je *in vitro* inhibicija rasta linija stanica adenovirusa 5, herpesvirusa 1, coxsackievirusa B5 i echovirusa 7.



Shema 4. Sinteza i strukture 2,5-supstituuiranih benzimidazola

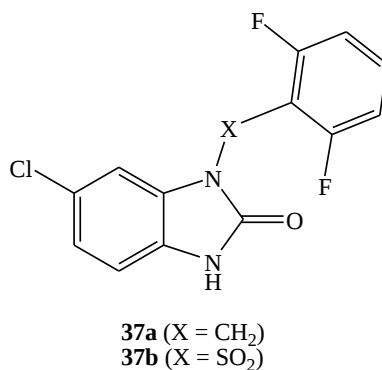
Rezultati su pokazali kako spojevi s imidazolinskom jezgrom **27–29** imaju vrlo slabo antiviralno djelovanje, te da oni spojevi koji sadrže piridinski prsten na C-2 položaju amidino supstituiranog benzimidazola **33–34** pokazuju selektivnu inhibitornu aktivnost prema RNK enterovirusima (coxsackievirus B5 i echovirus 7). S druge strane, spojevi **32** i **35** pokazali su znatan antiviralni efekt inhibicije herpesvirusa 1 ($EC_{50} = 28,5 \mu\text{M}$ i $EC_{50} = 56,7 \mu\text{M}$), ali su vrijednosti EC_{50} jako visoke i blizu citotoksičnim koncentracijama. Spoj **30** s karboksamidinskim supstituentom na C-5 i N-metil-pirolnim na C-2 položaju pokazao se kao obećavajući antiviralni agens protiv sva četiri tipa virusa (adenovirusa 5, s $EC_{50} = 5,9 \mu\text{M}$, herpesvirusa 1, sa $EC_{50} = 30 \mu\text{M}$, coxsackievirusa B5 sa $EC_{50} = 3,5 \mu\text{M}$ i echovirusa 7 sa $EC_{50} = 5 \mu\text{M}$) bez citotoksičnog djelovanja.

Skupina istraživača¹⁷ 2009. godine sintetizirala je nove amino supstituirane *N*-(1*H*-benzimidazol-2-ilmetil)-5,6,7,8-tetrahidro-8-kinoline s potencijalnim anti – HIV djelovanjem kao CXCR4 antagoniste. Godinu kasnije u istoj istraživačkoj grupi sintetizirani su novi *N*-supstituirani benzimidazoli s cikličkim aminima kao supstituentima, a spojevi koji su pokazali potencijalnu dobru aktivnost prikazani su na Slici 13.



Slika 13. *N*-supstituirani benzimidazoli kao potencijalni anti-HIV agensi

A. M. Monforte i suradnici¹⁸ sintetizirali su nove 2-supstituirane analoge *N*-1-aril-benzimidazola i testirali ih kao nove HIV-1 nenukleozidne inhibitore reverzne transkriptaze (NNRTI). Nekolicina spojeva pokazala se učinkovita u inhibiciji replikacije HIV virusa u submikromolarnim i nanomolarnim koncentracijama i s vrlo niskom citotoksičnošću, među njima spojevi **37a** i **37b** prikazani na Slici 14 pokazali su se kao obećavajući agensi s najboljom aktivnošću i najmanjom toksičnošću.

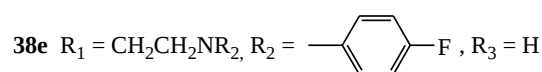
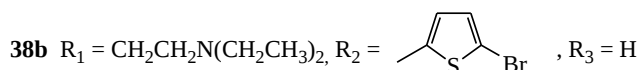
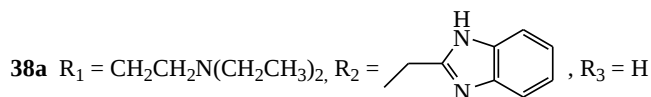
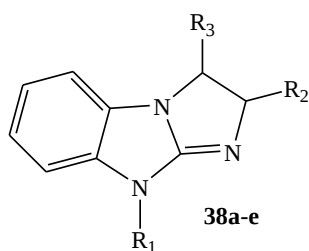


Slika 14. Analози benzimidazola kao novi HIV-1 nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze (NNRTI)

2.2.5. Derivati benzimidazola s antioksidativnim djelovanjem

Lijekovi koji posjeduju antioksidativno djelovanje uključeni su u liječenje različitih bolesti, a koje su direktno povezane s nedostatkom antioksidativne funkcije u organizmu. 1974. godine objavljen je jedan od najranijih znanstvenih radova o derivatima benzimidazola, 5-hidroksibenzimidazolu i 5-hidroksi-2-metilbenzimidazolu, kao potencijalnim antioksidansima. Uvođenjem tiadiazola, triazola i njima odgovarajućih otvorenih lanaca, tiosemikarbazida kao supstituenata na položaju 1 benzimidazola povećava se antioksidativna aktivnost, a arilni i alkilni supstituenti na ovim heterocikličkim jezgrama mogu dodatno povećati antioksidativnu aktivnost spoja.

V. A. Anisimova i suradnici¹⁹ objavili su sintezu i antioksidativnu aktivnost serije derivata 2-(heteroaril)imidazo[1,2-*a*]benzimidazola s 1-metilbenzimidazol-2-il i 5-bromo-2-tienilnim supstituentima na položaju 2 i različitim dialkilaminoalkilnim supstituentima R₂. Aktivnost spojeva ispitana je na *in vitro* modelu lipidne peroksidacije ovisne o askorbatu. Ista grupa otkrila je da *N*-acilmetilni derivati 9*H*-2,3-dihidroimidazo i 10*H*-2,3,4,10-tetrahidropirimido[1,2-*a*]benzimidazola s različitim supstituentima na C-1 položaju posjeduju slabu antioksidativnu aktivnost, dok spoj **38f** s fluorfenilnom skupinom na položaju 2 pokazuje najbolju aktivnost među sintetiziranim spojevima iz serije.

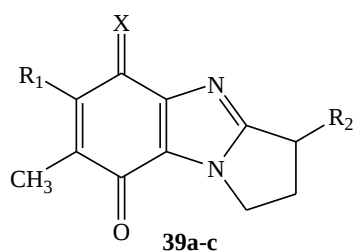


Slika 15. Derivati benzimidazola s antioksidativnim djelovanjem

2.2.6. Derivati benzimidazola kao antitumorski agensi

Brojni objavljeni antitumorski agensi (poznati i kao antiproliferativni agensi i antineoplastici) za liječenje mnogih vrsta tumora djeluju različitim mehanizmima. Međutim, glavni nedostatak ovih spojeva je citotoksičnost prema normalnim stanicama uslijed smanjene selektivnosti za abnormalne stanice zbog čega je već godinama prisutna kontinuirana potraga za agensima sa zadovoljavajućim antitumorskim djelovanjem i selektivnošću. Benzimidazol kao izoster purinskih nukleotida i bitna jezgra u raznolikim biološki aktivnim molekulama, naširoko je istražen u razvoju antitumorskih agenasa.

Pirololo[1,2-*a*]benzimidazoli su jedni od najranije objavljenih klasa antitumorskih spojeva čije se djelovanje temelji na cijepanju nukleotidnih baza gvanina i adenina te na mehanizmu reduktivnog alkiliranja DNK. E. B. Skibo i suradnici²⁰ objavili su sintezu, a strukture spojeva **39a–39c** koji su pokazali najbolje antiproliferativno djelovanje prikazane su na Slici 16.



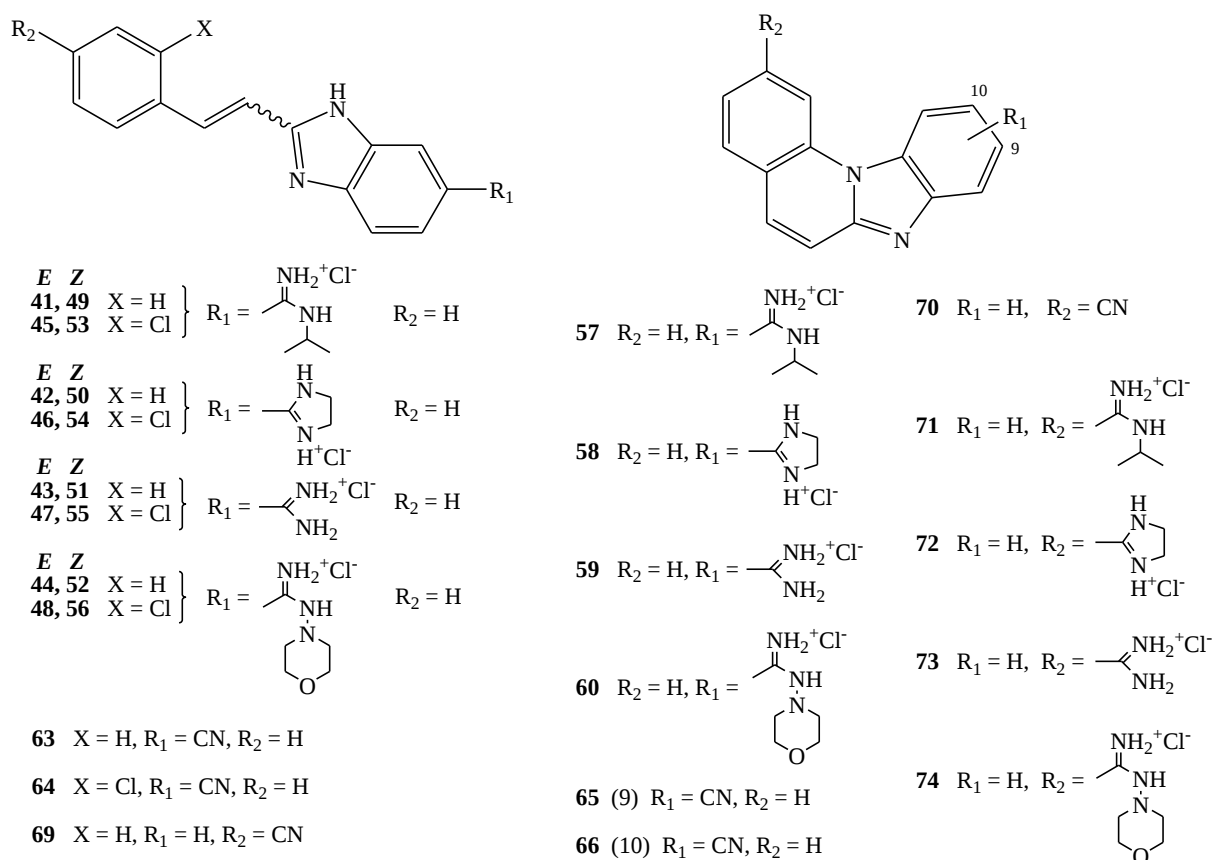
39a X = O, R₁ = , R₂ = CH₃

39b X = O, R₁ = NHCOCH₃, R₂ = ester

39c X = NH, R₁ = NHCOCH₃, R₂ = ester

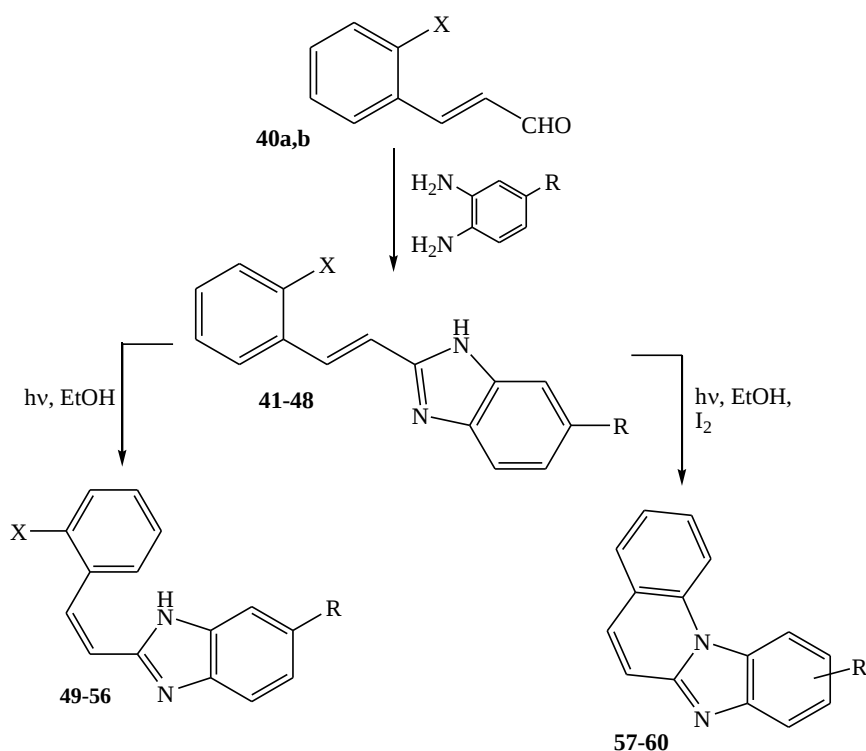
Slika 16. Derivati pirolo[1,2-*a*]benzimidazola s antitumorskim djelovanjem

M. Hranjec i suradnici²¹ su 2007. godine objavili sintezu i antitumorsko djelovanje novih cijano i amidino supstituiranih derivata stiril-2-benzimidazola i benzimidazo[1,2-*a*]kinolina, a strukture dobivenih derivata prikazane su na Slici 17.



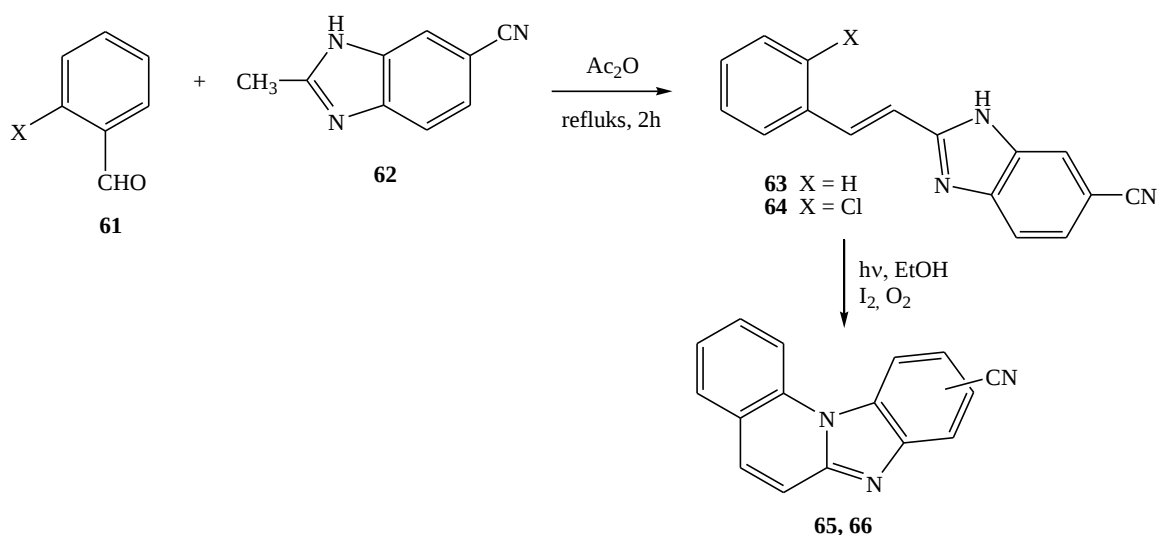
Slika 17. Cijano i amidino-supstituirani derivati 2-stirilbenzimidazola (**41–56**, **63**, **64** i **69**) i benzimidazo[1,2-*a*]kinolina (**57–60**, **65**, **66** i **70–74**)

Spojevi su dobiveni kondenzacijom, fotokemijskom dehidrociklizacijom i dehidrohalogenacijskom ciklizacijom prikazanim na Shemama 5, 6 i 7. Novi *N*-amidino-supstituirani *E*-2-stiril-1*H*-benzimidazoli **41–48** dobiveni su kondenzacijom *orto*-supstituiranih 3-fenil-propenala **40a,b** s 4-*N*-amidino supstituiranim 1,2-fenilendiaminima i *p*-benzikinonom u 49 – 74%-tnom iskorištenju. Cijano supstituirani *E*-2-stiril-1*H*-benzimidazoli **63** i **64** dobiveni su reakcijom *o*-susptituiranih benzaldehida i 6-cijano-2-metilbenzimidazola, a fotokemijskom izomerizacijom u etanolu dobiveni su *N*-amidino-supstituirani *Z*-2-stiril-1*H*-benzimidazoli **49–56**, s 60 – 78% iskorištenjima.

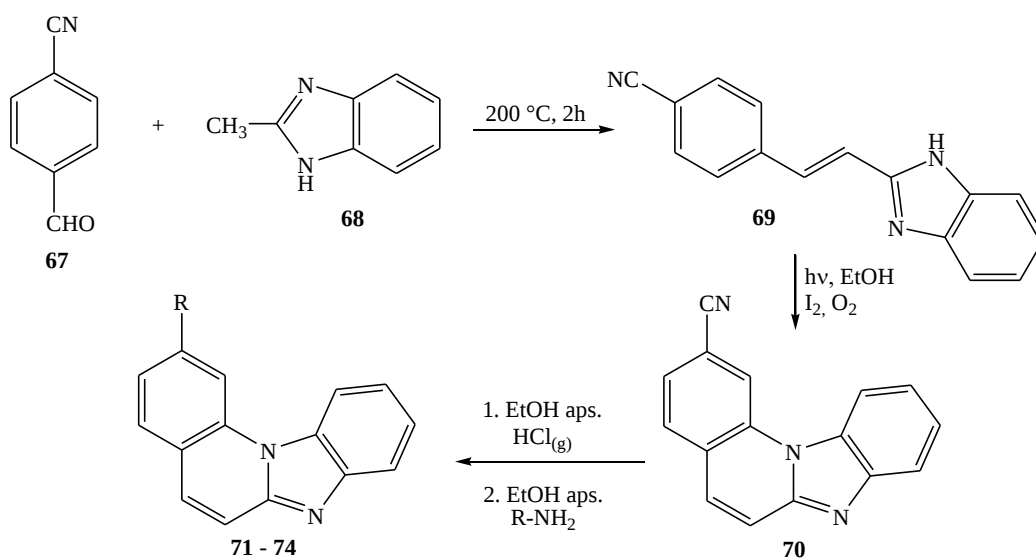


Shema 5. Sinteza amidino-supstituiranih derivata *E*- i *Z*-stiril-2-benzimidazola **41–56** i benzimidazo[1,2-*a*]kinolina **57–60**

N-amidino- i cijano supstituirani benzimidazo[1,2-*a*]kinolini **57–60**, **65**, **66** i **70** priređeni su fotokemijskom dehidrociklizacijom, dok su spojevi **57–60** priređeni fotokemijskom dehidrohalogenacijskom ciklizacijom, iz *N*-amidino supstituiranih *E*-2-stiril-1*H*-benzimidazola **41–48** u etanolu. Dobivene su smjese izomera spojeva **57–60** u iskorištenju 31 – 40%.



Shema 6. Sintaza cijano-supstituiranih derivata *E*-stiril-2-benzimidazola **63–64** i benzimidazo[1,2-*a*]kinolina **65–66**

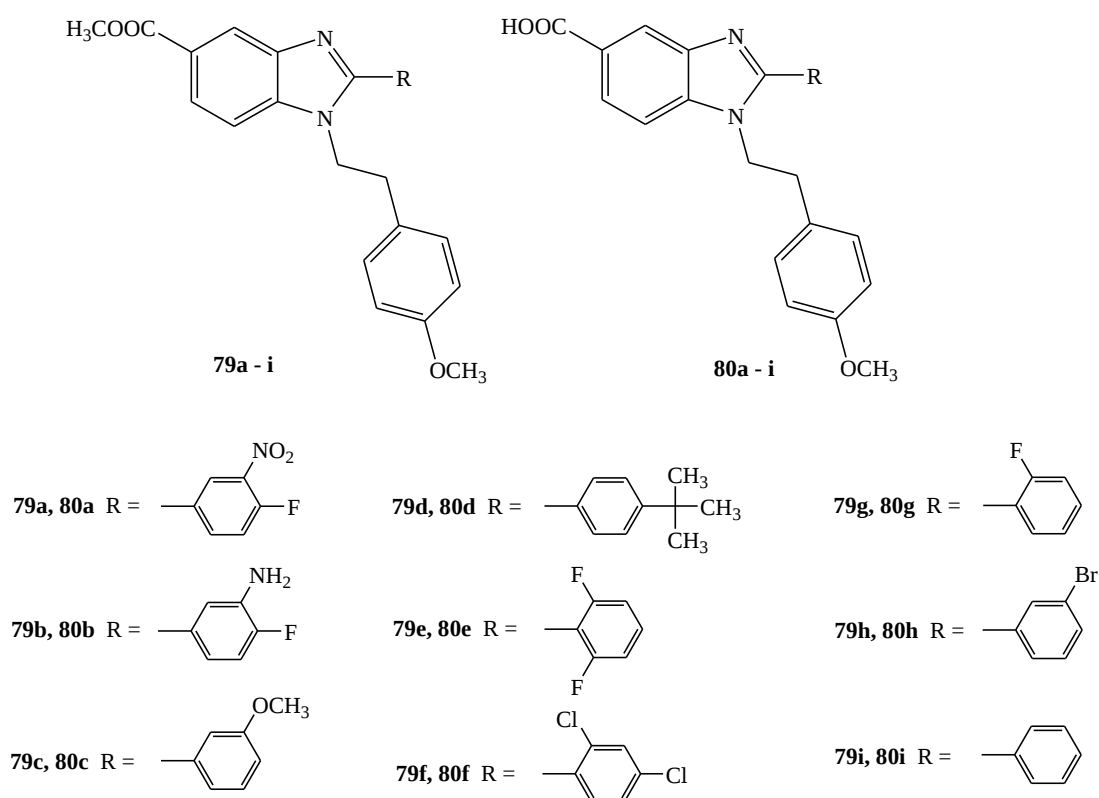


Shema 7. Sintaza cijano- i amidino-supstituiranih benzimidazo[1,2-*a*]kinolina **70–74**

Da bi se utvrdila mogućnost nekovalentnih interakcija ovih spojeva s DNK, provedeni su eksperimenti vezanja na *ct*-DNK s acikličkim derivatima **41–44** i **49–52**, i njihovim cikličkim analogima **57–60** i **71–74**. Rezultati su pokazali da ciklički derivati jako stabiliziraju dvostruku uzvojnica DNK, dok njihovi aciklički analozi pokazuju zanemarivu stabilizaciju *ct*-DNK. Spoj **58** je izabran kao reprezentativni za daljnja ispitivanja vezivanja na DNK spektrofotometrijskim titracijama i uspoređen je s acikličkim analogom **50**. Na temelju dobivenih rezultata, kao način interakcije predloženo je interkaliranje benzimidazo[1,2-*a*]kinolina u *ct*-DNK, dok je za aciklički derivat predloženo vezivanje u manji utor DNK.

Svim dobivenim spojevima ispitan je potencijalni antiproliferativni učinak *in vitro* na nekoliko staničnih linija humanih karcinoma te su svi ispitani spojevi pokazali izraženu antitumorsku aktivnost. Gotovo su svi aciklički derivati pokazali stanično djelovanje prema staničnim linijama karcinoma grlića maternice (HeLa) i linijama karcinoma dojke (MCF-7), a najizraženiju aktivnost među njima pokazao je 4-*N*-morfolino supstituirani spoj **48**, dok su svi ciklički spojevi bili 2–10 puta aktivniji što je povezano s njihovom sposobnosti da interkaliraju u DNK. Rezultati su također pokazali značajno selektivno djelovanje 2-imidazolinilskog cikličkog derivata **58** prema stanicama karcinoma debelog crijeva (SW620), te da inhibira topoizomerazu II i uzrokuje snažno zaustavljanje staničnog ciklusa, smanjujući napredovanje mitoze.

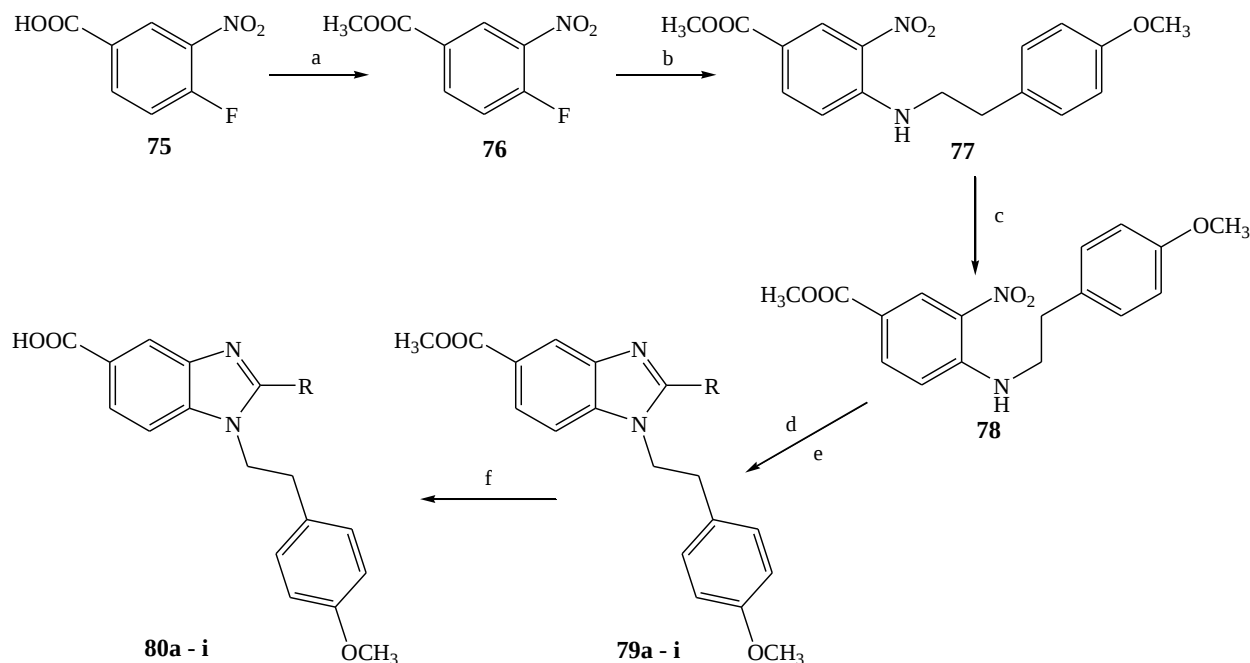
N. R. Gowda i suradnici²² 2009. godine objavili su sintezu i antiproliferativno djelovanje novih derivata 1-(4-metoksifenetil)-1*H*-benzimidazo-5-karboksilne kiseline **80a–i** s različitim arilnim supstuentima na položaju 2 benzimidazolske jezgre.



Slika 18. Strukture ciljanih derivata benzimidazola (**79a–i**, **80a–i**)

Reakcijom 4-fluoro-3-nitro-benzojeve kiseline **75** s metanolom i tionil kloridom nastaje metil-4-fluoro-3-nitrobenzoat **76**. Nukleofilnom aromatskom supstitucijom fluoridne skupine s 2-(4-

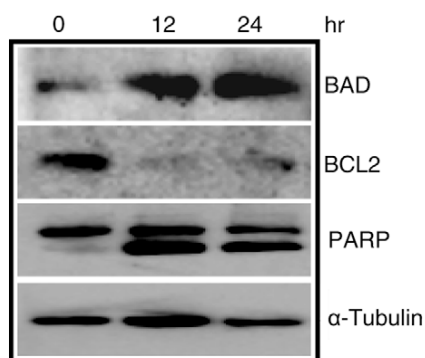
metoksifenil)etanaminom dobiven je metil-4-(4-metoksifenetilamino)-3-nitrobenzoat **77**. Arilna nitro grupa reducira se do amina uz 20%-tnu otopinu Fe(II) u NH₄Cl. Selektivnim aciliranjem primarnog aromatskog amina praćenim ciklizacijom dobiveni su prekursori **79a–79i**, koji hidrolizom daju konačne produkte **80a–80i**. Na Shemi 8 prikazan je sintetski put za dobivanje željenih produkata, a strukture dobivenih spojeva na Slici 18.



Shema 8. Sinteza derivata benzimidazola **79a–i** i **80a–i**. Reagensi i uvjeti: (a) tionil-klorid, CH₃OH, diklormetan, refluks; (b) 2-(4-metoksifenil)etanamin, DIPEA, DMF, 3h; (c) Fe prah, NH₄Cl, IPA, 70 °C, 4h; (d) R-COCl, TEA, CH₂Cl₂, 3h; (e) CH₃COOH, 90 °C, 8 h; (f) LiOH, THF/voda (2:1)

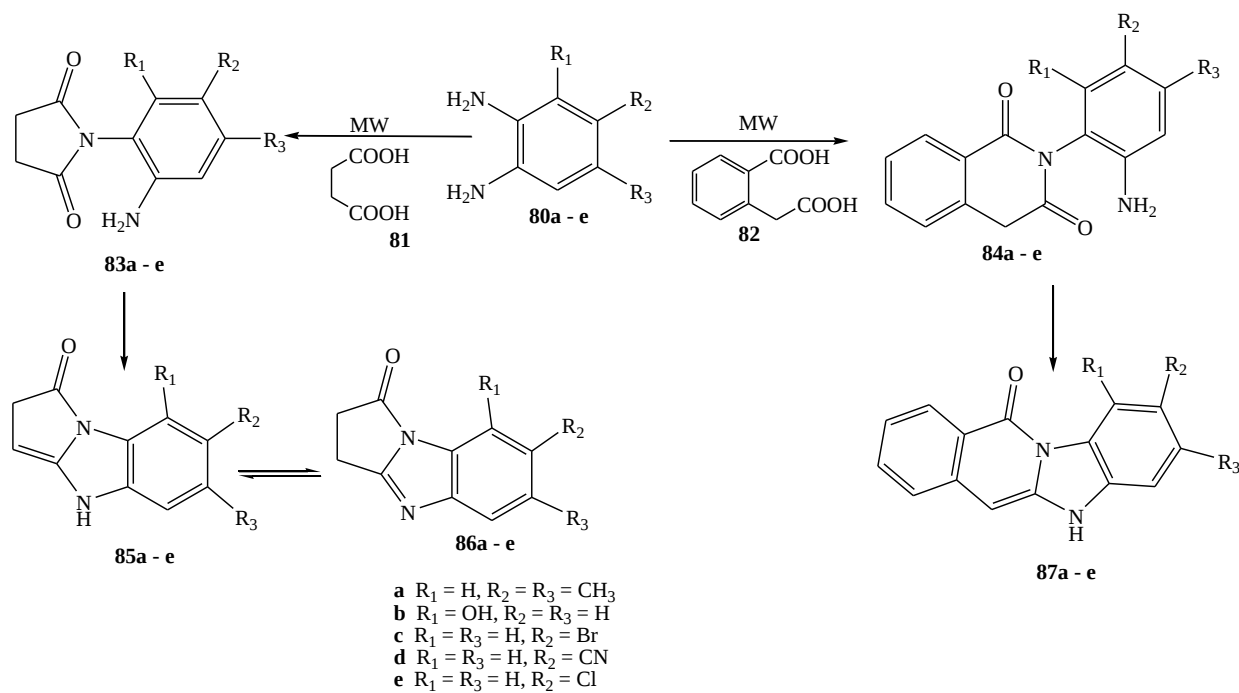
Dobiveni spojevi **80a–80i** i njihovi prekursori (**79a**, **79c–e**, **79g** i **79i**) pokazali su obećavajuće citotoksično djelovanje na tretirane stanice leukemije (K562 i CEM), a najbolju aktivnost pokazao je spoj koji sadrži elektron-odvlačeću fluoridnu i nitro-skupinu **79a**, izazivajući inhibiciju stanica s IC₅₀ vrijednosti 3 μM. Predložen je mehanizam djelovanja spoja kao inhibitora replikacije DNK blokiranjem staničnog ciklusa u S/G2 fazi. Osim toga, navedeni spoj pokazao je znatan utjecaj na proteine BAD, BCL2 i PARP povezane s apoptozom stanica, povećavajući ekspresiju proapoptičkog proteina BAD, odnosno smanjujući ekspresiju antiapoptičkog BCL2 proteina. Poznato je da se aktiviranjem apoptoze PARP protein cijepa na 85 i 27 kDa polipeptide, a djelovanjem spoja **79a** na stanice došlo je do maksimalnog cijepanja proteina nakon 12 h, a rezultati djelovanja spoja na navedene proteine prikazana je

na Slici 19. Dobiveni rezultati sugeriraju da bi metil 2-(4-fluoro-3-nitrofenil)-1-(4-metoksifenil)-1*H*-benzimidazo-5-karboksilat mogao biti potencijalni antileukemijski agens.



Slika 19. Spoj **79a** mijenja ekspresiju apoptotičkih proteina u K562 stanicama 12 i 24 h nakon tretiranja stanica sa 30 μ M **79a**. α -tubulin korišten je kao standard.

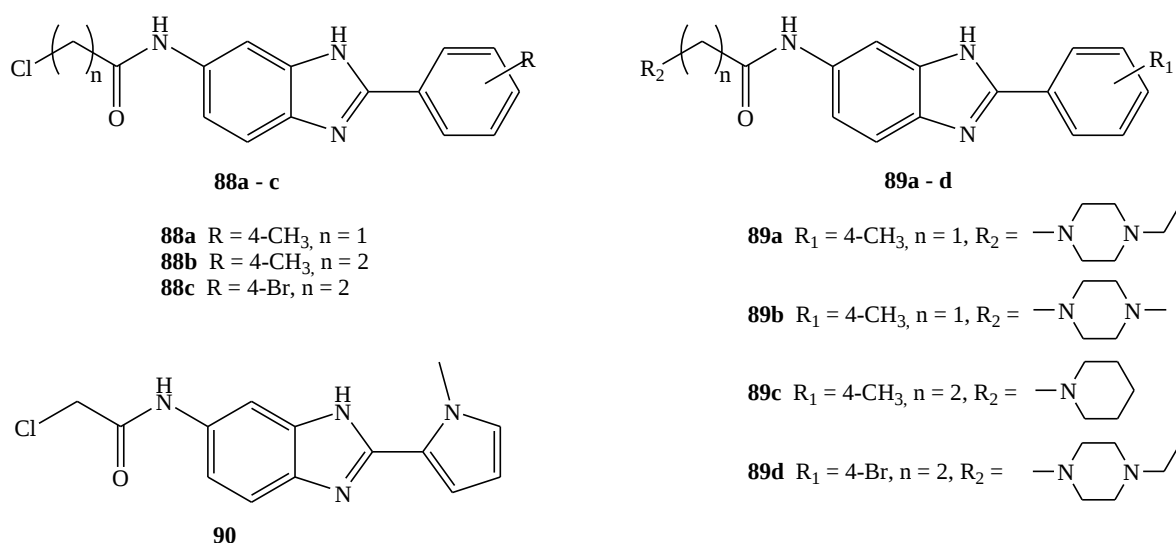
Godinu dana kasnije istraživačka skupina na čelu sa S. M. Sondhi²³ objavila je sintezu i antitumorsku aktivnost tricikličkih i tetracikličkih derivata benzimidazola. Konačni produkti **85a–e**, **87a–e** priređeni su kondenzacijom sukcininske kiseline **81** i homoftalne kiseline **82** i različito supstituiranih diamina **80a–e** bez upotrebe otapala potpomognutom mikrovalnim zračenjem u 85 – 98%-tnim iskorištenjima (Shema 9).



Shema 9. Sinteza tricikličkih i tetracikličkih derivata benzimidazola

In vitro antitumorska aktivnost spojeva ispitana je na staničnim linijama raka pluća (A-549, HOP-62), prostate (PC-3), jajnika (IGR-OV-1), dojke (MCF-7) te CNS limfoma (SF-295). Postotak inhibicije rasta tumorskih stanica određen je pri 10 μ M koncentracijama navedenih spojeva. Spojevi **85a**, **85b**, **85d**, **85e** (54%, 53%, 52%, 55%), su pokazali dobru aktivnost prema stanicama CNS limfoma, **85c** prema stanicama raka jajnika (50%), a **85e** 52%-tnu inhibiciju rasta stanica raka dojke.

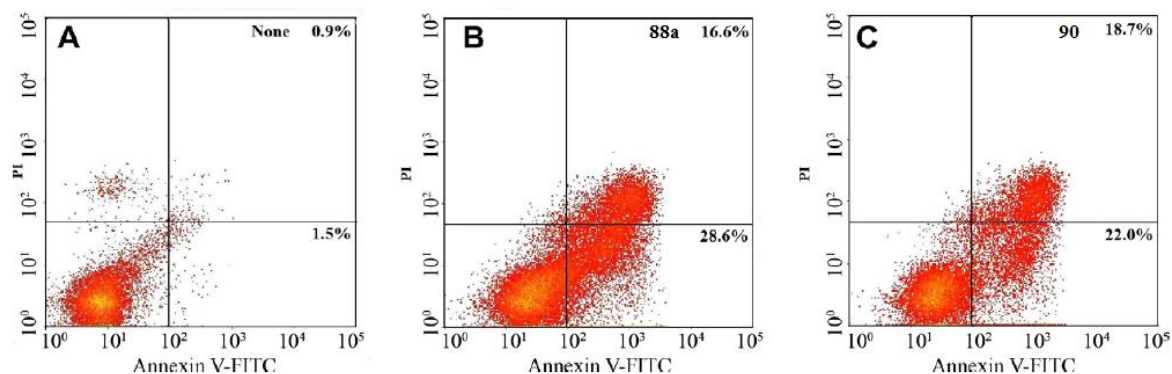
Y. Li i suradnici²⁴ 2011. godine su publicirali sintezu novih antitumorskih derivata 2-arilbenzimidazola kao multi-target inhibitora receptora tirozin kinaza (RTK). Poznato je da receptori tirozin kinaza, epidermalnog faktora rasta (EGFR), vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGFR-2), te PDGFR faktor rasta imaju važnu ulogu u regulaciji proliferacije tumorskih stanica, njihovoj diferencijaciji, angiogenezi i apoptozi. Sintetiziranim spojevima ispitano je *in vitro* antiproliferativno djelovanje na stanicama humanog hepatocelularnog karcinoma (HepG-2) te sa specifičnim tirozin kinazama. Strukture priređenih spojeva koje su pokazale najbolju aktivnost prikazane su na Slici 20.



Slika 20. Strukture novih derivata 2-arilbenzimidazola

Među priređenim spojevima, najbolju antiproliferativnu aktivnost prema HepG-2 stanicama pokazali su spojevi **88a** i **90** s IC₅₀ vrijednostima 2,0 i 1,8 μ M. Usporedbom dobivenih rezultata aktivnosti spojeva, došlo se do zaključka da elektron-odvlačeće skupine na fenilnom prstenu pridonose većoj citotoksičnosti spoja, te da duljina lanca između karbonilne skupine i kloridne, odnosno funkcionalne skupine na kraju utječe na citotoksičnost spoja, pa je tako primijećeno da je spoj **88b** neaktivan pri koncentraciji 50 μ M, dok **88a** s kraćim lancem pokazuje značajno veći inhibitorni efekt, s IC₅₀ = 2,0 μ M.

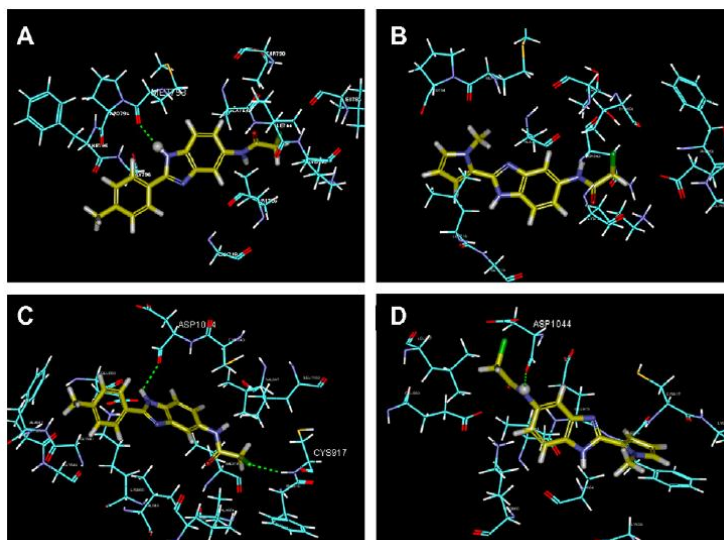
In vitro test inhibicije tirozin kinaza proveden je sa spojevima **88a**, **88b** i **90** pri koncentracijama 50 μM , a **88a** i **90** pokazali su najveći efekt inhibicije aktivnosti EGFR (88,03% i 86,90%), dok se vrijednosti inhibicije PDGFR i VEGFR nalaze između 33 – 42% i 16 – 18%. S obzirom na njihovu dobru citotoksičnost i inhibiciju kinaza, na spojevima **88a** i **90** provedena su ispitivanja apoptoze tumorskih stanica, testom Annexin-V/PI, a rezultati su prikazani na Slici 21, gdje gornji desni kvadrant prikazuje kasnu fazu apoptoze stanica ili njihovu smrt, a donji desni ranu fazu apoptoze.



Slika 21. Protočna citometrijska analiza fosfatidilserina (vezivanje Annexin-V) i integritet membrane stanica (PI naprezanje). (A) HepG-2 tumorske stanice; (B) HepG-2 stanice tretirane 72 h s 2 M **88a**; (C) HepG-2 stanice tretirane 7 h s 2 M **90**

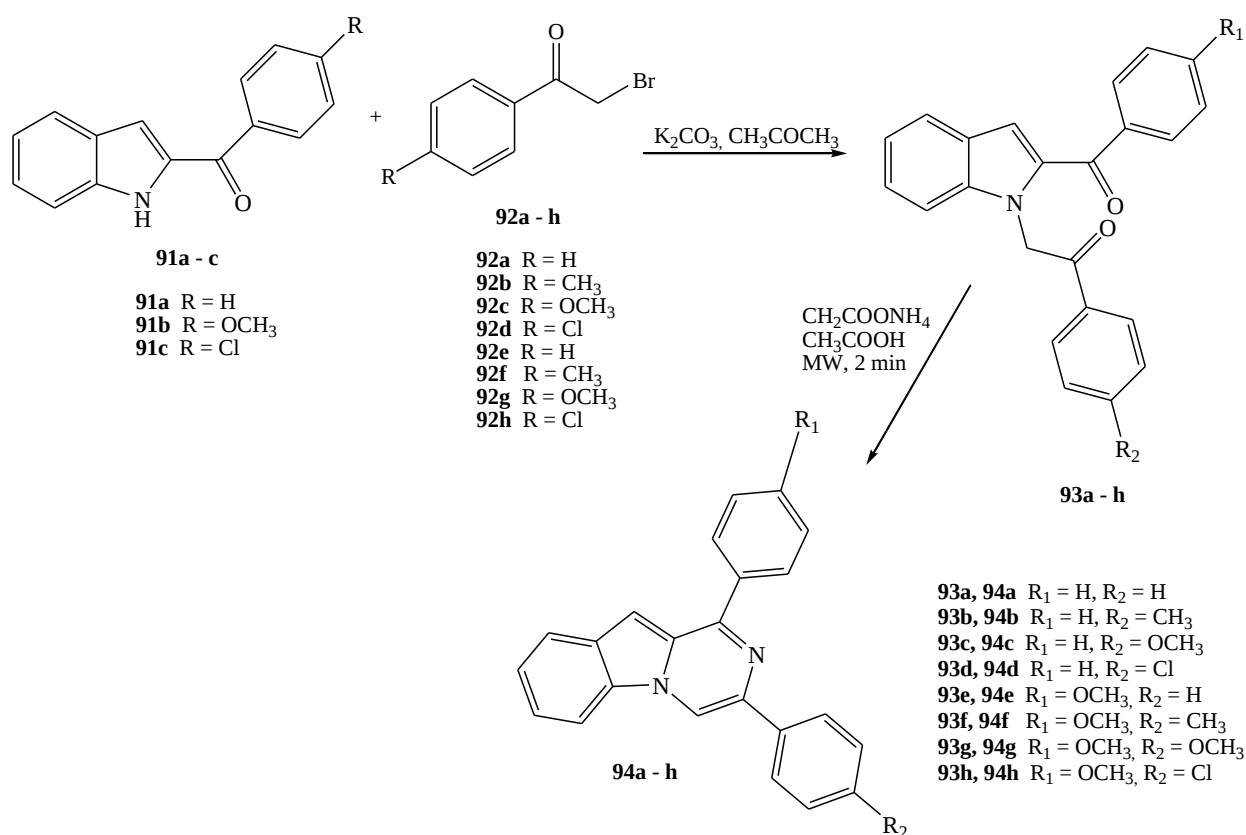
28,6% HepG-2 stanica tretiranih s **88a** su bile u ranoj fazi, a 16,6% u kasnoj fazi apoptoze ili mrtve, dok je spoj **90** pokazao veći efekt, sa 22,8% stanica u ranoj i 18,7% u kasnoj fazi.

U svrhu boljeg razumijevanja interakcija između spojeva i kinaza, provedena je studija molekuskog vezivanja izabranih spojeva na ATP vezno mjesto kinaza EGFR i VEGFR-2. Slika 22A prikazuje vezivanje **88a** na ATP vezno mjesto EGFR kinaze pri čemu spoj formira vodikove veze s ključnom aminokiselinom MET 793 (N-H $\cdots$ O: 2,485 Å). Spoj **90** pokazuje slabije interakcije s EGFR, što je u skladu s ranijim ispitivanjima inhibicije EGFR kinaze. Usporedbom vezivanja spojeva s VEGFR-2 kinazom, kao što je prikazano na slikama 22C i 22D, **88a** formira dvije vodikove veze s CYS 917 (N-H $\cdots$ Cl: 2,484 Å) i ASP 1044 (N-H $\cdots$ O: 2,429 Å), dok spoj **90** stvara samo jednu vezu s ASP 1044 (N-H $\cdots$ O: 2,419 Å), potvrđujući rezultate prijašnjih ispitivanja pri čemu je spoj **88a** bio bolji inhibitor VEGFR-2.



Slika 22. Modeli vezivanja izabranih derivata benzimidazola s ciljanim proteinima. (A) Spoj **88a** s EGFR; (B) Spoj **90** s EGFR; (C) Spoj **88a** s VEGFR-2; (D) Spoj **90** s VEGFR-2.

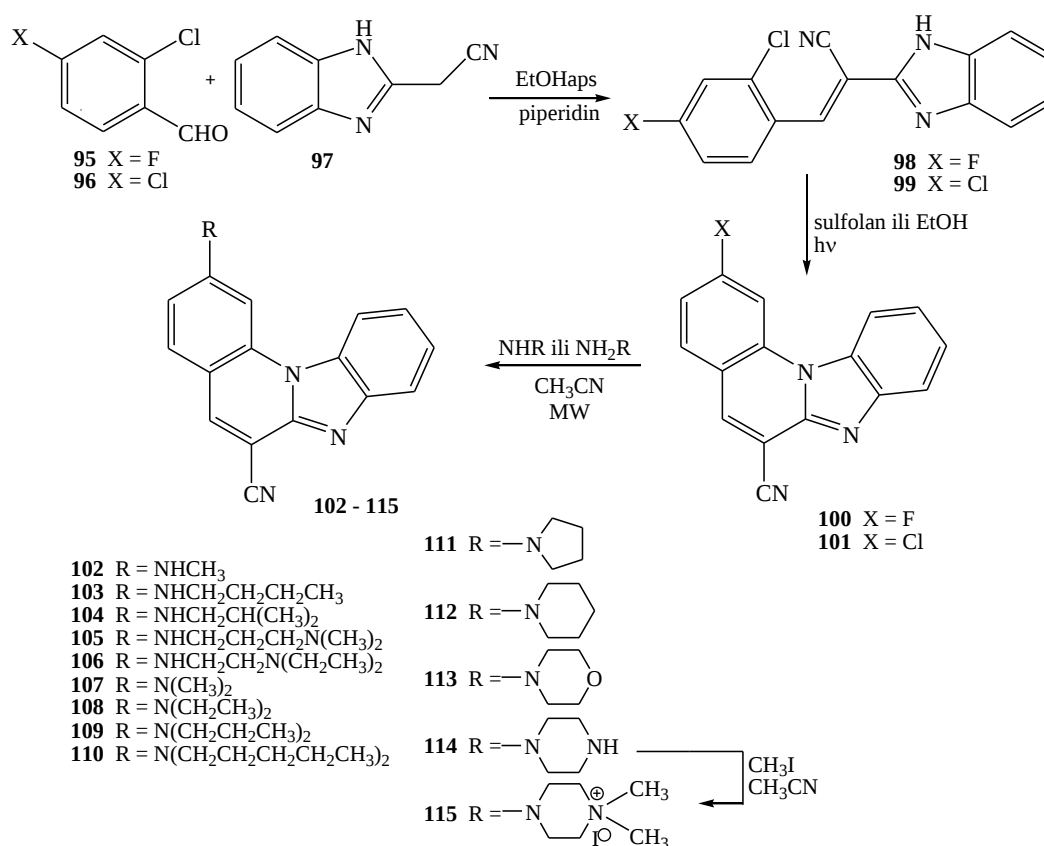
Iste godine S. Demirayak sa istraživačkom grupom²⁵ objavio je sintezu, strukturnu karakterizaciju i antitumorska ispitivanja novih 1,3-diarilpirazino[1,2-*a*]benzimidazolskih derivata.



Shema 10. Sinteza novih derivata 1,3-diarilpirazino[1,2-*a*]benzimidazola

Reakcijom 2-arilbenzimidazolskih derivata **91a–c** s 2-bromacetofenonima **92a–h** priređeni su prekursori 1-(2-aril-2-oksoetil)-2-arilbenzimidazoli **93a–h**, koji ciklizacijom potpomognutom mikrovalnim zračenjem u amonijevom acetatu daju 1,3-diarilpirazino[1,2-*a*]benzimidazole **94a–h**, čije su strukture i sinteza prikazani na Shemi 10. Među sintetiziranim spojevima, **93c**, **93d**, **93g** i **93h** su pokazali vrlo dobru inhibiciju rasta stanica leukemije, u vrijednostima 28,08%, 35,87%, 25,51% i 31,68%. Iz dobivenih rezultata, zaključeno je kako spojevi koji sadrže metoksi skupinu (-OCH₃) imaju značajno višu inhibitornu aktivnost na ispitane linije stanica.

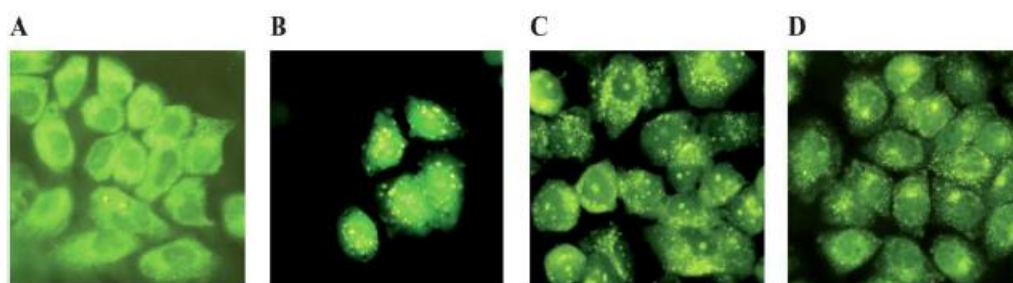
2013. godine N. Perin i suradnici²⁶ objavili su sintezu novih 2-supstituiranih benzimidazo[1,2-*a*]kinolina s različitim vrstama i duljinama amino lanaca na kinolinskoj jezgri. Amino supstituirani spojevi su sintetizirani nekataliziranim aminiranjem potpomognutim mikrovalovima iz odgovarajućih klor(fluor)-supstituiranih prekursora prema Shemi 11.



Shema 11. Sinteza amino supstituiranih benzimidazo[1,2-*a*]kinolina

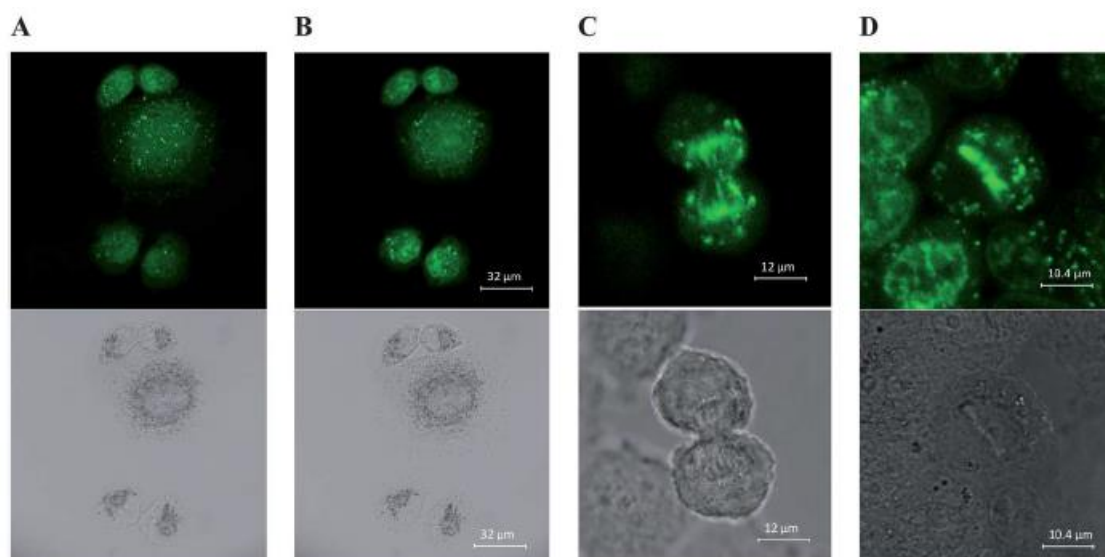
Benzimidazo [1,2-*a*] kinolini i srodni benzanulirani benzimidazoli koji posjeduju konjugirane planarne kromofore su dobro poznati DNK interkalatori, a pokazalo se da amino lanci različite dužine i fleksibilnost mogu značajno povećati interakcije s DNK bazama, te da alkilaminski supstituenti, bilo aciklički ili ciklički, značajno povećavaju antitumorsko djelovanje u usporedbi s ranije priređenim nitro i amino supstituiranim benzimidazo[1,2-*a*]kinolinima. Svi spojevi su pokazali istaknuto antiproliferativno djelovanje prema tri ispitane stanične linije humanih tumora a većina spojeva se pokazala aktivnima u submikromolarnim IC₅₀ koncentracijama. Spoj s najdužim tercijarnim aminskim lancem pokazao je najmanju aktivnost, a na najaktivnijim spojevima **105**, **114** i **115** provedeni su dodatni biološki eksperimenti da bi se odredio mehanizam njihovog biološkog djelovanja. Spojevi **105**, **114** i **115** pokazali su selektivno vezanje na DNK, od kojih se *N,N*-dimetilaminopropilni analog **105** pokazao kao jaki DNK interkalator, dok spojevi **114** i **115** nisu pokazali isti efekt na živim stanicama.

Da bi se ispitala lokalizacija najaktivnijih spojeva u tumorskim stanicama, stanice H460 su inkubirane s navedenim spojevima i snimljene fluorescentnim mikroskopom. Među njima, svi su pokazali pretežnu lokalizaciju u citoplazmi, a samo **105** je pokazao lokalizaciju u jezgri i citoplazmi, što je prikazano na Slici 23.



Slika 23. Fluorescentne mikroskopske slike H460 tretirane 2 sata sa spojevima **104** (A), **105** (B), **114** (C), **115** (D) koncentracija 10 μ M. (uvećanje 400x)

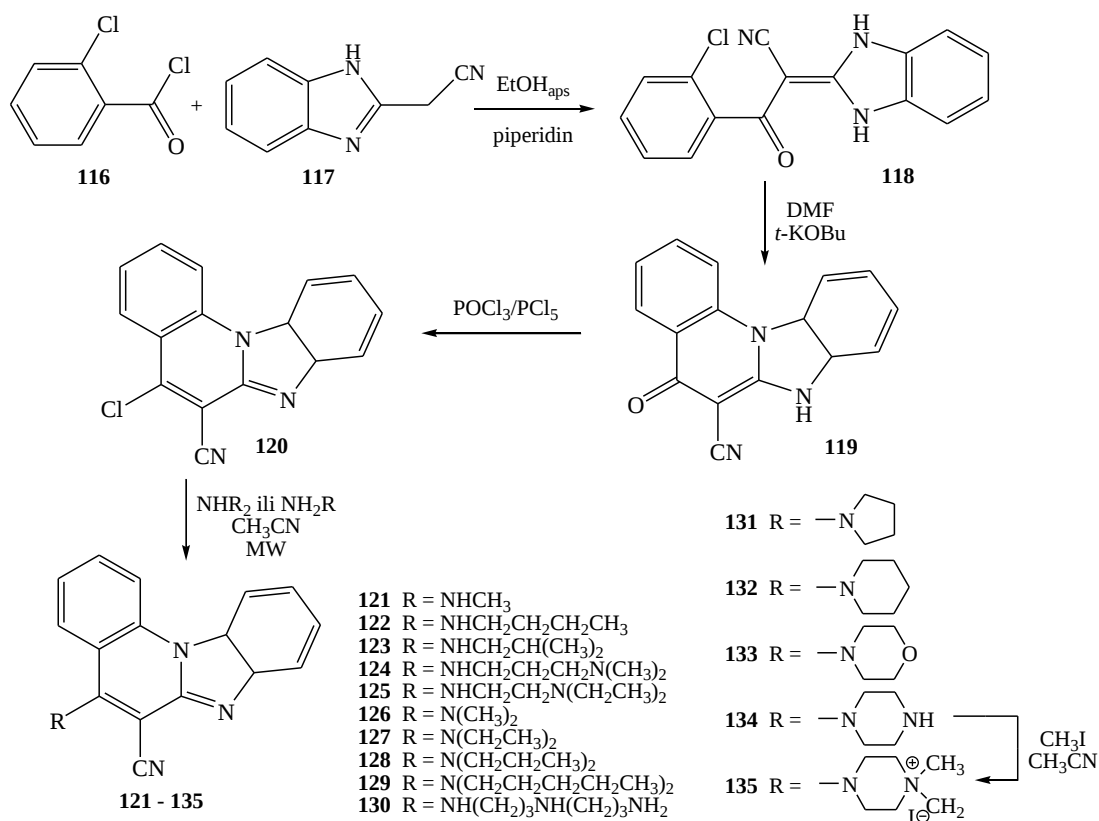
S obzirom da je pokazao najbolje bojenje uzorka, provedena je konfokalna laserska mikroskopija pri čemu su stanice H460 tretirane 2 sata sa **105** koncentracije 10 μ M, što je rezultiralo intenzivnim bojenjem mitotičkih kromosoma, dokazujući afinitet *N,N*-dimetilaminopropilnog analoga prema DNK.



Slika 24. Konfokalna laserska mikroskopija stanica H460 tretiranih 2 sata s 10 μM koncentracijom spoja **105**. A i B predstavljaju dva optička profila snimljena na različitim razinama duž z-osi kroz iste stanice, a C i D intenzivno obojenje mitotičkih kromosoma. Gornje slike predstavljaju fluorescentne slike a detekcijom 424 – 527 nm, dok su ispod njih prikazane iste slike, ali s propuštajućim svjetlom.

Spoj s *i*-butilaminskim bočnim lancem **104** nije se pokazao kao tipičan interkalator, ali je pokazao izražen G2/M zastoj s drastičnom redukcijom S faze staničnog ciklusa, rezultirajući inhibicijom mitoze što je moglo biti postignuto DNK interkaliranjem i oštećenjem diobenog vretena, te bi se navedeni *i*-butilamino supstituirani benzimidazo[1,2-*a*]kinolin **104** trebao dalje testirati da bi mu se potvrdilo antimitotičko djelovanje.

Ista skupina autora²⁷ je 2014. godine objavila sintezu novih 5-amino supstituiranih benzimidazo[1,2-*a*]kinolina-6-karbonitrila, prikazanu na Shemi 12, kao potencijalnih antiproliferativnih i DNK-alkilirajućih agenasa. Aciklički prekursori priređeni su aldolnom kondenzacijom 2-klorobenzoilklorida s cijanometilbenzimidazolom, a ciklički keto derivati termičkom ciklizacijom u DMF-u korištenjem *t*-KOBu kao bazu. Glavni prekursor za sintezu željenih spojeva, klor-supstituirani benzimidazo[1,2-*a*]kinolin, priređen je reakcijom keto derivata s POCl_3 i PCl_5 u iskorištenju 70%. Konačni spojevi dobiveni su nekataliziranim aminiranjem potpomognutim mikrovalovima, s iskorištenjima 30 – 74%, osim *N,N*-diamino supstituiranih derivata dobivenih u vrlo malim iskorištenjima, 12 – 24%.



Shema 12. Sinteza 5-amino supstituiranih derivata benzimidazo[1,2-a]kinolina-6-karbonitrila

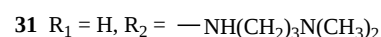
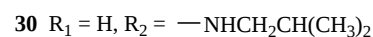
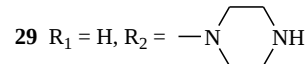
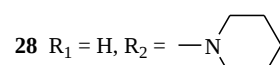
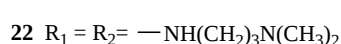
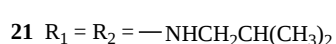
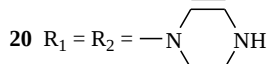
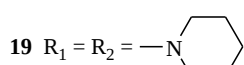
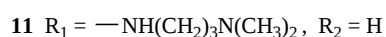
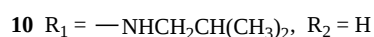
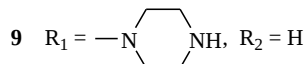
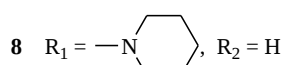
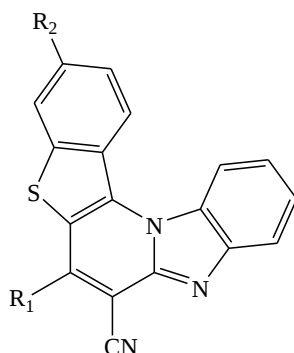
Spojevi sa sekundarnim amino lancem su pokazali istaknuto antiproliferativno djelovanje prema tri ispitane stanične linije humanih tumora, za razliku od spojeva s tercijarnim aminskim i cikličkim amino lancem, osim piperazinskog supstituenta **134**. Najaktivnijim spojem pokazao se *N,N*-dimetilaminopropil **124** i piperazinil supstituirani derivat **134**. Ova dva spoja pokazala su jaki afinitet prema DNK i interkaliranje u DNK uzvojnicu, ali samo spoj **124** ulazi u stanicu i lokalizira se u jezgri, dok spoj **134** ulazi u stanicu ali se lokalizira u citoplazmi, što ukazuje na to da DNK nije njegova funkcionalna meta. Zanimljivo je da je dimetil-*N*-piperazinil supstituirani spoj **135**, koji ima slična *in vitro* DNK vezujuća svojstva kao **124** i **134**, pokazao slabu proliferativnu aktivnost u stanicu, što je u skladu s njegovom nemogućnosti ulaska u stanicu. Fluorescentni spojevi **129** i **132** su citotoksični za ispitane stanične linije i lokalizirani su u citoplazmi kao i spoj **134**.

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Cilj rada

Cilj ovog rada bio je prirediti amino i diamino supstituirane derivate pentacikličkih derivata benzimidazola. Supstituirani 6-amino i 3,6-diamino derivati 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola priređeni su reakcijama kondenzacije halogeno supstituiranih benzo[*b*]tiofenil-2-karbaldehida **4**, **15** i **25** i 2-cijanometilbenzimidazola **3**. Halogeno supstituirani derivati 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **7**, **18** i **27** kao glavni prekursori za sintezu ciljanih produkata priređeni su termičkom ciklizacijom odgovarajućih acikličkih halogeno supstituiranih benzimidazola **5**, **16** i **26**. Konačni produkti **8–11**, **19–22** te **28–31** priređeni su nekataliziranom aminacijom potpomognutom mikrovalnim zračenjem, a strukture priređenih spojeva prikazane na Slici 25 potvrđene su ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom.

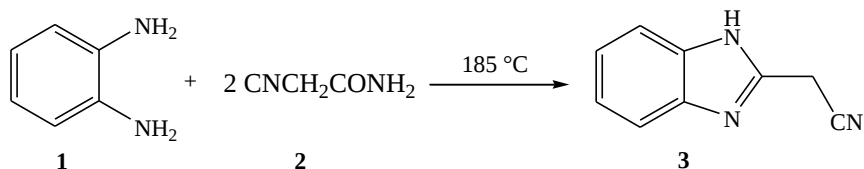
Spektroskopska karakterizacija spojeva provedena je UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom matičnih otopina pripremljenih u metanolu.



Slika 25. Strukture ciljanih spojeva

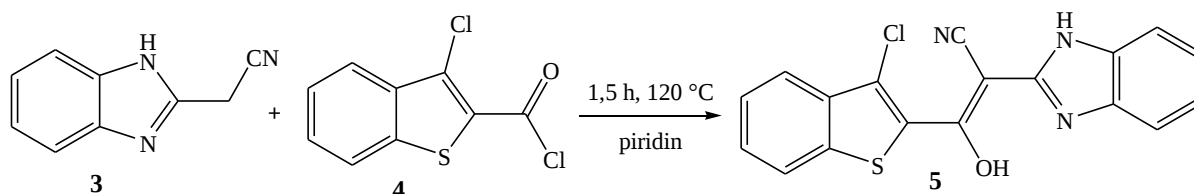
3.2. Sinteza ciljanih spojeva

Za sintezu acikličkih derivata benzimidazola **5**, **16** i **26** potrebno je prvotno prirediti 2-cijanometilbenzimidazol **3**, zagrijavanjem *o*-fenilendiamina **1** i 2-cijanoacetamida **2**:



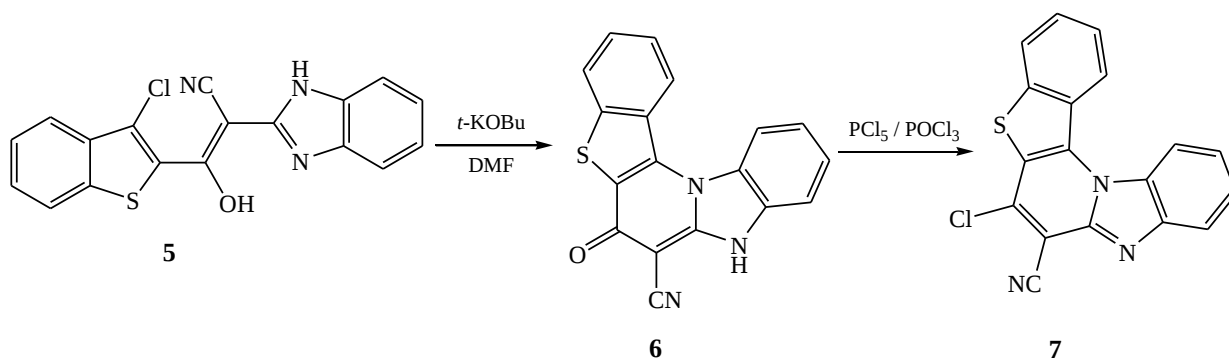
Shema 13. Priprava 2-cijanometilbenzimidazola **3**

2-(2-benzimidazolil)-3-hidroksi-3-(3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-il)akrilonitril **5** priređen je kondenzacijom 2-cijanometilbenzimidazola **3** i 3-klorobenzo[*b*]tiofen-2-karbonil- klorida **4** uz zagrijavanje u piridinu u dobrom iskorištenju od 59%²⁸:



Shema 14. Priprava 2-(2-benzimidazolil)-3-hidroksi-3-(3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-il)akrilonitrila **5**

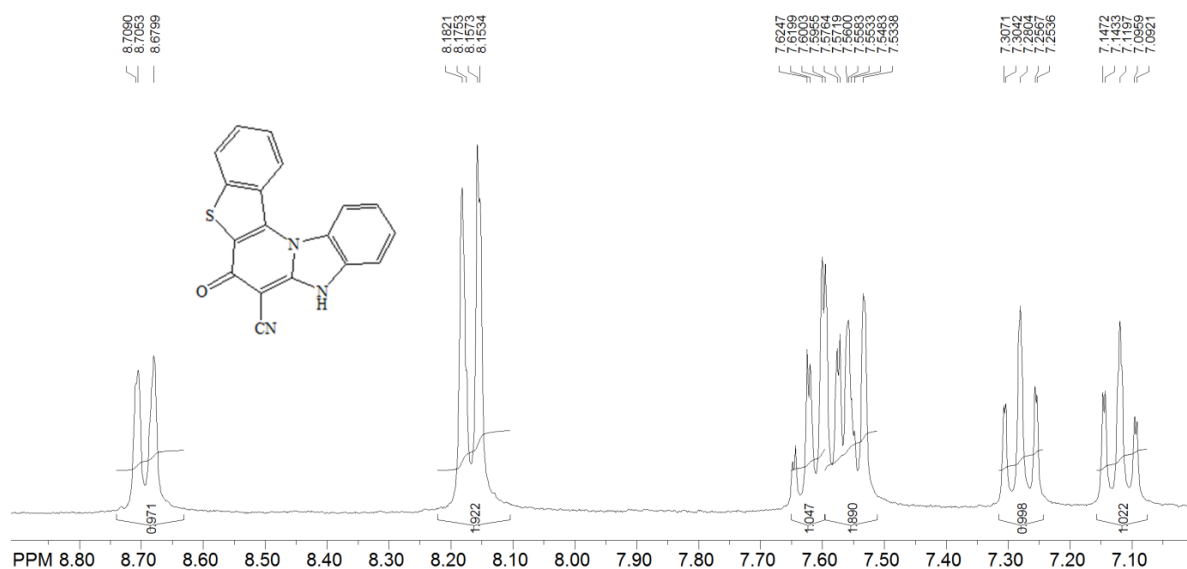
Termičkom ciklizacijom spoja **5** priređen je ciklički keto derivat 7-cijano-6-oksobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **6** u 74%-tnom iskorištenju. Njegovim zagrijavanjem s POCl₃ i PCl₅ dobiven je 7-cijano-6-klorbenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **7** (80%) prema Shemi 3. kao glavni prekursor za sintezu željenih produkata **8–11**²⁹.



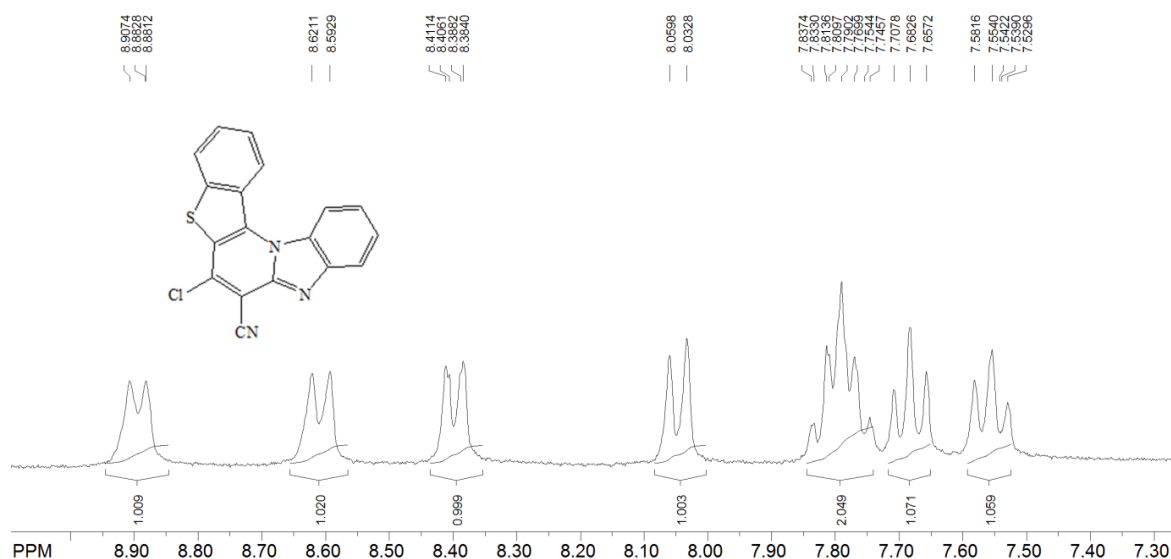
Shema 15. Priprava spojeva **6** i **7**

Strukture spojeva **6** i **7** potvrđene su NMR spektroskopijom, a dobiveni ^1H prikazani su na Slici 26. a i b U ^1H NMR spektru spoja **6** može se uočiti odgovarajući broj signala koji odgovaraju aromatskim protonima u području 8,69 – 7,12 ppm.

a)



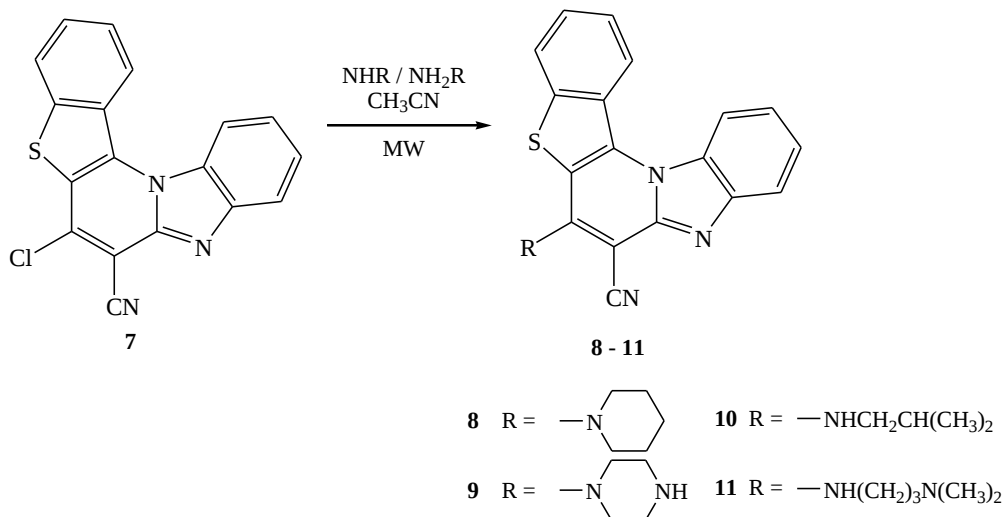
b)



Slika 26. a) ^1H NMR spektar spoja **6**; b) ^1H NMR spektar spoja **7**

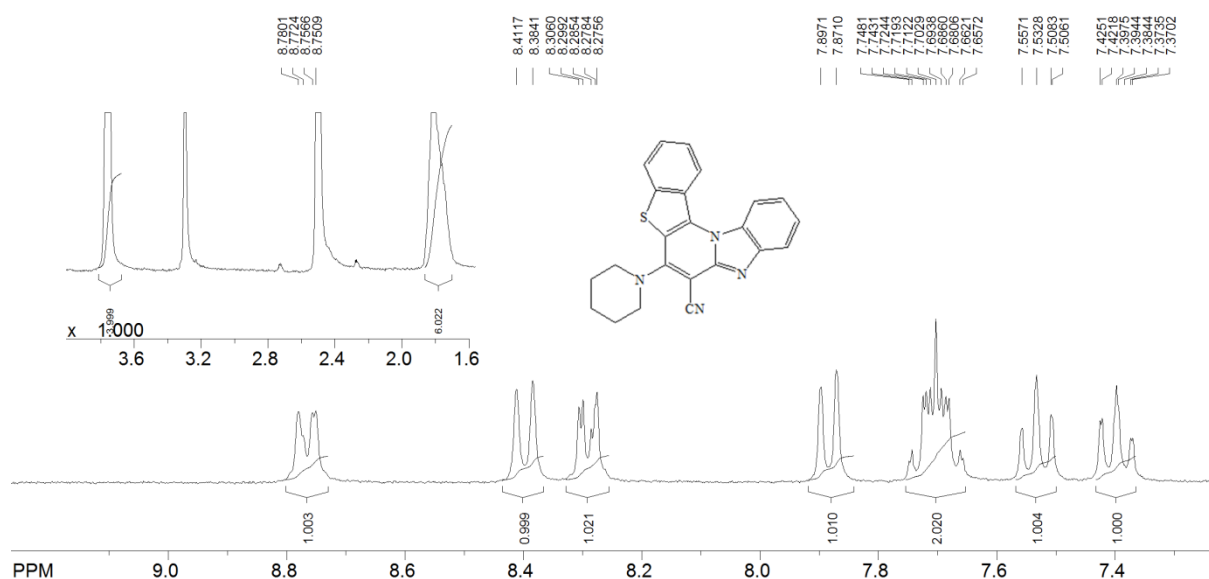
Aminacijom kloro derivata potpomognutom mikrovalovima u acetonitrilu s odgovarajućim aminima, priređeni su 6-*N*-supstituirani derivati 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **8–11** prema Shemi 16.

Čisti produkti **8**, **10** i **11** izolirani su kolonskom kromatografijom na SiO₂ kao adsorbensu i sustavu CH₂Cl₂/CH₃OH kao eluensu, **8** i **10** u vrlo dobrim iskorištenjima (74%, 67%), a **11** s niskim iskorištenjem od 23%. Strukture priređenih spojeva potvrđene su NMR spektroskopijom.^{30,31}



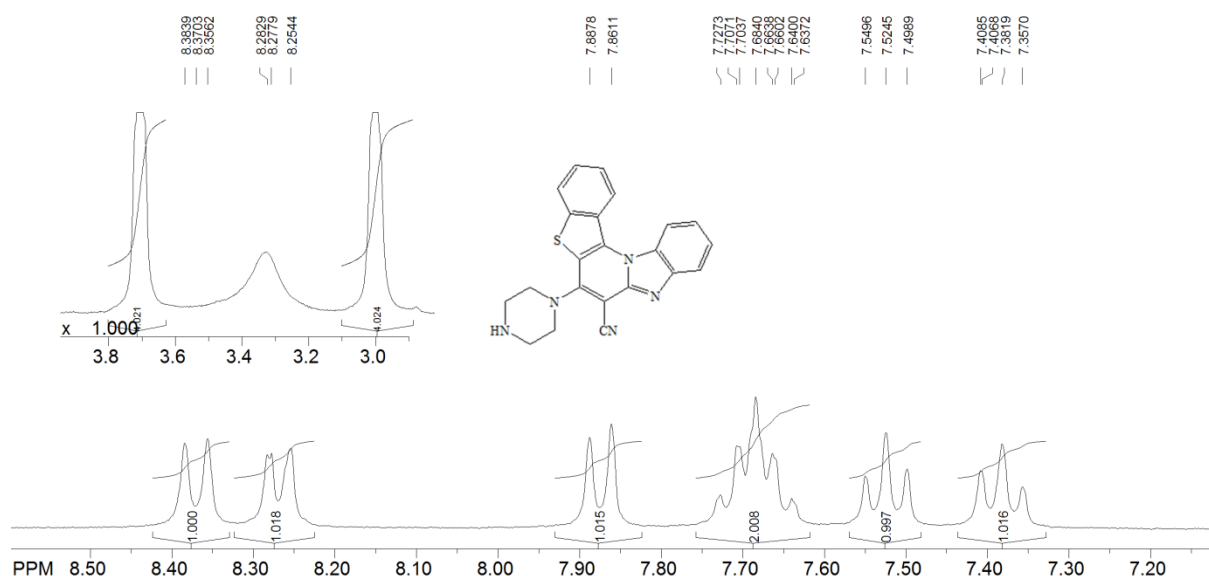
Shema 16. Sinteza 5-supstituiranih derivata **8–11**

Na Slici 27 prikazan je ¹H NMR spektar spoja **8** u kojem je vidljiv odgovarajući broj signala aromatskih protona u području 8,77 – 7,40 ppm, te signali alifatskih protona piperidinske skupine u području 3,80 – 1,72 ppm. Pomaci signala aromatskih protona pomaknuti su u niže magnetsko polje u odnosu na aromatske protone spoja **7**.



Slika 27. ¹H NMR spektar spoja **8**

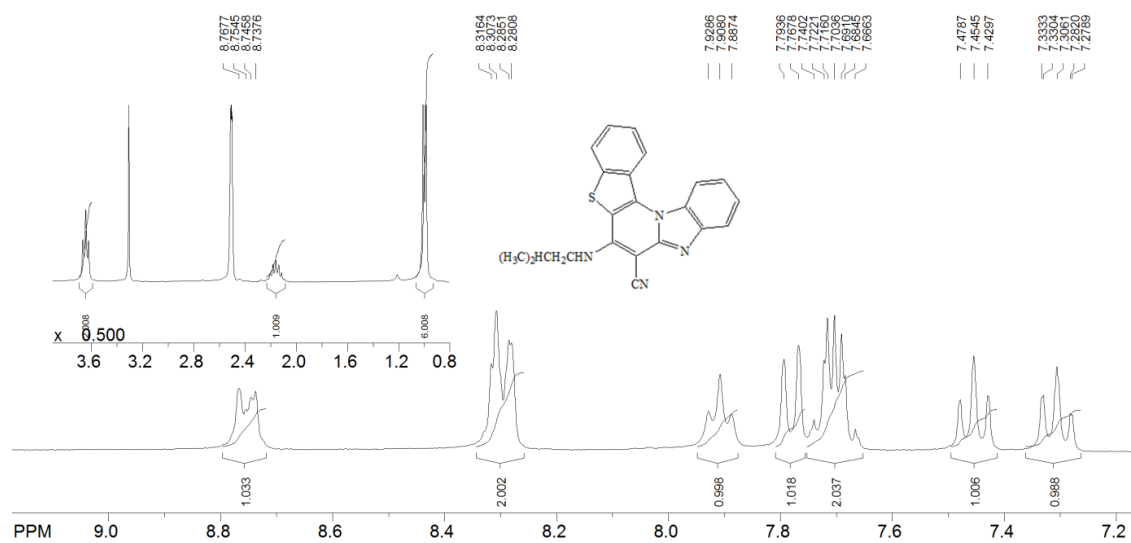
U ^1H NMR spektru spoja **9** na Slici 28 može se uočiti odgovarajući broj signala koji odgovaraju aromatskim protonima u području 8,74 – 7,38 ppm, te signali alifatskih protona piperazinske skupine u području 3,71 – 3,00 ppm. Pomaci signala aromatskih protona također su pomaknuti u niže magnetsko polje u odnosu na aromatske protone spoja **7**.



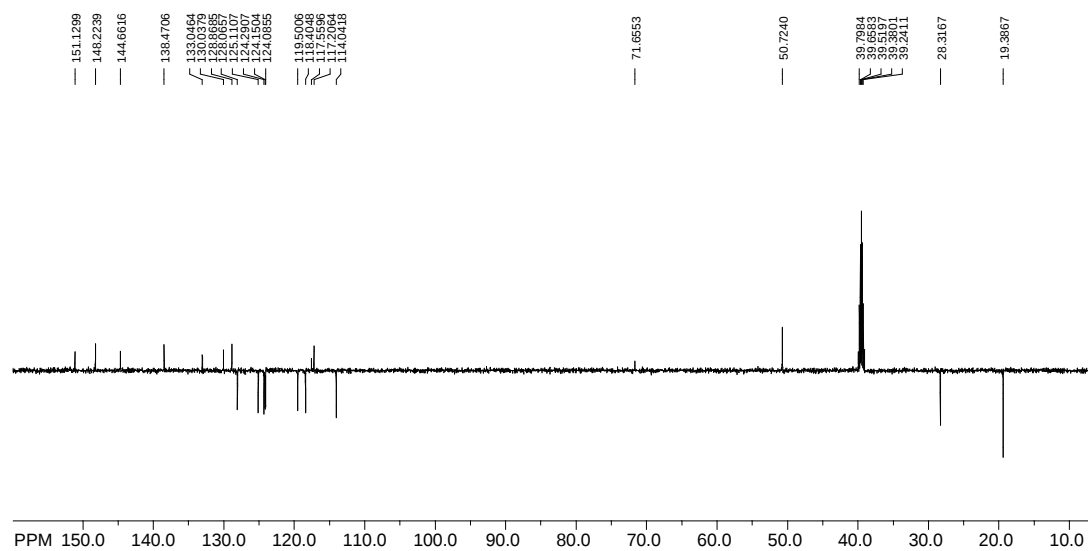
Slika 28. ^1H NMR spektar spoja **9**

Na Slici 29. a-c prikazani su ^1H i ^{13}C NMR spektri te kromatogram i MS spektar spoja **10**. U ^1H NMR spektru može se uočiti odgovarajući broj signala aromatskih protona u području 8,74 – 7,31 ppm, signal dušikovog protona aminske skupine na 7,91 ppm, te signali alifatskih protona izobutilne skupine u području 3,64 – 1,00 ppm. Pomaci signala aromatskih protona spoja **10** također su pomaknuti u niže magnetsko polje u odnosu na aromatske protone spoja **7**. U ^{13}C NMR spektru spoja **10** mogu se uočiti odgovarajući broj signala koji odgovaraju kvaternim ugljikovim atomima i odgovarajući signali CH skupina aromatskog dijela molekule. U alifatskom dijelu vidljivi su signali na 50,86 ppm koji odgovara CH_2 skupini, na 28,32 ppm koji odgovara CH skupini, te na 19,39 ppm koji odgovara ugljikovim atomima metilnih skupina na izobutilnom supstituentu. Na prikazanom kromatogramu i MS spektru vidljiv je odgovarajući molekulski pik spoja **10**.

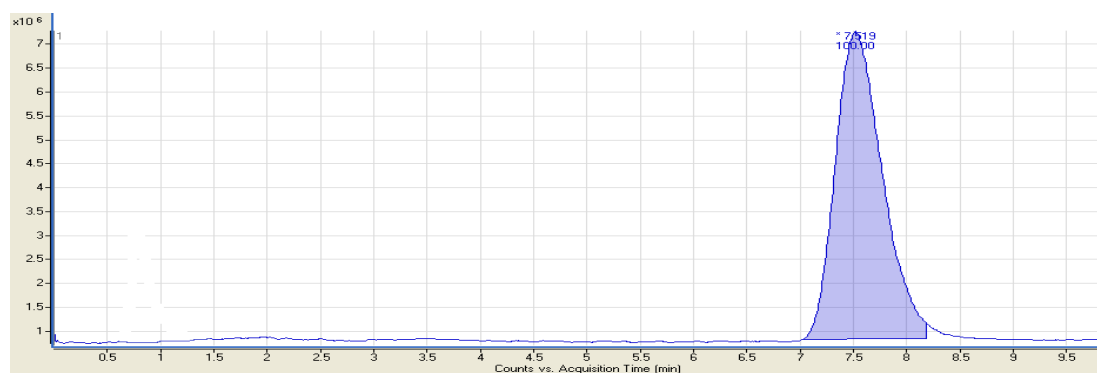
a)

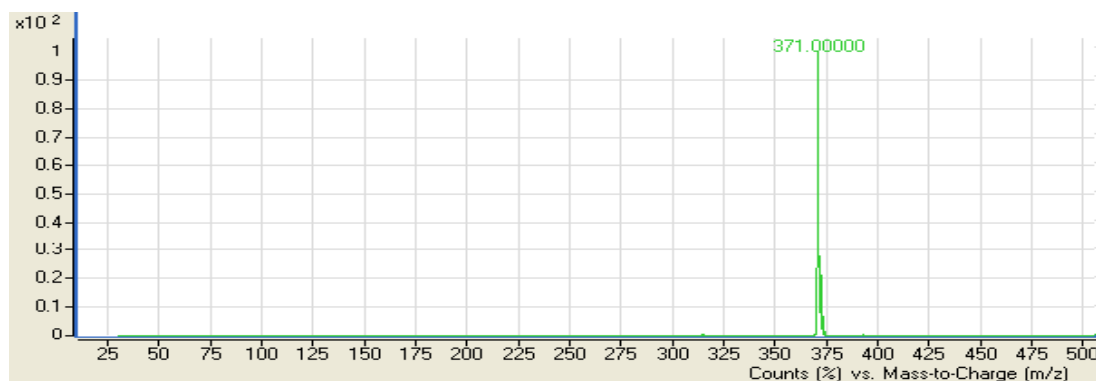


b)



c)



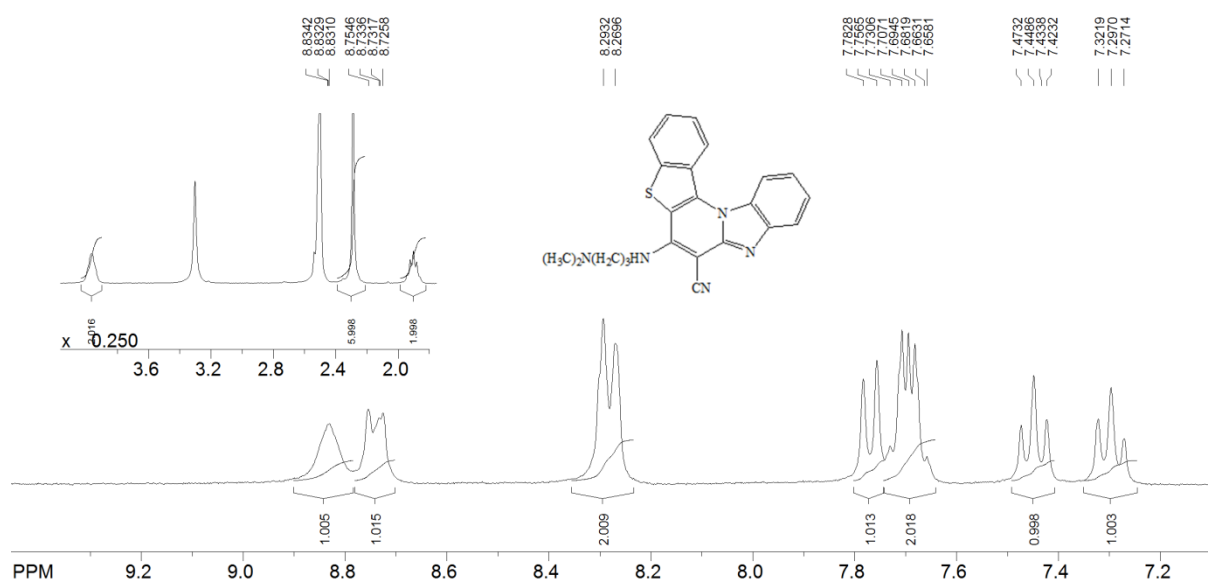


Slika 29. a) ^1H NMR spektar; b) ^{13}C NMR spektar; c) kromatogram i MS spektar spoja **10**

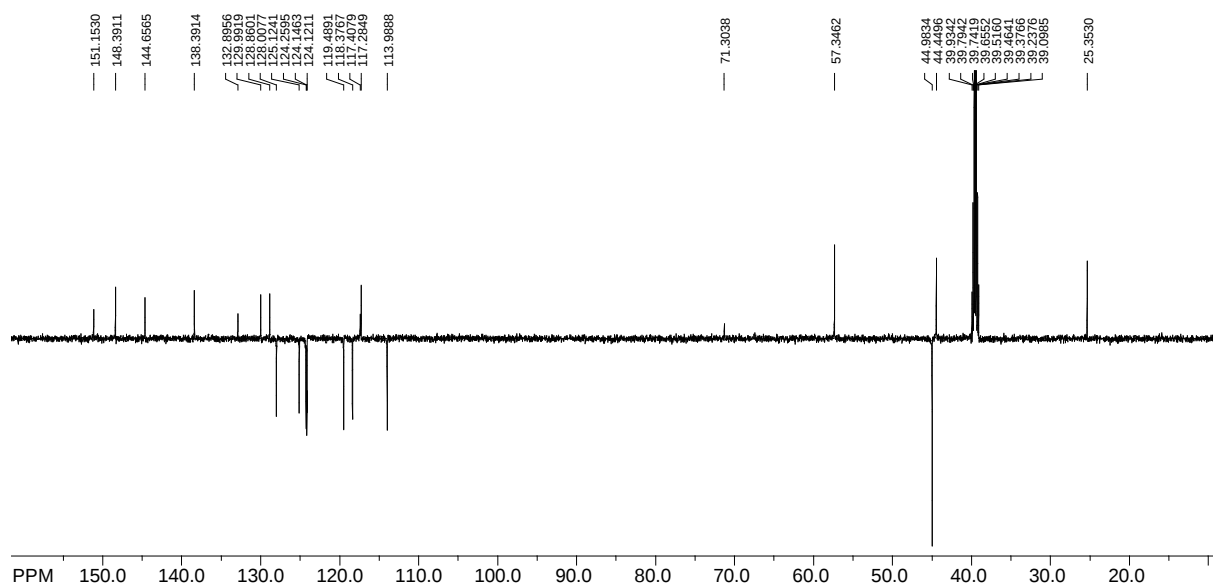
Na Slici 30. a, b prikazani su ^1H i ^{13}C NMR spektri spoja **11**. U ^1H NMR spektru spoja **11** (Slika 30. a) može se uočiti široki singletni signal koji odgovara dušikovom protonu aminske skupine na 8,83 ppm, odgovarajući broj signala aromatskih protona u području 8,74 – 7,30 ppm, te signali alifatskih protona u području 3,97 – 1,86 ppm. Pomaci signala aromatskih protona pomaknuti su u niže magnetsko polje u odnosu na aromatske protone spoja **7**.

U ^{13}C NMR spektru spoja **11** na Slici 30. b može se vidjeti odgovarajući broj signala koji odgovaraju kvaternim ugljikovim atomima i odgovarajući broj signala koji odgovaraju CH skupinama. U alifatskom dijelu vidljiva su tri signala na 57,35 ppm, 44,45 ppm i 25,35 ppm koji odgovaraju CH_2 skupinama te na 44,98 ppm koji odgovara ugljikovim atomima metilnih skupina spoja **11**.

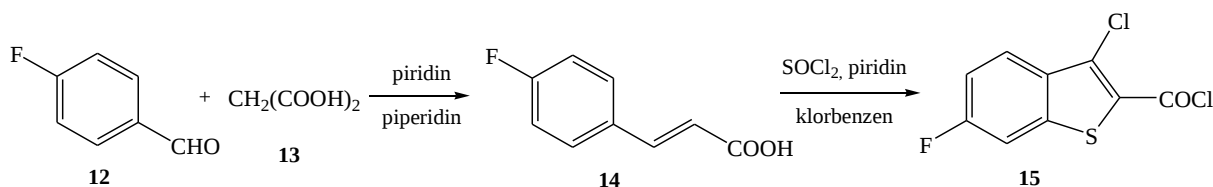
a)



b)

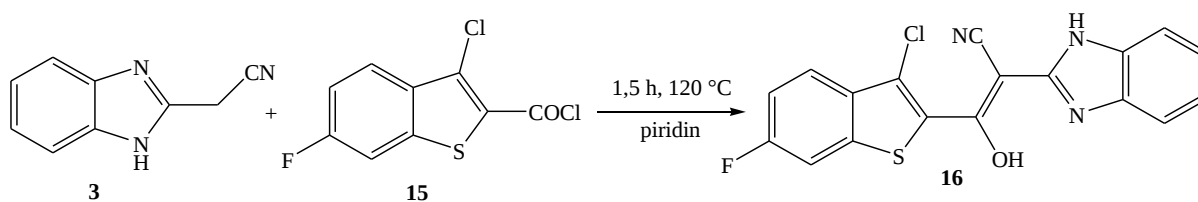
Slika 30. a) ^1H NMR spektar; b) ^{13}C NMR spektar spoja 11

Za pripremu 2-(2-benzimidazolil)-3-hidroksi-3-(6-fluor-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-il)akrilonitrila **16** kao prekursora u sintezi cikličkih derivata benzimidazola potrebno je prirediti 6-fluor-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karbonil-klorid **15** iz 4-fluorcimetne kiseline **14**, prema Shemi 17³²:

Shema 17. Sintaza 6-fluor-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karbonil klorida **15**

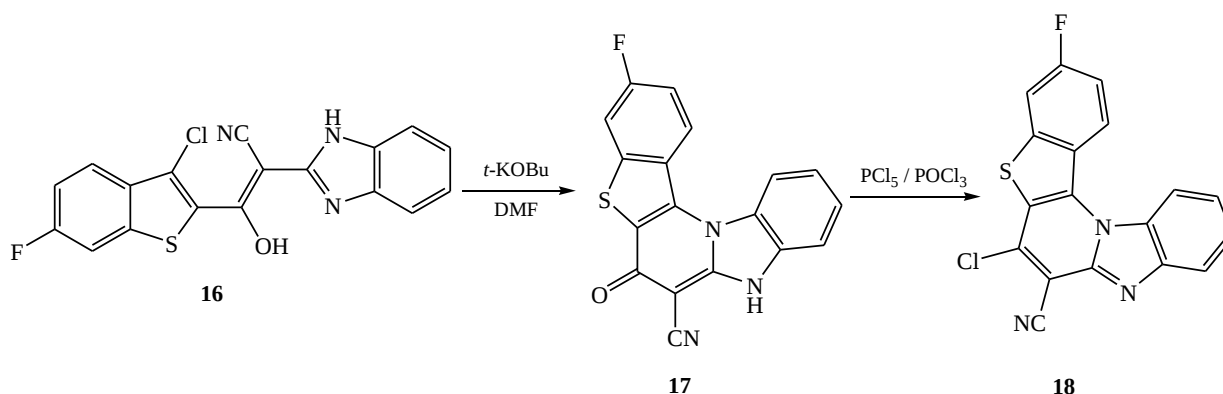
4-fluorcimetna kiselina **14** priređena je iz 4-fluorbenzaldehida **12**, malonske kiseline **13**, uz piridin i piperidin. Daljnjom ciklizacijom kiseline uz SOCl_2 , klorbenzen i piridin nastaje 6-fluor-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karbonil-klorid u niskom iskorištenju (14%).

2-(2-benzimidazolil)-3-hidroksi-3-(6-fluor-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-il)akrilonitril **16** priređen je kondenzacijom 2-cijanometilbenzimidazola **3** i 6-fluor-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karbonil klorida **4** uz zagrijavanje u piridinu u vrlo dobrom iskorištenju od 52%:



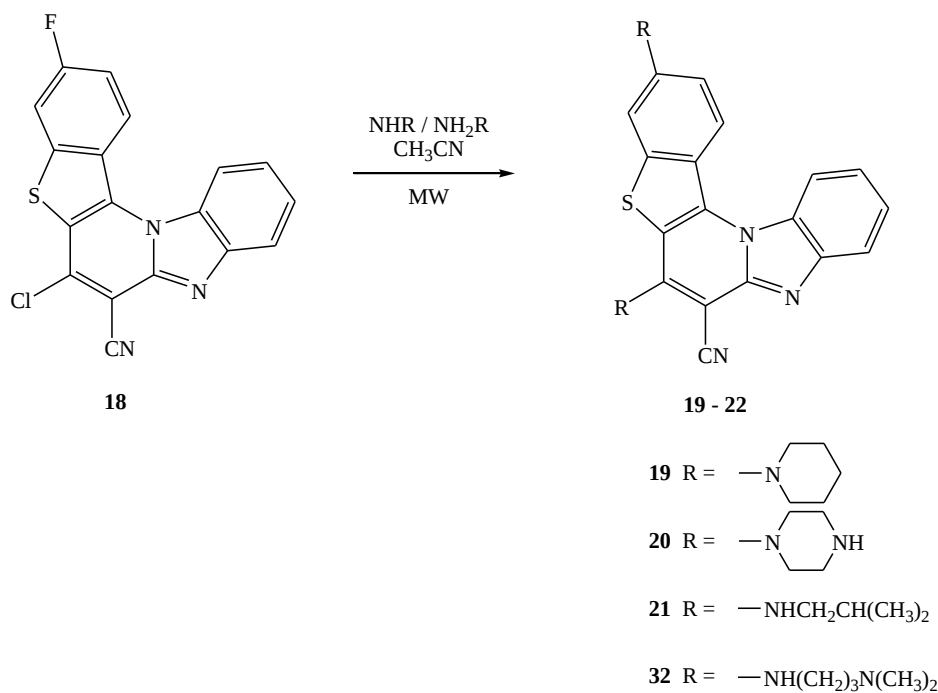
Shema 18. Sinteza *E*-2-(1H-benzo[*d*]imidazol-2-il)-3-(3-kloro-6-fluorobenzo[*b*]tiofen-2-il)-3-hidroksiakrilonitrila **16**

Termičkom ciklizacijom spoja **16** priređen je 7-cijano-3-fluor-6-oksobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **17** u 72%-tnom iskorištenju. Njegovim zagrijavanjem s POCl₃ i PCl₅ priređen je 7-cijano-3-fluor-6-klorbenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **18** prema Shemi 19, u vrlo dobrom iskorištenju (83%) kao glavni prekursor za sintezu 3,6-diamino supstituiranih derivata.



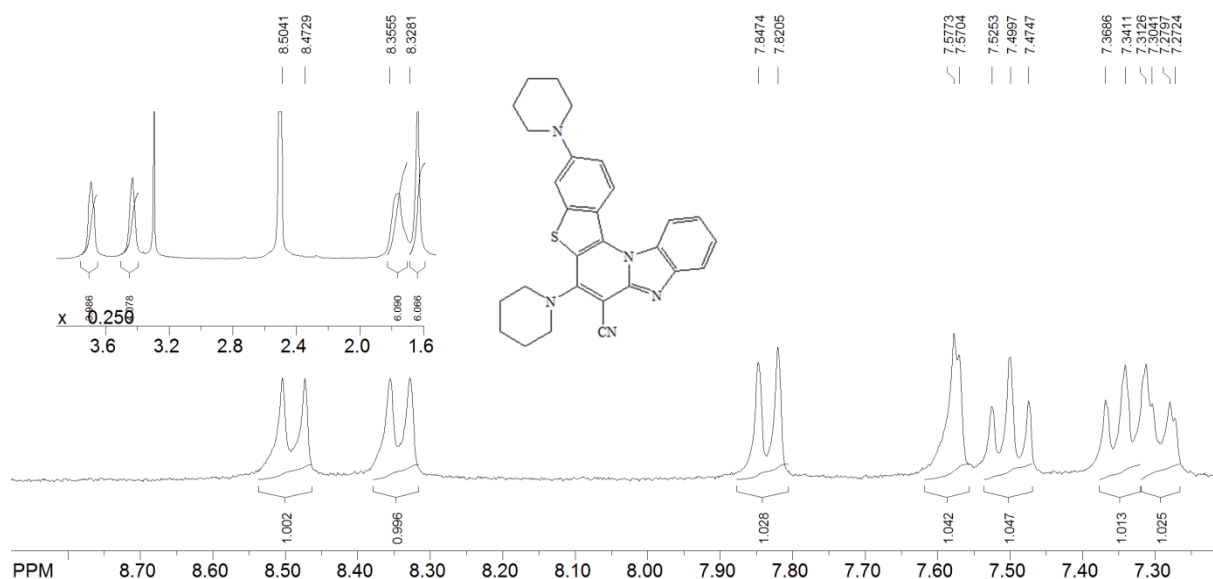
Shema 19. Sinteza spojeva **17** i **18**

Aminiranjem klor supstituiranog derivata potpomognutim mikrovalovima u acetonitrilu s odgovarajućim aminima, priređeni su 3,6-*N,N*-disupstituirani derivati 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **19–21**. 7-cijano-3,6-di[*N*-(*N,N*-dimetilaminopropil-1-amino)]benzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **22** nije dobiven. Čisti produkti **19** i **21** izolirani su kolonskom kromatografijom na SiO₂ kao adsorbensu i sustavu CH₂Cl₂/CH₃OH kao eluensu, **19** u vrlo dobrom iskorištenju (83%), a **21** u vrlo niskom iskorištenju (19%). Strukture dobivenih spojeva potvrđene su NMR spektroskopijom.



Shema 20. Sinteza 2,5-diamino supstituiranih derivata **19–22**

Na Slici 31 prikazan je ^1H NMR spektar spoja **19** na kojem se može uočiti odgovarajući broj signala aromatskih protona u području 8,49 – 7,29 ppm, te signali koji odgovaraju alifatskim protonima dviju piperidinskih skupina u području 3,43 – 1,64 ppm. Signali aromatskih protona pomaknuti su u niže magnetsko polje u odnosu na aromatske protone spoja **18**.

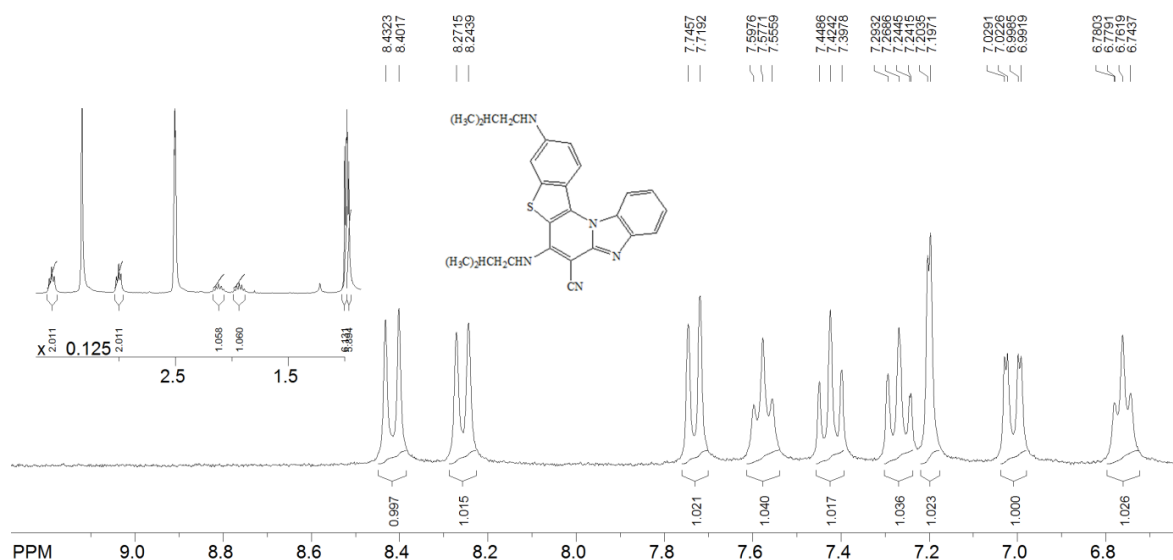


Slika 31. ^1H NMR spektar spoja **19**

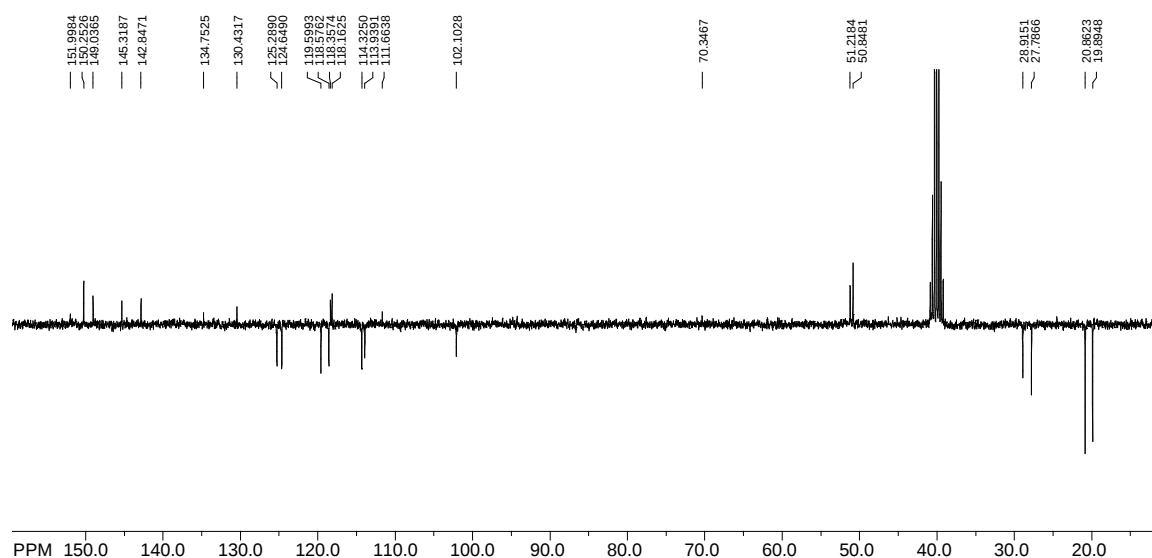
Na Slici 32. a prikazan je ^1H NMR spektar spoja **21** na kojem se može uočiti odgovarajući broj signala aromatskih protona u području 8,42 – 6,76 ppm, signali dušikovih protona aaminskih skupina na 7,58 ppm i 6,76 ppm, te signali alifatskih protona izobutilne skupine u području 3,60 – 0,97 ppm.

U ^{13}C NMR spektru spoja **21** na Slici 32. b može se vidjeti odgovarajući broj signala kvaternih ugljikovih atoma i odgovarajući broj signala koji odgovaraju CH skupinama. U alifatskom dijelu vidljiva su dva signala na 51,22 ppm i 50,65 ppm koji odgovaraju dvjema CH_2 skupinama, signali na 28,92 ppm i 27,79 ppm dviju CH skupina te na 20,68 ppm i 19,89 ppm koji odgovaraju ugljikovim atomima metilnih skupina izobutilnog supstituenta spoja **21**. Na Slici 32. c prikazan je kromatogram i MS spektar spoja **21**.

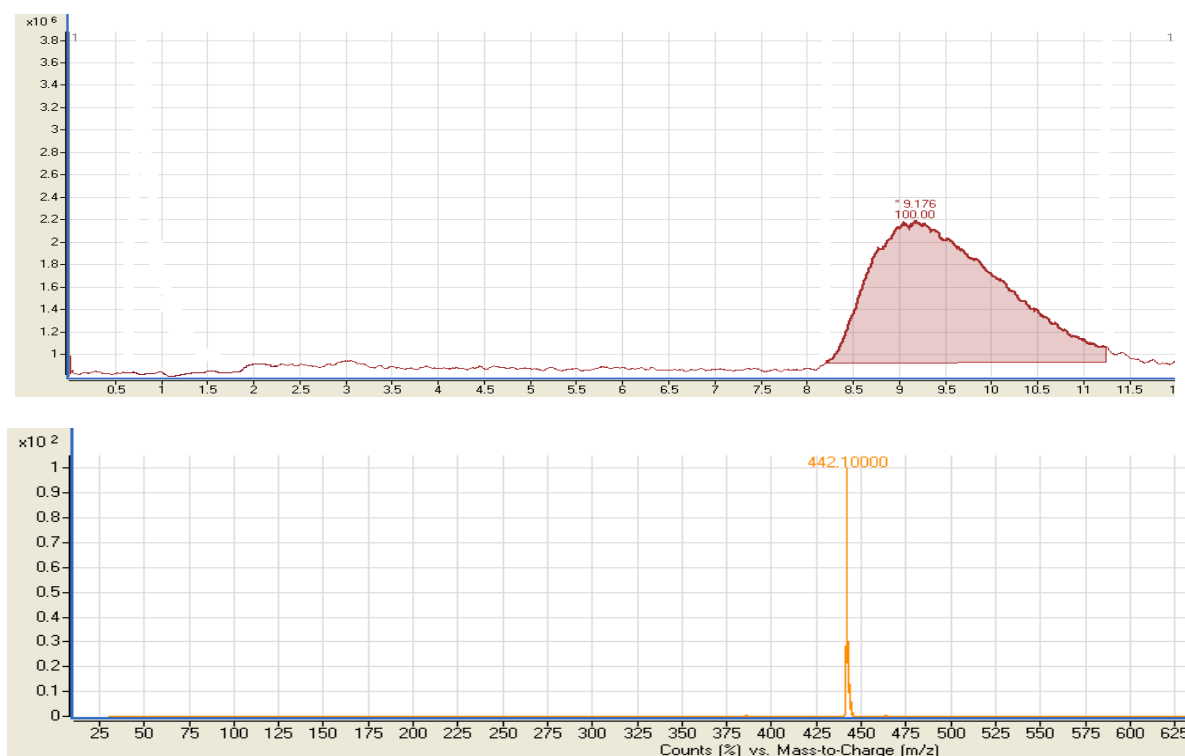
a)



b)

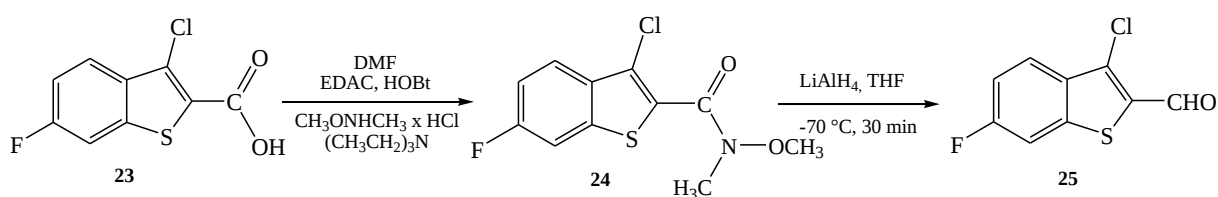


c)



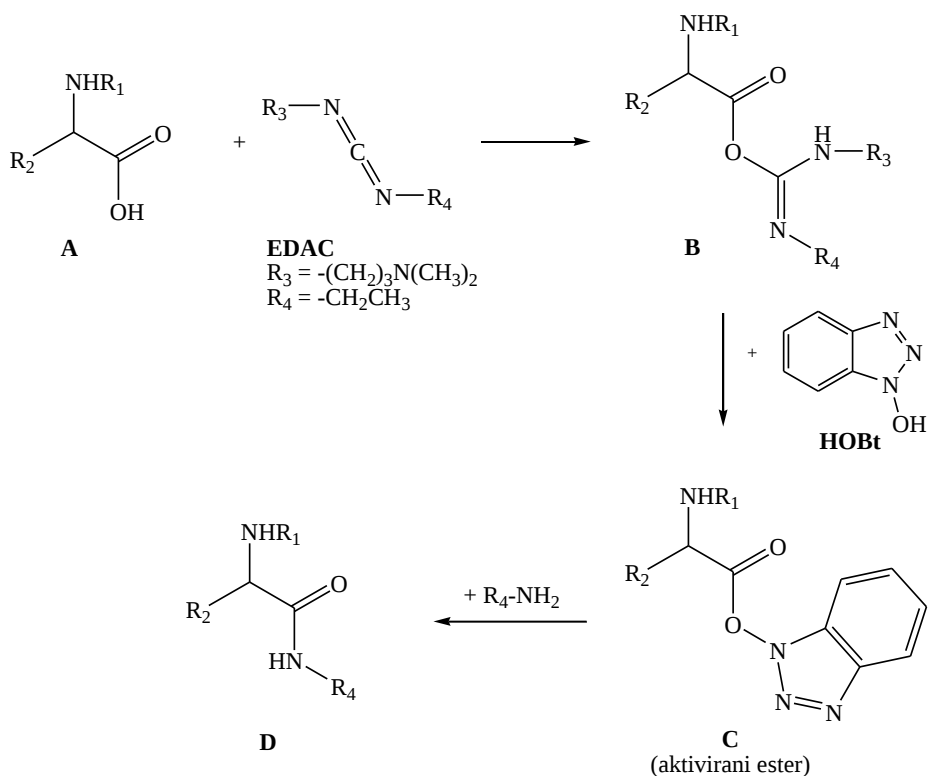
Slika 32. a) ^1H NMR spektar; b) ^{13}C NMR spektar; c) kromatogram i MS spektar spoja 21

Za sintezu 3-amino supstituiranih pentacikličkih derivata benzimidazola i njihovih prekursora potrebno je prirediti 6-fluor-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karbaldehid **25** iz odgovarajuće karboksilne kiseline, 6-fluor-3-klor-benzo[*b*]tiofen-2-karboksilne kiseline **23** prema shemi³³:



Shema 21. Sinteza aldehyda **25**

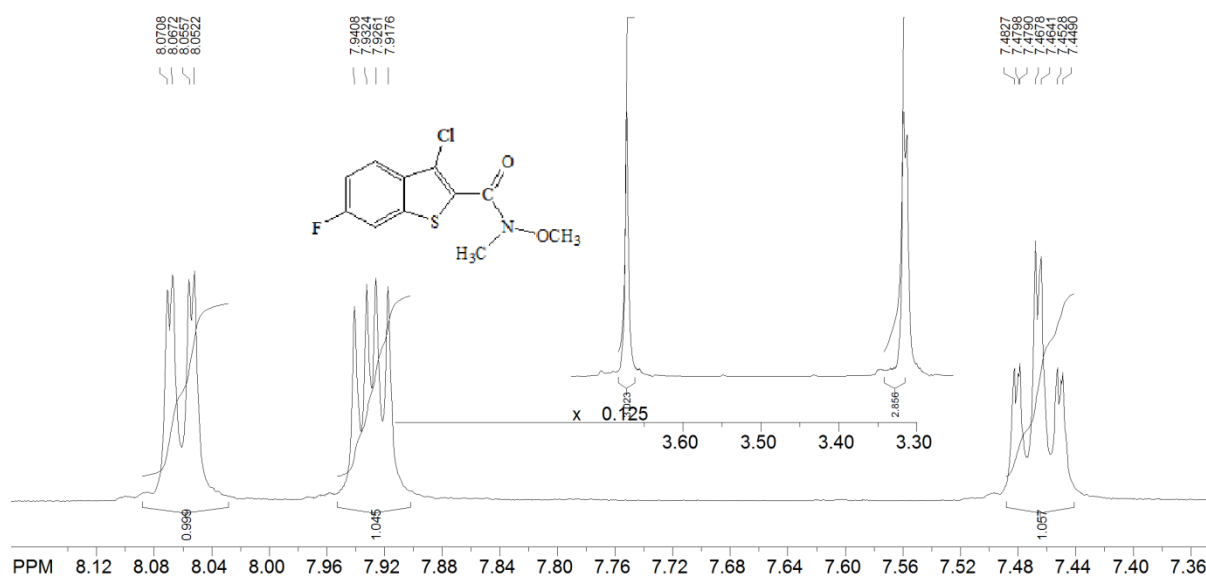
U prvom koraku, iz kiseline **23** u reakciji s EDAC, HOBt, (*N,O*)-dimetilhidroksilamin-hidrokloridom i trietilaminom u suhom DMF-u nastaje međuprodukt *N*-metil-*N*-metoksi-6-fluor-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karboksamid **24**, koji se dalje reducira s LiAlH_4 u THF-u pri temperaturi -70°C do aldehyda **25**. Na Shemi 22 prikazan je mehanizam priprave amida **24** korištenjem HOBt-a i EDAC-a.



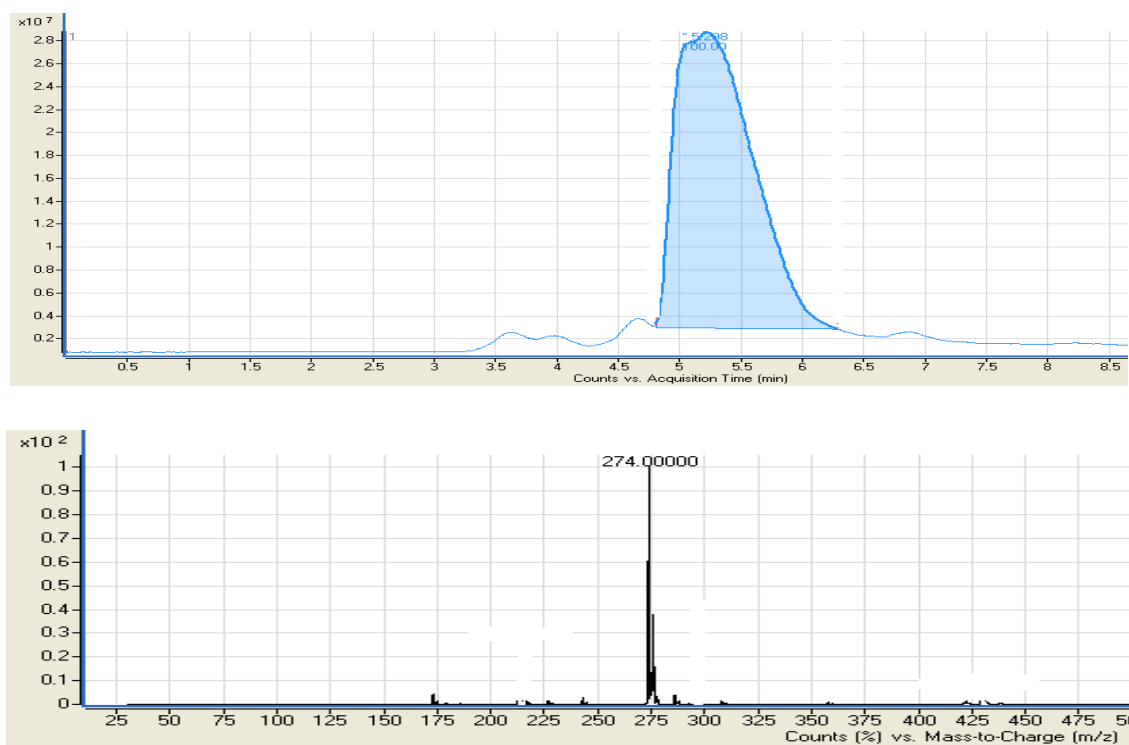
Shema 22. Mehanizam sinteze amida iz karboksilne kiseline preko intermedijara aktiviranog estera koji nastaje aktiviranjem s EDAC-om i HOBt-om

Strukture dobivenih spojeva **24** i **25** potvrđene su ^1H NMR i masenom spektroskopijom, a dobiveni spektri prikazani su na Slikama 33 i 34.

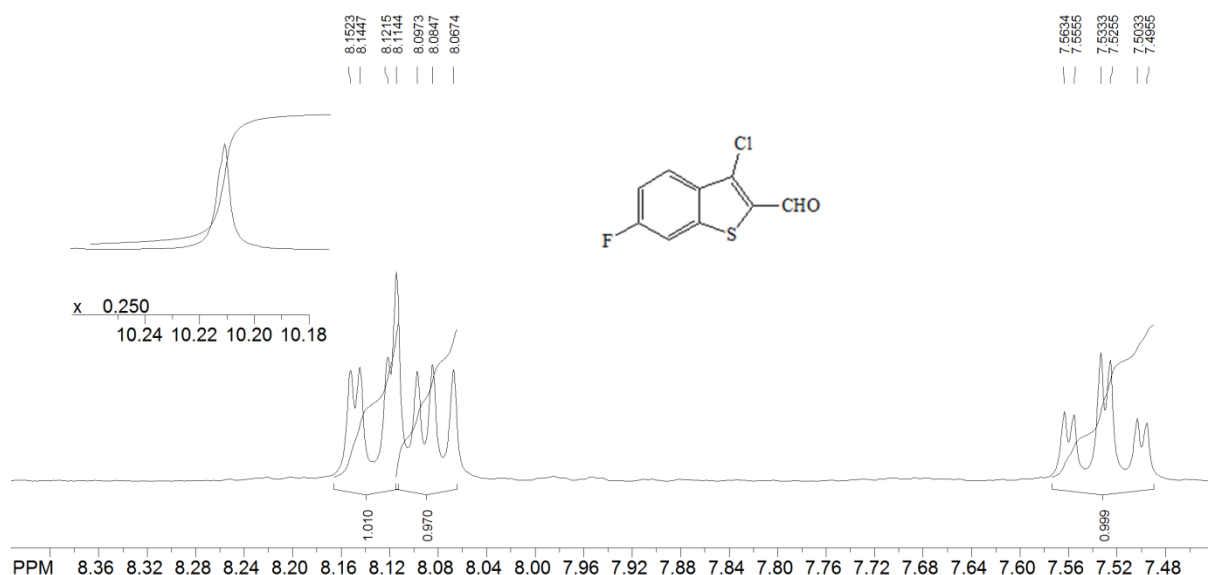
U ^1H NMR spektru spoja **24** na Slici 33. a mogu se uočiti tri signala koji odgovaraju aromatskim protonima u području 8,06 – 7,47 ppm, te po jedan singlet na 3,67 ppm i 3,32 ppm koji odgovaraju trima protonima metilne i metoksi skupine. Na Slici 33. b prikazan je MS spektar i kromatogram spoja **24** u kojemu se može uočiti odgovarajući molekulski pik.

a) ^1H NMR spektar spoja 24

b) kromatogram i MS spektar spoja 24

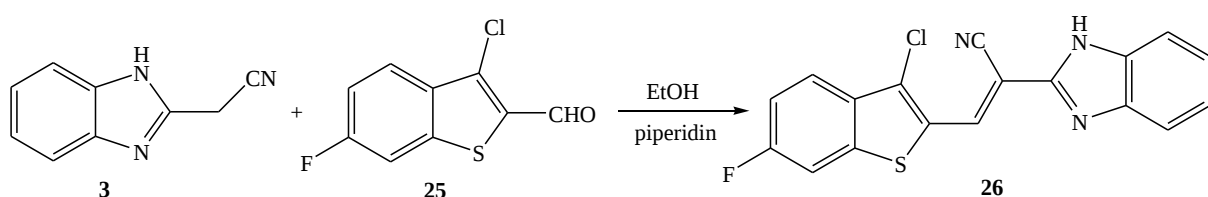
Slika 33. a) ^1H NMR spektar spoja 24; b) kromatogram i MS spektar spoja 24

Slici 34 u ^1H NMR spektru aldehida **25** vidljiv je signal na 10,21 ppm koji odgovara protonu karbonilne, CHO skupine, te odgovarajući signali triju aromatskih protona između 8,13 – 7,53 ppm.



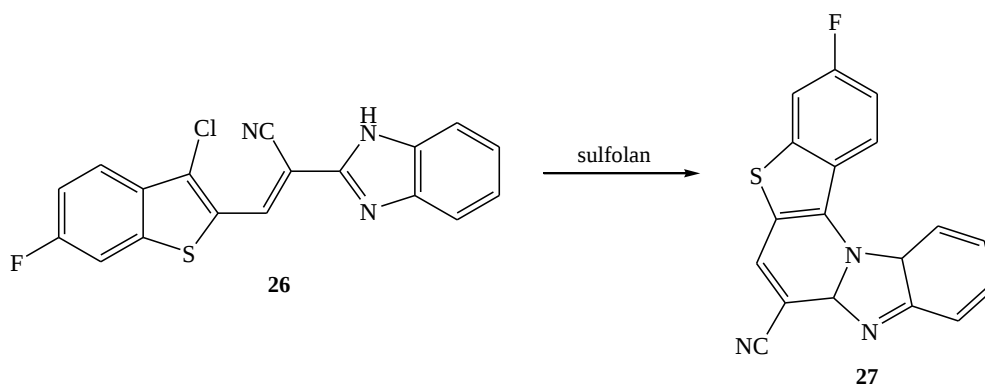
Slika 34. ^1H NMR spektar spoja **25**

2-(2-benzimidazolil)-3-(6-fluor-3-klorbenzo[b]tiofen-2-il)akrilonitril **26** pripremljen je kondenzacijom 2-cijanometilbenzimidazola **3** i 6-fluor-3-klorbenzo[b]tiofen-2-karbaldehida **25** uz zagrijavanje u etanolu uz dodatak piridina:



Shema 23. Sintaza acikličkog derivata **26**

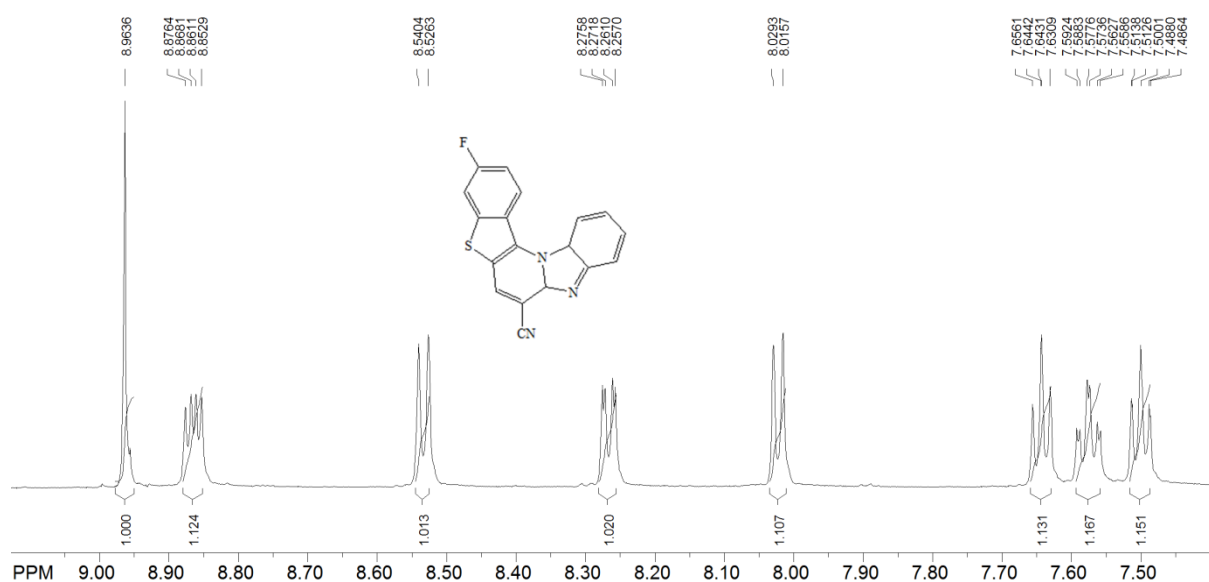
Glavni prekursor za pripravu ciljanih 2-supstituiranih derivata **28–31**, 7-cijano-3-fluorbenzo[b]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **27** priređen je zagrijavanjem acikličkog spoja **26** u sulfolanu prema Shemi 23, a nakon prekrystalizacije iz etanola, dobiven je u iskorištenju od 63%.



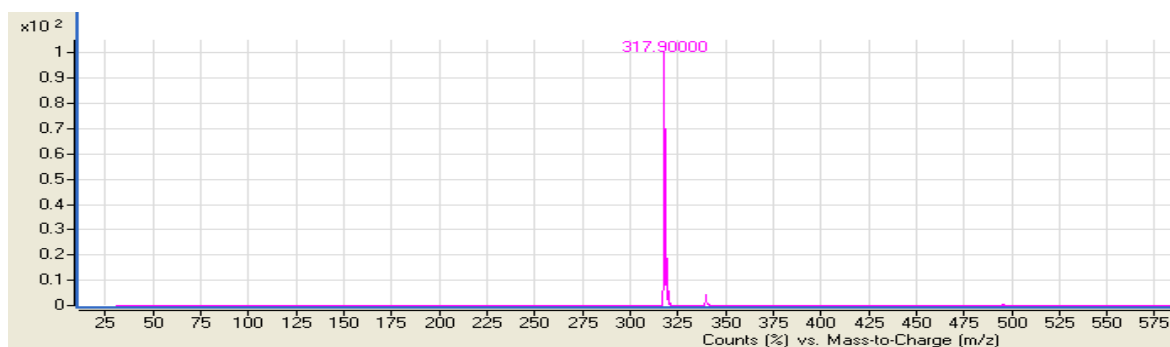
Shema 24. Sinteza 1-cijano-2-klor-5-fluorbenzotieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **27**

Struktura cikličkog derivata **27** potvrđena je NMR i masenom spektroskopijom, a dobiveni spektri prikazani su na Slici 35. a-b. U ^1H NMR spektru vidljiv je odgovarajući broj signala koji odgovaraju aromatskim protonima u području 8,96 – 7,50 ppm.

a)

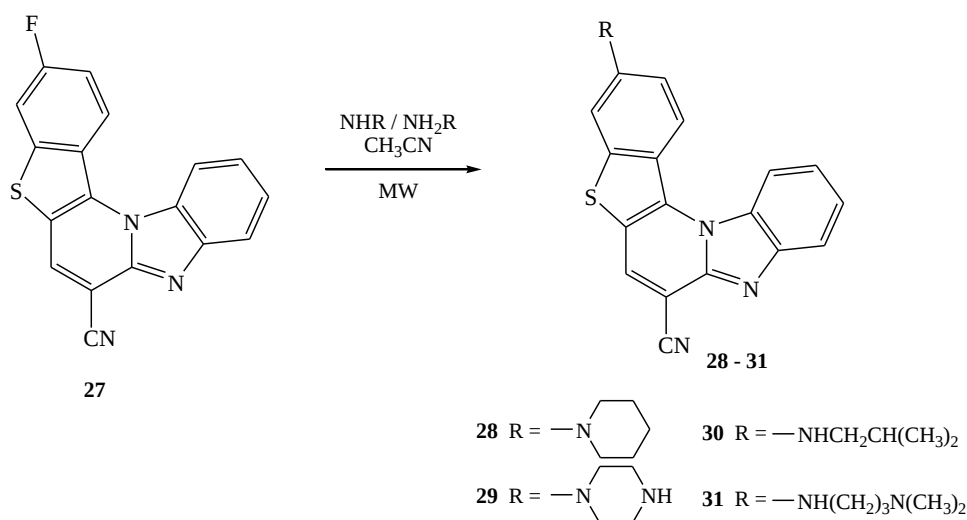


b)



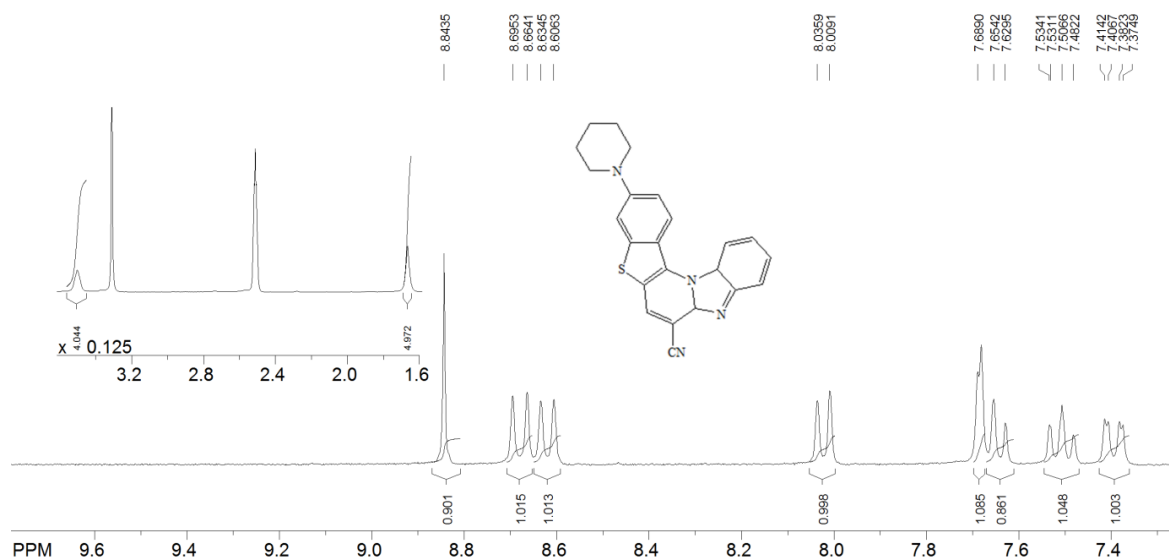
Slika 35. a) ^1H NMR spektar; b) MS spektar spoja **27**

Aminacijom cikličkog derivata potpomognutom mikrovalovima u acetonitrilu s odgovarajućim aminima, priređeni su 2-*N*-disupstituirani derivati 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **28–31**, prema Shemi 24. Čisti produkti **28**, **30** i **31** izolirani su kolonskom kromatografijom na SiO₂ kao adsorbensu i sustavu CH₂Cl₂/CH₃OH kao eluensu, u iskorištenjima od 45%, 27% i 22%. Strukture dobivenih spojeva potvrđene su NMR spektroskopijom.



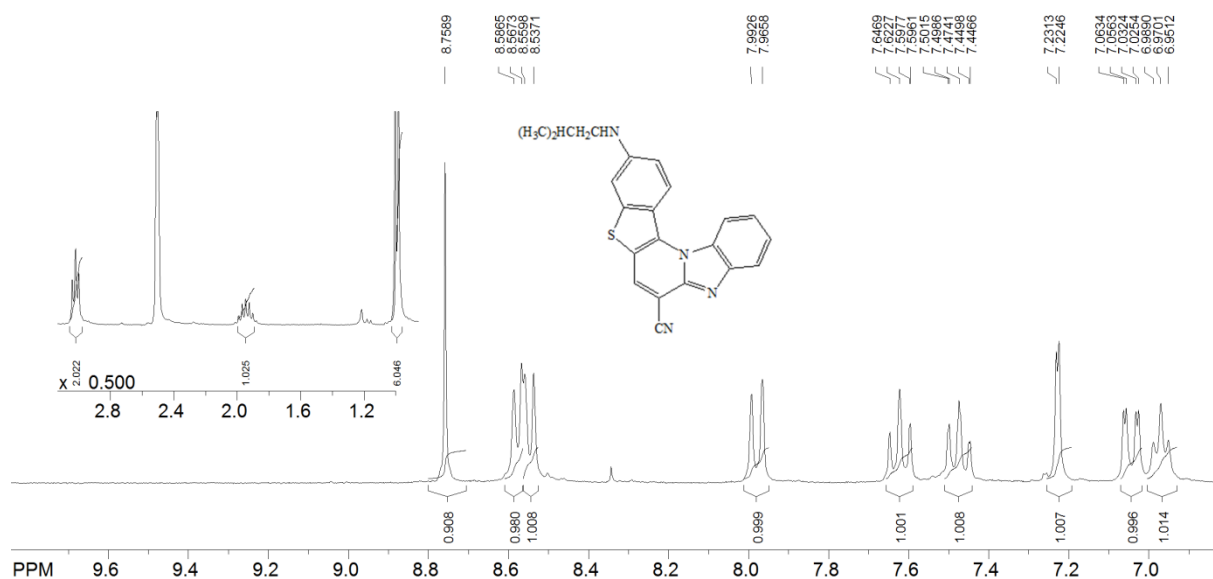
Shema 25. Sinteza 2-amino supstituiranih derivata **28–31**

Na Slici 36 prikazan je ¹H NMR spektar spoja **28** na kojem se može uočiti odgovarajući broj signala aromatskih protona u području 8,84 – 7,39 ppm, te signali alifatskih protona piperidinske skupine u području 3,50 – 1,66 ppm. Signali aromatskih protona pomaknuti su u niže magnetsko polje u odnosu na aromatske protone spoja **27**.



Slika 36. ¹H NMR spektar spoja **28**

Na Slici 37 prikazan je ^1H NMR spektar 7-cijano-3-*N*-izobutilaminobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **30**. Može se uočiti odgovarajući broj signala koji odgovaraju aromatskim protonima molekule u području 8,76 – 7,04 ppm i triplet na 6,97 ppm koji odgovara dušikovom protonu aminske skupine. U alifatskom dijelu vidljivi su signali tripleta na 3,02 ppm koji odgovaraju protonima CH_2 skupine izobutilnog supstituenta, multiplet na 1,95 ppm koji odgovara protonu CH skupine, te dublet na 0,99 ppm koji odgovara šest protona dviju metilnih CH_3 skupina.



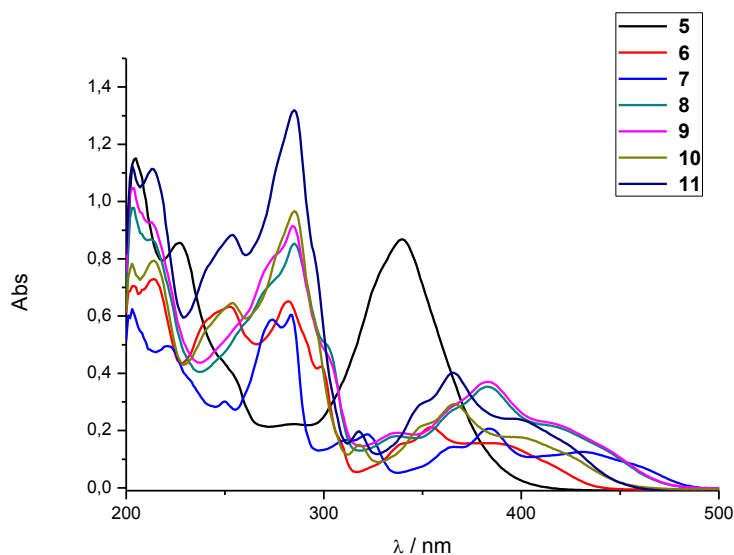
Slika 37. ^1H NMR spektar spoja **30**

3.3. Spektroskopska karakterizacija priređenih spojeva

Svim priređenim amino i diamino supstituiranim derivatima benzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **8–11**, **19–21** i **28–31** ispitane su spektroskopske karakteristike korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije. Matične otopine spojeva priređene su u metanolu u području koncentracija $5 \times 10^{-8} - 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Apsorpcijske vrpce u području od 200 do 325 nm rezultat su elektronskih $\pi-\pi^*$ prijelaza, a apsorpcijske vrpce u području od 325 do 500 nm rezultat su elektronskih $n-\pi^*$ prijelaza.

3.3.1. UV/Vis spektroskopija

UV/Vis spektri svih okarakteriziranih spojeva snimani su pri istoj koncentraciji $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Na Slici 38 prikazani su usporedni apsorpcijski spektri 6-amino supstituiranih derivata 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **8–11** snimljeni u metanolu pri koncentraciji $2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

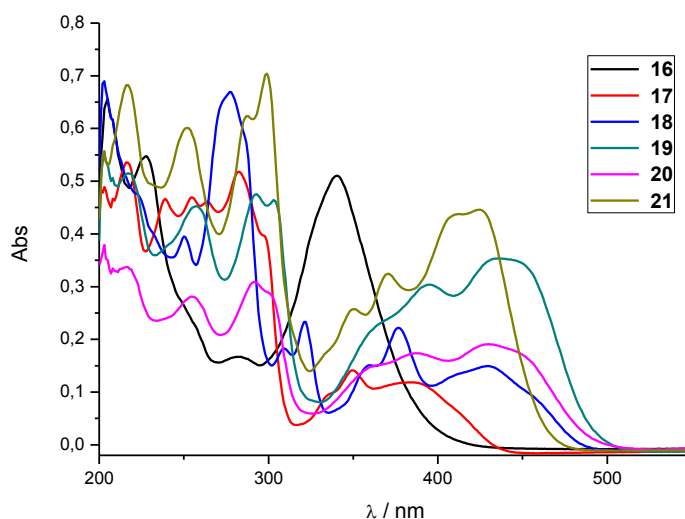


Slika 38. Apsorpcijski spektri spojeva **5–11** u metanolu

Usporedbom spektara spojeva **5–11** prikazanih na Slici 38 može se uočiti batokromni i hipokromni pomak masimuma apsorbancije spojeva **6–11** u području oko 350 nm u odnosu na maksimum apsorbancije početnog spoja **5**, a najizraženiji batokromni pomak maksimuma

apsorbancije je kod klor-supstituiranog spoja **7**. U području nižih valnih duljina 200 – 300 nm, spojevi **6–11** pokazuju hiperkromni pomak intenziteta apsorbcije u odnosu na početni aciklički spoj **5**, a najizraženiji hiperkromni pomak pokazuje 7-cijano-6-*N*-(*N,N*-dimetilaminopropil-1-amino)benzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **11** u skoro cijelom valnom području. 6-Amino supstituirani derivati 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **8–11** u cijelom području valnih duljina pokazuju hiperkromne pomake u odnosu na prekursore **5**, **6** i **7**.

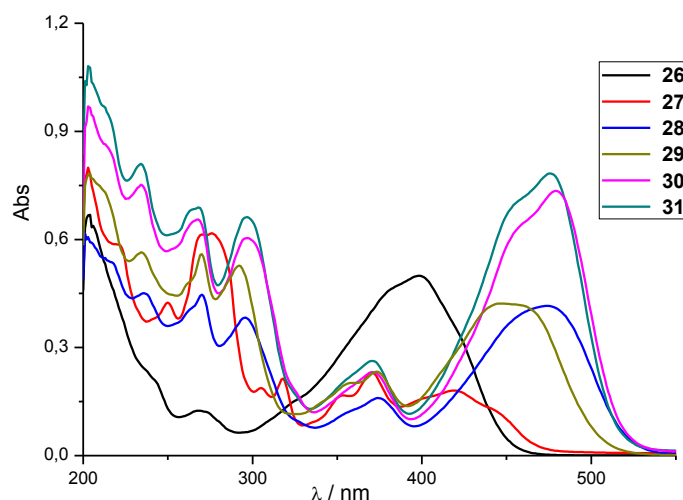
Na Slici 39 prikazani su usporedni spektri 3,6-diamino supstituiranih derivata 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **19–21** i njihovih prekursora **16–18**, snimljenih u metanolu pri koncentraciji 2×10^{-5} mol dm⁻³.



Slika 39. Apsorpcijski spektri spojeva **16–21** u metanolu

Spojevi **17** i **18**, te 3,6-diamino supstituirani derivati 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **19–21** pokazuju batokromni i hipokromni pomak maksimuma apsorbcije u odnosu na početni spoj **16** iznad 350 nm. Spoj **17** (keto-fluor-supstituirani derivat) pokazuje najmanji batokromni pomak u odnosu na ostale spojeve, a najizraženiji batokromni pomak prisutan je kod spoja s *N*-piperidinskim supstituentima **19** na 437 nm. Spoj s *N*-piperazinskim supstituentima ima također izražen batokromni pomak u odnosu na **16**, ali i hipokromni pomak u odnosu na **19** u području iznad 350 nm. U području nižih valnih duljina svi derivati 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola pokazuju hiperkromni pomak intenziteta apsorbcije u odnosu na početni **16**. Spoj **21** u cijelom području valnih duljina pokazuje hiperkromni pomak intenziteta apsorbcije u odnosu na ostale spojeve.

Usporedni spektri spojeva **26**, **27** te 3-amino supstituiranih derivata 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **28–31** snimljenih pri koncentracijama 2×10^{-5} mol dm⁻³ u metanolu prikazani su na Slici 40.

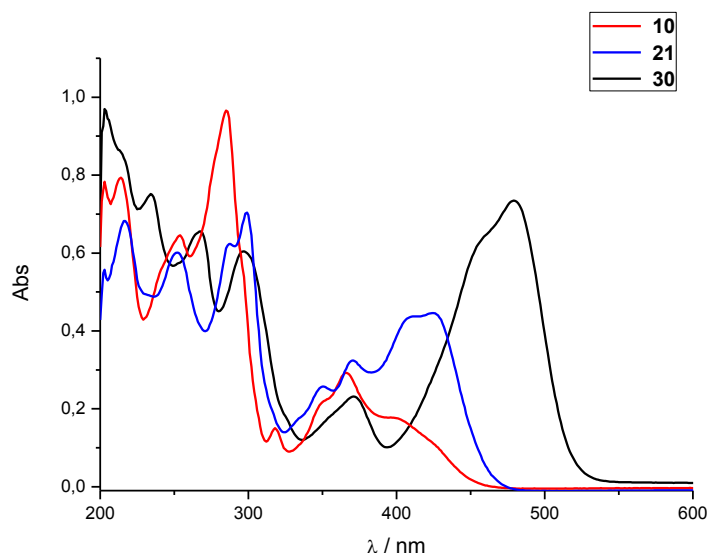


Slika 40. Apsorpcijski spektri spojeva **26–31** u metanolu

Spojevi **27–31**, čiji su spektri prikazani na Slici 40 pokazuju batokromne pomake maksimuma apsorpcije u odnosu na početni **26** u području viših valnih duljina. *N*-izobutilamino i *N,N*-dimetilaminopropil-1-amino supstituirani spojevi **30** i **31** pokazuju izraženi batokromni i hiperkromni pomak intenziteta apsorpcije u odnosu na ostale derivate, s maksimumima na 479 i 475 nm. U području nižih valnih duljina između 200 i 300 nm ciklički keto-derivat **27** pokazuje hiperkromni pomak intenziteta apsorpcije u odnosu na početni **26**. Spoj **28** pokazuje hipokromni pomak u području ispod 400 nm odnosu na ostale 3-amino supstituirane derivate 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **29–31**, dok **31** u cijelom području valnih duljina pokazuje hiperkromni pomak intenziteta apsorpcije u odnosu na ostale 3-amino supstituirane derivate.

Na Slici 41 prikazani su usporedni spektri spojeva s *N*-izobutilamino supstituentom **10**, **21** i **30** pri koncentraciji $c = 2 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³ u metanolu. Iz apsorpcijskih spektara može se uočiti da 3-supstituirani derivat 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **30** pokazuje izraženi batokromni i hiperkromni pomak maksimuma apsorpcije na 480 nm u odnosu na 3,6-diamino i 6-amino supstituirane derivate **10** i **21**, te hiperkromni pomak u području ispod 270 nm. Pri valnim duljinama u području 295 – 430 nm 3,6-diamino supstituirani derivat **21** pokazuje hiperkromni pomak intenziteta apsorpcije u odnosu na

ostala dva spoja. Spoj **10** u cijelom području valnih duljina pokazuje hipsokromni pomak maksimuma apsorbancije u odnosu na **21** i **30**, te izraženi hiperkromni pomak intenziteta apsorbancije na 285 nm.

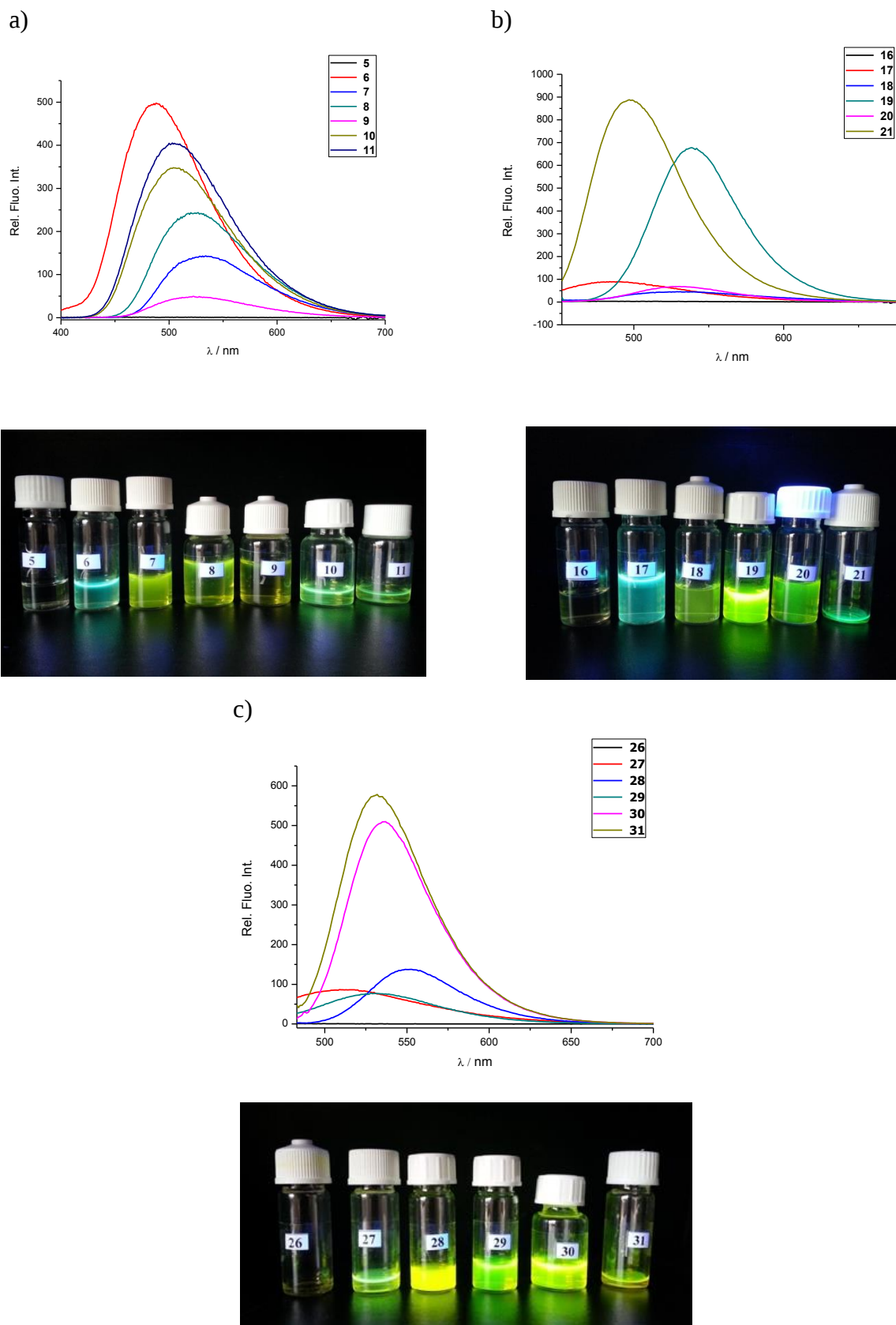


Slika 41. Apsorpcijski spektar *N*-izobutilamino supstituiranih derivata 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **10**, **21** i **30**

3.3.2. Fluorimetrijska spektroskopija

Fluorimetrijska spektroskopska ispitivanja, moguće je zbog visoke osjetljivosti metode provesti kod manjih koncentracija. Mjerenja su provedena pri koncentracijama spojeva $c = 5 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$, $1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ i $5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$. Otopine priređenih spojeva pobuđene su svjetlošću valne duljine ekscitacije koja odgovara valnoj duljini maksimuma apsorbancije.

Na Slici 42 prikazani su emisijski fluorimetrijski spektri 3-amino **5–11** (a), 3,6-diamino **16–21** (b) i 6-amino **26–31** (c) supstituiranih derivata 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola.



Slika 42. Emisijski spektri spojeva a) 5–11; b) 16–21; c) 26–31 snimani u metanolu

Na Slici 42. a-c vidljivo je kako aciklički derivati **5**, **16** i **26** ne pokazuju fluorescenciju. Na Slici 42a na kojoj su prikazani 6-amino supstituirani derivati i njihovi keto i klor supstituirani prekursori, najizraženiji intenzitet fluorescencije prisutan je kod 7-cijano-6-oksobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **6** s maksimumom emisije na 488 nm, dok spoj **7** pokazuje znatno niži intenzitet fluorescencije u usporedbi sa spojem **6**. Spojevi **8-11** pokazuju hipokromne pomake intenziteta emisije i batokromne pomake maksimuma emisije u usporedbi sa spojem **6**, odnosno hiperkromne pomake u odnosu na spoj **7**, s iznimkom *N*-piperazinskog derivata, koji jedini pokazuje hipokromni pomak maksimuma intenziteta fluorescencije u odnosu na **7**.

Među priređenim 6-amino supstituiranim spojevima izraženi hiperkromni pomak intenziteta fluorescencije pokazuje *N,N*-dimetilaminopropil-1-amino supstituirani derivat **11** s maksimumom na 503 nm, te hipsokromni pomak maksimuma emisije u odnosu na ostale derivate **8-10**. Spoj **9** s *N*-piperazinskim supstituentom pokazuje najniži intenzitet fluorescencije u odnosu na ostale 6-amino derivate.

Na Slici 42b prikazani su usporedni fluorescencijski spektri spojeva **16**, **17** i **18** te 3,6-diamino supstituiranih derivata **19-21**. Spojevi **17** i **18** pokazuju znatno niži intenzitet fluorescencije od priređenih 3,6-diamino derivata s *N*-izobutilnim i *N*-piperazinskim supstituentima. Najveći intenzitet fluorescencije pokazuje 7-cijano-3,6-di(*N*-izobutilamino)benzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **21** s maksimumom emisije na 497 nm te hipsokromni pomak maksimuma emisije u usporedbi sa spojevima **19** i **20**. *N*-piperidinski derivat 7-cijano-benzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **19** pokazuje hipokromni pomak intenziteta fluorescencije u odnosu na **21**, a njegova dva maksimuma emisije nalaze se na 540 i 440 nm. I u ovom slučaju derivat s *N*-piperazinskim supstituentima **20** pokazuje hipokromni pomak intenziteta fluorescencije u odnosu na ostale 3,6-diamino supstituirane derivate.

Usporedbom emisijskih fluorescencijskih spektara spojeva **26-31** prikazani na Slici 42c vidljivo je kako najizraženiji intenzitet fluorescencije pokazuje 7-cijano-3-*N*-(*N,N*-dimetilaminopropil-1-amino)benzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **31** u odnosu na ostale spojeve s maksimumom fluorescencije na 532 nm. Ostali priređeni 3-amino supstituirani derivati **28-30**, pokazuju batokromni pomak maksimuma emisije i hipokromni pomak intenziteta fluorescencije u usporedbi s **31**. Ciklički prekursor 7-cijano-3-fluorbenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **27**, pokazuje hipsokromni pomak maksimuma emisije u odnosu na ostale spojeve, te hipokromni pomak intenziteta

fluorescencije u odnosu na spojeve **28**, **30** i **31**. Najniži intenzitet fluorescencije prisutan je kod spoja **29**, 7-cijano-3-*N*-(piperazin-1-il)benzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol, s maksimumom emisije na 530 nm.

U Tablicama 1., 2. i 3. prikazani su rezultati i karakteristike dobivene UV/Vis i fluorimetrijskim spektroskopskim ispitivanjima spojeva **5–11**, **16–21** i **26–31**.

Tablica 1. UV/Vis i fluorimetrijski podaci ispitanih spojeva **5–11** u metanolu

Spoj	$\lambda_{\max}$ / nm	ε / dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹	λ_{emis} / nm	<i>I</i> (a.u.)
5	339 227	43300 42600	-	-
6	391 355 299 282 253	7750 10700 21300 32600 31450	487	496
7	434 385 365 322 284 274	6400 10250 7050 9550 30100 29200	533	142
8	383 337 285	17450 9250 42400	524	243
9	383 336 284	18600 9450 46000	521	50
10	401 367 319 285 253	8800 14500 7200 48100 32100	505	347
11	400 365 318 285 253	11950 20000 9700 65700 44000	503	405

Tablica 2. UV/Vis i fluorimetrijski podaci ispitanih spojeva **16–21** u metanolu

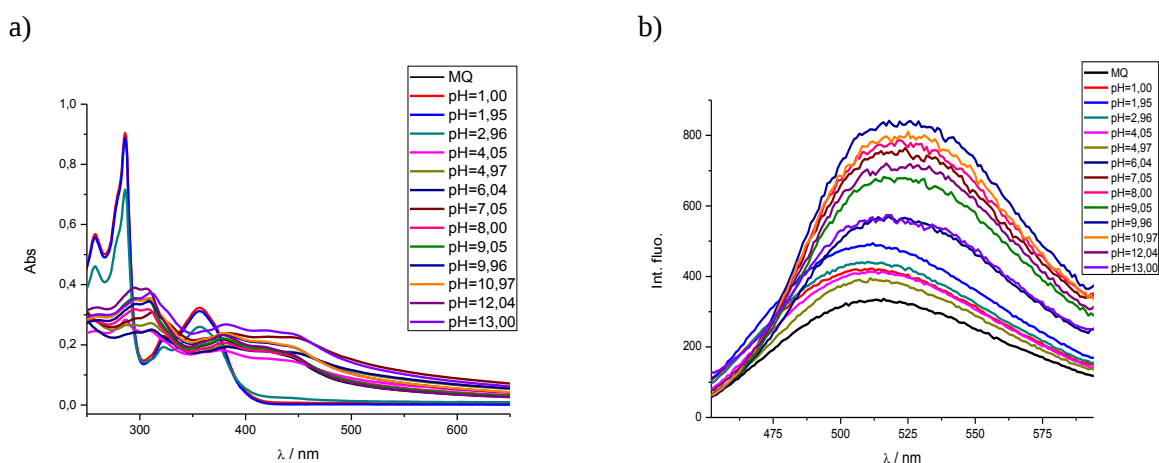
Spoj	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$	$\varepsilon / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{emis}} / \text{nm}$	<i>I</i> (a.u.)
16	340 282 228	25550 8350 27350	-	-
17	384 349 282 264 255 239	5850 7100 25800 23000 23450 23300	482	87
18	431 377 359 321 309 278 251	7500 11150 7500 11550 9050 33350 19700	531	46
19	437 395 303 293 258	17600 15200 23150 23750 22600	538	676
20	431 387 301 292 255	9600 8800 14350 15500 14100	529	69
21	425 412 370 350 230 287 252	22200 21900 16350 12850 35200 31150 30000	498	885

Tablica 3. UV/Vis i fluorimetrijski podaci ispitanih spojeva **26–31** u metanolu

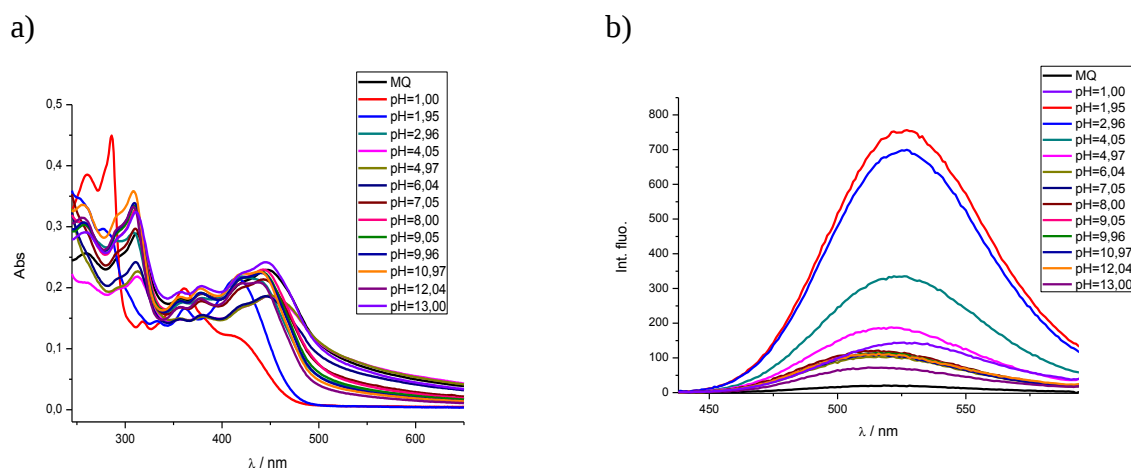
Spoj	$\lambda_{\max}$ / nm	ε / $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$	λ_{emis} / nm	I (a.u.)
26	399 269	24950 6350	-	-
27	420 371 352 319 276 250	9000 11450 8150 10650 30850 21050	510	87
28	474 374 295 270 236	20850 8000 19000 22300 22500	551	139
29	451 374 357 293 270 234	21050 11450 10250 26350 27800 28400	532	579
30	479 459 371 297 267 234	36600 32300 11450 30050 32700 37400	536	512
31	475 457 371 297 268 234	39250 35350 13300 33100 34350 40450	529	75

3.3.3. Utjecaj pH na spektroskopska svojstva spojeva 10, 21 i 30

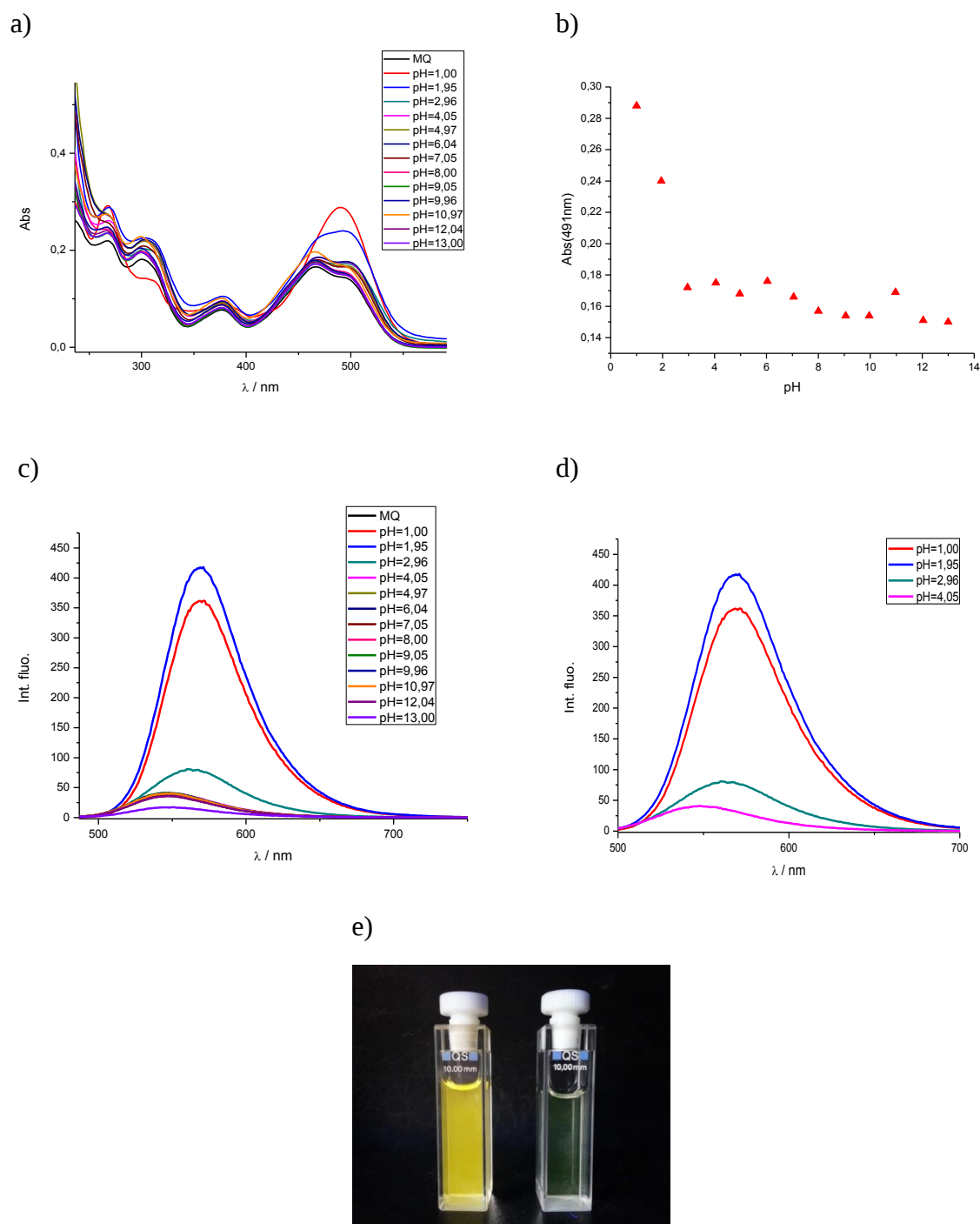
Kako bi se ispitala mogućnost primjene spojeva **10**, **21** i **30** kao optičkih pH senzora, ispitana je promjena njihovih spektroskopskih svojstava ovisno o vrijednosti pH otopine korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije. Snimljeni su apsorpcijski i emisijski spektri ispitivanih spojeva u otopinama univerzalnog pufera i metanola različitih vrijednosti pH. Kiselo bazna svojstva spojeva u otopinama univerzalnog pufera različitih vrijednosti pH prikazana su na Slikama 43, 44 i 45.



Slika 43. a) Apsorpcijski spektar spoja **10** u otopinama univezalnog pufera različitih vrijednosti pH; b) Emisijski spektar spoja **10** u otopinama univezalnog pufera različitih vrijednosti pH ($\lambda_{\text{exc.}}=310\text{nm}$).



Slika 44. a) Apsorpcijski spektar spoja **21** u otopinama univezalnog pufera različitih vrijednosti pH; b) Emisijski spektar spoja **21** u otopinama univezalnog pufera različitih vrijednosti pH ($\lambda_{\text{exc.}}=308\text{nm}$).



Slika 45. a) Apsorpcijski spekter spoja **30** u otopinama univezalnog pufera različitih vrijednosti pH; b) Ovisnost apsorbancije spoja **30** o vrijednosti pH na 419 nm; c) Emisijski spekter spoja **30** u otopinama univezalnog pufera različitih vrijednosti pH ($\lambda_{exc.}=467nm$); d) Emisijski spekter spoja **30** u otopinama univerzalnog pufera u rasponu pH vrijednosti od pH=1,00 do pH=4,05; e) Otopine spoja **30** u univerzalnom puferu pH vrijednosti pH=1,00 (lijevo) i pH=7,05 pod UV lampom.

Iz dobivenih rezultata može se uočiti promjena spektroskopskih svojstava ispitivanih spojeva kod različitih vrijednosti pH. Iz emisijskih spektara spojeva **30** i **21** vidljivo je da spojevi fluoresciraju u kiselom mediju, dok se porastom pH vrijednosti otopine, fluorescencija gasi. Kako bi se jasnije uočilo gašenje fluorescencije prilikom prijelaza spoja **30** iz protoniranog u deprotonirani oblik, na Slici 20.d prikazan je spektar u rasponu pH vrijednosti od pH=1,00 do pH=4,05. Da bi se potvrdila mogućnost primjene ispitivanih spojeva **10**, **21** i **30** kao optičkih pH senzora potrebno je provesti dodatna detaljnija eksperimentalna i teorijska ispitivanja.

4. EKSPERIMENTALNI DIO

4.1. Opće napomene

Tališta priređenih spojeva određena su na SMP11 Bibby i Buchi 535 aparatu te nisu korigirana.

^1H NMR spektri snimljeni su na spektrometrima Varian Gemini 300 na 300 MHz i instrumentu Bruker AV-600 na 600 MHz. Svi NMR spektri snimani su u $\text{DMSO-}d_6$ kao otapalu, koristeći tetrametilsilan kao interni standard. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm vrijednostima, a konstante sprege (J) u Hz.

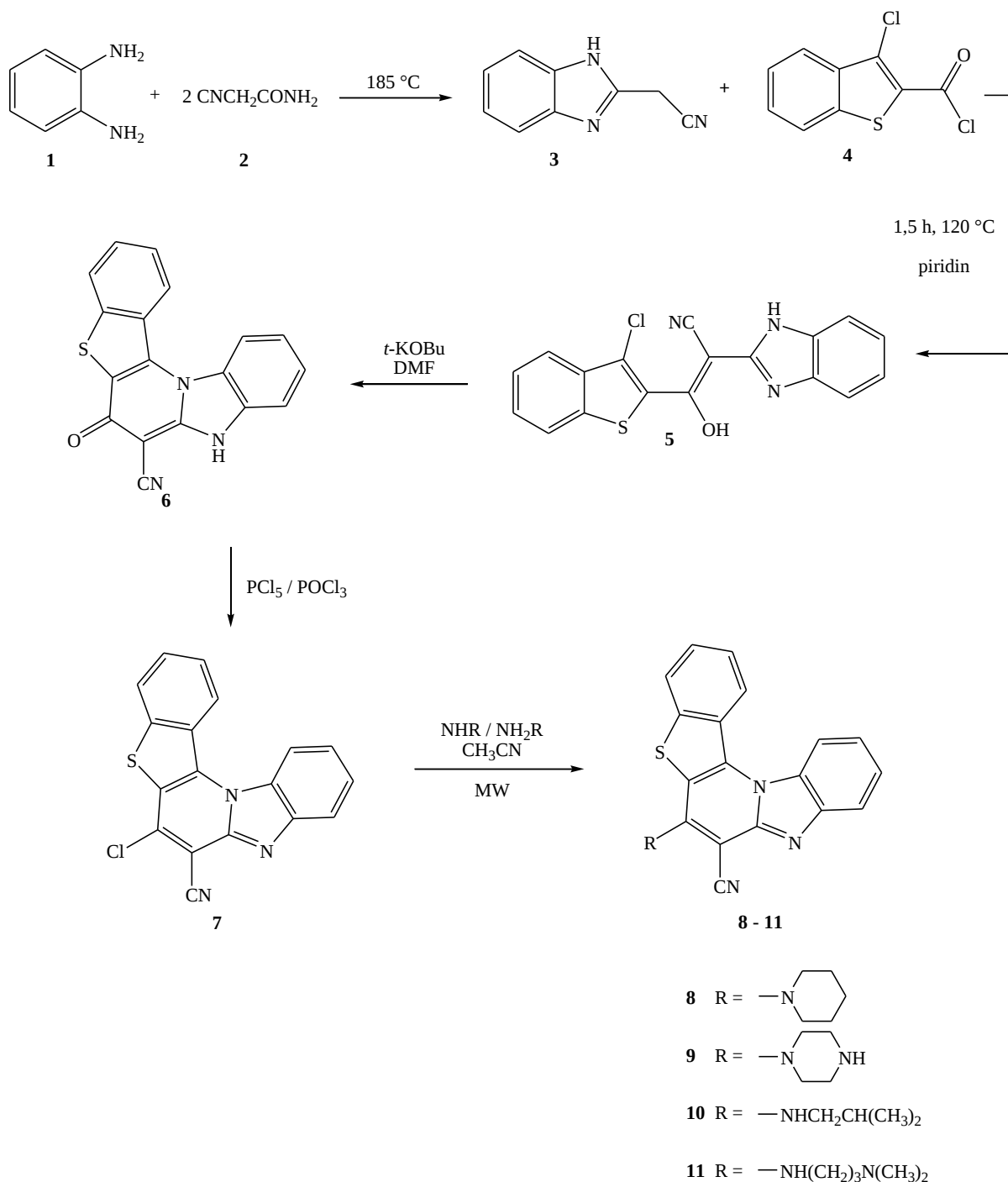
Maseni spektri snimljeni su na veznom sustavu HPLC-MS/MS, na instrumentu Agilent Technologies 1200 HPLC – 6410 QQQ masenom spektrometru.

UV spektri snimljeni su na spektrofotometru Varian Cary 50, a fluorescencijski spektri na Cary Eclipse spektrofotometru. U oba slučaja korištene su kvarcne kivete promjera 1 cm i volumena 3 cm^3 . Reakcije su provedene uobičajenim sintetskim metodama.

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

Reakcije potpomognute mikrovalnim zračenjem provedene su u Milestone Start S mikrovalnoj pećnici u kvarcnim posudama (40 bar).

4.2. Sinteza 6-amino supstituiranih derivata 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola



Shema 26. Sinteza 6-amino supstituiranih derivata 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola

4.2.1. Priprava 2-cijanometilbenzimidazola **3**

U okruglu tikvicu stavi se 5,000 g (46,0 mmol) *o*-fenilendiamina **1** i 7,740 g (92,0 mmol) 2-cijanoacetamida **2**, dobro promiješa, te pažljivo grije uz miješanje na 185 °C 15 minuta. U toplu reakcijsku smjesu dodaje se 25%-tna smjesa vode i etanola dok se sav produkt ne otopi. Otopina se prebaci u Erlenmayerovu tikvicu i prokuha kratko s malom količinom aktivnog ugljena te profiltrira. Hlađenjem nastali talog se profiltrira. Dobiveno je 4,550 g (63%) žuto-smeđeg kristaliničnog produkta.

4.2.2. Priprava 2-(2-benzimidazolil)-3-hidroksi-3-(3-klorbenzo[b]tiofen-2-il)akrilonitrila **5**

Reakcijska smjesa 1,000 g (4,32 mmol) 3-klorbenzo[b]tiofen-2-karbonil-klorida **4**, 8,00 ml piridina i 0,680 g (4,32 mmol) 2-cijanometilbenzimidazola **3** refluksira se 1,5 h pri 120 °C. Nakon hlađenja smjese na sobnu temperaturu, u reakcijsku smjesu se doda voda, a dobiveni talog se profiltrira i prekrizalizira iz 300 ml etanola. Dobiveno je 0,900 g (59%) svijetlosmeđeg praškastog produkta. T.t. > 300 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ/ppm = 13,23 (s, 2H, NH_{benz.}), 8,13 – 8,10 (m, 1H, H_{arom.}), 7,92 – 7,89 (m, 1H, H_{arom.}), 7,62 – 7,58 (m, 4H, H_{arom.}), 7,35 – 7,32 (dd, 2H, *J*₁ = 3,21 Hz, *J*₂ = 5,97 Hz, H_{arom.}); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ/ppm = 177,78 (s), 150,55 (s), 137,04 (s), 136,49 (s), 136,00 (s), 130,89 (s, 2C), 127,35 (d), 126,30 (d), 124,35 (d, 2C), 123,84 (d), 122,63 (d), 119,78 (s), 118,40 (s), 112,92 (d, 2C), 69,37 (s).

4.2.3. Priprava 7-cijano-6-oksobenzo[b]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **6**

Reakcijska smjesa 0,500 g (1,42 mmol) 2-(2-benzimidazolil)-3-hidroksi-3-(3-klorbenzo[b]tiofen-2-il)akrilonitrila **5**, 0,370 g (1,42 mmol) *t*-KOBu i 8,8 mL DMF refluksira se 1,5 h. Po završetku reakcije reakcijska smjesa se upari pod sniženim tlakom do suha, doda se voda i nastali talog se profiltrira. Talog se prekrizalizira iz 150 ml etanola. Dobiveno je 0,331 g žutog praškastog produkta (74%). T.t. > 300 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ/ppm = 8,69 (d, 1H, *J* = 7,62 Hz, H_{arom.}), 8,17 (d, 2H, *J* = 7,44 Hz, H_{arom.}), 7,62 (td, 1H, *J*₁ = 1,44 Hz, *J*₂ = 7,22 Hz, H_{arom.}), 7,58 – 7,53 (m, 2H, H_{arom.}),

7,28 (td, 1H, $J_1 = 0,90$ Hz, $J_2 = 8,03$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7,12 (td, 1H, $J_1 = 1,16$ Hz, $J_2 = 8,27$ Hz, $H_{\text{arom.}}$); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): $\delta/\text{ppm} = 180,84$ (s), 170,37 (s), 155,92 (s), 145,90 (s), 139,39 (s), 130,90 (s), 130,85 (s), 127,73 (d), 124,81 (d), 124,76 (d), 124,31 (d), 123,36 (d), 120,26 (s), 117,89 (d), 117,23 (d), 113,19 (d).

4.2.4. Priprava 7-cijano-6-klorbenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **7**

Reakcijska smjesa 0,550 g (1,74 mmol) 7-cijano-6-oksobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **6**, 0,206 mg PCl_5 i 13,8 mL POCl_3 reflektira se 1,5 h pri 110 °C. Po završetku reakcije smjesa se upari pod sniženi tlakom do suha, doda se mala količina vode te se nastali talog profiltrira. Dobiveno je 0,469 g (80%) žutog praškastog produkta. T.t. 251–256 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): $\delta/\text{ppm} = 8,89$ (d, 1H, $J = 7,89$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 8,61 (d, 1H, $J = 8,47$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 8,40 (d, 1H, $J = 8,28$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 8,05 (d, 1H, $J = 8,10$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7,84 – 7,75 (m, 2H, $H_{\text{arom.}}$), 7,68 (t, 1H, $J = 7,64$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7,55 (t, 1H, $J = 7,80$ Hz, $H_{\text{arom.}}$); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): $\delta/\text{ppm} = 174,13$ (s), 156,40 (s), 148,30 (s), 144,95 (s), 140,59 (s), 137,35 (s), 130,24 (s), 129,69 (d), 129,38 (s), 126,71 (d), 126,20 (d), 125,28 (d), 124,98 (d), 122,49 (d), 120,78 (d), 115,80 (d), 113,73 (s).

4.2.5. Opći postupak priprave spojeva **8–11**

Spojevi **8–11** priređeni su sintezom potpomognutom mikrovalovima korištenjem MW zračenja snage 800 W i temperature 170 °C, iz spoja **7** u 10 ml acetonitrila i uz suvišak odgovarajućeg amina. Reakcijska se smjesa nakon hlađenja profiltrira, ukoliko je potrebno prethodno se upari pod sniženim tlakom na manji volumen, a nastali produkt se pročisti kolonskom kromatografijom na silikagelu uz $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ kao eluens.

7-cijano-6-*N*-piperidinilbenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **8**

Spoj **8** priređen je prethodno opisanom metodom, iz spoja **7** (0,100 g, 0,30 mmol) i piperidina (0,150 ml, 1,50 mmol), nakon 3 h MW zračenja dobiveno je 0,085 g (64%) žutog praškastog produkta. T.t. 239–245 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ/ppm = 8,77 (dd, 1H, J_1 = 2,01 Hz, J_2 = 6,75 Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 8,40 (d, 1H, J = 8,28 Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 8,29 (dd, 1H, J_1 = 2,49 Hz, J_2 = 6,63 Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,88 (d, 1H, J = 7,83 Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,75 – 7,65 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,53 (t, 1H, J = 7,32 Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,40 (dt, 1H, J_1 = 0,97 Hz, J_2 = 7,74 Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 3,80 – 3,71 (m, 4H, CH_2), 1,85 – 1,72 (m, 6H, CH_2); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ/ppm = 154,48 (s), 150,08 (s), 145,07 (s), 139,78 (s), 134,54 (s), 130,54 (s), 129,33 (s), 128,56 (d), 125,56 (d), 125,34 (d), 124,62 (d), 124,34 (d), 122,34 (s), 120,83 (d), 119,63 (d), 116,74 (s), 114,97 (d), 84,97 (s), 52,86 (t), 26,71 (t, 2C), 23,88 (t).

7-cijano-6-*N*-(piperazin-1-il)benzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol 9

Spoj **9** priređen je prethodno opisanom metodom, iz spoja **7** (0,100 g, 0,30 mmol) i piperazina (0,130 g, 1,50 mmol), nakon 3 h MW zračenja dobiveno je 0,074 g (65%) žuto-smeđeg praškastog produkta. T.t. 282–286 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ/ppm = 8,74 (d, 1H, J = 7,53, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 8,37 (d, 1H, J = 8,31 Hz), 8,27 (d, 1H, J = 7,30 Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,87 (d, 1H, J = 8,01 Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,73 – 7,64 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,52 (t, 1H, J = 7,61 Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,38 (t, 1H, J = 7,47 Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 3,71 (t, 4H, J = 4,29 Hz, CH_2), 3,00 (t, 4H, J = 4,13 Hz, CH_2).

7-cijano-6-*N*-izobutilaminobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol 10

Spoj **10** priređen je prethodno opisanom metodom, iz spoja **7** (0,100 g, 0,30 mmol) i izobutilamina (0,350 ml, 3,50 mmol), nakon 3 h MW zračenja dobiveno je 0,074 g (67%) žutog praškastog produkta. T.t. 198–202 °C.

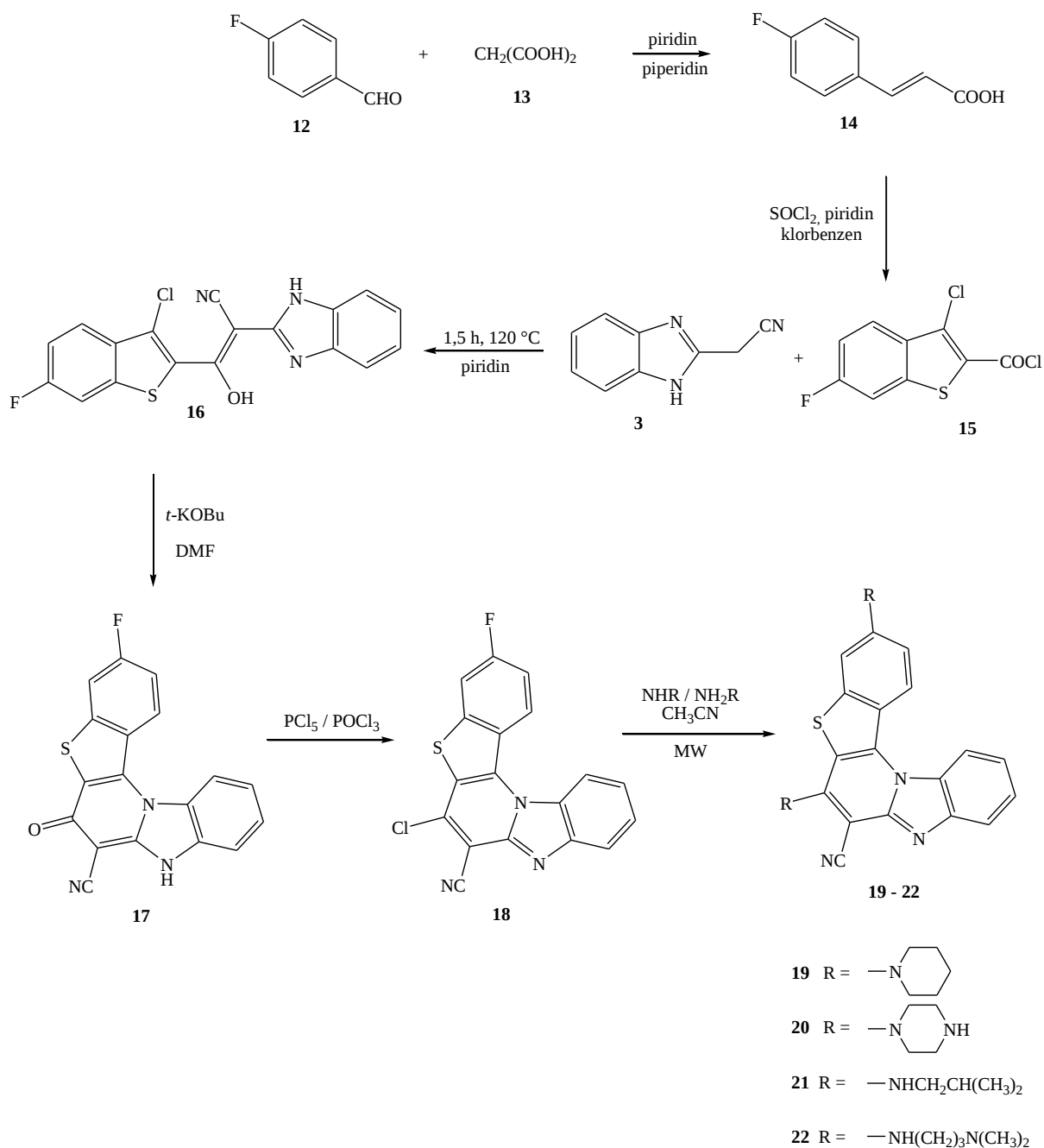
^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ/ppm = 8,75 (d, 1H, J = 9,03 Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 8,30 (dd, 2H, J_1 = 2,01 Hz, J_2 = 8,67 Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,91 (t, 1H, J = 6,18 Hz, NH), 7,78 (d, 1H, J = 7,74 Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,74 – 7,67 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,45 (t, 1H, J = 7,35 Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,31 (t, 1H, J = 7,26 Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 3,64 (t, 2H, J = 6,72 Hz, CH_2), 2,23 – 2,09 (m, 1H, CH), 1,00 (d, 6H, J = 6,60 Hz, CH_3); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ/ppm = 151,13 (s), 148,22 (s), 144,66 (s), 138,47 (s), 133,05 (s), 130,04 (s), 128,87 (s), 128,07 (d), 125,11 (s), 124,29 (d), 124,15 (d), 124,09 (d), 119,50 (d), 118,40 (d), 117,56 (s), 117,21 (s), 114,04 (d), 71,65 (s), 50,72 (t), 28,32 (d), 19,39 (q, 2C).

7-cijano-6-*N*-(*N,N*-dimetilaminopropil-1-amino)benzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol 11

Spoj **11** priređen je prethodno opisanom metodom, iz spoja **7** (0,100 g, 0,30 mmol) i izobutilamina (0,370 ml, 3,30 mmol), nakon 3 h MW zračenja dobiveno je 0,028 g (23%) žutog praškastog produkta. T.t. 188–193 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ/ppm = 8,83 (šs, 1H, NH), 8,74 (d, 1H, *J* = 8,64 Hz, H_{arom.}), 8,28 (d, 2H, *J* = 7,08 Hz, H_{arom.}), 7,77 (d, 1H, *J* = 7,89 Hz, H_{arom.}), 7,73 – 7,66 (m, 2H, H_{arom.}), 7,45 (t, 1H, *J* = 7,50 Hz, H_{arom.}), 7,30 (t, 1H, *J* = 7,58 Hz, H_{arom.}), 3,97 – 3,93 (m, 2H, CH₂), 2,55 – 2,52 (m, 2H, CH₂), 2,29 (s, 6H, CH₃), 1,94 – 1,86 (m, 2H, CH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ/ppm = 151,15 (s), 148,39 (s), 144,66 (s), 138,39 (s), 132,90 (s), 129,99 (s), 128,86 (s), 128,01 (d), 125,12 (d), 124,26 (d), 124,15 (d), 124,12 (d), 119,49 (d), 118,38 (d), 117,41 (s), 117,28 (s), 113,99 (d), 71,31 (s), 57,35 (t), 44,98 (q, 2C), 44,45 (t), 25,35 (t).

4.3. Sinteza 3,6-diamino supstituiranih derivata 7-cijanobenzo-*[b]*tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola



Shema 27. Sinteza 3,6-diamino supstituiranih derivata 7-cijanobenzo-*[b]*tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola

4.3.1. Priprava 4-fluorcimetne kiseline 14

Otopina 10,00 g (80,60 mmol) 4-fluorbenzaldehida 12, 10,06 g (96,0 mmol) malonske kiseline 13 i 1,74 ml piperidina u 90 ml piridina refluksira 20 h. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu smjesa se izlije na led (400 g), te se zakiseli s koncentriranom HCl do pH 1–2. Dobiveni talog se profiltrira i dobro ispere vodom, te se prekristalizira iz 600 ml 50%-tnog etanola. Dobiveno je 13,380 g (61%) bijelog kristaliničnog produkta.

4.3.2. Priprava 6-fluor-3-klorbenzo[b]tiofen-2-karbonil-klorida 15

U okruglu dvogrlu tikvicu stavi se 7,500 g (30,0 mmol) 4-fluorcimetne kiseline 14, 0,90 ml piridina i 65,40 ml klorbenzena. Tikvica se uroni u ledenu kupelj te se dokapava 32,67 ml SOCl₂. Reakcijska smjesa refluksira 15 h na 140 °C. Suvišak SOCl₂ i klorbenzena ukloni se destilacijom pod sniženim tlakom, a ostatak se ekstrahira vrućim cikloheksanom. Dobiveno je 1,63 g (14%) žutog praškastog produkta.

4.3.3. Priprava 2-(2-benzimidazolil)-3-hidroksi-3-(6-fluor-3-klorbenzo[b]tiofen-2-il)akrilonitrila 16

Reakcijska smjesa 0,500 g (2,0 mmol) 6-fluor-3-klorbenzo[b]tiofen-2-karbonil-klorida 15, 4 ml piridina i 0,315 g (2,0 mmol) 2-cijanometilbenzimidazola 3 refluksira se 1,5 h pri 120 °C. Nakon hlađenja smjese na sobnu temperaturu, u reakcijsku smjesu se doda voda, a dobiveni talog se profiltrira i prekristalizira iz 500,0 ml etanola. Dobiveno je 0,390 g (52%) svijetlosmeđeg praškastog produkta. T.t. > 300 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ/ppm = 13,23 (s, 2H, H_{benzimidazol}), 8,07 (dd, 1H, *J*₁ = 2,32 Hz, *J*₂ = 9,11 Hz, H_{arom.}), 7,92 (dd, 1H, *J*₁ = 5,07 Hz, *J*₂ = 8,94 Hz, H_{arom.}), 7,60 (dd, 2H, *J*₁ = 3,18 Hz, *J*₂ = 6,03 Hz, H_{arom.}), 7,48 (td, 1H, *J*₁ = 2,41 Hz, *J*₂ = 9,02 Hz, H_{arom.}), 7,34 (dd, 2H, *J*₁ = 3,20 Hz, *J*₂ = 5,99 Hz, H_{arom.}); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ/ppm = 204,76 (s), 177,36 (s), 161,53 (d, *J*_{CF} = 243,73 Hz), 150,52 (s), 138,38 (s), 138,23 (s), 132,87 (s), 130,88 (s, 2C), 124,52 (d, *J*_{CF} = 9,66 Hz), 124,37 (d, 2C), 119,74 (s), 115,44 (d, *J*_{CF} = 24,70 Hz), 112,93 (d, 2C), 110,15 (d, *J*_{CF} = 26,23 Hz), 69,30 (s).

4.3.4. Priprava 7-cijano-3-fluor-6-oksobenzo[b]tieno[2,3-b]pirido[1,2-a]benzimidazola 17

Reakcijska smjesa 0,500 g (1,35 mmol) 2-(2-benzimidazolil)-3-hidroksi-3-(6-fluor-3-klorbenzo[b]tiofen-2-il)akrilonitrila 16, 0,353 g (1,35 mmol) *t*-KOBU i 8,5 ml DMF refluksira se 1,5 h. Po završetku reakcije reakcijska smjesa se upari pod sniženim tlakom do suha, doda se voda i nastali talog se profiltrira. Talog se prekrystalizira iz 250,0 ml etanola. Dobiveno je 0,325 g žutog praškastog produkta (72%). T.t. > 300 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ/ppm = 8,71 (dd, 1H, *J*₁ = 5,10 Hz, *J*₂ = 9,15 Hz, H_{arom.}), 8,13 (d, 1H, *J* = 8,85 Hz, H_{arom.}), 8,12 (d, 1H, *J* = 9,30 Hz, H_{arom.}), 7,56 – 7,47 (m, 2H, H_{arom.}), 7,29 (t, 1H, *J* = 7,52 Hz, H_{arom.}), 7,12 (t, 1H, *J* = 7,16 Hz, H_{arom.}); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz): δ/ppm = 169,63 (s), 160,37 (d, *J*_{CF} = 243,95 Hz), 155,46 (s), 140,62 (s), 140,56 (s), 130,38 (s), 130,24 (s), 127,41 (s), 125,50 (d, *J*_{CF} = 9,36 Hz), 122,92 (d), 119,63 (s), 117,42 (d), 116,75 (d), 113,12 (d, *J*_{CF} = 24,00 Hz), 112,57 (d), 110,37 (d, *J*_{CF} = 25,17 Hz), 74,86 (s).

4.3.5. Priprava 7-cijano-3-fluor-6-klorbenzo[b]tieno[2,3-b]pirido[1,2-a]benzimidazola 18

Reakcijska smjesa 0,300 g (0,90 mmol) 7-cijano-3-fluor-6-oksobenzo[b]tieno[2,3-b]pirido[1,2-a]benzimidazola 17, 0,092 mg PCl₅ i 12 ml POCl₃ refluksira se 1,5 h pri 110 °C. Po završetku reakcije smjesa se upari pod sniženi tlakom do suha, doda se mala količina vode te se nastali talog profiltrira. Dobiveno je 0,249 g (83%) žutog praškastog produkta. T.t. > 300 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ/ppm = 8,99 (dd, 1H, *J*₁ = 5,06 Hz, *J*₂ = 9,26 Hz, H_{arom.}), 8,63 (d, 1H, *J* = 8,52 Hz, H_{arom.}), 8,39 (dd, 1H, *J*₁ = 2,54 Hz, *J*₂ = 8,93 Hz, H_{arom.}), 8,06 (d, 1H, *J* = 8,07 Hz, H_{arom.}), 7,73 – 7,66 (m, 2H, H_{arom.}), 7,58 (td, 1H, *J*₁ = 1,22 Hz, *J*₂ = 7,82 Hz, H_{arom.}); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ/ppm = nije dovoljno topljivo.

4.3.6. Opći postupak priprave spojeva 19–22

Spojevi 19–22 priređeni su sintezom potpomognutom mikrovalovima korištenjem MW zračenja snage 800 W i temperature 170 °C, iz spoja 18 u 10 ml acetonitrila i uz suvišak

odgovarajućeg amina. Reakcijska se smjesa nakon hlađenja profiltrira, ukoliko je potrebno prethodno se upari pod sniženim tlakom na manji volumen, a nastali produkt se pročisti kolonskom kromatografijom na silikagelu uz CH₂Cl₂/CH₃OH kao eluens.

7-cijano-3,6-di(*N*-piperidinil)benzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol 19

Spoj **19** priređen je prethodno opisanom metodom, iz spoja **18** (0,100 g, 0,28 mmol) i piperidina (0,700 ml, 6,86 mmol), nakon 12 h MW zračenja dobiveno je 0,110 g (83%) žutog praškastog produkta. T.t. 296–299 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ/ppm = 8,49 (d, 1H, *J* = 9,36 Hz, H_{arom.}), 8,34 (d, 1H, *J* = 8,22 Hz, H_{arom.}), 7,84 (d, 1H, *J* = 8,07 Hz, H_{arom.}), 7,57 (d, 1H, *J* = 2,07 Hz, H_{arom.}), 7,50 (t, 1H, *J* = 7,59 Hz, H_{arom.}), 7,34 (t, 1H, *J* = 8,40 Hz, H_{arom.}), 7,29 (dd, 1H, *J*₁ = 9,53 Hz, *J*₂ = 2,49 Hz, H_{arom.}), 3,69 (šs, 4H, CH₂), 3,43 (šs, 4H, CH₂), 1,77 – 1,69 (m, 6H, CH₂), 1,64 (šs, 6H, CH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ/ppm = nije dovoljno topljivo.

7-cijano-3,6-di(*N*-piperazin-1-il)benzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol 20

Spoj **20** priređen je prethodno opisanom metodom, iz spoja **18** (0,100 g, 0,28 mmol) i piperazina (0,320 g, 3,70 mmol), nakon 12 h MW zračenja dobiveno je 0,043 g (33%) žutog praškastog produkta. T.t. > 300 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ/ppm = 8,55 (d, 1H, *J* = 9,05 Hz, H_{arom.}), 8,37 (d, 1H, *J* = 8,10 Hz, H_{arom.}), 7,86 (d, 1H, *J* = 7,86 Hz, H_{arom.}), 7,65 (šs, 1H, H_{arom.}), 7,51 (t, 1H, *J* = 7,53 Hz, H_{arom.}), 7,39 – 7,33 (m, 2H, H_{arom.}), 3,67 (šs, 4H, CH₂), 3,39 (šs, 4H, CH₂), 2,97 (šs, 4H, CH₂), 2,95 (šs, 4H, CH₂).

7-cijano-3,6-di(*N*-izobutilamino)benzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol 21

Spoj **21** priređen je prethodno opisanom metodom, iz spoja **18** (0,100 g, 0,28 mmol) i piperidina (1,250 ml, 12,37 mmol), nakon 27 h MW zračenja dobiveno je 0,024 g (19%) žutog praškastog produkta. T.t. 144–148 °C.

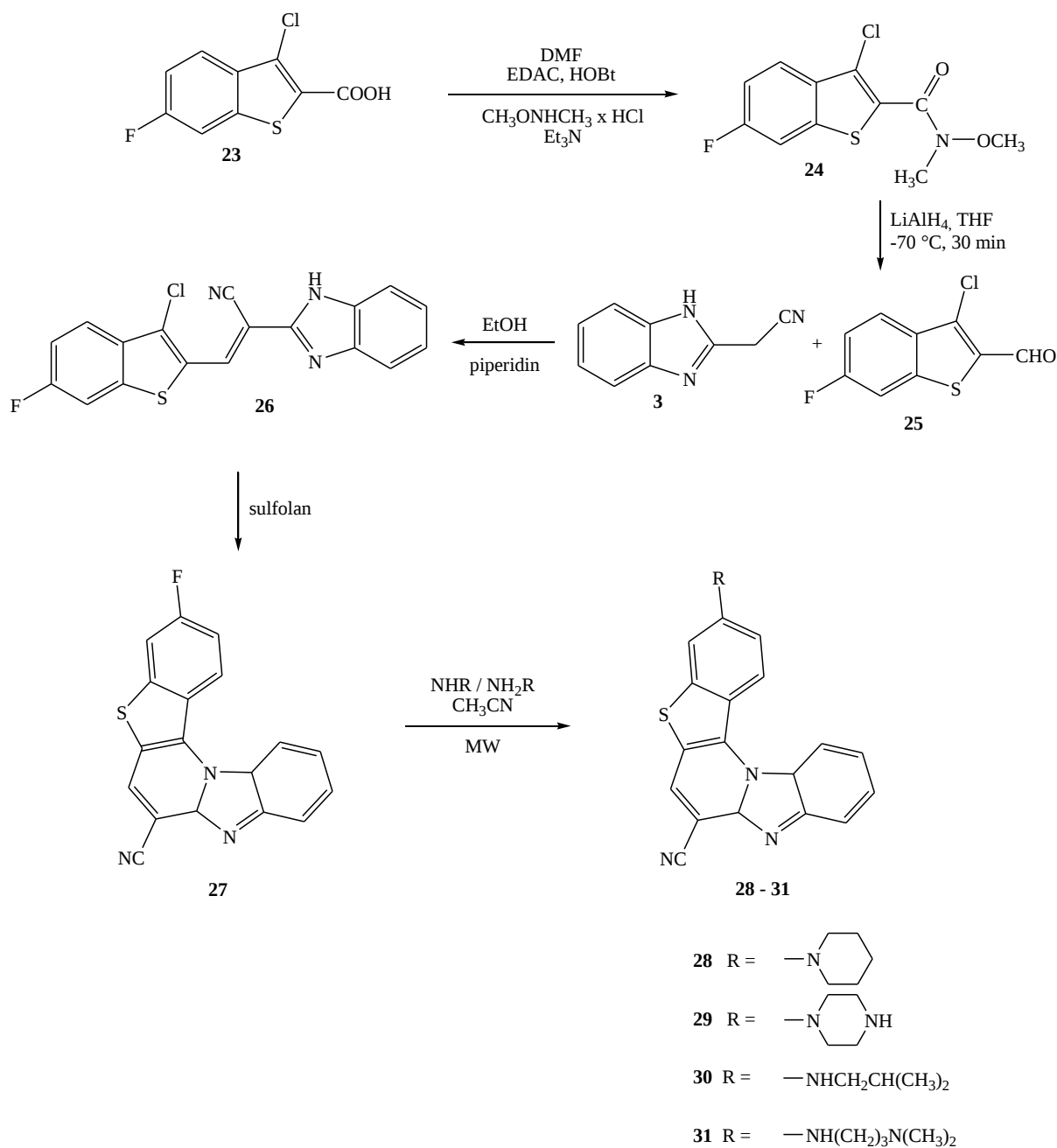
¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ/ppm = 8,42 (d, 1H, *J* = 9,15 Hz, H_{arom.}), 8,26 (d, 1H, *J* = 8,22 Hz, H_{arom.}), 7,73 (d, 1H, *J* = 7,86 Hz, H_{arom.}), 7,58 (t, 1H, *J* = 6,26 Hz, NH), 7,42 (t, 1H, *J* = 7,61 Hz, H_{arom.}), 7,27 (t, 1H, *J* = 7,76 Hz, H_{arom.}), 7,20 (d, 1H, *J* = 1,92 Hz, H_{arom.}), 7,01 (dd, 1H, *J*₁ = 1,97 Hz, *J*₂ = 9,20 Hz, H_{arom.}), 6,76 (t, 1H, *J* = 5,30 Hz, NH), 3,60 (t, 2H, *J* = 6,63 Hz, CH₂), 3,00 (t, 2H, *J* = 6,14 Hz, CH₂), 2,19 – 2,06 (m, 1H, CH), 2,00 – 1,86 (m, 1H, CH),

0,99 (d, $J = 4,68$ Hz, 6H, CH₃), 0,97 (d, $J = 4,62$ Hz, 6H, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): $\delta/\text{ppm} = 151,00$ (s), 150,25 (s), 149,04 (s), 145,32 (s), 142,85 (s), 134,75 (s), 130,43 (s), 125,29 (d), 124,65 (d), 119,60 (d), 118,58 (d), 118,36 (s), 118,16 (s), 114,32 (d), 113,94 (d), 111,66 (s), 102,10 (d), 70,35 (s), 51,22 (t), 50,65 (t), 28,92 (d), 27,79 (d), 20,68 (q, 2C), 19,89 (q, 2C).

7-cijano-3,6-di[*N,N*-dimetilaminopropil-1-amino]]benzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol 22

Pokušaj sinteze spoja 22 prethodno opisanom metodom nije bio uspješan.

4.4. Sinteza 3-amino supstituiranih derivata 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola



Shema 28. Sinteza 3-amino supstituiranih derivata 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola

4.4.1. Priprava 6-fluor-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karbaldehida 25³³**Korak 1. Priprava *N*-metil-*N*-metoksi-6-fluor-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karboksamida 24**

U otopinu 6-fluor-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karboksilne kiseline 23 (1,10 g, 2,60 mmol) i suhog DMF (27,50 ml) doda se 1,375 g EDAC i 0,968 g HOBt pri čemu nastaje bijela suspenzija. Nakon 5 minuta miješanja na sobnoj temperaturi, u tikvicu se doda 0,698 g (*N,O*)-dimetilhidroksilamin hidroklorida i 0,99 ml trietilamina. Reakcijska smjesa se miješa 16 h na sobnoj temperaturi. Reakcijskoj smjesi potom je dodan etil-acetat (68,70 ml), te se dobivena otopina ekstrahira s 0,5 M HCl (41,25 ml), zasićenom otopinom NaHCO₃ (41,25 ml) i s vodom (13,75 ml). Organski sloj suši se 1 h iznad bezvodnog MgSO₄, profiltrira se i upari do suha. Dobiveno je 1,061 g (82%) bijelog kristaliničnog produkta.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ /ppm = 8,06 (dd, 1H, $J_1 = 2,16$ Hz, $J_2 = 9,06$ Hz, H_{arom.}), 7,93 (dd, 1H, $J_1 = 5,10$ Hz, $J_2 = 8,88$ Hz, H_{arom.}), 7,47 (td, 1H, $J_1 = 2,26$ Hz, $J_2 = 9,00$ Hz, H_{arom.}), 3,67 (s, 3H, CH₃), 3,32 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ /ppm = 161,84 (s, $J_{CF} = 244,43$ Hz), 160,63 (s), 139,28 (s), 139,13 (s), 132,34 (s), 132,32 (s), 124,79 (d, $J_{CF} = 9,71$ Hz), 115,59 (d, $J_{CF} = 24,80$ Hz), 109,94 (d, $J_{CF} = 26,36$ Hz), 62,24 (t, CH₃), 35,51 (t, CH₃).

Korak 2. Priprava 6-fluor-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karbaldehida 25

U otopinu 0,500 g *N*-metil-*N*-metoksi-6-fluor-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karboksamida 24 (1,83 mmol) u suhom THF (8,60 ml), koja je propuhivana dušikom i ohlađena na -70 °C, dokapava se suspenzija LiAlH₄ u THF (1,00 M, 0,051 g LiAlH₄ u 1,35 ml THF) kroz 10 min, nakon čega se reakcijska smjesa miješa 0,5 h na -70 °C. Reakcija se prekida dokapavanjem 3,00 ml vode. Nakon što je reakcijska smjesa postigla sobnu temperaturu, u reakcijsku smjesu doda se 28,60 ml etil-acetata. Organski sloj ekstrahira se s 1 M HCl (14,30 ml) i s zasićenom otopinom NaCl (14,30 ml), te se suši 1 h iznad bezvodnog MgSO₄. Organski sloj upari se do suha. Dobiveno je 0,356 g (91%) bijelog kristaliničnog produkta.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ /ppm = 10,21 (s, 1H, H_{ald.}), 8,13 (dd, 1H, $J_1 = 2,21$ Hz, $J_2 = 9,17$ Hz, H_{arom.}), 8,09 (dd, 1H, $J_1 = 5,15$ Hz, $J_2 = 8,96$ Hz, H_{arom.}), 7,53 (td, 1H, $J_1 = 7,35$ Hz, $J_2 = 9,02$ Hz, H_{arom.}); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz): δ /ppm = 182,62 (d), 162,79 (s, $J_{CF} = 250,35$ Hz), 140,66 (s), 135,34 (s), 132,77 (s), 129,11 (s), 125,63 (d, $J_{CF} = 9,70$ Hz), 115,94 (d, $J_{CF} = 25,33$ Hz), 110,37 (d, $J_{CF} = 26,40$ Hz).

4.4.2. Priprava 2-(2-benzimidazolil)-3-(6-fluor-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-il)akrilonitrila 26

Reakcijska smjesa 0,356 g (1,7 mmol) 6-fluor-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-karbaldehida 25, 0,261 g (1,7 mmol) 2-cijanometilbenzimidazola 3, 7,2 ml apsolutnog etanola i 4 kapi piperidina refluksira se 2 h. Po završetku reakcije ohlađena smjesa se filtrira. Dobiveno je 0,500 g (85%) žuto-narančastog praškastog produkta. T.t. 274–279 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ/ppm = 13,37 (šs, 1H, NH), 8,58 (s, 1H, H_{arom.}), 8,19 (d, 1H, *J* = 8,34 Hz, H_{arom.}), 8,00 (dd, 1H, *J*₁ = 5,13 Hz, *J*₂ = 8,55 Hz, H_{arom.}), 7,64 (šs, 2H, H_{arom.}), 7,51 (t, 1H, *J* = 8,46 Hz, H_{arom.}), 7,27 (šs, 2H, H_{arom.}); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ/ppm = 162,57 (s, *J*_{CF} = 246,86 Hz), 147,25 (s), 150,05 (s), 139,90 (s), 133,69 (d), 132,24 (s), 130,49 (s), 130,44 (s), 127,83 (s), 125,21 (d, *J*_{CF} = 9,66 Hz), 124,57 (d), 123,05 (d), 119,86 (d), 116,34 (s), 116,21 (d, *J*_{CF} = 24,16 Hz), 112,18 (d), 110,48 (d, *J*_{CF} = 25,31 Hz), 103,87 (s).

4.4.3. Priprava 7-cijano-3-fluorbenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola 27

Reakcijska smjesa 0,400 g (1,14 mmol) 2-(2-benzimidazolil)-3-(6-fluor-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-il)akrilonitrila 26 i 2,2 ml sulfolana zagrijava se 10 min pri 280 °C. Po završetku reakcije smjesi se doda voda, nastali produkt se filtrira i prekrizalizira iz 150 ml etanola. Dobiveno je 0,227 g (63%) narančastog praškastog produkta. T.t. 227–232 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ/ppm = 8,96 (s, 1H, H_{arom.}), 8,87 (dd, 1H, *J*₁ = 4,95 Hz, *J*₂ = 9,15 Hz, H_{arom.}), 8,53 (d, 1H, *J* = 8,46 Hz, H_{arom.}), 8,27 (dd, 1H, *J*₁ = 2,40 Hz, *J*₂ = 8,88 Hz, H_{arom.}), 8,02 (d, 1H, *J* = 8,16 Hz, H_{arom.}), 7,64 (t, 1H, *J* = 7,56 Hz, H_{arom.}), 7,58 (td, *J*₁ = 2,44 Hz, *J*₂ = 8,91 Hz, H_{arom.}), 7,50 (t, *J* = 7,74 Hz, H_{arom.}); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ/ppm = 161,80 (d, *J*_{CF} = 247,84 Hz), 146,73 (s), 144,49 (s), 143,23 (s), 134,58 (s), 134,06 (d), 130,07 (s), 126,62 (d, *J*_{CF} = 9,65 Hz), 126,42 (d), 125,71 (s), 123,42 (s), 122,09 (d), 120,70 (d), 116,11 (s), 115,60 (d), 114,63 (d, *J*_{CF} = 24,53 Hz), 111,01 (d, *J*_{CF} = 26,05 Hz), 98,96 (s).

4.4.4. Opći postupak pripreme spojeva 28–31

Spojevi 28–31 priređeni su sintezom potpomognutom mikrovalovima korištenjem MW zračenja snage 800 W i temperature 170 °C, iz spoja 27 u 10 ml acetonitrila i uz suvišak odgovarajućeg amina. Reakcijska se smjesa nakon hlađenja filtrira, ukoliko je potrebno

prethodno se upari pod sniženim tlakom na manji volumen, a nastali produkt se pročisti kolonskom kromatografijom na silikagelu uz CH₂Cl₂/CH₃OH kao eluens.

7-cijano-3-*N*-piperidinilbenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol 28

Spoj 28 priređen je prethodno opisanom metodom, iz spoja 27 (0,100 g, 0,32 mmol) i piperidina (0,400 ml, 4,11 mmol), nakon 5 h MW zračenja dobiveno je 0,068 g (45%) narančastog praškastog produkta. T.t. > 300 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ/ppm = 8,84 (s, 1H, H_{arom.}), 8,68 (d, 1H, *J* = 9,36 Hz, H_{arom.}), 8,62 (d, 1H, *J* = 8,46 Hz, H_{arom.}), 8,02 (d, 1H, *J* = 8,04 Hz, H_{arom.}), 7,68 (s, 1H, H_{arom.}), 7,64 (t, 1H, *J* = 8,09 Hz, H_{arom.}), 7,51 (t, 1H, *J* = 7,83 Hz, H_{arom.}), 7,39 (dd, 1H, *J*₁ = 2,24 Hz, *J*₂ = 9,56 Hz, H_{arom.}), 3,50 (šs, 4H, CH₂), 1,66 (šs, 6H, CH₂).

7-cijano-3-*N*-(piperazin-1-il)benzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol 29

Spoj 29 priređen je prethodno opisanom metodom, iz spoja 27 (0,100 g, 0,32 mmol) i piperazina (0,380 g, 4,48 mmol), nakon 9 h MW zračenja dobiveno je 0,023 g (19%) narančastog praškastog produkta. T.t. 280–285 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ/ppm = 8,87 (s, 1H, H_{arom.}), 8,72 (d, 1H, *J* = 9,39 Hz, H_{arom.}), 8,62 (d, 1H, *J* = 8,22 Hz, H_{arom.}), 8,03 (d, 1H, *J* = 8,22 Hz, H_{arom.}), 7,73 (s, 1H, H_{arom.}), 7,66 (t, 1H, *J* = 7,58 Hz, H_{arom.}), 7,51 (t, 1H, *J* = 7,68 Hz, H_{arom.}), 7,42 (dd, 1H, *J*₁ = 1,10 Hz, *J*₂ = 9,11 Hz, H_{arom.}), 3,46 (t, 4H, *J* = 4,61 Hz, CH₂), 3,01 (t, 4H, *J* = 4,64 Hz, CH₂).

7-cijano-3-*N*-izobutilaminobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol 30

Spoj 30 priređen je prethodno opisanom metodom, iz spoja 27 (0,100 g, 0,32 mmol) i izobutilamina (1,200 ml, 24,44 mmol), nakon 13 h MW zračenja dobiveno je 0,032 g (27%) narančastog praškastog produkta. T.t. 247–252 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ/ppm = 8,76 (s, 1H, H_{arom.}), 8,58 (d, 1H, *J* = 5,76 Hz, H_{arom.}), 8,55 (d, 1H, *J* = 6,81 Hz, H_{arom.}), 7,98 (d, 1H, *J* = 8,04 Hz, H_{arom.}), 7,62 (t, 1H, *J* = 7,62 Hz, H_{arom.}), 7,47 (t, 1H, *J* = 7,80 Hz, H_{arom.}), 7,23 (d, 1H, *J* = 2,01 Hz, H_{arom.}), 7,04 (dd, 1H, *J*₁ = 2,16 Hz, *J*₂ = 9,29 Hz, H_{arom.}), 6,97 (t, 1H, *J* = 5,67 Hz, NH), 3,02 (t, 2H, *J* = 6,23 Hz, CH₂), 1,95 (m, 1H, CH), 0,99 (d, 6H, *J* = 6,60 Hz, CH₃).

7-cijano-3-*N*-(*N,N*-dimetilaminopropil-1-amino)benzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol 31

Spoj 31 priređen je prethodno opisanom metodom, iz spoja 27 (0,100 g, 0,30 mmol) i izobutilamina (0,200 ml, 8,47 mmol), nakon 8 h MW zračenja dobiveno je 0,028 g (22%) narančastog praškastog produkta. T.t. 190–195 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ/ppm = 8,79 (s, 1H, H_{arom.}), 8,59 (d, 2H, *J* = 8,97 Hz, H_{arom.}), 7,99 (d, 1H, *J* = 8,25 Hz, H_{arom.}), 7,63 (t, 1H, *J* = 7,53 Hz, H_{arom.}), 7,49 (t, 1H, *J* = 7,80 Hz, H_{arom.}), 7,26 (d, 1H, *J* = 1,89 Hz, H_{arom.}), 7,03 (dd, 1H, *J*₁ = 1,94 Hz, *J*₂ = 9,26 Hz, H_{arom.}), 6,94 (t, 1H, *J* = 5,36 Hz, NH), 3,23 (m, 2H, CH₂), 2,42 (t, 2H, *J* = 6,96 Hz, CH₂), 2,23 (s, 6H, CH₃), 1,78 (m, 2H, CH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz): δ/ppm = 149,90 (s), 147,00 (s), 145,23 (s), 144,22 (s), 135,00 (s), 133,17 (d), 129,53 (s), 125,69 (d), 124,99 (d), 120,86 (d), 119,68 (d), 118,13 (s), 117,40 (s), 116,47 (s), 114,94 (d), 113,77 (d), 101,72 (d), 93,69 (s), 56,58 (t), 45,02 (q, 2C), 40,59 (t), 26,24 (t).

5. ZAKLJUČAK

- U ovom radu priređeni su sljedeći spojevi: 2-(2-benzimidazolil)-3-hidroksi-3-(3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-il)akrilonitril **5**, 7-cijano-6-oksobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **6**, 7-cijano-6-klorbenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **7**, 7-cijano-6-*N*-piperidinilbenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **8**, 7-cijano-6-*N*-(piperazin-1-il)benzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **9**, 7-cijano-6-*N*-izobutilaminobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **10**, 7-cijano-6-*N*-(*N,N*-dimetilaminopropil-1-amino)benzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **11**, 2-(2-benzimidazolil)-3-hidroksi-3-(6-fluor-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-il)akrilonitril **16**, 7-cijano-3-fluor-6-oksobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **17**, 7-cijano-3-fluor-6-klorbenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **18**, 7-cijano-3,6-di(*N*-piperidinil)benzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **19**, 7-cijano-3,6-di(*N*-piperazin-1-il)benzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **20**, 7-cijano-3,6-di(*N*-izobutilamino)benzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **21**, 2-(2-benzimidazolil)-3-(6-fluor-3-klorbenzo[*b*]tiofen-2-il)akrilonitril **26**, 7-cijano-3-fluorbenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **27**, 7-cijano-3-*N*-piperidinilbenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **28**, 7-cijano-3-*N*-(piperazin-1-il)benzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **29**, 7-cijano-3-*N*-izobutilaminobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **30** i 7-cijano-3-*N*-(*N,N*-dimetilaminopropil-1-amino)benzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **31**.
- Aciklički akrilonitrili **5**, **16** i **26** priređeni su reakcijom kondenzacije odgovarajućih halogeno supstituiranih benzo[*b*]tiofenil-2-karbaldehida **4**, **15**, **25** i 2-cijanometilbenzimidazola **3**.
- Keto supstituirani derivati 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **6** i **17** priređeni su temičkom ciklizacijom akrilonitrila **5** i **16** uz DMF i dodatak *t*-KOBu.
- Halogeno i dihalogeno-supstituirani derivati **7** i **18** priređeni su zagrijavanjem u POCl₃ uz dodatak PCl₅, a **27** temičkom ciklizacijom akrilonitrila **26** u sulfolanu.
- 6-amino supstituirani derivati 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **8–11**, 3,6-diamino disupstituirani derivati 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **19–21** i 3-amino supstituirani derivati 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **28–31** priređeni su iz prekursora **7**, **18** i **27** mikrovalnom sintezom u acetonitrilu uz dodatak odgovarajućeg amina u suvišku.
- Strukture priređenih spojeva potvrđene su ¹H NMR, ¹³C NMR, UV/Vis spektroskopijom, te HPLC/MS spektrometrijom.

- Spektroskopska karakterizacija matičnih otopina priređenih derivata u metanolu provedena je korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije.
- Ciljani 6-amino, 3,6-diamino i 3-amino supstituirani derivati 7-cijanobenzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazola **8–11**, **19–21** i **28–31** u cijelom području valnih duljina pokazuju hiperkromne pomake intenziteta apsorpcije u odnosu na njihove prekursore.
- Među priređenim 3-amino i 6-amino supstituiranim derivatima najveći intenzitet apsorpcije i fluorescencije pokazuju spojevi s *N,N*-dimetilaminopropil-1-amino supstituentom **11** i **31**.
- Među priređenim 3,6-diamino supstituiranim derivatima najveći intenzitet apsorpcije i fluorescencije pokazuje 7-cijano-3,6-di(*N*-izobutilamino)benzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirido[1,2-*a*]benzimidazol **21**.
- Kako bi se ispitala mogućnost primjene spojeva **10**, **21** i **30** kao optičkih pH senzora, ispitana je promjena njihovih spektroskopskih svojstava ovisno o vrijednosti pH otopine korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije. Spojevi **30** i **21** fluoresciraju u kiselom mediju, dok se porastom pH vrijednosti otopine, fluorescencija gasi.

6. LITERATURA

1. M. Hranjec, *Doktorska disertacija „Sinteza, biološko djelovanje i interakcija s ct-DNK novih derivata benzimidazola”*, Zagreb, (2007).
2. B. Narasimhan, D. Sharma, P. Kumar, *Med. Chem. Res.* **21** (2012) 269-283.
3. D. W. Woolley, *J. Biol. Chem.* (1944) 152, 225.
4. N. G. Brink, K. Flokers, *J. Am. Chem. Soc.* **71** (1949) 2951.
5. Y. Bansal, O. Silakari, *Bioorg. Med. Chem.* **20** (2012) 6208-6236.
6. K. Kubo, Y. Inada, Y. Kohara, Y. Sugiura, M. Ojima, K. Itoh, Y. Furukawa, K. Nishikawa, T. Nakat, *J. Med. Chem.* **36** (1993) 1772.
7. S. Estrada-Soto, R. Villalobos-Molina, F. Aguirre-Crespo, J. Vergara-Galicia, H. Moreno-Diaz, M. Torres-Piedra, G. Navarrete-Vazquez, *Life Sci.* **79** (2006) 430–435.
8. M. C. Sharma, D. V. Kohli, S. Sharma, *Int. J. Drug Delivery* **2** (2010) 265.
9. M. Gaba, S. Singh, C. Mohan, *Eur. J. Med. Chem* **76** (2014) 494-505.
10. R. Paramashivappa, P.P. Kumar, P.V.S. Rao, A.S. Rao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13** (4) (2003) 657-660.
11. P. A. Thakurdesai, S. G. Wadodkar, C. T. Chopade, *Pharmacologyonline* **1** (2007) 314.
12. S. M. Sondhi, R. Rani, J. Singh, P. Roy, S. K. Agrawal, A. K. Saxena, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20** (2010) 2306.
13. D. Sharma, B. Narasimhan, P. Kumar, A. Jalbout, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 1119-1127.
14. K. F. Ansari, C. Lal, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 4028-4033.
15. B. S. Kuarm, Y. T. Reddy, J. V. Madhav, P. A. Crooks, B. Rajitha, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21** (2011) 524.
16. K. Starčević, M. Kralj, K. Ester, I. Sabol, M. Grce, K. Pavelić, G. Karminski-Zamola, *Bioorg. Med. Chem.* **15** (2007) 4419–4426.
17. K. S. Gudmundsson, P. R. Sebahar, L. D. Richardson, J. F. Miller, E. M. Turner, J. G. Catalano, A. Spaltenstein, W. Lawrence, M. Thomson, S. Jenkinson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19** (2009) 5048-5052.
18. A.-M. Monforte, S. Ferro, L. D. Luca, G. L. Surdo, F. Morreale, C. Pannecouque, J. Balzarini, A. Chimirri, *Bioorg. Med. Chem.* **22** (2014) 1459-1467.
19. V. A. Anisimova, A. A. Spasov, I. E. Tolpygin, V. I. Minkin, M. V. Chernikov, D. S. Yakovlev, A. Y. Stukovina, I. I. Goryagin, O. Y. Grechko, N. V. Kirillova, V. A. Kosolapov, E. V. Tibirkova, O. A. Salaznikova, L. V. Naumenko, N. A. Gurova, *Pharm. Chem. J.* **44** (2010) 345.
20. E. B. Skibo, I. Islam, M. J. Heileman, W. G. Schulz, *J. Med. Chem.* (1994) 37, 78.

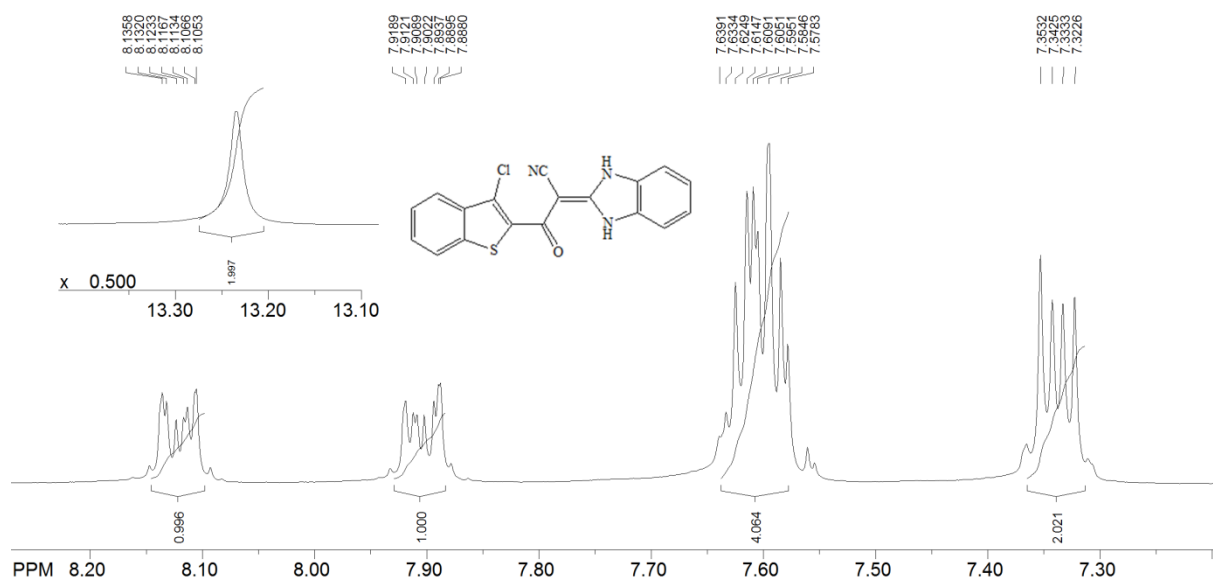
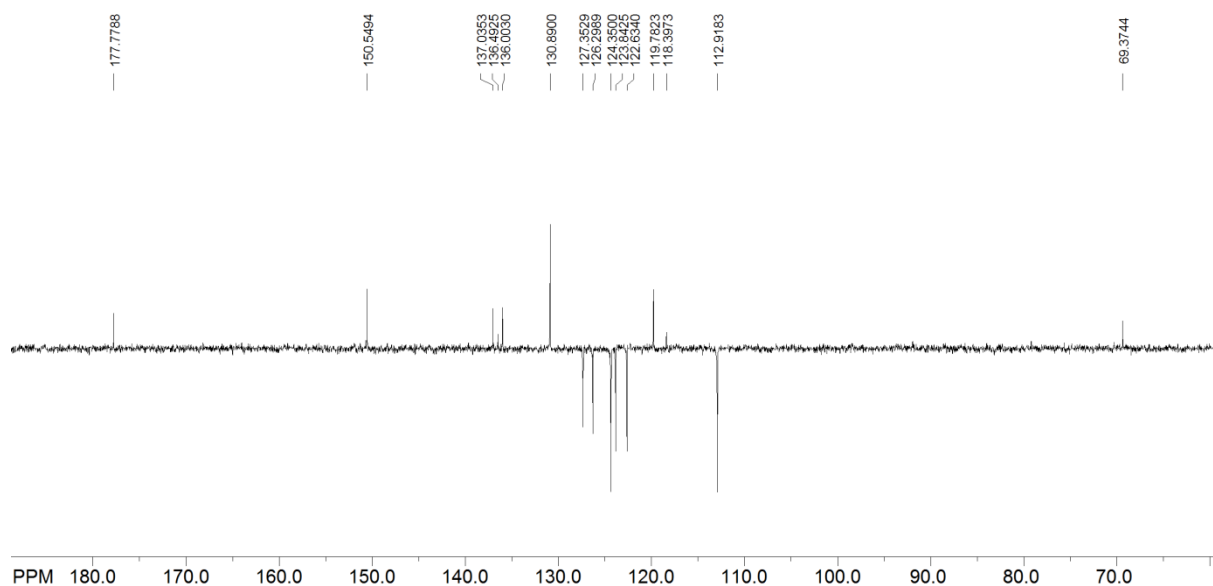
21. M. Hranjec, M. Kralj, I. Piantanida, M. Sedić, L. Šuman, K. Pavelić, G. Karminski-Zamola, *J. Med. Chem.* **50** (2007) 5696-5711.
22. N. R. Thimme Gowda, C. V. Kavitha, K. K. Chiruvella, O. Joy, K. S. Rangappa, S. C. Raghavan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19** (2009) 4594-4600.
23. S. M. Sondhi, R. Rani, J. Singh, P. Roy, S. K. Agrawal, A. K. Saxena, *Bioorg. Med. Chem. Lett* **20** (2010) 2306-2310.
24. Y. Li, C. Tan, C. Gao, C. Zhang, X. Luan, X. Chen, H. Liu, Y. Chen, Y. Jiang, *Bioorg. Med. Chem.* **19** (2011) 4529-4535.
25. S. Demirayak, I. Kayagil, L. Yurttas, *Eur. J. Med. Chem* **46** (2011) 411-416.
26. N. Perin, I. Martin-Kleiner, R. Nhili, W. Laine, M.-H. David-Cordonnier, O. Vugrek, G. Karminski-Zamola, M. Kralj, M. Hranjec, *Med. Chem. Commun.* **4** (2013) 1537-1550.
27. N. Perin, R. Nhili, K. Ester, W. Laine, G. Karminski-Zamola, M. Kralj, M.-H. David-Cordonnier, M. Hranjec, *Eur. J. Med. Chem* **80** (2014) 218-227.
28. M. Aleksić, B. Bertoša, R. Nhili, L. Uzelac, I. Jarak, S. Depauw, M.-H. David-Cordonnier, M. Kralj, S. Tomić, G. Karminski-Zamola, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 5044-5060.
29. Y. M. Volovenko, A. G. Nemazanyi, G. L. Vesel'skaya, F. S. Babichev, *Ukr. Khim. Zh.* **53** (1987) 1085-1088.
30. N. Perin, M. Hranjec, G. Pavlović, G. Karminski-Zamola, *Dyes and Pigments* **91** (2011) 79-88.
31. N. Perin, *Doktorska disertacija „Sinteza i biološka aktivnost novih amino supstituiranih benzimidazo[1,2-a]kinolina”* Zagreb, 2014.
32. M. Aleksić, B. Bertoša, R. Nhili, S. Depauw, I. Martin-Kleiner, M.-H. David-Cordonnier, S. Tomić, M. Kralj, G. Karminski-Zamola, *Eur. J. Med. Chem.* **71** (2014) 267-281.
33. P. Čapek, Y. Zhang, D. J. Barlow, K. L. Houseknecht, G. R. Smith i T. J. Dickerson, *ACS Chem. Neurosci.* **2** (2011) 288-293.

7. ŽIVOTOPIS

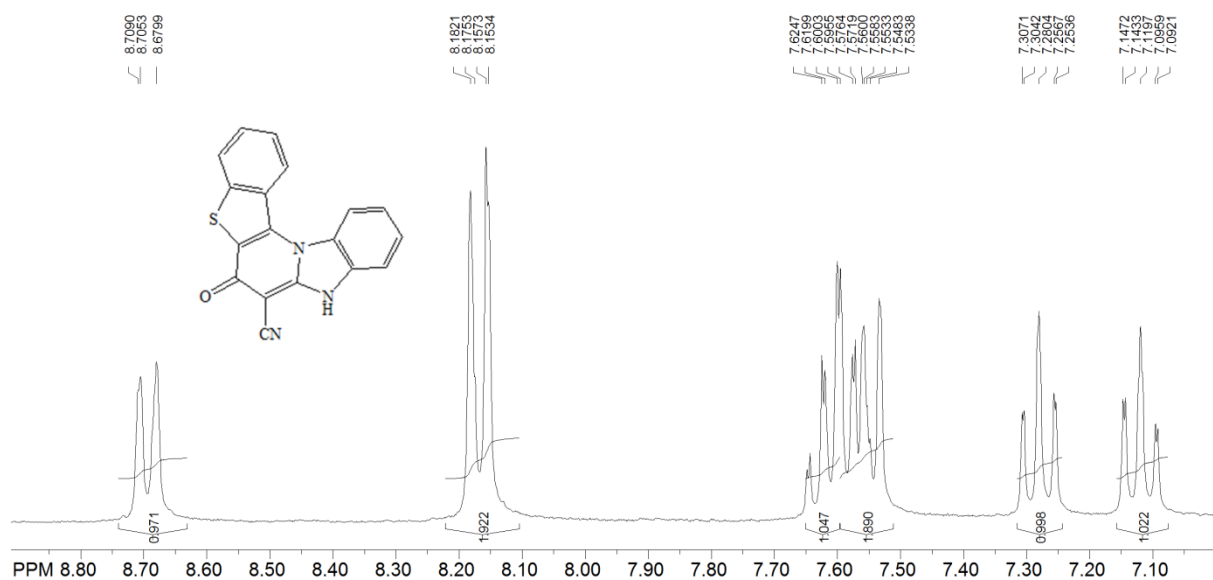
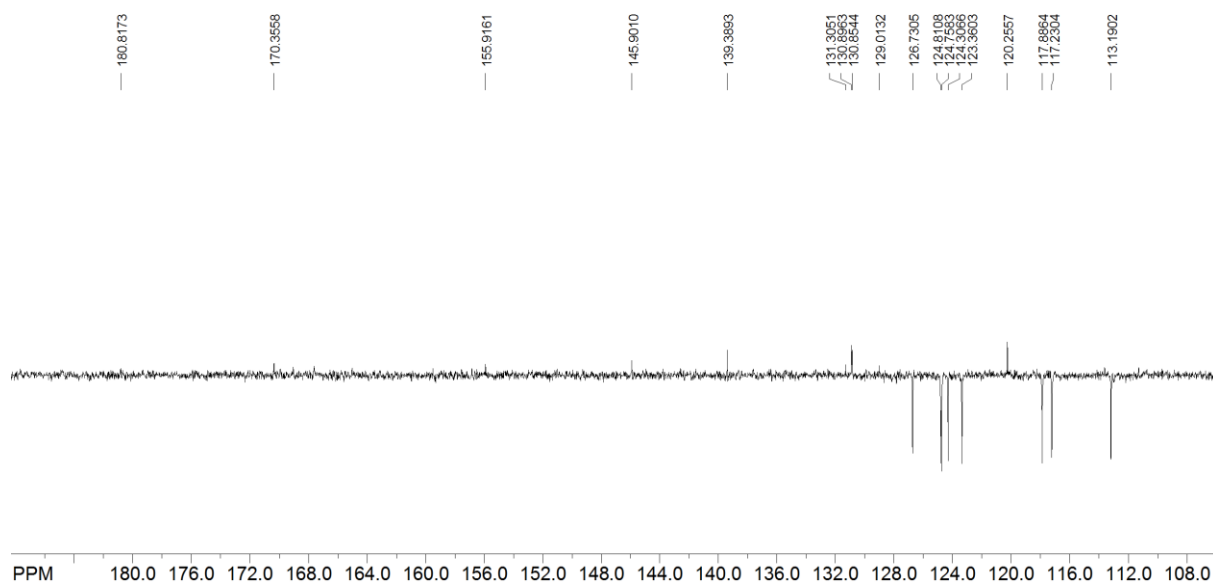
Kristina Bobanović rođena je 03. travnja 1991. godine u Zagrebu. Osnovnu školu završila je u Polači, nakon čega upisuje Opću gimnaziju u Biogradu. Maturirala je 2009. godine s odličnim uspjehom i iste godine upisala preddiplomski studij na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Primijenjena kemija. Tijekom studiranja na preddiplomskom studiju odradila je stručnu praksu u Plivi d.o.o. u Laboratoriju za istraživanje i razvoj. Završni rad izradila je na Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu uz mentorstvo izv. prof. dr. sc. Zvezdane Findrik Blažević s temom *Kinetička karakterizacija enzima NADH oksidaze iz mikroorganizma Lactococcus lactis i regeneracija koenzima NAD⁺*, s kojim je 2014. godine sudjelovala na X. Susretu mladih kemijskih inženjera. 2013. godine upisala je diplomski studij Primijenjena kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. 2014. godine bila je demonstrator na Zavodu za analitičku kemiju, a iste godine sudjelovala je na 15. Međunarodnoj školi kromatografije na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.

8. PRILOZI

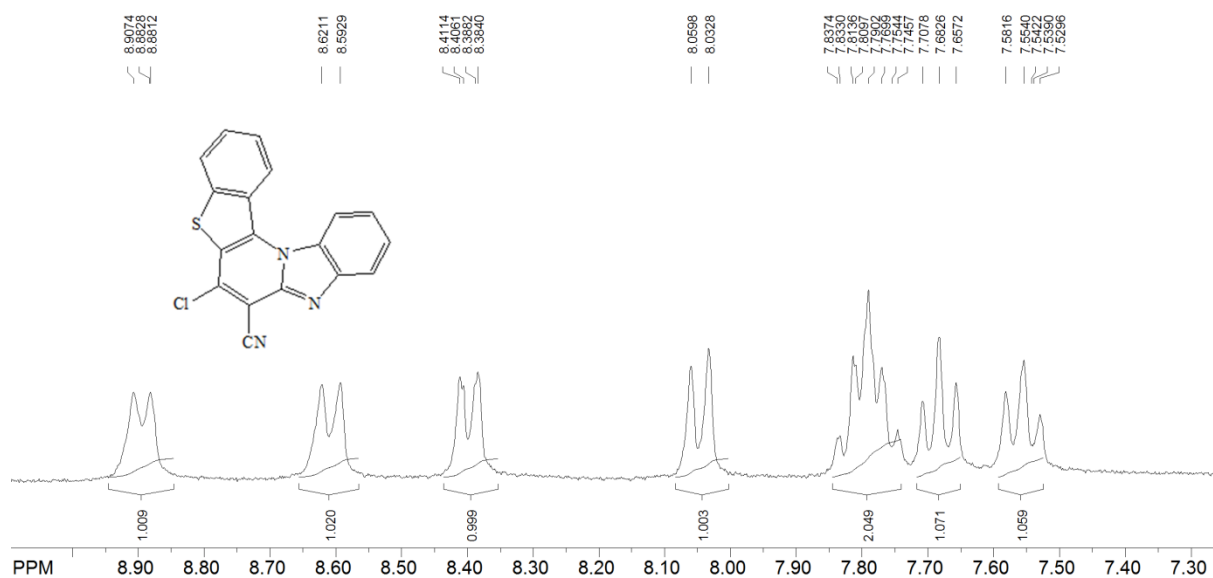
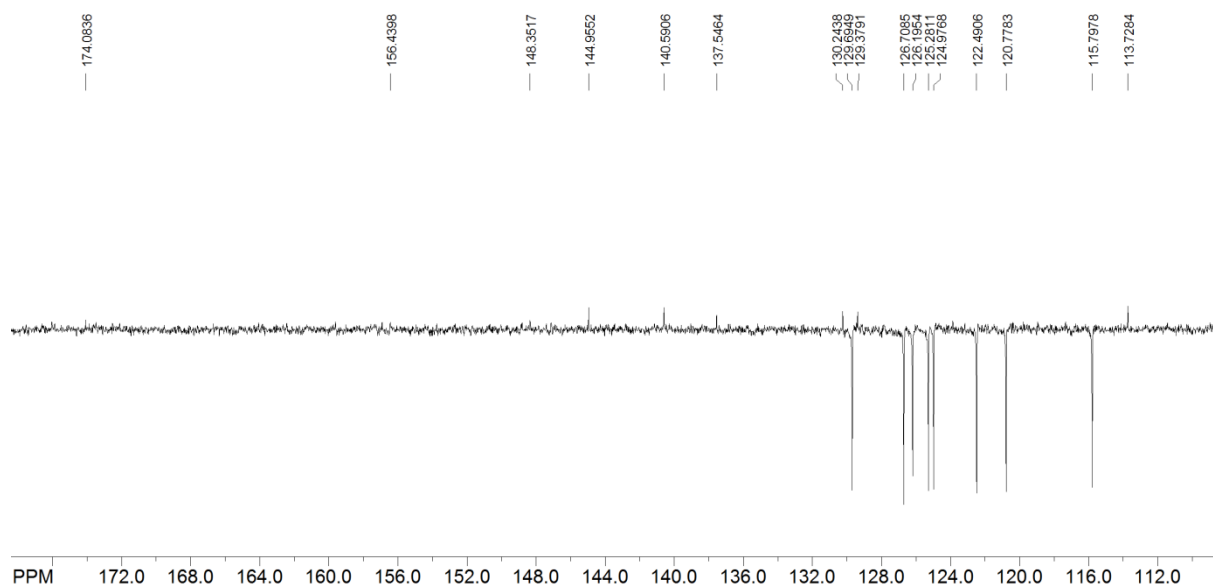
Prilog 1.

a) ^1H NMR spektar spoja 5b) ^{13}C NMR spektar spoja 5

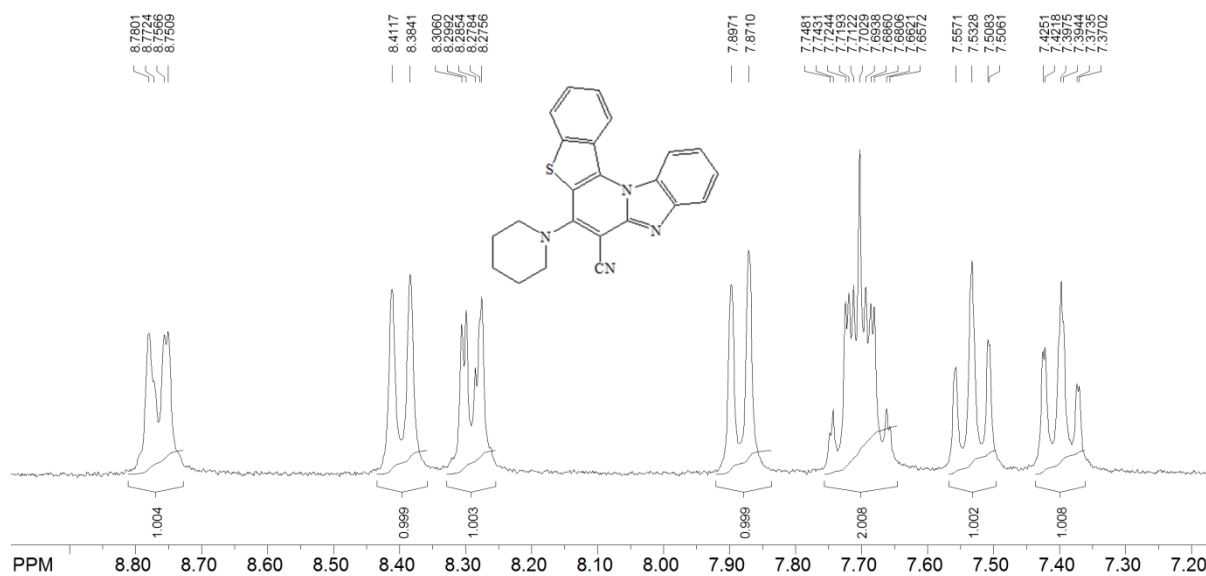
Prilog 2.

a) ^1H NMR spektar spoja 6b) ^{13}C NMR spektar spoja 6

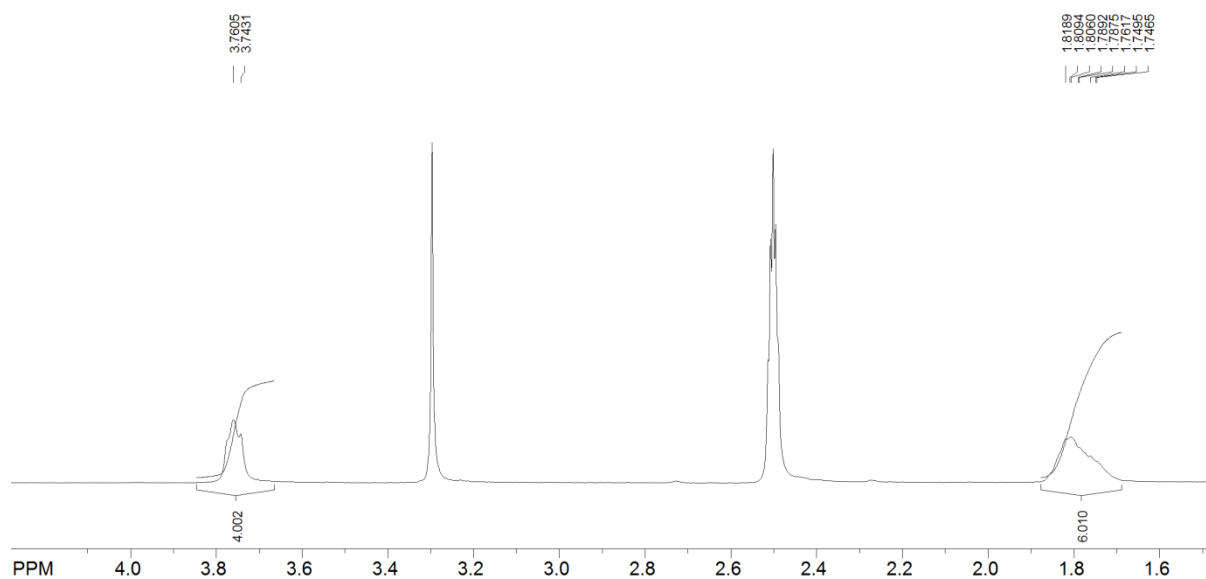
Prilog 3.

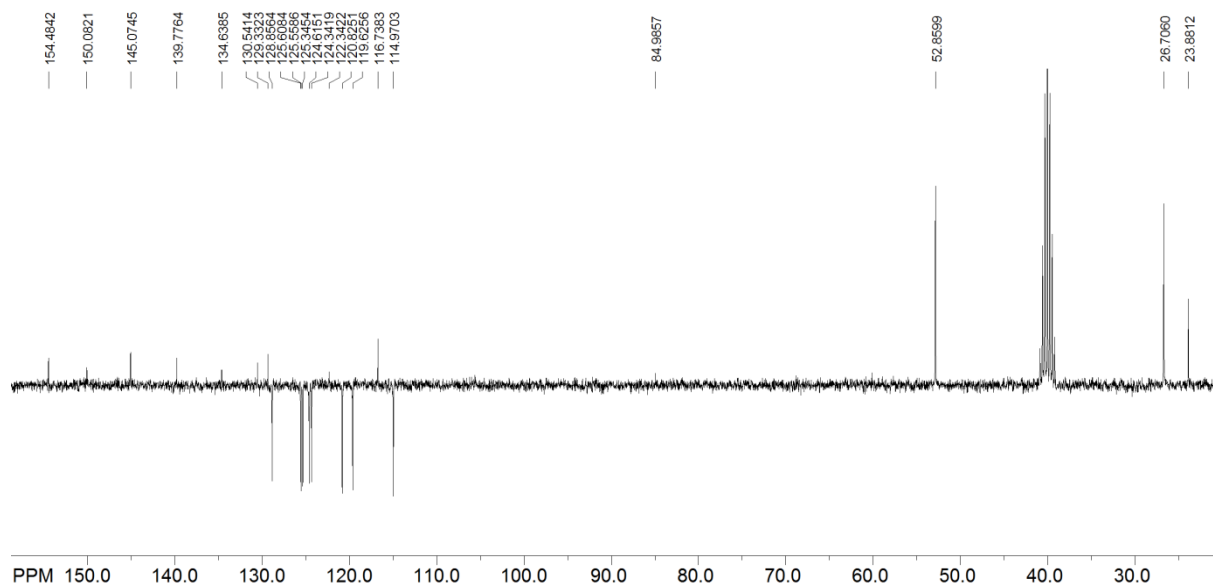
a) ^1H NMR spektar spoja 7b) ^{13}C NMR spektar spoja 7

Prilog 4. Aromatski dio ^1H NMR spektra spoja **8**

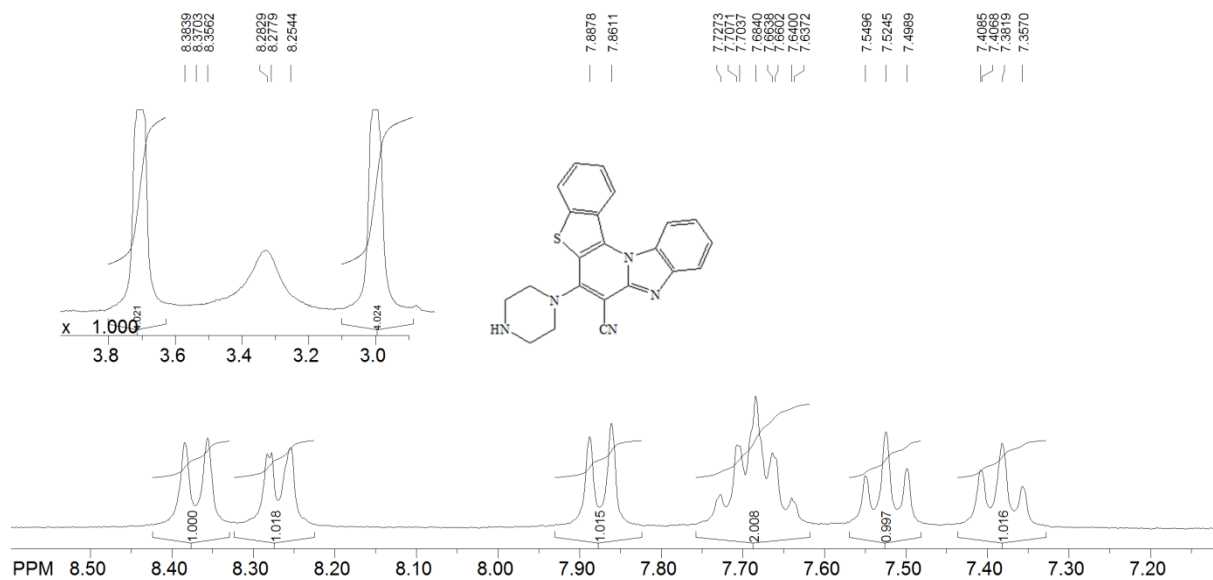


a) Alifatski dio ^1H NMR spektar spoja **8**

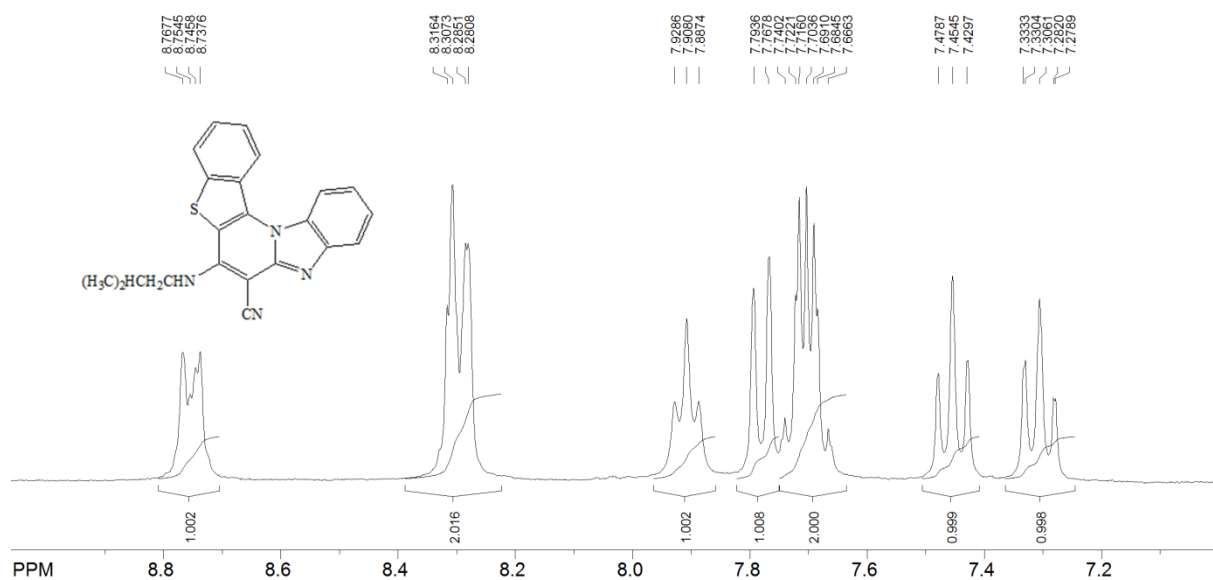
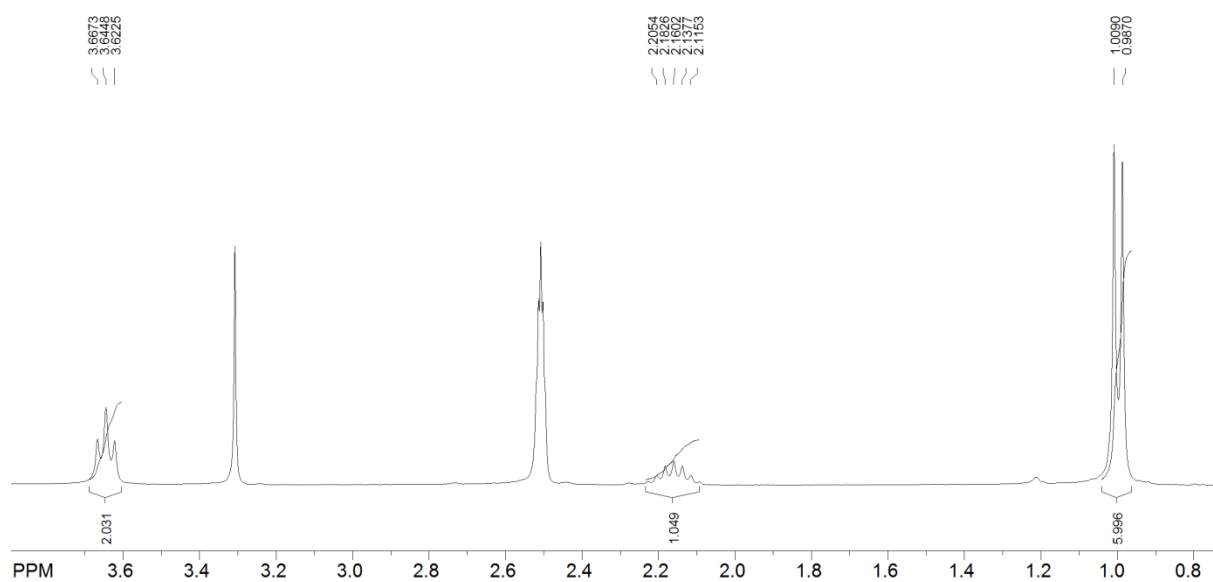


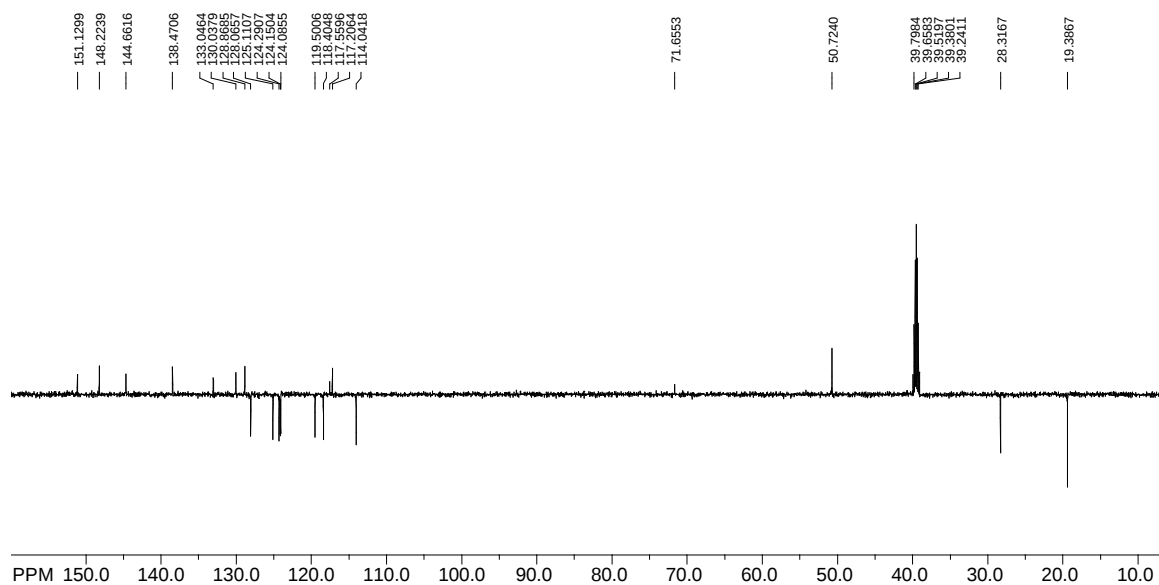
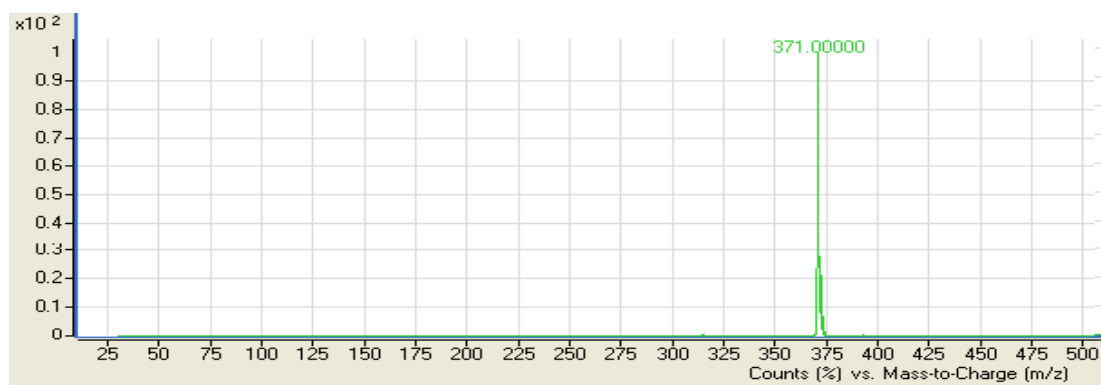
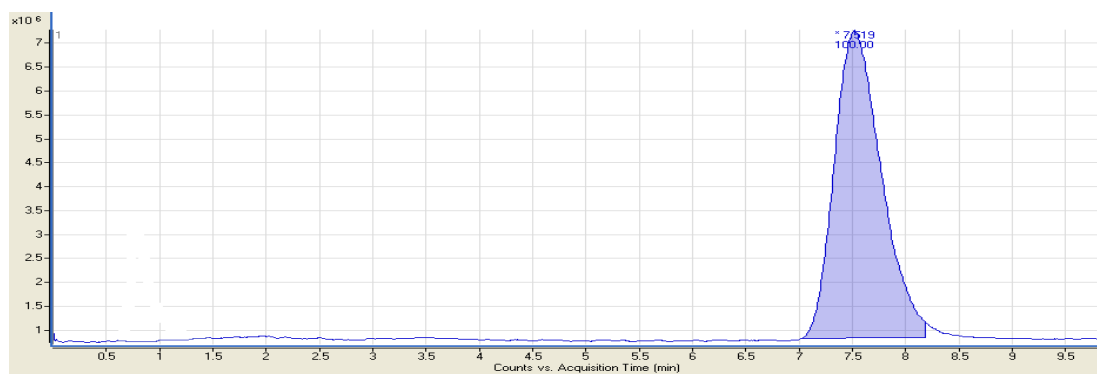
b) ^{13}C NMR spektar spoja **8**

Prilog 5.

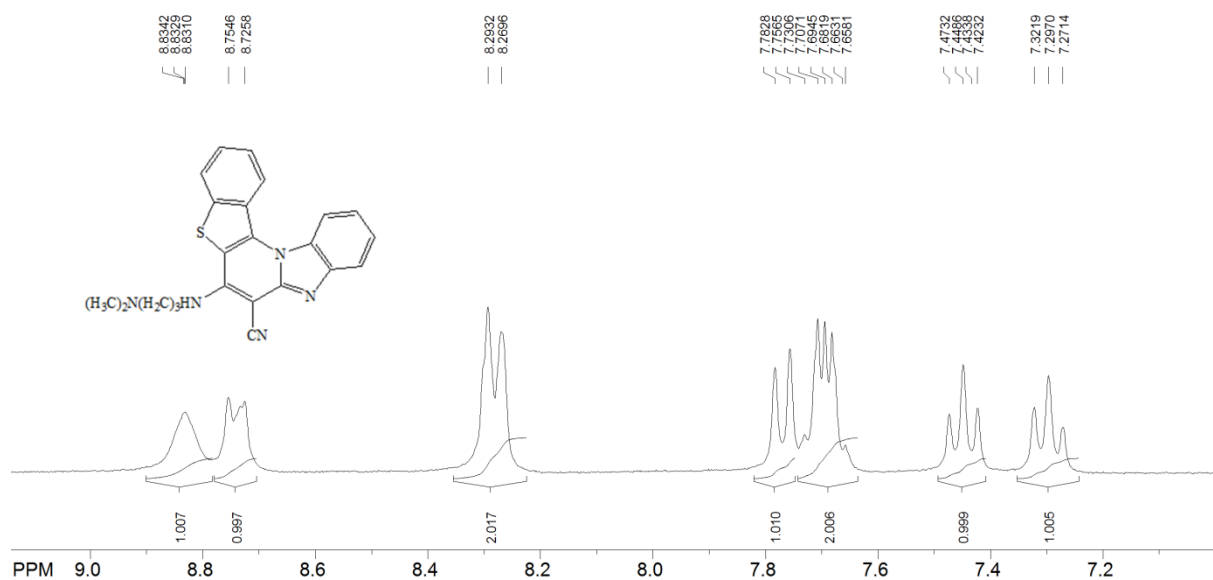
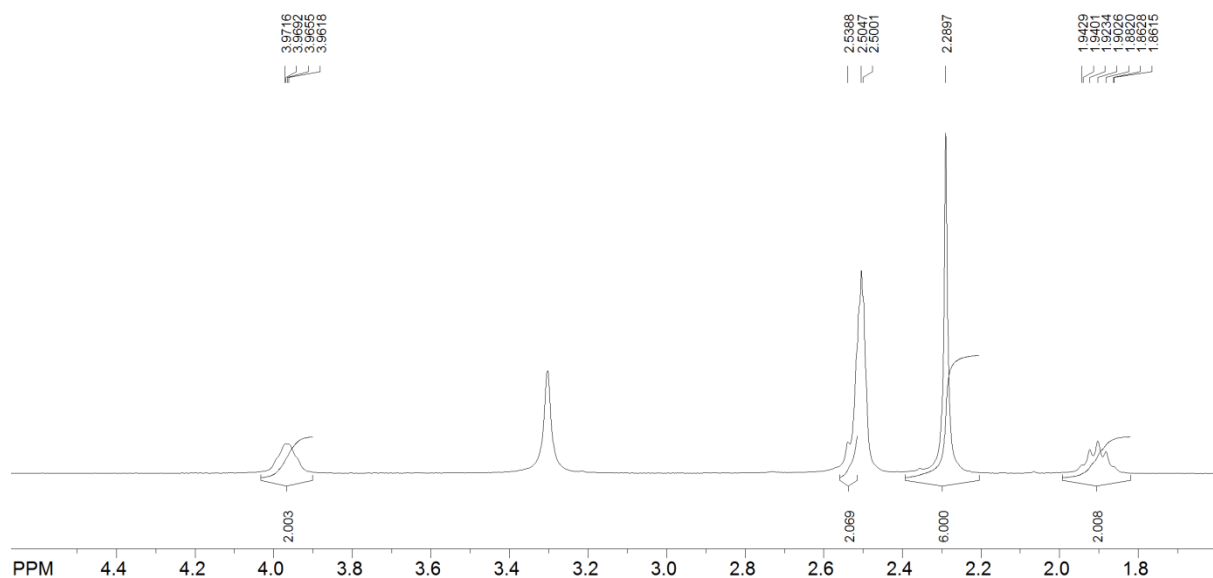
a) ^1H NMR spektar spoja **9**

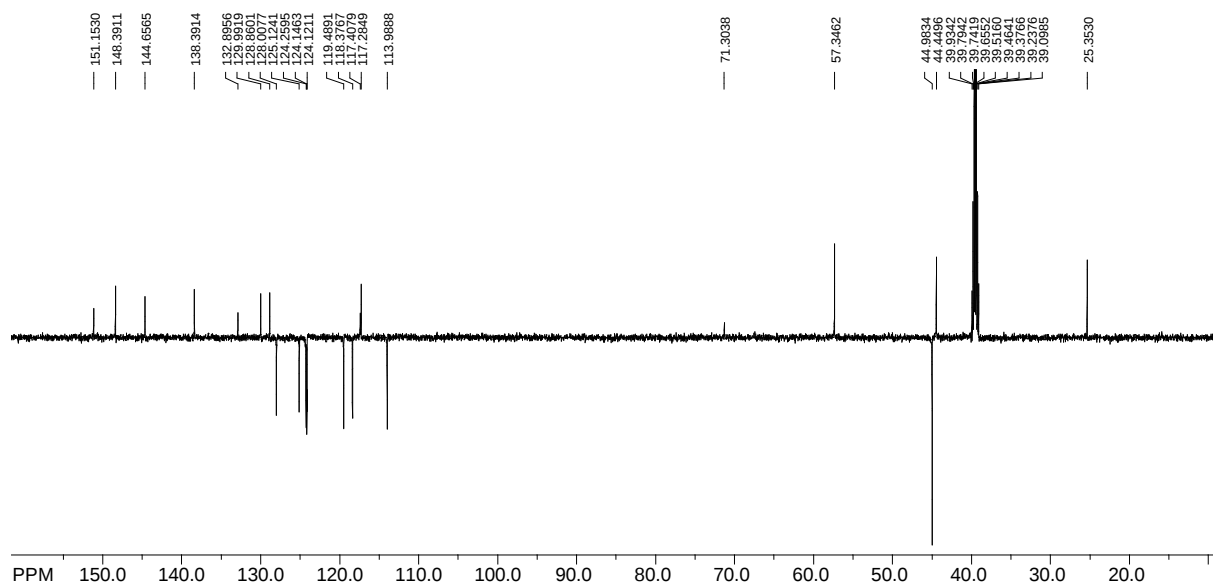
Prilog 6.

a) Aromatski dio ^1H NMR spektra spoja **10**b) Alifatski dio ^1H NMR spektar spoja **10**

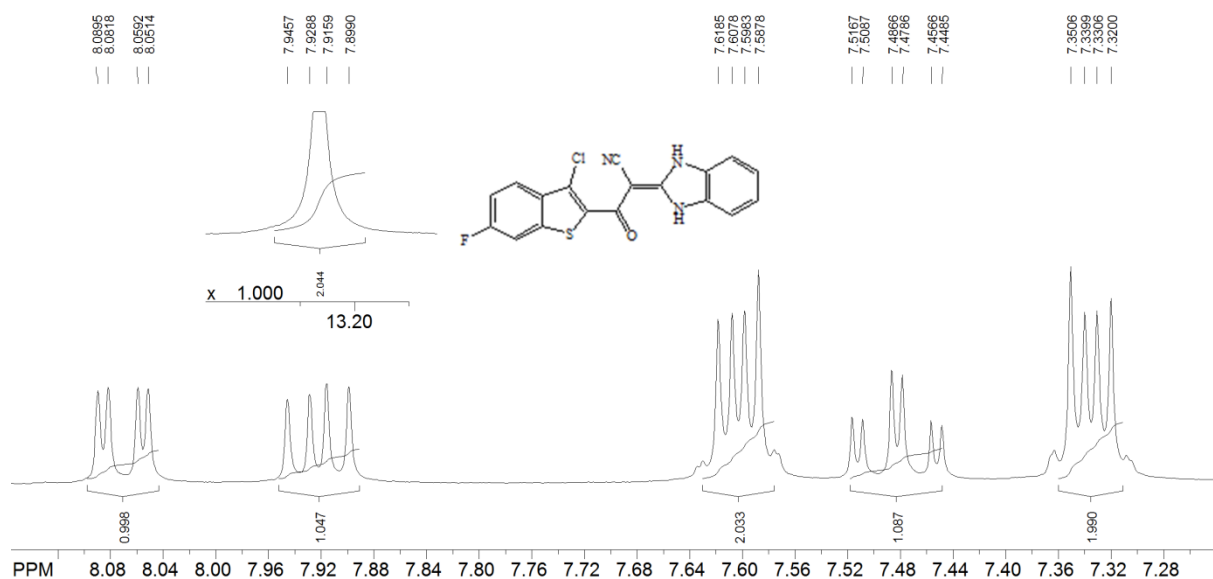
c) ^{13}C NMR spektar spoja **10**d) Kromatogram i MS spektar spoja **10**

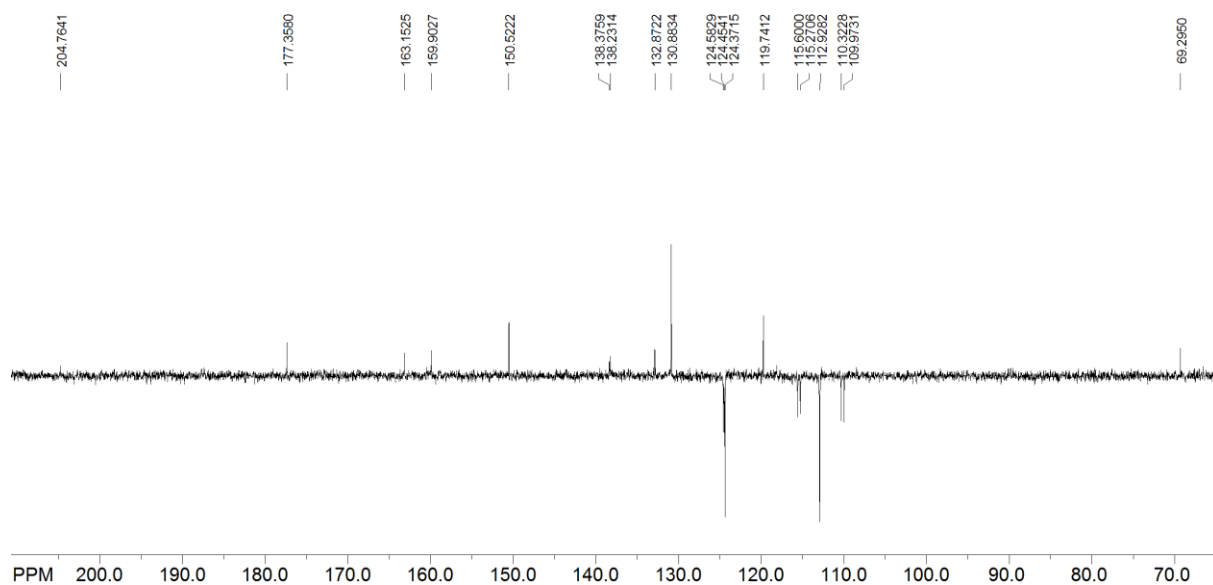
Prilog 7.

a) Aromatski dio ^1H NMR spektra spoja **11**b) Alifatski dio ^1H NMR spektra spoja **11**

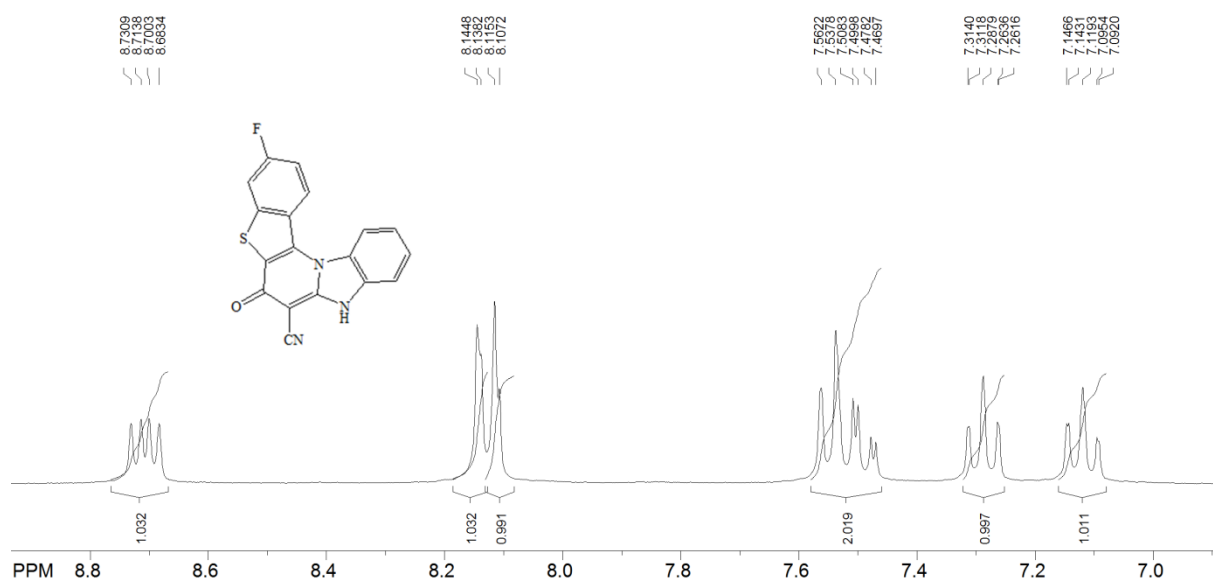
c) ^{13}C NMR spektar spoja **11**

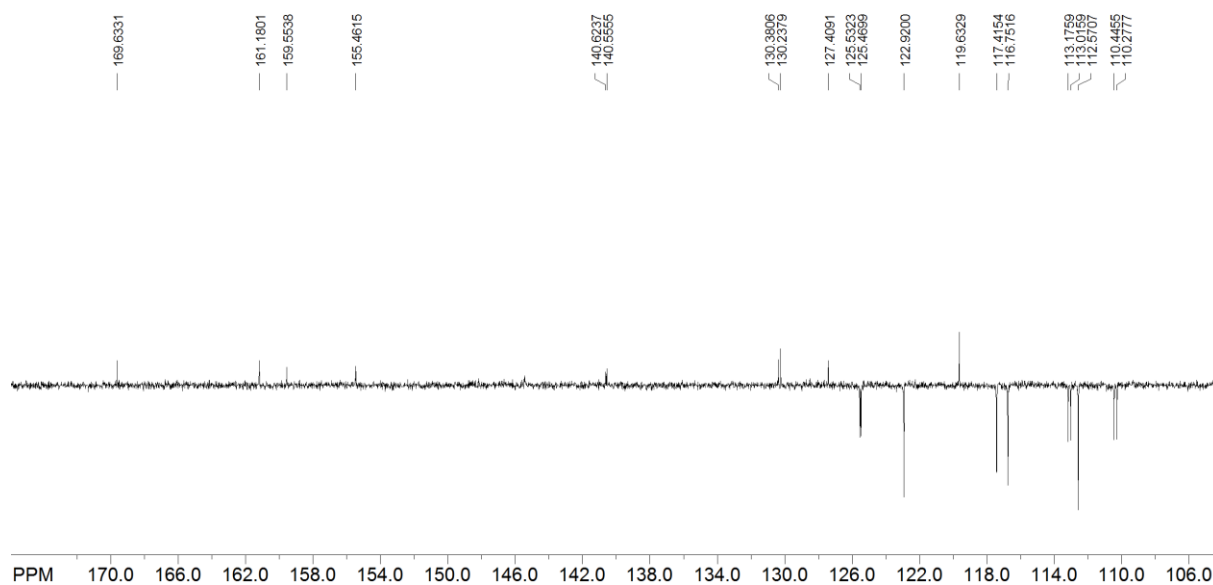
Prilog 8.

a) ^1H NMR spektar spoja **16**

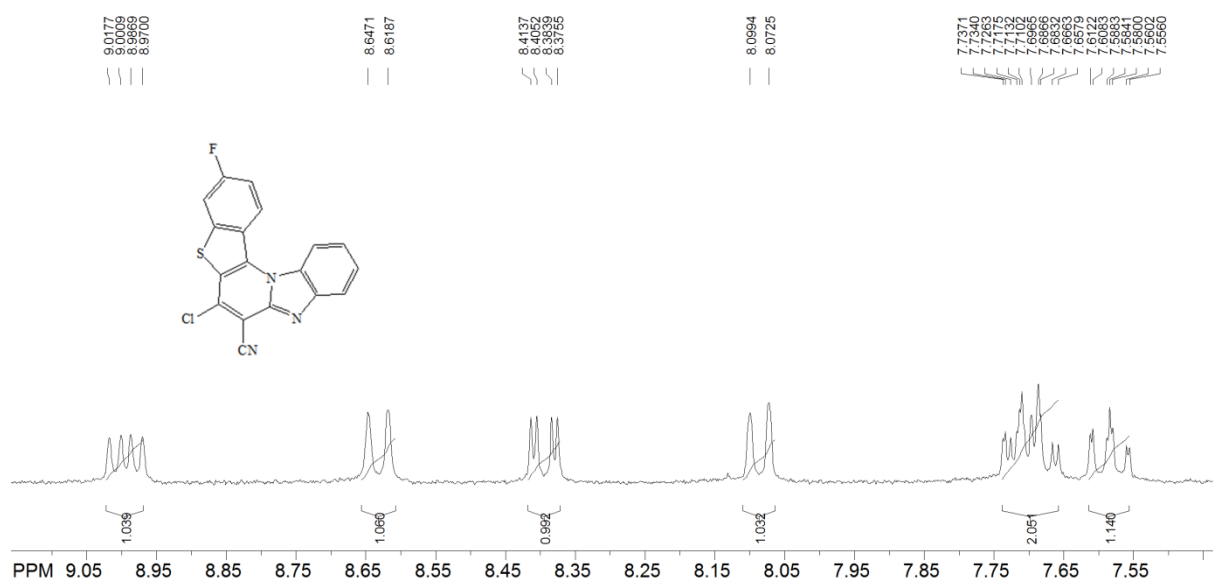
b) ^{13}C NMR spektar spoja **16**

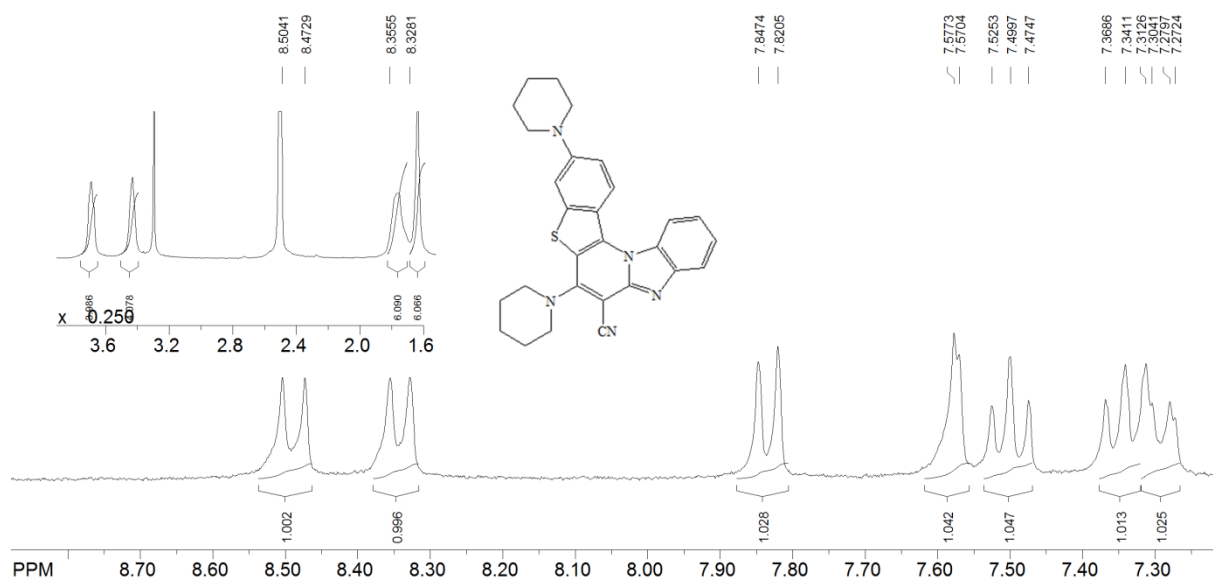
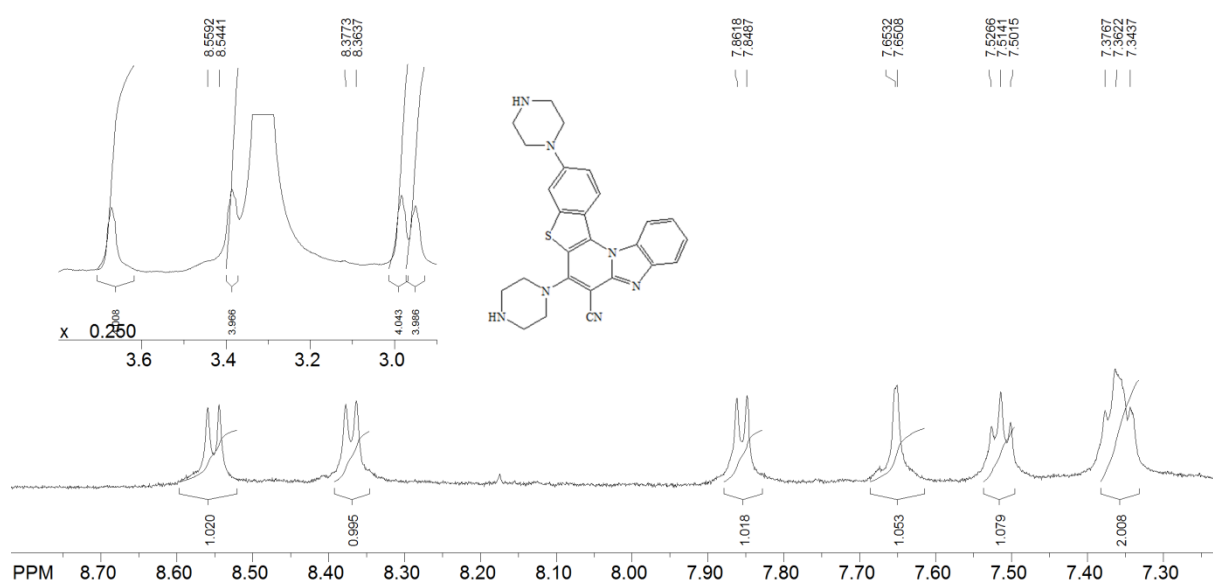
Prilog 9.

a) ^1H NMR spektar spoja **17**

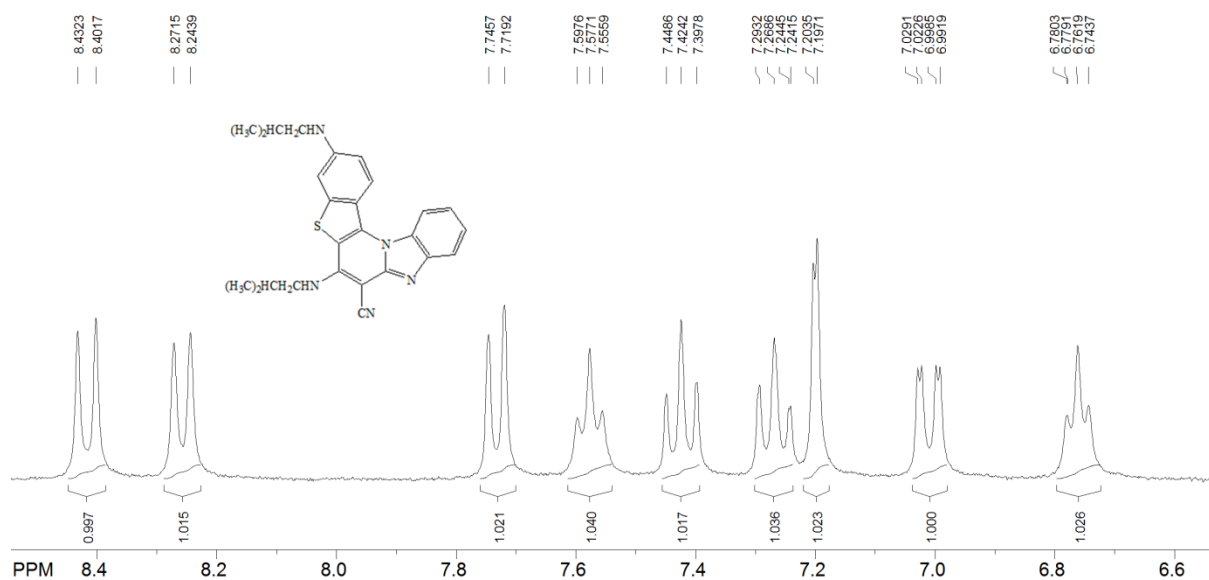
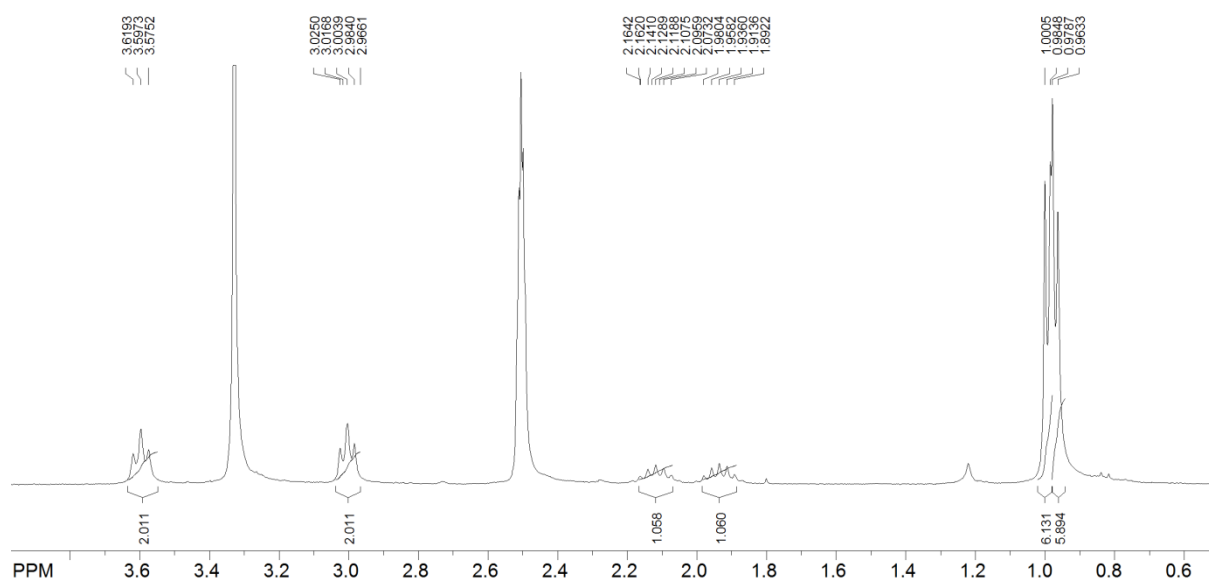
b) ^{13}C NMR spektar spoja **17**

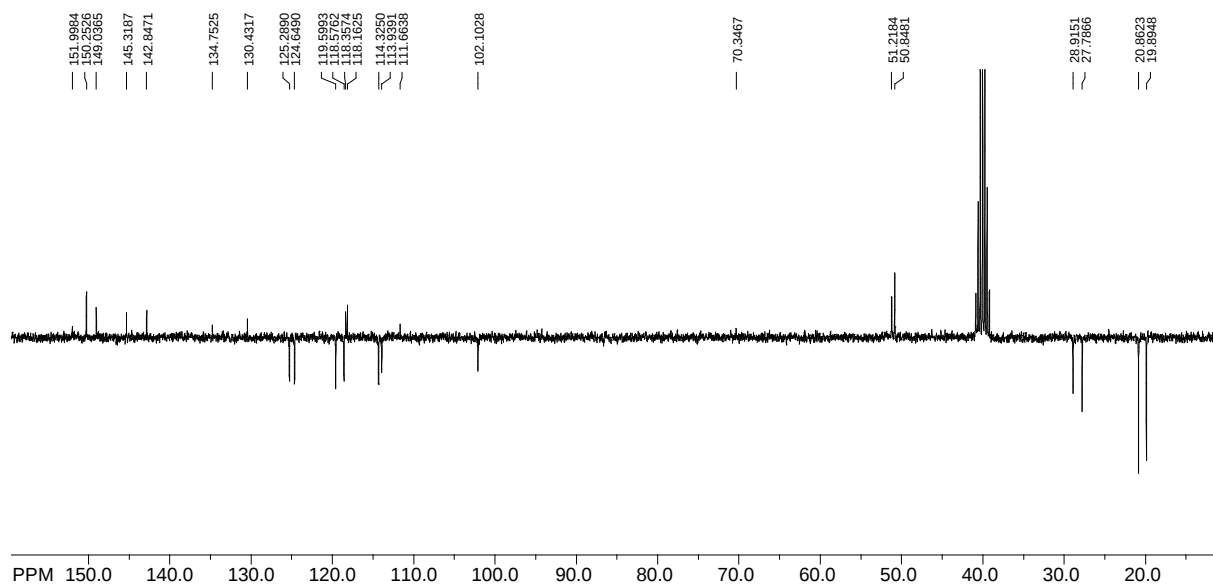
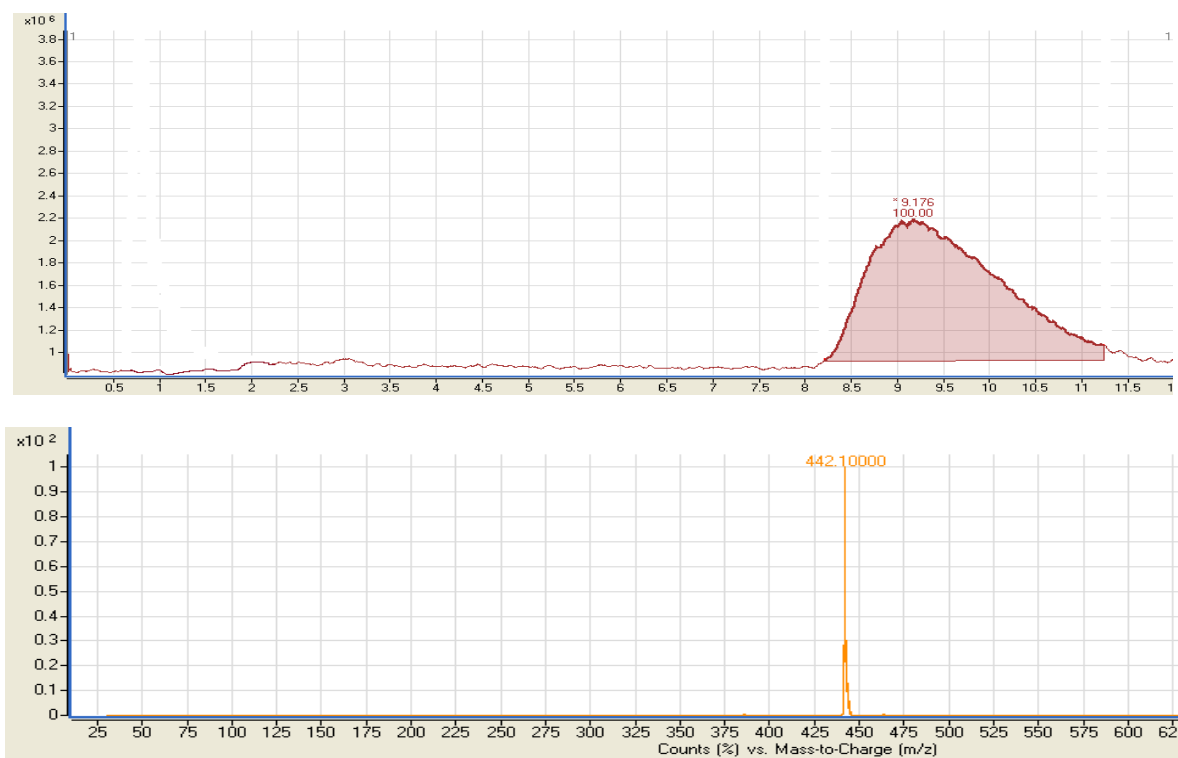
Prilog 10.

a) ^1H NMR spektar spoja **18**

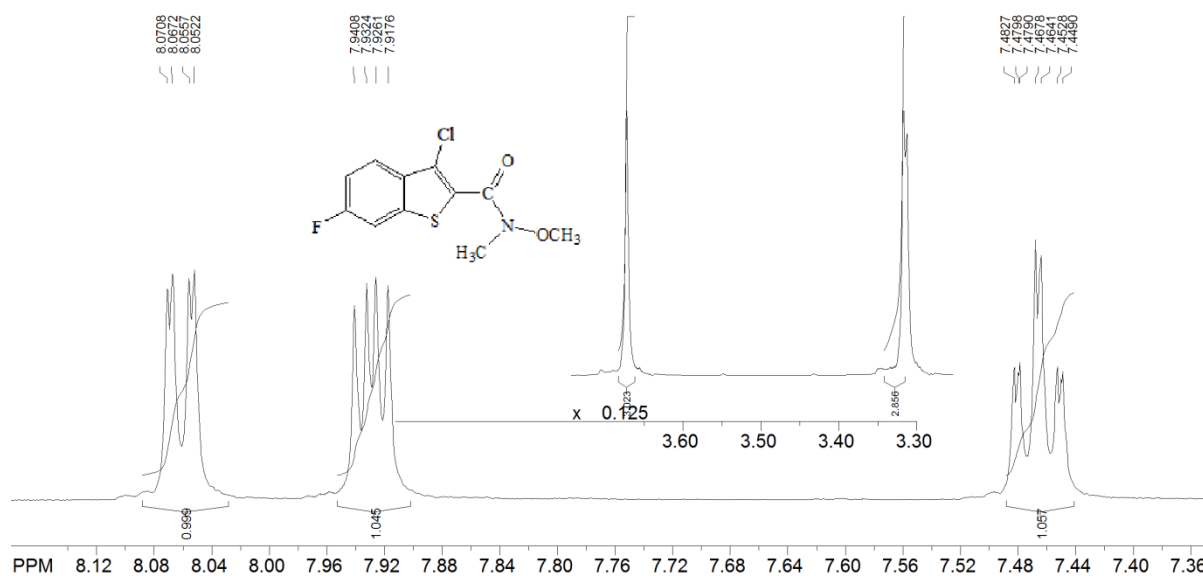
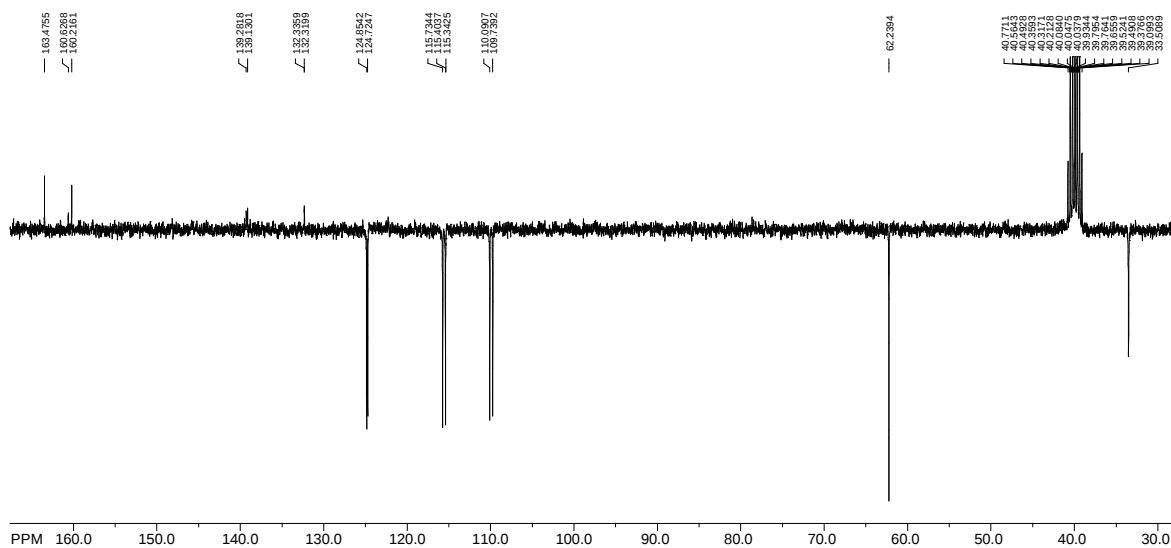
Prilog 11.**a) ^1H NMR spektar spoja 19****Prilog 12.****a) ^1H NMR spektar spoja 20**

Prilog 13.

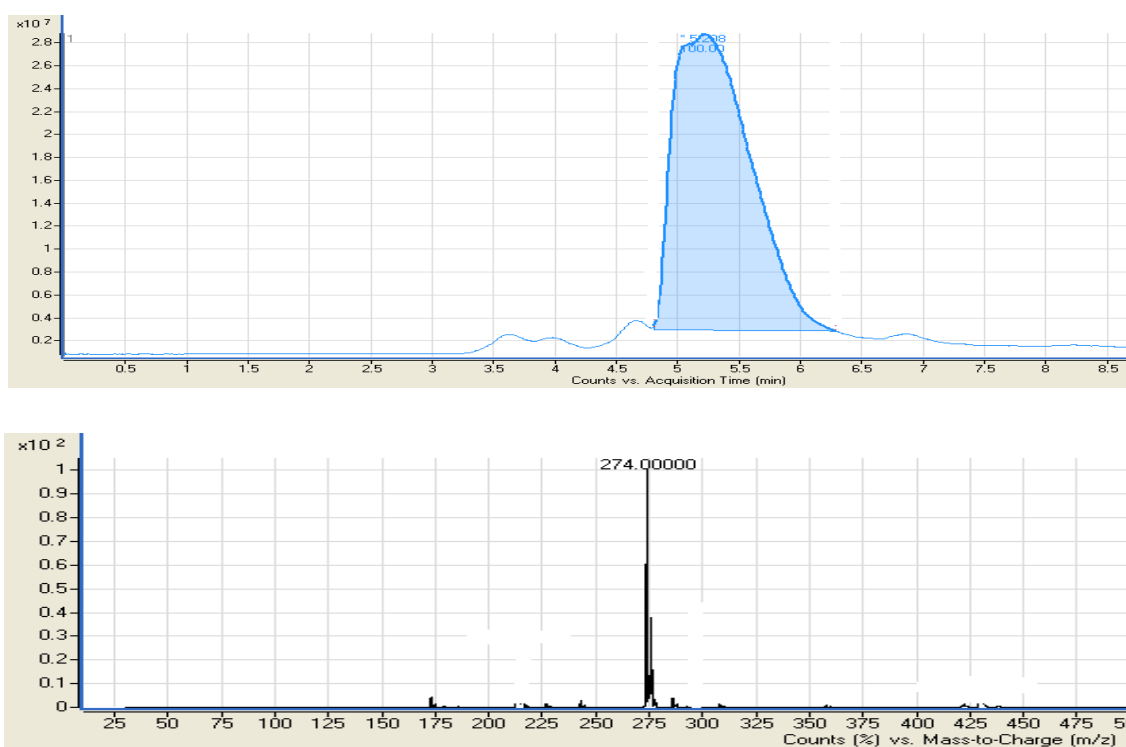
a) Aromatski dio ^1H NMR spektra spoja **21**b) Alifatski dio ^1H NMR spektra spoja **21**

c) ^{13}C NMR spektar spoja **21**d) Kromatogram i MS spektar spoja **21**

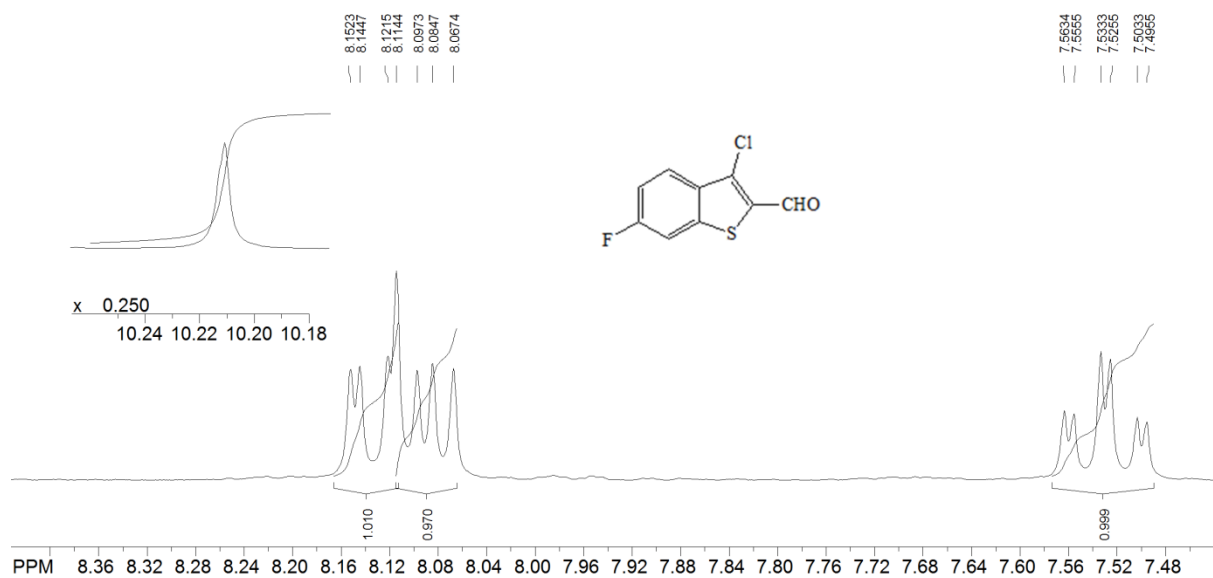
Prilog 14.

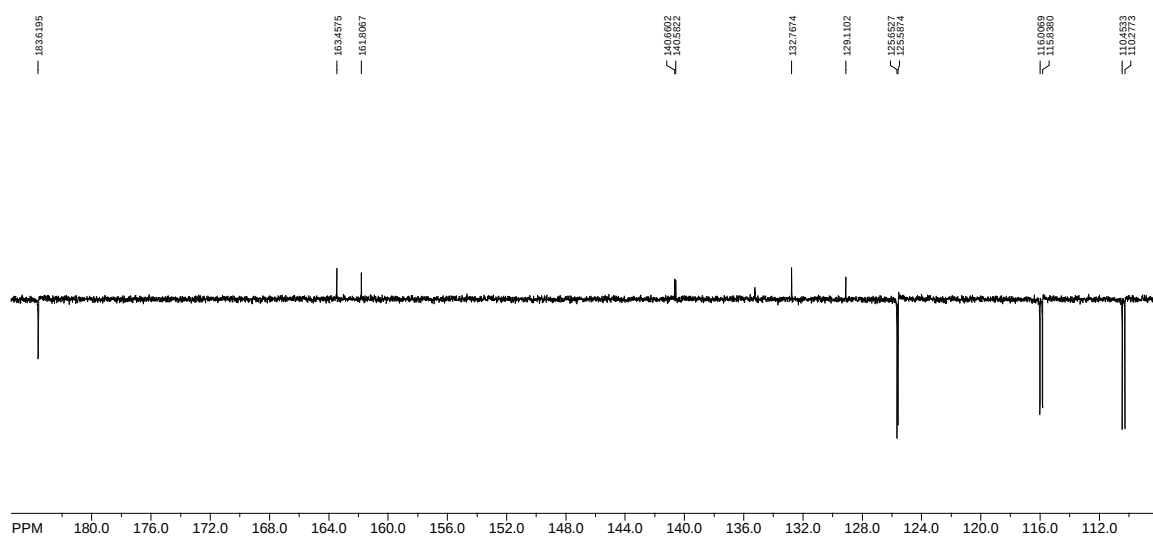
a) ^1H NMR spektar spoja 24b) ^{13}C NMR spektar spoja 24

c) Kromatogram i MS spektar spoja 24

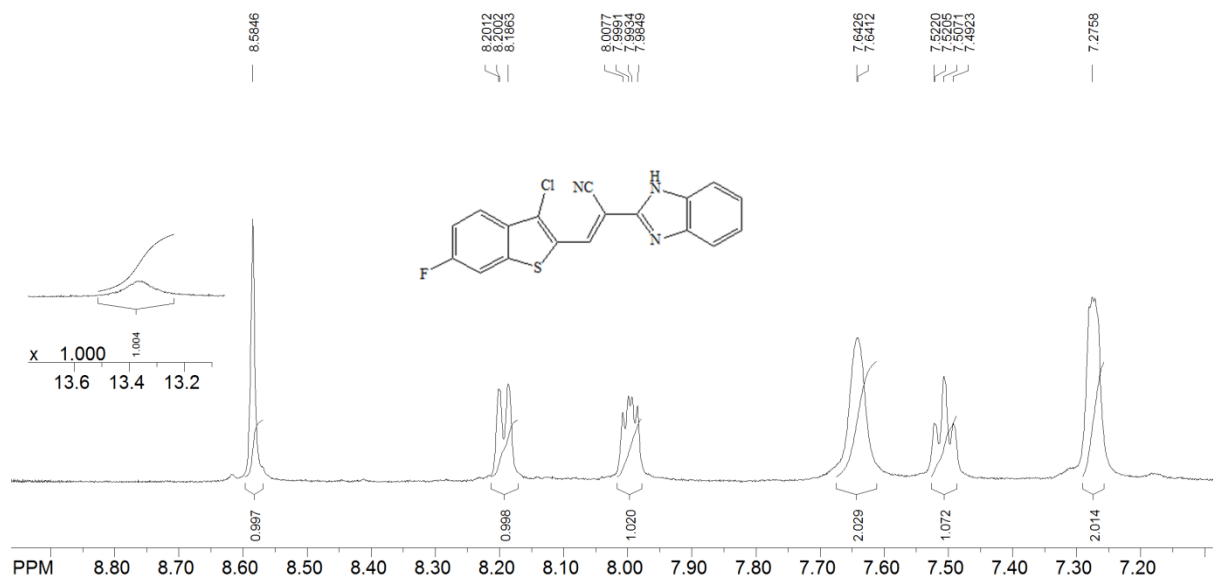


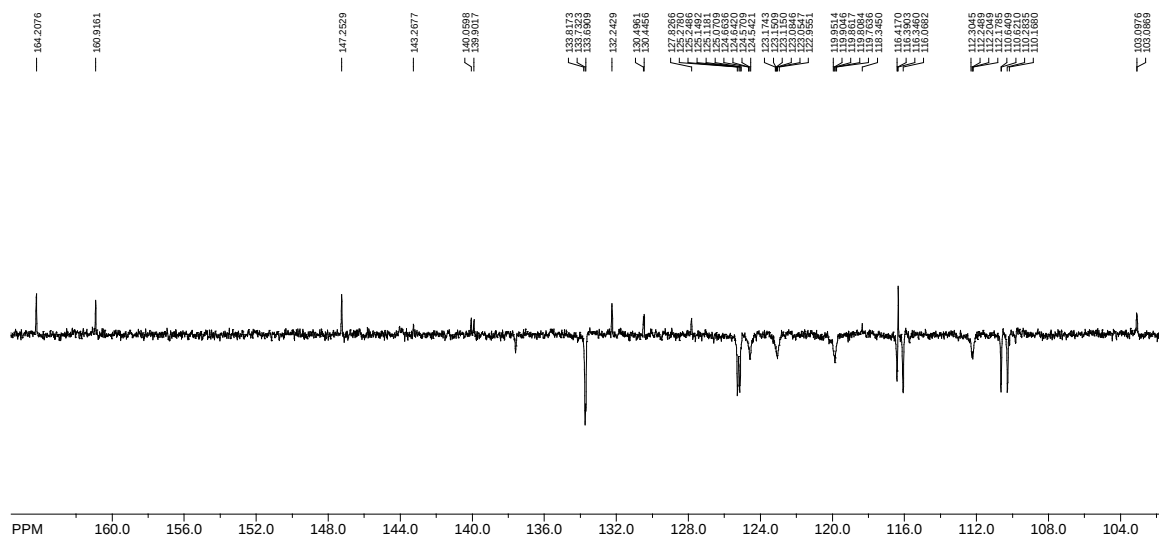
Prilog 15.

a) ^1H NMR spektar spoja 25

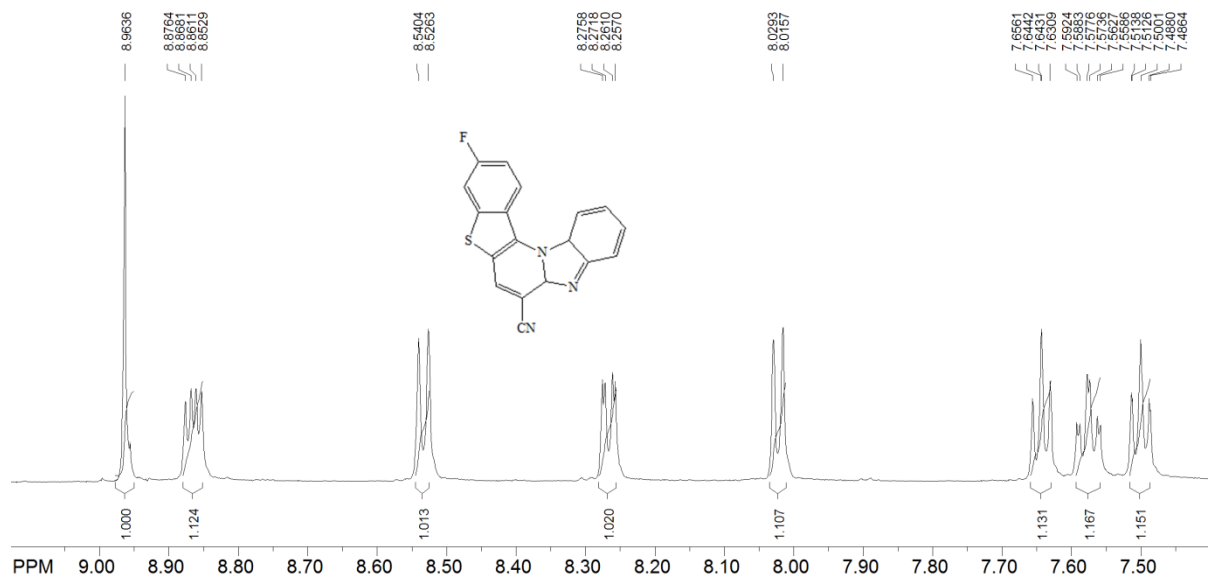
b) ^{13}C NMR spektar spoja 25

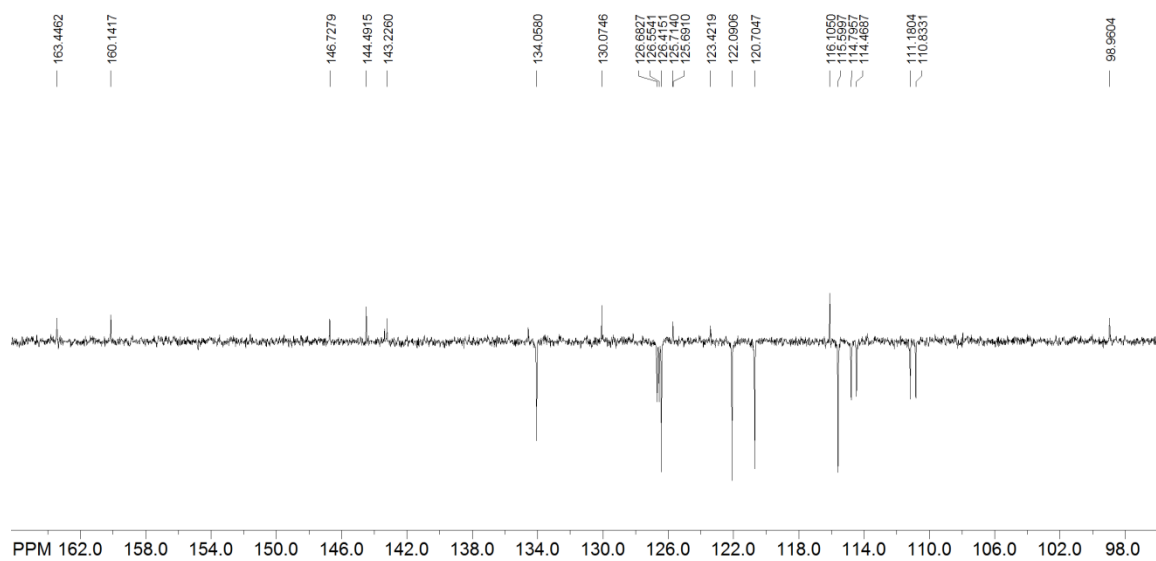
Prilog 16.

a) ^1H NMR spektar spoja 26

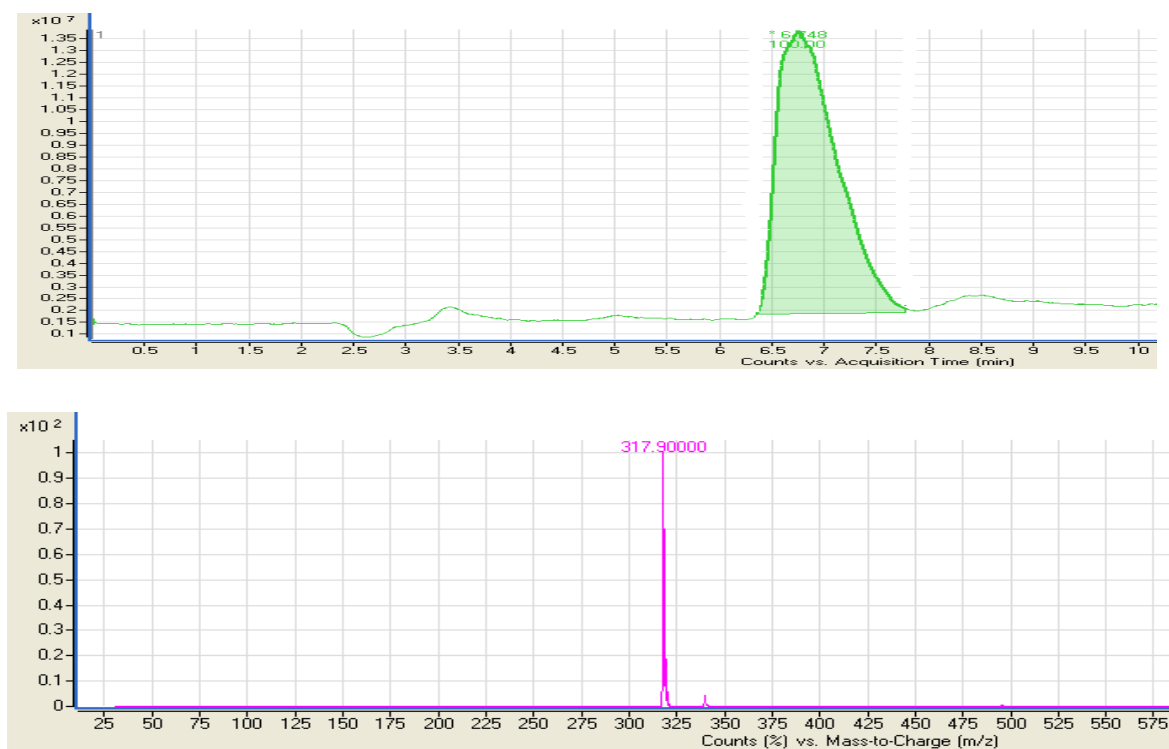
b) ^{13}C NMR spektar spoja 26

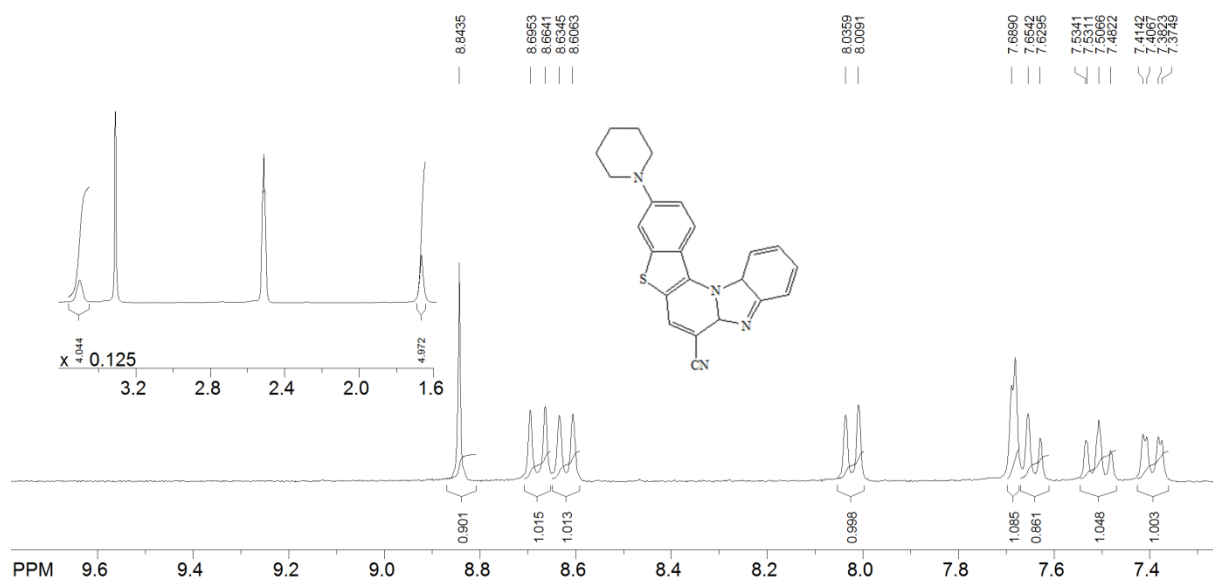
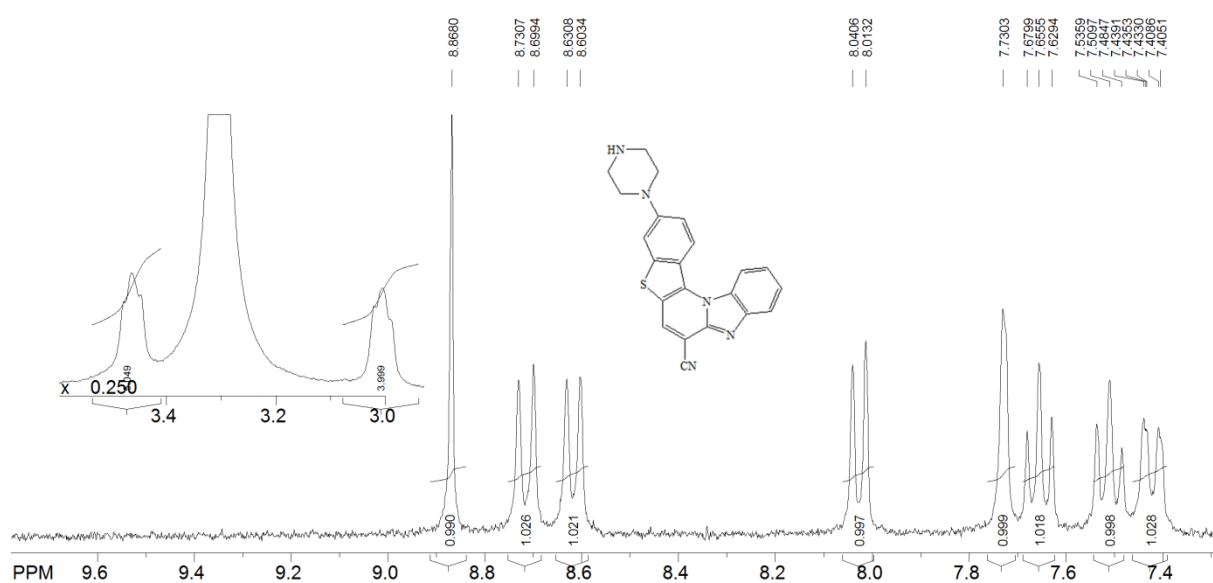
Prilog 17.

a) ^1H NMR spektar spoja 27

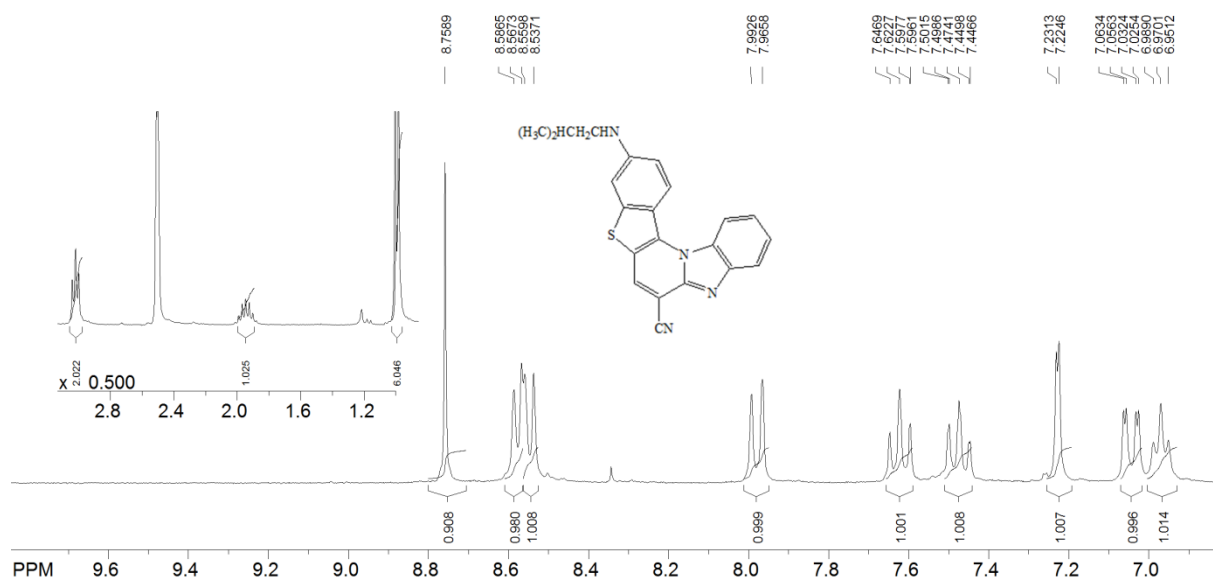
b) ^{13}C NMR spektar spoja 27

c) Kromatogram i maseni spektar spoja 27

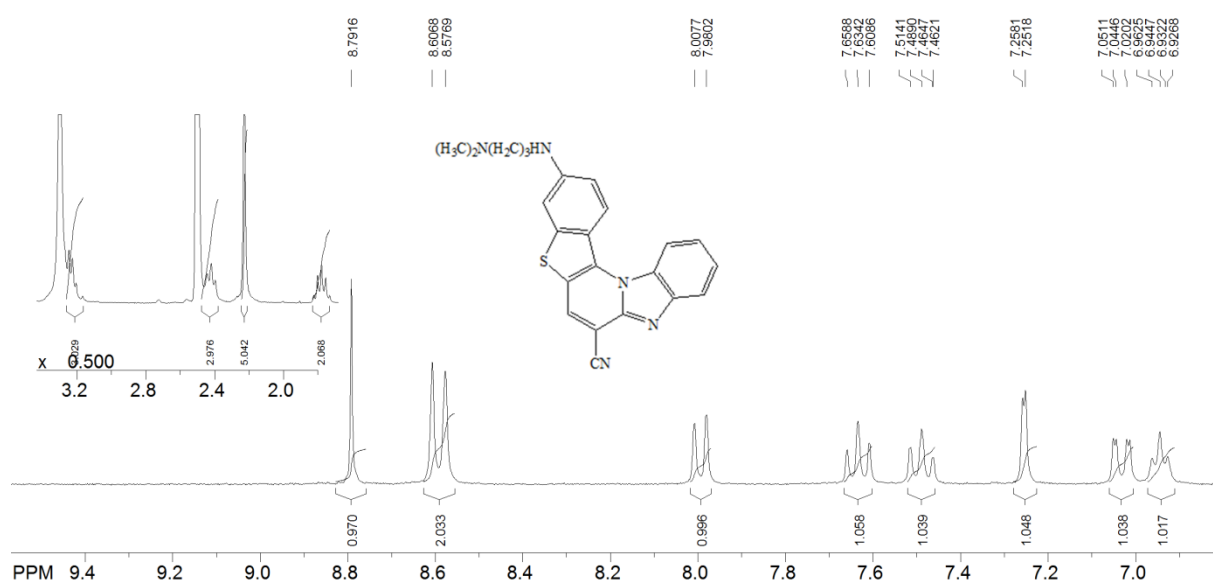


Prilog 18.**a) ^1H NMR spektar spoja 28****Prilog 19.****a) ^1H NMR spektar spoja 29**

Prilog 20.

a) ^1H NMR spektar spoja 30

Prilog 21.

a) ^1H NMR spektar spoja 31

OZNAKE I KRATICE

DMF – *N,N*-dimetilformamid

EDAC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid hidroklorid

Et₃N – trietilamin

HCl_{konc.} – koncentrirana klorovodična kiselina

HOBt – hidroksibenzotriazol hidrat

NMR – nuklearna magnetska rezonancija

PCl₅ – fosforov(V)-klorid

POCl₃ – fosforov oksiklorid

t-KOBu – kalijev *tert*-butoksid

THF – tetrahidrofuran

UV/Vis – ultraljubičasta/vidljiva spektroskopija

ε – molarni ekstincijski koeficijent [dm³ mol⁻¹ cm⁻¹]