

# Novi hidroksi supstituirani derivati benzamida kao potencijalni antioksidansi

---

**Boček, Ida**

**Undergraduate thesis / Završni 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:149:558486>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-20**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ**

**Ida Boček**

**ZAVRŠNI RAD**

**Zagreb, srpanj 2015.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ**

**Ida Boček**

**NOVI HIDROKSI SUPSTITUIRANI DERIVATI BENZAMIDA KAO**  
**POTENCIJALNI ANTIOKSIDANSI**

**ZAVRŠNI RAD**

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

**Članovi ispitnog povjerenstva:**

- 1. dr. sc. Marijana Hranjec, izv. prof. FKIT-a**
- 2. dr. sc. Nataša Perin, poslijedoktorandica FKIT-a**
- 3. dr. sc. Mirjana Novak Stankov, poslijedoktorandica FKIT-a**

**Zagreb, srpanj 2015.**

## SAŽETAK

### NOVI HIDROKSI SUPSTITUIRANI DERIVATI BENZAMIDA KAO POTENCIJALNI ANTIOKSIDANSI

U okviru ovog rada predviđena je sinteza novih hidroksi supstituiranih derivata benzamida kao potencijalnih antioksidansa. Prema ranijim istraživanjima derivati benzamida imaju širok spektar biološkog djelovanja te se i dalje intenzivno istražuju. Za pripravu ciljanih molekula korištene su klasične metode organske sinteze. Višestupnjevitom linearnom sintezom priređeni su odgovarajući prekursori, 2-amino-5-cijanobenzimidazol **6** i 2-amino-6-cijanobenzotiazol **19**. Kondenzacijom 2,4-dimetoksibenzoil-klorida **14** i odgovarajućeg amina priređen je 2,4-dimetoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamid **21**. Nakon djelomično uspješnog uklanjanja zaštitnih skupina, Pinnerovom reakcijom priređen je 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-[6-(2-imidazolinil)-benzotiazol-2-il]benzamid **26**. Tijek Pinnerove reakcije praćen je IR spektroskopijom. Strukture priređenih spojeva potvrđene su  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijom.

**Ključne riječi:** amidi, benzimidazoli, benzotiazoli,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopija, organska sinteza, Pinnerova reakcija

## SUMMARY

### NOVEL HYDROXY SUBSTITUED BENZAMIDE DERIVATIVES AS POTENTIAL ANTIOXIDANS

The aim of this study was the synthesis of novel hydroxy substituted benzamide derivatives as a potential antioxidants. According to previous research, benzamide derivatives have a broad spectrum of biological activities and therefore are a subject of intensive scientific research. Classical organic chemistry methods were used for preparation of targeted compounds. Required precursors, 2-amino-5-cyanobenzimidazole **6** i 2-amino-6-cyanobenzothiazole **19** were prepared by using multi-step linear synthesis. In the condensation of 2,4-dimethoxybenzoyl-chloride **14** and corresponding amine, 2,4-dimethoxy-*N*-(6-cyanobenzothiazol-2-yl)benzamide **21** was prepared. After the partial successful removal of protection groups, 2-hydroxy-4-methoxy-*N*-[6-(2-imidazolyl)-benzothiazol-2-yl]benzamide **26** was prepared in the Pinner reaction. The Pinner reaction was monitored by IR spectroscopy. The structures of all newly prepared compounds were confirmed by means of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy.

**Key words:** amides, benzimidazoles, benzothiazoles,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy, organic synthesis, Pinner reaction

*Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Marijani Hranjec, mentorici, na predloženoj temi, predanosti u ispravljanju ovog rada u svim etapama njegovog nastanka te na stručnoj potpori i strpljenju.*

*Zahvaljujem dr. sc. Ireni Sović, neposrednoj voditeljici, na velikoj pomoći, susretljivosti i korisnim savjetima koje mi je pružila tijekom izrade i pisanja ovog rada.*

*Posebno zahvaljujem svojoj obitelji na bezuvjetnoj potpori tijekom čitavog mog školovanja.*

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO.....	3
2.1. Općenito o amidnoj vezi.....	4
2.2. Strategije formiranja amidne veze.....	4
2.3. Biološki aktivni derivati galne kiseline .....	8
3. REZULTATI I RASPRAVA .....	20
3.1. Ciljevi rada .....	21
3.1. Sinteza priređenih spojeva.....	22
4. EKSPERIMENTALNI DIO.....	36
4. 1. Opće napomene .....	37
4.2. Priprava 6-supstituiranih 2-aminobenzimidazola .....	38
4.3. Priprava 6-supstituiranih 2-aminobenzotiazola .....	42
4.5. Priprava hidroksi supstituiranih amida .....	46
5. ZAKLJUČAK .....	49
6. LITERATURA.....	51
7. PRILOZI.....	54
8. ŽIVOTOPIS .....	69

# **1. UVOD**

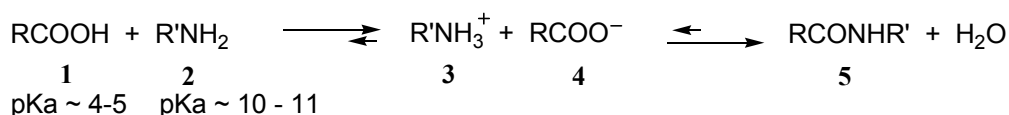


Amidna skupina jedna je od najvažnijih strukturnih jedinica prirodnih i sintetskih organskih spojeva poput proteina, polimera, pesticida ili farmaceutika. Na važnost i zastupljenost amidne veze upućuje podatak da se nalazi u strukturi 25% svih farmaceutika prisutnih na tržištu i u strukturi 2/3 svih potencijalnih biološki aktivnih organskih spojeva.<sup>1</sup> Objašnjenje zašto su amidi toliko zastupljeni u farmaceutskoj industriji leži u činjenici da su karboksamidi neutralni stabilni organski spojevi koji imaju akceptorska i donorska svojstva. Procjena je da 16% svih reakcija u sintezi modernih farmaceutika čine reakcije aciliranja amina čime one postaju najzastupljenije reakcije u farmaceutskoj industriji.<sup>2</sup> Sintetski polimeri povezani amidnom vezom imaju vrlo široku primjenu, od materijala poput najlona do napredne distribucije lijekova unutar organizma.<sup>3</sup> Amidna (peptidna) veza ima ključnu ulogu u živim organizmima. Osim što se njome povezuju aminokiseline u peptide i izgrađuju proteine, imaju značajnu ulogu u enzimskoj katalizi budući da su gotovo svi enzimi proteini. Važnost amidne veze najbolje prikazuje zastupljenost u živom organizmu čovjeka jer kroz hemoglobin omogućava prijenos kisika, antitijelima sudjeluje u imunološkom odgovoru a kroz kolagen daje mehaničku čvrstoću tkivima.

## **2. OPĆI DIO**

## 2.1. Općenito o amidnoj vezi

Amidna veza nastaje kondenzacijom karboksilne kiseline ili njezinih derivata i amina uz izlazak jedne molekule vode. U živim organizmima stvaranje amidne veze pri sintezi proteina odvija se preko selektivnog aktivacijskog procesa kataliziranog enzimima pri čemu se određena aminokiselina prevodi u intermedijerni amino ester.



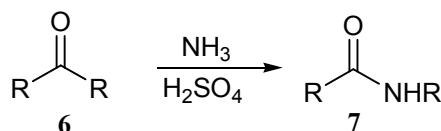
Shema 1. Stvaranje amidne veze

Pri sintezi amidne veze problem su kompetitivne kiselo-bazne reakcije koje se događaju u smjesi amina i karboksilnih kiselina. Direktno stvaranje veze između amina i karboksilnih kiselina zahtjeva mnogo energije i moguće je samo u vrlo žestokim uvjetima uz vrlo nisko iskorištenje.<sup>4</sup> Ukoliko se reakcija provodi s reagensom ili katalizatorom za stvaranje amidne veze, reakcijski uvjeti su blaži ali na jednu molekulu produkta dolazi do stvaranja barem jednog ekvivalenta nusprodukata što vodi također niskom iskorištenju reakcije. Uklanjanje nusprodukata zahtjevan je i skup proces zbog cijene i toksičnosti samog reagensa. Zbog navedenih problema, kao i važnosti amidne veze u farmaceutskoj industriji, problematika katalitičkog stvaranja amidne veze bez nusprodukata danas je područje brojnih istraživanja.<sup>5</sup>

## 2.2. Strategije formiranja amidne veze

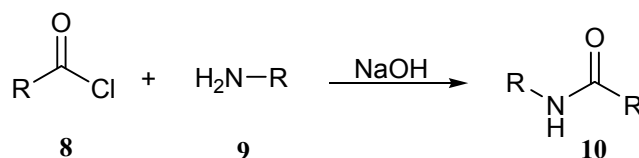
Za sintezu amidne veze danas je poznat veliki broj različitih sintetskih metoda. Neke od najvažnijih sintetskih metoda su:

**Schmidtova reakcija** - kiselo katalizirana reakcija azida i elektrofilnih karbonilnih spojeva



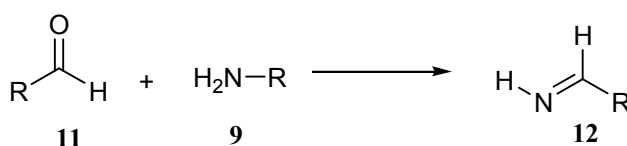
Shema 2. Schmidtova reakcija

**Schotten – Baumannova reakcija** - dodatkom baze stvara se ravnoteža pogodna za nastanak amida iz amina i acil klorida



**Shema 3. Schotten – Baumannova reakcija**

**Ugijeva reakcija** - kondenzacija aldehida, amina, karboksilne kiseline i izocijanata koja rezultira stvaranjem raznih  $\alpha$ -aminoacil amidnih derivata koji imaju važnu primjenu u farmaceutskoj industriji



**Shema 4. Ugijeva reakcija**

Razvijeno je mnogo metoda formiranja amidne veze amida koje za reaktante koriste alkohole, aldehide, nitrile i aril halogenide. Iako bi za sintezu peptida bile vrlo vrijedne, reakcije u kojima su početni reaktanti karboksilne kiseline, vrlo su rijetke. Direktnu kondenzaciju soli moguće je ostvariti pri visokim temperaturama (160-180°C) koje pritom nepovoljno djeluju na druge funkcionalne skupine. Taj problem djelomično je riješen aktivacijom karboksilne skupine kiseline u acil-klorid. Aktivacija se sastoji od zamjene hidroksilne skupine karboksilne kiseline s odlazećom skupinom jer bi u protivnom kiselina reagirala s aminom tvoreći sol.

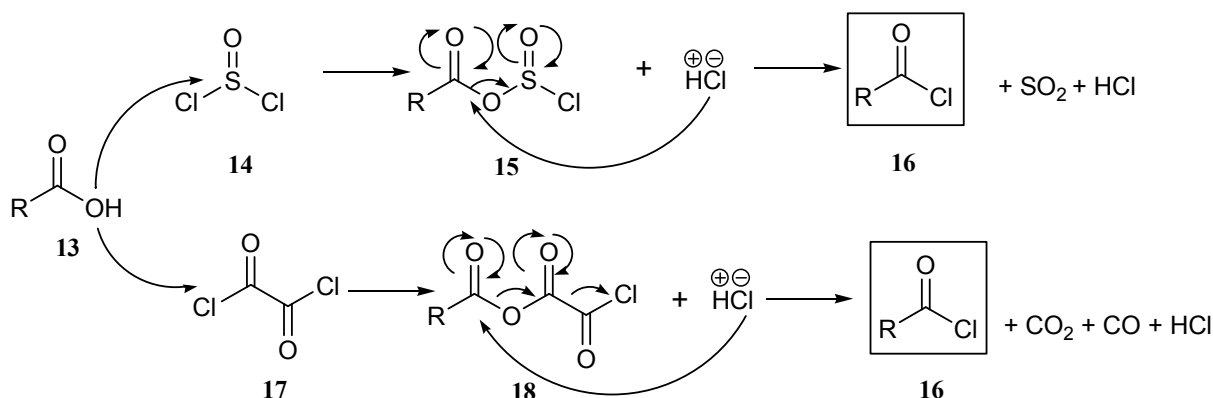
Karboksilne kiseline moguće je aktivirati prevođenjem u acilne halogenide, acilne azide, acilimidazole, anhidride, estere i druge spojeve s dobrim odlazećim skupinama. Postoje razni načini kondenzacije reaktivnog derivata karboksilne kiseline s aminom:

- intermedijerni acilirajući agens formira se i izolira te podliježe reakciji s aminom
- reaktivni acilirajući agens se formira iz kiseline u nekoliko odvojenih koraka nakon čega slijedi trenutno tretiranje s aminom
- acilirajući agens generira se u realnom vremenu iz kiseline uz prisutnost amina i dodatak reagensa za povezivanje

Budući da formiranje amidne veze nailazi na probleme niskih iskorištenja, racemizacije, odcjepljivanja i teškoća pri pročišćavanju, bilo je potrebno odabrati metode i blage reagense za povezivanje koji će rezultirati ne samo boljim iskorištenjima već i spriječiti racemizaciju na susjednim kiralnim centrima.

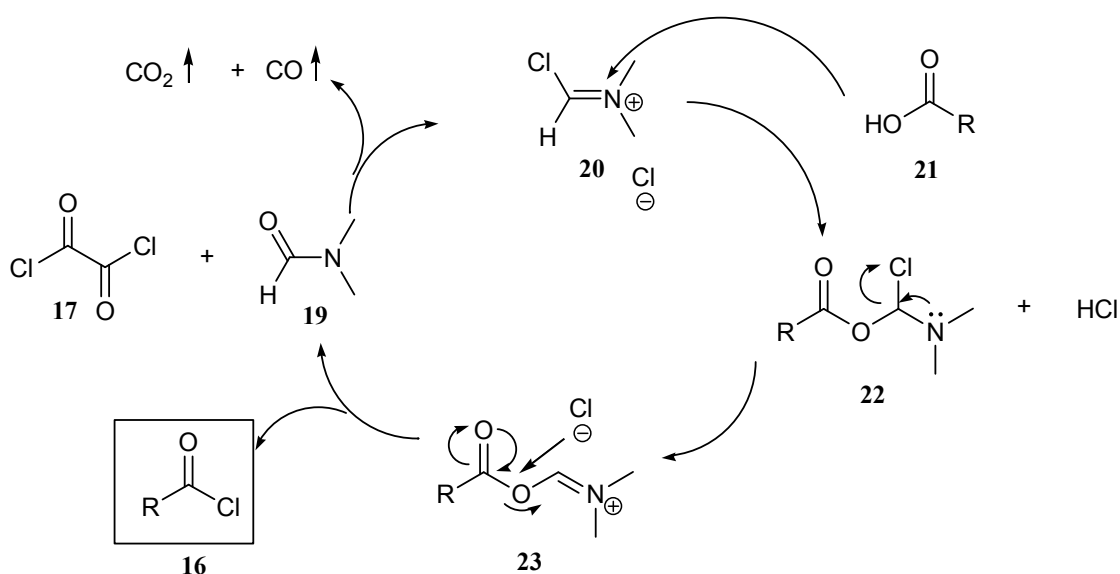
### 2.2.1. Reakcije povezivanja s acil kloridima

Tionil-klorid ( $\text{SOCl}_2$ ), oksalil-klorid ( $\text{COCl}_2$ ), fosfor-triklorid ( $\text{PCl}_3$ ), fosforoksi-klorid ( $\text{POCl}_3$ ) i fosfor-pentaklorid ( $\text{PCl}_5$ ) uobičajena su sredstva za pripremu acil-klorida iz odgovarajućih karboksilnih kiselina.  $\text{PCl}_5$  uglavnom se koristi za aromatske kiseline koje imaju elektron odvlačeće supstituente jer ne reagiraju dobro s  $\text{SOCl}_2$ . Na Shemi 5 prikazan je mehanizam sinteze kiselinskog klorida koristeći  $\text{SOCl}_2$  i  $(\text{COCl})_2$ . Važno je napomenuti da upotreba  $(\text{COCl})_2$  rezultira s 2 molekule plina od kojih je jedna CO što predstavlja sigurnosni i kemijski rizik te je potrebno odvagati prednosti i moguće posljedice reakcije.



Shema 5. Mehanizam stvaranja acil-klorida korištenjem tionil- i oksalil-klorida

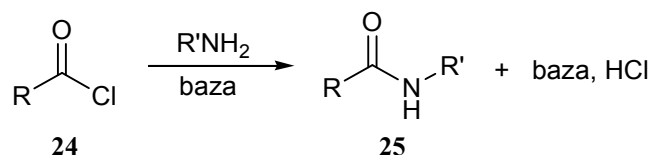
Reakcije su često potpomognute uz kap *N,N*-dimetilformamida (DMF) čija je katalitička uloga prikazana na Shemi 6.



Shema 6. Katalitičko djelovanje DMF

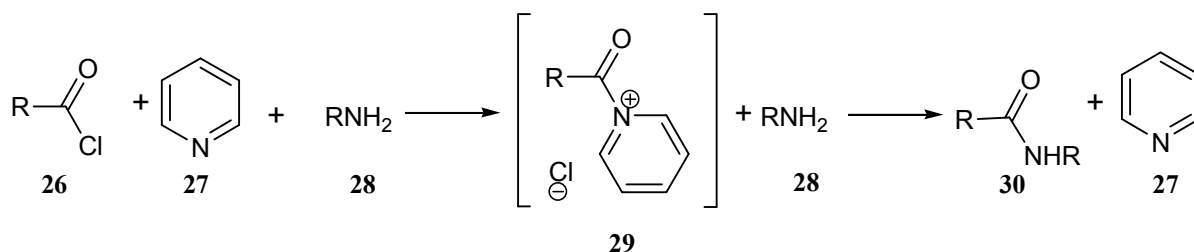
Jedan od najvećih nedostataka navedenih agensa za kloriranje je razvijanje plinovitog HCl. Neki supstrati, primjerice amini zaštićeni Boc skupinom, osjetljivi su na kiseline i zahtijevaju bazične uvjete.

Amidna veza formira se reakcijom kondenzacije acil-klorida s određenim aminom.



**Shema 7. Sinteza amina**

Dodatak baze služi za neutralizaciju kiseline kako bi se izbjegla njena reakcija s aminom čime bi nastala nereaktivna sol. Povezivanje se provodi u inertnom suhom otapalu uz prisutnost tercijarnog amina koji nije nukleofil, primjerice trietilamina ( $\text{Et}_3\text{N}$ ).<sup>6</sup> U navedenim uvjetima (Schotten-Baumannova kondenzacija) acil-kloridi dovoljno su otporni kako bi se povezali s aminima uz prisutnost baze NaOH. Reakcije se mogu ubrzati katalitičkom količinom piridina ili *N,N*-dimetilaminopiridina. U nekim slučajevima piridin se koristi i kao otapalo. Formiranje intermedijerne acilpirimidinske soli prikazano je Shemom 8.

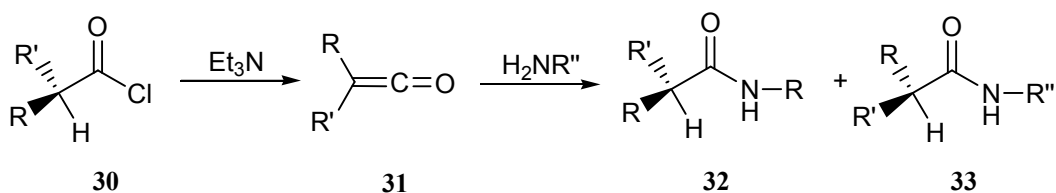


**Shema 8. Katalitička uloga piridina**

Cink se također koristi za ubrzavanje reakcije povezivanja na sobnoj temperaturi. Metoda je primjenjiva na alkile, arile, heterocikle, ugljikohidrate i aminokiseline te se dobivaju visoka iskorištenja.<sup>7</sup>

### 2.2.2. Ograničenja acil klorida

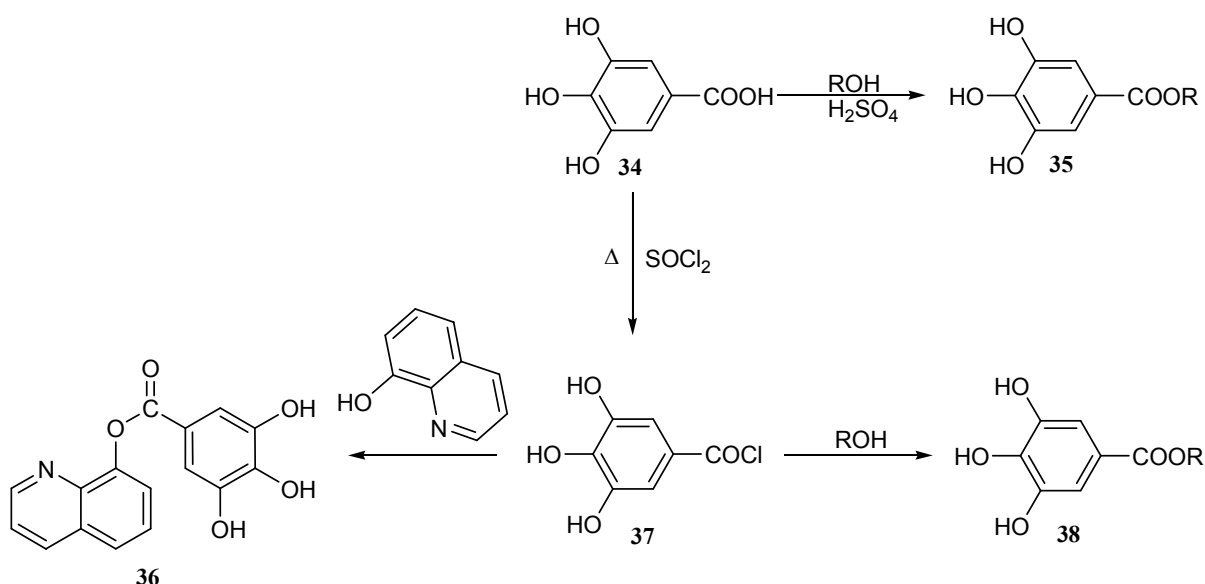
Unatoč svim prednostima, acil-kloridi imaju ograničenu upotrebu u povezivanju peptida zbog mogućnosti hidrolize, racemizacije, odcjepljenja zaštitnih skupina i sporednih i neželjenih reakcija. Težnja acil-klorida prema racemizaciji u bazičnim uvjetima objašnjena je na Shemi 9. Ketenji se pripremaju reakcijom acil klorida koji sadrže  $\alpha$ -C atom uz prisutnost  $\text{Et}_3\text{N}$ . Dalje mogu reagirati s nukleofilom, npr. aminom.<sup>8</sup>



Shema 9. Racemizacija preko ketenske forme

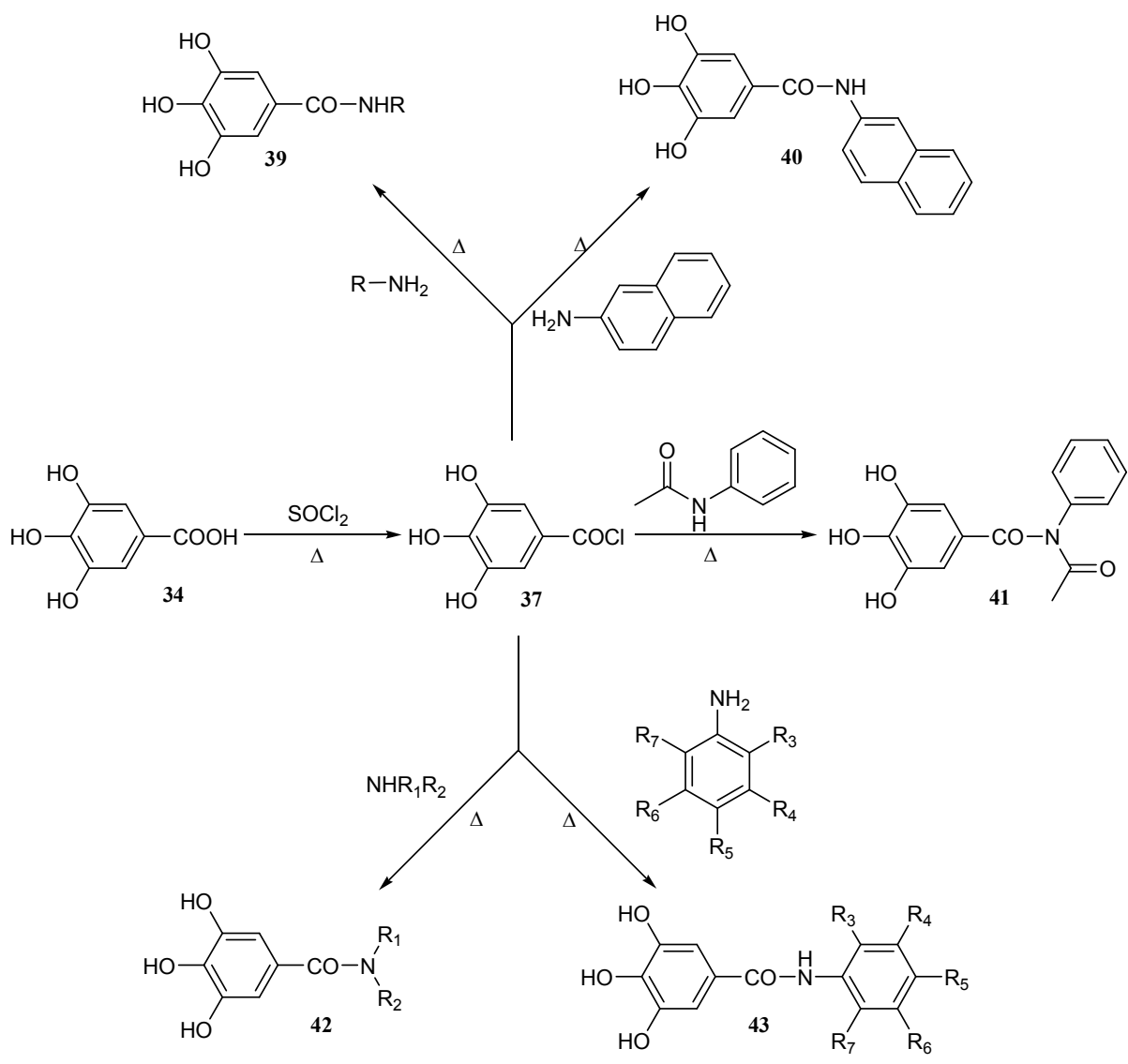
### 2.3. Biološki aktivni derivati galne kiseline

Khatkar i suradnici<sup>9</sup> sintetizirali su seriju amidnih i esterskih derivata galne kiseline i okarakterizirali ih fizikalnim i spektroskopskim svojstvima. Sintetizirani spojevi *in vitro* su testirani na antimikrobnu aktivnost prema različitim Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama i na sojeve gljivica. Sintetizirani esterski derivati prikazani su na Shemi 10.



Shema 10. Sinteza derivata galne kiseline

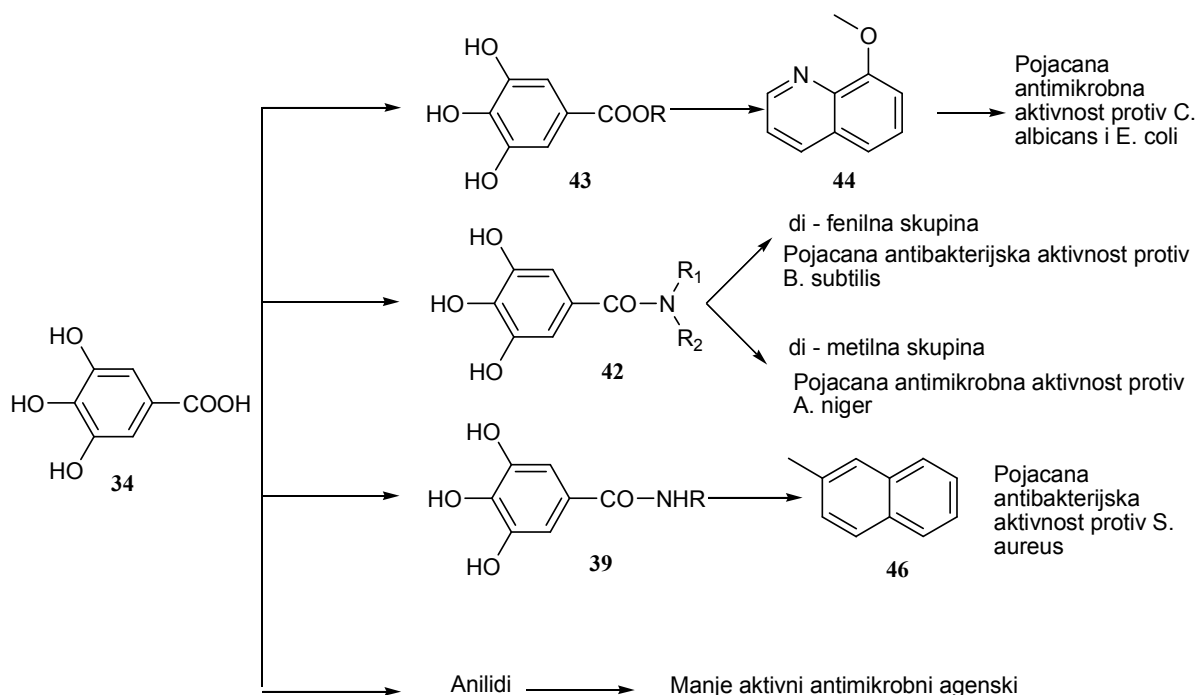
Svi korišteni reaktanti i otapala analitičke su čistoće. Reakcije prikazane Shemom 11 praćene su tankoslojnom kromatografijom a produkti su pročišćeni prekrizacijom. Dokazivanje produkata IR i <sup>1</sup>H NMR tehnikama opće su prihvaćene metode detekcije i utvrđivanja uspješnosti sinteze.



**Shema 11. Sinteza derivata galne kiseline**

Sintetizirani derivati galne kiseline bili su testirani *in vitro* na antibakterijsku aktivnost protiv *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* i antifungalnu aktivnost protiv *C. albicans* i *A. niger* metodom razrjeđivanja. Istraživanja su dala rezultate koji su predočeni Shemom 12.



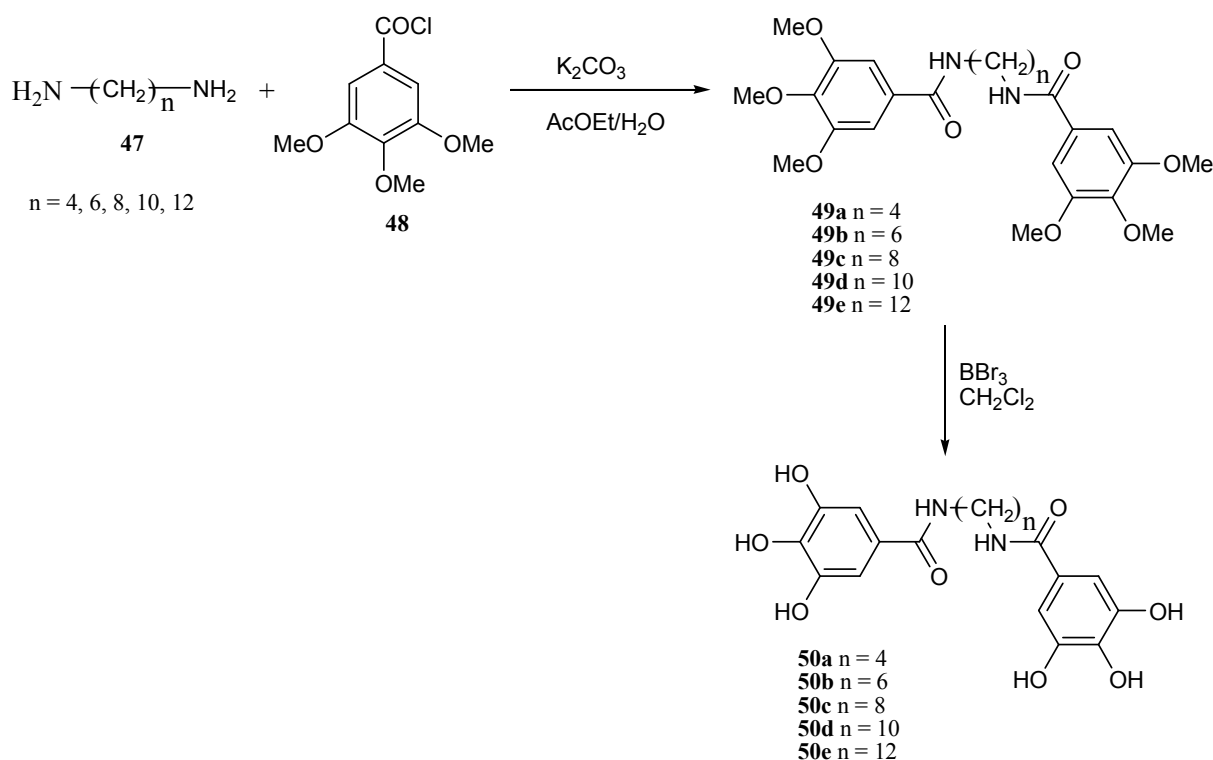


**Shema 12. Odnos strukture i djelovanja za sintetizirane derivate galne kiseline**

Esteri i amidi galne kiseline pokazali su izraženije antimikrobno djelovanje od anilida. Kao najdjelotvorniji antimikrobni agensi protiv *E. coli* i *C. albicans* pokazali su se kinolin-8-il i 3,4,5-trihidroksibenzoat. Iz toga je moguće zaključiti da će esteri na aromatskoj jezgri biti učinkoviti antimikrobni agensi protiv soja *E. coli* i *C. albicans*. Najbolja antibakterijska svojstva od svih sintetiziranih derivata galne kiseline protiv soja *S. aureus* pokazali su 3,4,5-trihidroksi-*N*-(naftalen-2-il)benzamid zbog bicikličnog aromatskog prstena. Protiv bakterije *B. subtilis* najučinkovitiji je bio 3,4,5-trihidroksi-*N,N*-difenilbenzamid i 3,4,5-trihidroksi-*N*-(naftalen-2-il)benzamid zbog prisutnosti dvije fenilne skupine i bicikličke aromatske jezgre. Rezultati antifungalne aktivnosti protiv *A. niger* pokazali su da je 3,4,5-trihidroksi-*N,N*-dimetilbenzamid imao najsnažnije antifungalno djelovanje te da se antifungalna aktivnost smanjuje produljenjem lanca. Sintetizirani anilidi nisu pokazali antimikrobnu aktivnost. Rezultati antimikrobnog testiranja derivata galne kiseline pokazuju da su esteri i amidi učinkovitiji od anilida. Spoj **6** pokazao se kao najaktivniji antimikrobni agens ( $\text{pMIC}_{\text{am}} = 1,92 \mu\text{M/mL}$ ). Rezultati QSAR studija pokazali su da antibakterijska, antifungalna i općenito antimikrobna aktivnost sintetiziranih derivata galne kiseline proizlaze iz elektronskih parametara, ukupne kozmičke i nuklearne energije.

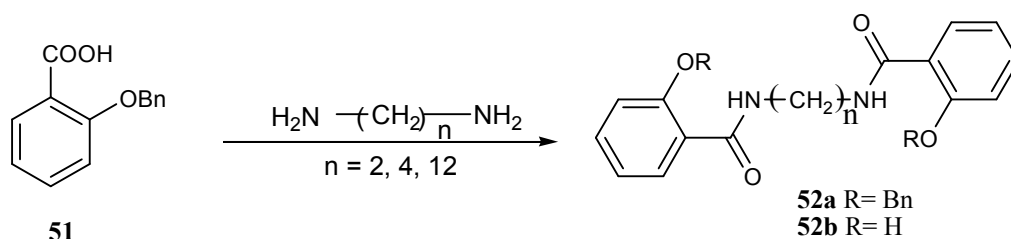
Rivero-Buceta<sup>10</sup> i suradnici sintetizirali su različite serije derivata hidroksibenzojevih kiselina u kojima su uključene galna kiselina (3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina) i njen izomer (2,3,4-trihidroksibenzojeva kiselina) kao i druge mono- i dihidroksibenzojeve skupine koje su korištene kao supstituenti linearnih poliamida i poliakohola. Sintetiziranim spojevima testirana je antivirusna aktivnost protiv HIV-a i virusnog hepatitisa C. Kako bi odredili utjecaj kemijske strukture na antivirusnu aktivnost, znanstvenici su proučavali prirodu veze između galne skupine i amida ili estera; broj galnih skupina koje su vezane za amid ili ester; broj i položaj OH skupina na benzenskoj jezgri.

Na Shemi 14 prikazani su sintetizirani amidi galne kiseline s različitom dužinom alkilnog lanca. Sintetizirani su kondenzacijom komercijalno dostupnih metoksi-zaštićenih klorida galne kiseline s odgovarajućim diaminima.



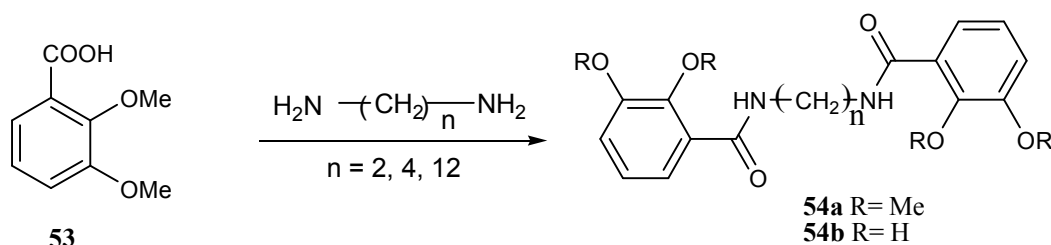
**Shema 14. Sinteza alkil amida galne kiseline s reagensom BBr<sub>3</sub>**

Kako bi odredili utjecaj broja hidroksilnih skupina vezanih za aromatsku jezgru na antivirusnu aktivnost pripremili su spojeve sa jednom i dvije hidroksilne skupine.



**Shema 15. Sinteza 2-monohidroksibenzojevih derivata**

Dihidroksibenzoilni analozi već su ranije bili sintetizirani no njihova antivirusna aktivnost nije bila do sada istražena.<sup>11</sup>

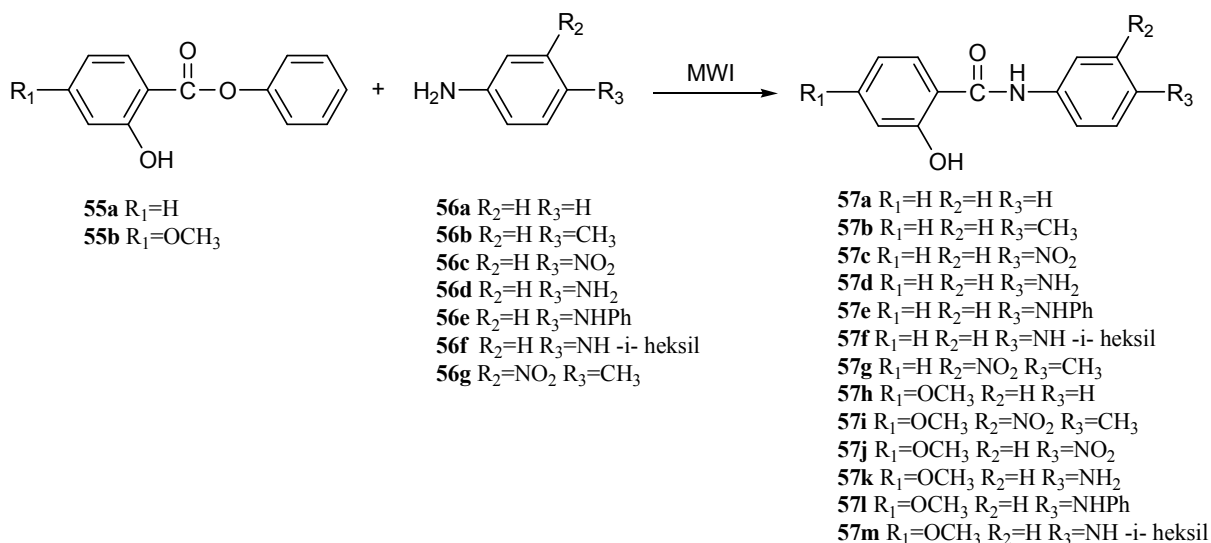


**Shema 16. Sinteza 2,3-dihidroksibenzojevih derivata**

Prisutnost slobodnih fenolnih OH skupina od presudne je važnosti za antivirusnu aktivnost budući da je spojevi s zaštićenim OH skupinama nisu pokazali. Pojačanu anti-HIV aktivnost pokazali su razgranati spojevi s tri fenilne skupine u odnosu na linearne spojeve s jednom ili dvije fenilne skupine. Protiv virusa hepatitisa C, spojevi s jednom OH skupinom pokazali su se neaktivnima što znači da je prisutnost više OH skupina na benzenskoj jezgri od presudne važnosti. Spojevi koji za supstituente imaju 2,3,4-trihidroksibenzojeve skupine pokazali su veću aktivnost protiv oba navedena virusa uspoređujući sa spojevima koji imaju 3,4,5-trihidroksibenzojeve supstituente.

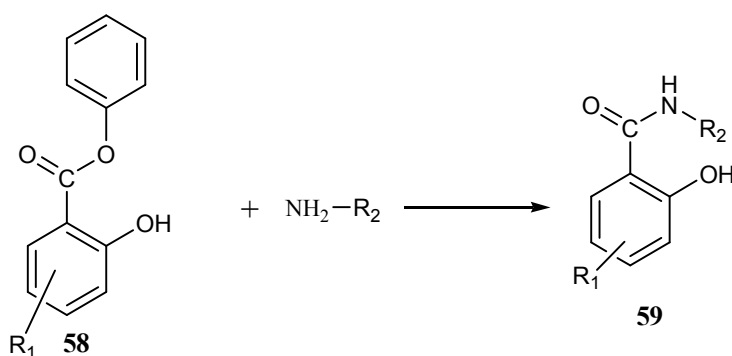
Zbog biološke aktivnosti koju posjeduju, salicilanilidi predmet su brojnih istraživanja organskih i medicinskih kemičara. Klasična sinteza salicilanilida uključuje interakciju kiselinskog klorida ili estera salicilne kiselina s aminima. Grupa slovačkih autora<sup>12</sup> u svom znanstvenom radu uspješno je usavršila metodu sinteze salicilanilida iz fenil-salicilata, što je najčešća metoda njihove pripreme jer nema zaštite i uklanjanja zaštite OH skupine. Metoda se sastoji od kratkog izlaganja smjese fenil-salicilata i anilida mikrovalovima u uvjetima bez otapala.

Na Shemi 17 prikazani su sintetizirani derivati salicilne kiseline. Spojevi su dobiveni u vrlo visokim iskorištenjima (70-95%) nakon izlaganja mikrovalnom zračenju samo 3-7 minuta.



**Shema 17. Sinteza derivata salicilne kiseline potpomognuta mikrovalovima**

J. Matyak i suradnici<sup>13</sup> sintetizirali su seriju derivata heterocikličkih analoga salicilanilida. Spojevi su testirani in vitro na antimikrobnu aktivnost protiv *M. tuberculosis*, *M. avium* i dva soja bakterije *M. kansasii*. Salicilanilidi kombinirani su s drugim heterocikličkim prstenovima koji imaju amidnu skupinu poput pirimidina, pirazina, tiazola, benzotiazola, benzimidazola i oksazola. Sinteza ovih spojeva prikazana je na Shemi 18.



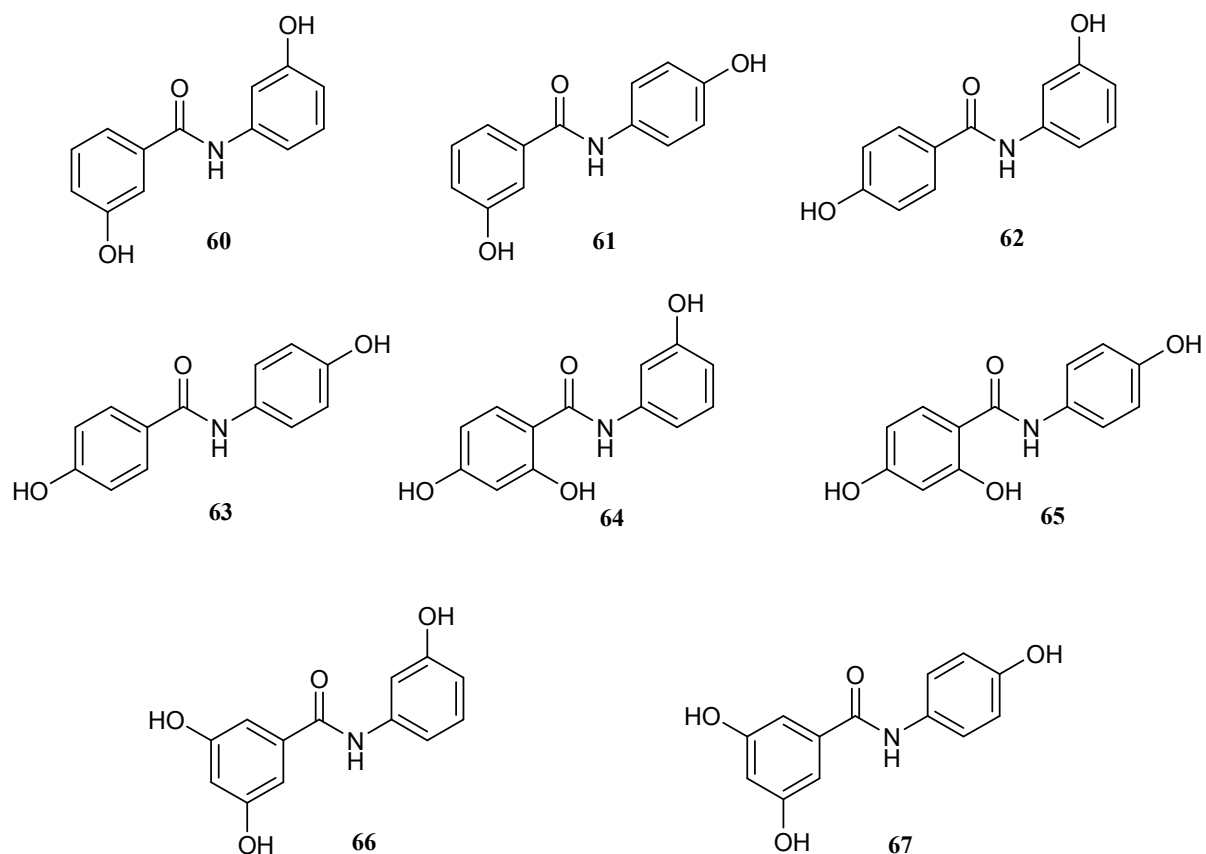
**Shema 18. Sinteza N-heteroaril-2-hidroksi-benzamida**

**Tablica 1. Supstituenti *N*-heteroaril-2-hidroksi-benzamida**

R <sub>1</sub>		R <sub>2</sub>	
1 H	5 5-F	<b>a</b> <i>N</i> -(4,6-dimetilpirimidin-2-il)	<b>f</b> <i>N</i> -(1,2,4-triazol-3-il)
2 4-CH <sub>3</sub>	6 5-Br	<b>b</b> <i>N</i> -(4-metilpirimidin-2-il)	<b>g</b> <i>N</i> -(benzimidazol-2-il)
3 4-OCH <sub>3</sub>	7 5-Cl	<b>c</b> <i>N</i> -(pirazin-2-il)	<b>h</b> <i>N</i> -(benzotiazol-2-il)
4 4-Cl		<b>d</b> <i>N</i> -(tiazol-2-il)	<b>i</b> <i>N</i> -(metiloksazol-3-il)
		<b>e</b> <i>N</i> -(1,2,4-triazol-4-il)	<b>k</b> <i>N</i> -(4-metiltiazol-2-il)

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti pokazali su da supstitucija na benzenskoj jezgri u položaju 4 i 5, uz prisutnost acilne skupine na molekuli, pojačava antimikrobnu aktivnost protiv svih sojeva ispitivane bakterije. Od svih sintetiziranih heterocikličkih skupina, benzimidazol pokazao je dobru antimikrobnu aktivnost a izoksazol pokazao je snažan utjecaj na aktivnost protiv soja *M. tuberculosis*.

Osim spomenutih antivirusnih, antimikrobnih i antioksidativnih svojstava, *N*-arilbenzamidi koriste se kao preteče za razvoj novih agonista estrogenskih receptora.<sup>14</sup> Agonisti oponašaju molekule estrogena i daju lažni signal receptorima. S obzirom da se estrogen povezuje s brojnim vrstama karcinoma i povoljno djeluje na razvoj tumorskih stanica, istraživanje i razvoj agonista estrogenskih receptora vrlo je važno. Općeniti farmakofor za estrogenskih receptora identificiran je i postupno su sintetizirani brojni spojevi. Caldarelli i suradnici<sup>15</sup> prvi su odlučili uzeti na razmatranje amidne spojeve. Za razliku od drugih modela farmakofora estrogenskih receptora, amidni spojevi strukturno su jednostavniji. Sintetizirani *N*-arilbenzamidi vrlo su dobre preteče za sintezu agonista estrogenskih receptora jer se amidna veza može lako sintetizirati iz karboksilnih kiselina i aminskih prekursora koji imaju odgovarajuć raspored OH skupina. Pregled sintetiziranih spojeva prikazan je na Shemi 19.

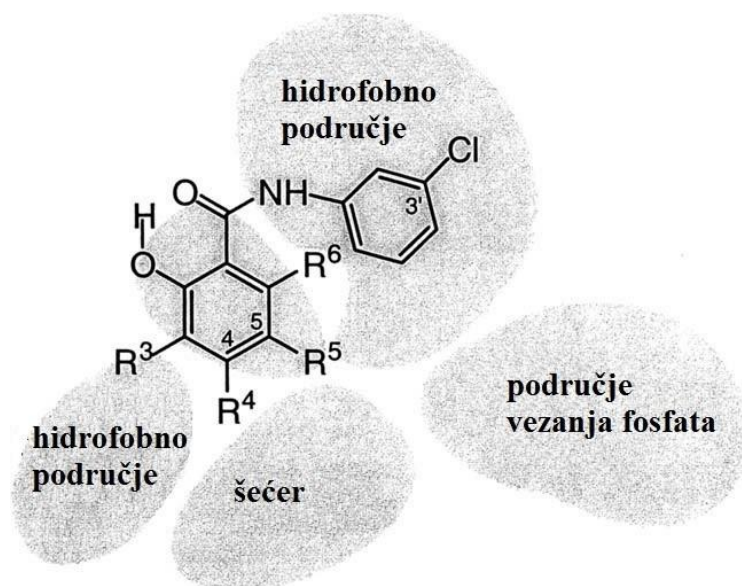


**Shema 19. Sintetizirani polihidroksi-*N*-arilbenzamidi**

Sintetizirani spojevi transfekcijom su uvedeni u stanicu preko plazmida u količini od 100 nM. Spojevi **62**, **63**, **65** i **66** pokazali su aktivnost. Spoj **62** pokazao je u preliminarnim ispitivanjima značajnu antagonističku aktivnost čak i u količini od 10 nM. Odnos strukture i djelovanja pokazao je da će za agoniste najbolje odgovarati spojevi s tri ili četiri hidroksilne skupine dok oni s dvije pokazuju smanjenje ili potpuni gubitak aktivnosti što se objašnjava intermolekularnim vodikovim vezama ili steričkim smetnjama. Sinteza ovih amidnih derivata otvorila je novi put za sintezu potencijalnih agonista.

Model farmakofora ATP kompetitivnih inhibitora u interakciji s aktivnim mjestom receptora proteina tirozin kinaza epidermalnog faktora rasta sugerira da bi funkcionalna skupina salicilne kiseline mogla poslužiti kao farmakoforska zamjena za pirimidinski prsten.<sup>16</sup> Grupa švicarskih znanstvenika<sup>17</sup> sintetizirala je seriju salicilanilida i istražila njihovu inhibitorску aktivnost. Ustanovili su da su neki od sintetiziranih spojeva selektivni i snažni inhibitori tirozin kinaza receptora za epidermalni faktor rasta.

S obzirom na rezultate istraživanja odnosa strukture i aktivnosti, da bi molekula inhibirala djelovanje receptora za epidermalni rast proteina tirozin kinaze treba ispuniti zahtjeve koji su prikazani Slikom 1.



**Slika 1. Shematski prikaz veznog mjesta tirozin kinaze epidermalnog faktora rasta**

S obzirom na rezultate istraživanja odnosa strukture i aktivnosti, da bi molekula inhibirala djelovanje receptora za epidermalni rast proteina tirozin kinaza treba ispuniti sljedeće zahtjeve:

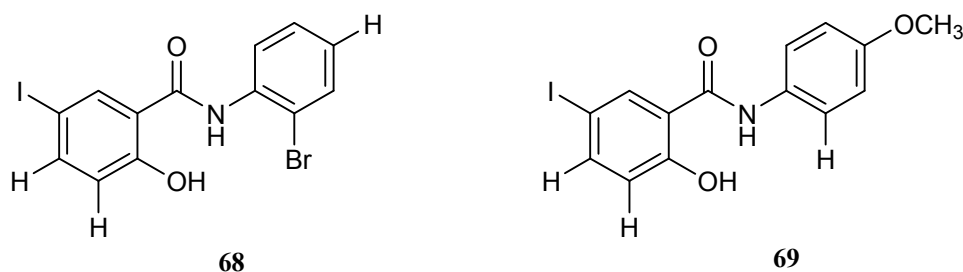
- 1) salicilni dio molekule zahtjeva intramolekularno povezivanje vodikovim vezama koje se uspostavljaju između hidroksilne i karboksilne skupine
- 2) ne smije biti supstituenta u položaju 3 a supstituenti u položaju 4 i 5 moraju biti elektron donorske skupine
- 4) anilinski dio molekule zahtjeva malu, lipofilnu i elektron odvlačeću skupinu u položaju 3 dok je na drugim položajima poželjno da nema supstituenata.

Z. Zhu i suradnici<sup>18</sup> sintetizirali su derivate salicilanilida te istraživali njihovu antiproliferativnu aktivnost prema Hep-G2 staničnim linijama odnosno njihov potencijal kao inhibitora tirozin kinaze epidermalnog faktora rasta. Derivati salicilanilida izolirani iz biljaka pokazali su antiproliferativnu aktivnost prema Hep-G2 staničnoj liniji.<sup>19</sup> Spoj 4-metoksidiantramid B, izoliran iz biljke *Dianthus superbis* koja se koristi u kineskoj tradicionalnoj medicini, pokazao je antiproliferativnu aktivnost prema Hep-G2 staničnoj liniji

raka na 50% inhibitorske koncentracije ( $IC_{50}$ ) s vrijednošću od 4,08  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>20</sup> Ta činjenica dala je naslutiti kako bi sintetski derivati salicilanilida mogli posjedovati antiproliferativnu aktivnost istog ili višeg ranga. Spojevi su dizajnirani tako da blokiraju tirozin kinazu epidermalnog faktora rasta kao potencijalni i selektivni ATP-kompetitivni inhibitori.<sup>21</sup> Receptor proteina tirozin kinaze imao je ključnu ulogu u regulaciji dijeljenja i diferencijacije stanica. Interakcija faktora rasta s tim receptorima inače je normalan dio regulacije staničnog rasta. U posebnim uvjetima koji su rezultat mutacije, receptori mogu postati hiperaktivni i inducirati nekontroliranu proliferaciju stanica. Spojevi koji inhibiraju tirozin kinaze epidermalnog faktora rasta od velikog su interesa kao novi antitumorski agenti.<sup>22</sup> Salicilanilidi su sintetizirani reakcijom četiri vrste supstituiranih salicilnih kiselina i nekoliko vrsta supstituiranih anilina. Svi sintetizirani spojevi čija je struktura dokazana odgovarajućim analitičkim i spektroskopskim tehnikama, podijeljeni su u 4 serije:

1. serija derivata salicilne kiseline
2. serija derivata 4-metilsalicilne kiseline
3. serija derivata 5-jodsalicilne kiseline
4. serija derivata 3,5-dibromsalicilne kiseline.

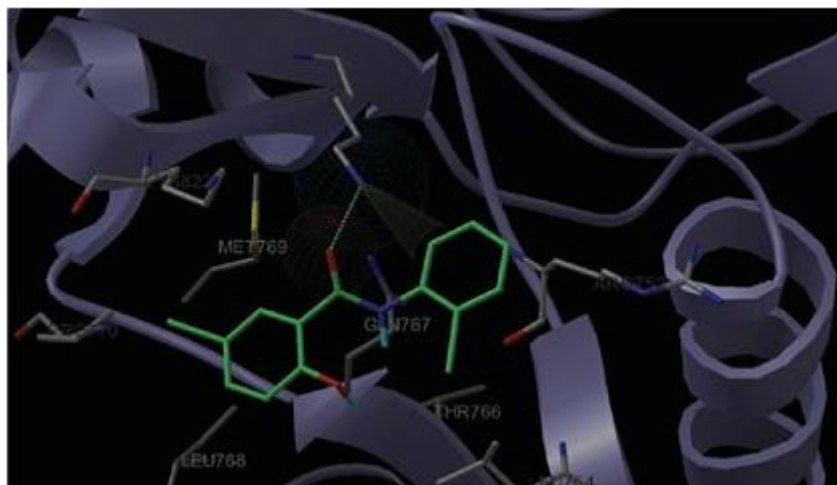
Svi spojevi testirani su u rasponu koncentracija od 0,5 do 300  $\mu\text{M}$  te su određene  $IC_{50}$  vrijednosti. Odnos strukture i aktivnosti pokazao je da serija derivata 5-jodsalicilne kiseline pokazuje najveću aktivnost u ulozi antiproliferativne tvari i inhibitora. Pokazalo se da jod u položaju 5 značajno poboljšava aktivnost. Supstituent u položaju 2 značajno pojačava aktivnost u odnosu na supstituente u položaju 4. Nadalje, spojevima je testirana sposobnost inhibicije autofosforilacije kinaze epidermalnog faktora rasta te su se istaknuli derivati **68** i **69** koje su u istraživanju općenito pokazali najbolju aktivnost. Zbog toga su dalje podvrgnuti simulaciji veznog mjesta s kinazom epidermalnog faktora rasta.



**Shema 20. Najaktivnije sintetizirane komponente**

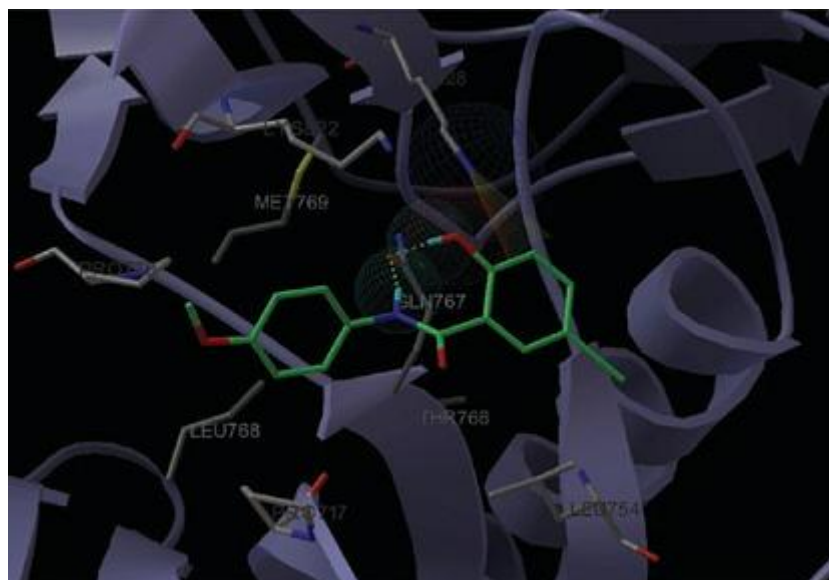


Kako bi se dobio strukturni uvid u interakcije liganda i dobilo objašnjenje dobre aktivnosti spojeva **68** i **69**, napravljena je simulacija vezanja navedenih spojeva na kompleksnu strukturu kinaze epidermalnog faktora rasta.



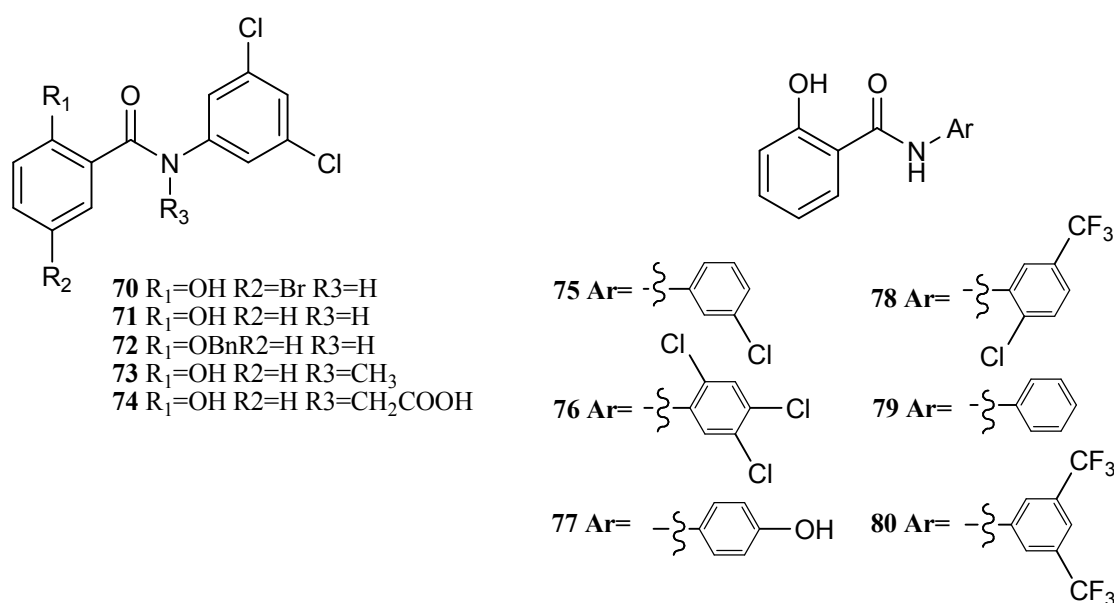
**Slika 2. Model veznog mjesta spoja 68**

Model veznog mjesta spoja **68** na receptor epidermalnog faktora rasta pokazuje da se stvara vodikova veza između karbonilnog kisika spoja **68** i pobočnog lanca Lys828. To su nekovalentne interakcije između sustava koji je bogat  $\pi$  elektronima i susjednog kationa a u ovom slučaju igraju važnu ulogu u molekularnom prepoznavanju. Upravo te interakcije čine kompleks 68/EGRF stabilnijim.



**Slika 3. Model veznog mjesta spoja 69**

Interleukin (IL)-12p40 sastoji se od komponenata IL-12 i IL-23 koje se proučavaju zbog uloge u upalnim bolestima. Povezane su s T stanicama tipa 1 koje sudjeluju u osnovnoj imunološkoj obrani ali i upalnim bolestima poput reumatoidnog artritisa, astme, psorijaze i Chronove bolesti.<sup>23</sup> IL-23 ima posebnu imunološku ulogu u reguliranju T stanica koje proizvode protuupalne citokine. IL-12p40 može postojati u monomernom ili homodimernom obliku koji posjeduju vlastite bio-aktivnosti neovisno o IL-12 i IL-23 koji uključuju kemijsko prilvačenje makrofaga i stimuliranje dendritskih stanica.<sup>24</sup> M. E. Brown i suradnici<sup>25</sup> proučavali su djelovanje salicilanilida kao selektivnih inhibitora interleukina-12p40.



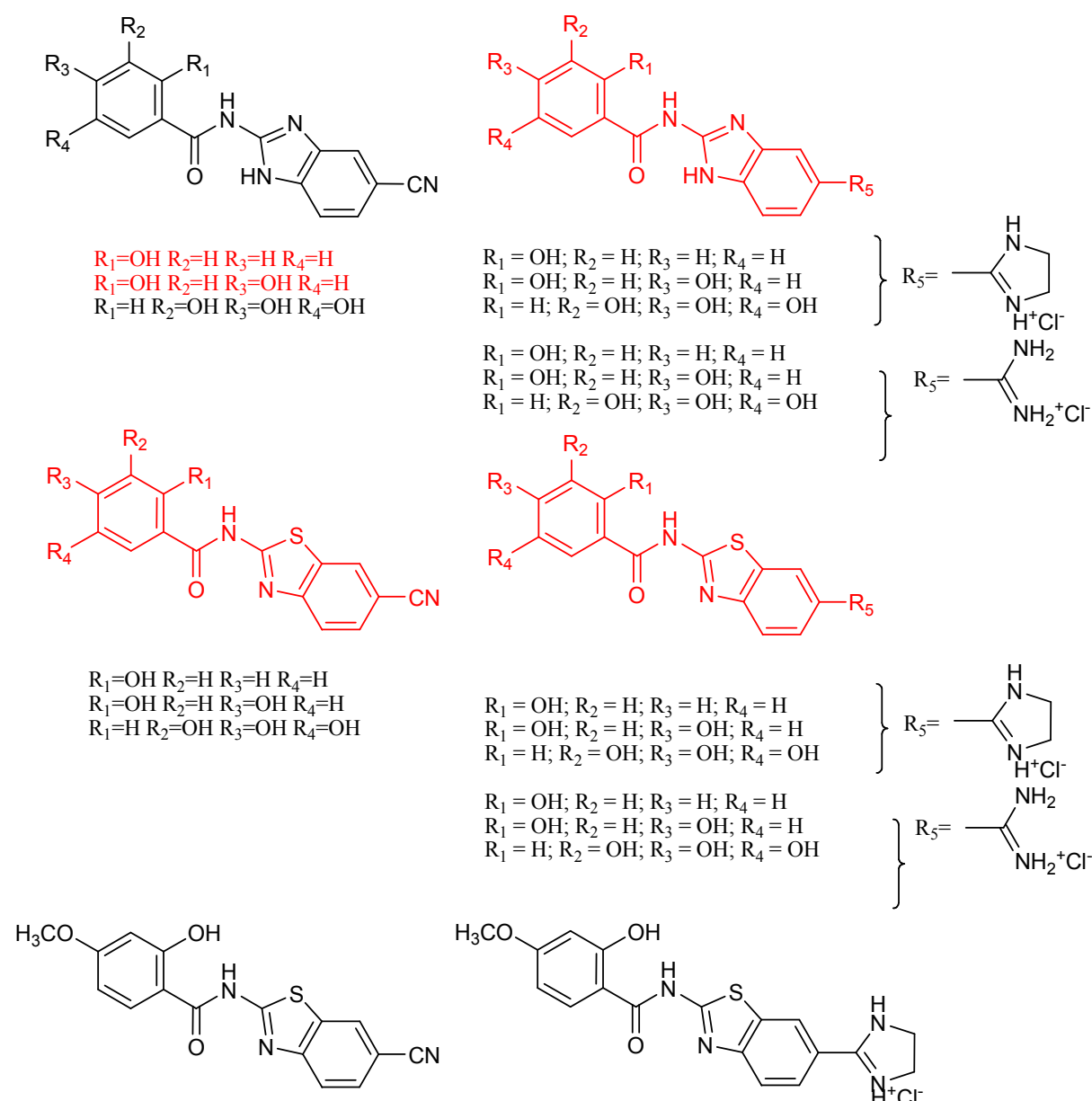
**Shema 21. Pregled biološki aktivnih derivata salicilanilida**

Salicilanilid **70** inhibira proizvodnju IL-12p40 i IL-6 u stimuliranim primarnim humanim dendritskim stanicama a sličnog je djelovanja i u dendritskoj staničnoj liniji. Citotoksični profil za taj spoj nije objasnio funkcionalnu aktivnost IL-12p40. Utvrđeno je da je karbonilna skupina važna za aktivnost IL-12p40 i IL-6. Spojevi koji umjesto broma imaju nitro skupinu izgubili su aktivnost prema IL-12p40. U odnosu na **70**, spoj **71** ima vodikov atom umjesto broma. Osim aktivnosti prema IL-12p40 pokazao je značajno bolju selektivnost za inhibiciju proizvodnje IL-6. Kako bi se utvrdila važnost fenolne grupe i njezin utjecaj na aktivnost, selektivnost i inhibiciju, sintetizirani su spojevi s različitim supstytutentima. Spoj **72**, O-benzilni eter, pokazao je značajno smanjenje inhibicije proizvodnje IL-12p40. Spoj **75** pokazao je značajno lošije djelovanje iako se razlikuje samo za jedan atom klora. Tri supstytutirana klora pokazala su relativno dobru inhibicijsku aktivnost. Akseptori ili donori vodikove veze poput **77** i **78** nisu pokazali inhibicijsko djelovanje na proizvodnju IL-12p40.

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

### 3.1. Ciljevi rada

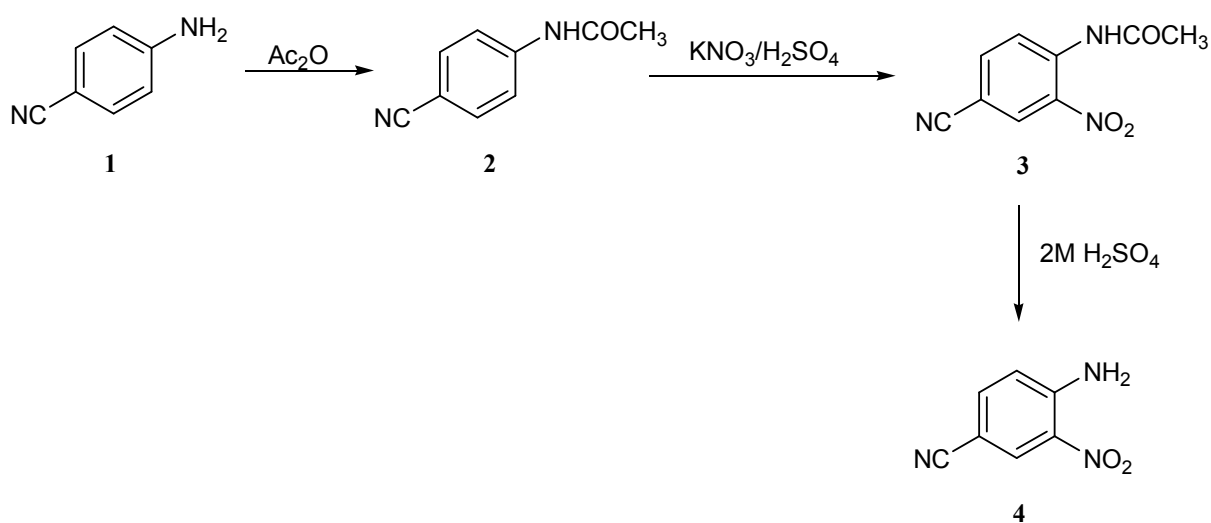
Zadatak ovog rada bila je priprava novih hidroksi supstituiranih derivata benzamida kao potencijalnih antioksidansa. Na Slici 4 prikazane su strukture ciljanih spojeva. Za sintezu derivata benzamida korištene su metode sa različitim skupinama za zaštitu hidroksi skupine. U prvoj metodi korištena je metoksi zaštita dok je u drugoj primijenjena metoda benzilne zaštite. Dobiven je 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-[6-(2-imidazolinil)-benzotiazol-2-il]benzamid **26** i 3,4,5-trihidroksi-*N*-(6-cijanobenzimidazol-2-il)benzamid **33**.



Slika 4. Strukture ciljanih spojeva

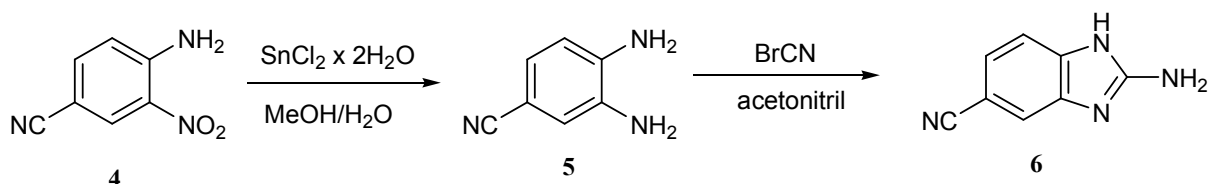
### 3.1. Sinteza priređenih spojeva

Za sintezu hidroksi supstituiranih derivata benzamida bilo je prvotno potrebno prirediti prekursore 2-amino-5-cijanobenzimidazol **6** i 2-amino-6-cijanobenzotiazol **19**. Oba prekursora priređena su linearnom sintezom u nekoliko stupnjeva iz početnog 4-aminobenzonitrila. U prvom koraku sinteze 2-amino-5-cijanobenzimidazola **6** acetiliranjem je zaštićena amino skupina te je dobiven spoj **2**, 4-acetamidobenzonitril, čija elektron-donorska skupina usmjerava uvođenje nitro supstituenta u sljedećem stupnju u željeni *ortho* položaj. Slijedi uklanjanje acetilne zaštite reakcijom kisele hidrolize čime je dobiven 4-amino-3-nitrobenzonitril **4**.



Shema 22.

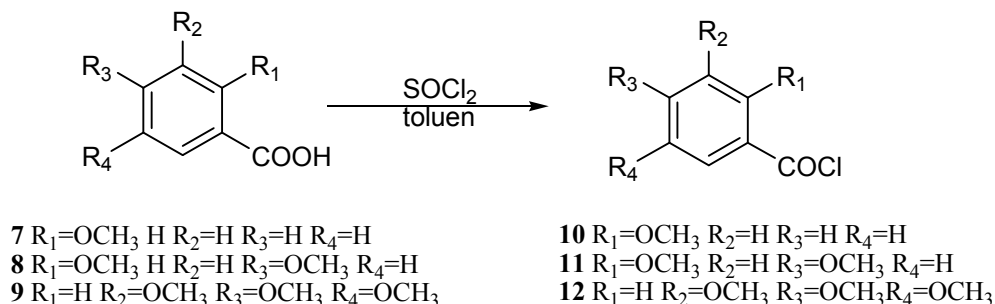
Redukcijom nitro skupine 4-amino-3-nitrobenzonitrila **4** uz kositrov(IV) klorid kao redukcijsko sredstvo u amino skupinu dobiven je 3,4-diaminobenzonitril **5** koji ciklizacijom daje 2-amino-5-cijanobenzimidazol **6** u 97% iskorištenju.



Shema 23.

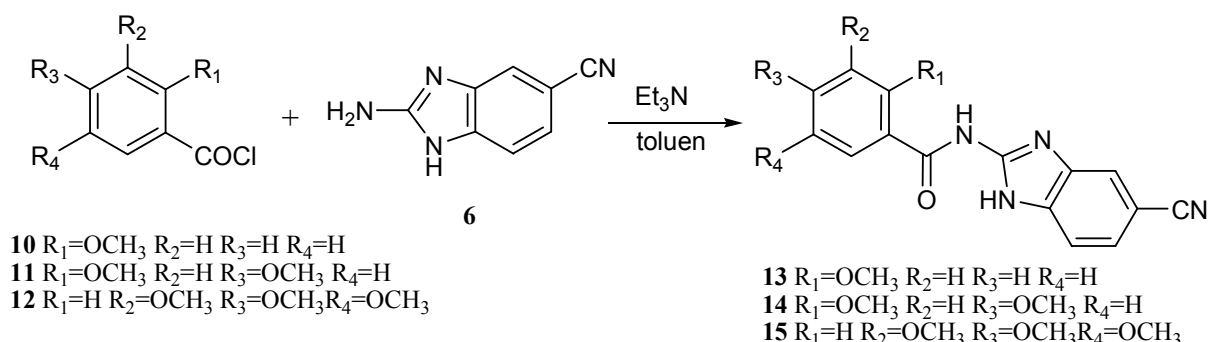
Prevođenje karboksilne skupine metoksi zaštićenih kiselina **7**, **8**, **9** u kiselinski klorid provedeno je u apsolutnom toluenu uz reagens  $\text{SOCl}_2$  (Shema 24). Dobiveni su produkti u

visokim iskorištenjima: 2-metoksibenzoil-klorid **10** (95,9%), 2,4-dimetoksibenzoil-klorid **11** (67,0%) i 3,4,5-trimetoksibenzoil-klorid **12** (92,0%).



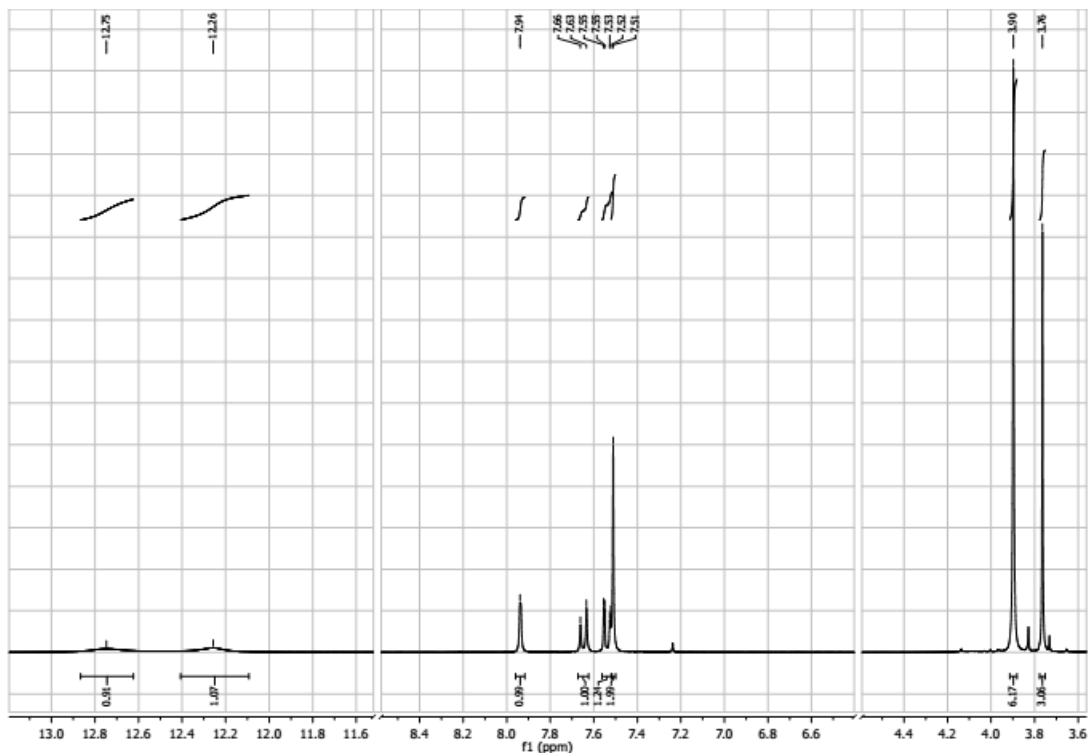
Shema 24.

Reakcije kondenzacije 2-amino-5-cijanobenzimidazola **6** s odgovarajućim metoksi supstituiranim kloridima **10**, **11** i **12** provedene su u apsolutnom toluenu uz dodatak trietilamina koji je dodan u suvišku proporcionalno broju supstituiranih metoksi skupina (Shema 25). 2-metoksi-*N*-(5-cijanobenzimidazol-2-il)benzamid **13**, 2,4-dimetoksi-*N*-(5-cijanobenzimidazol-2-il)benzamid **14** i 3,4,5-trimetoksi-*N*-(5-cijanobenzimidazol-2-il)benzamid **15** dobiveni su u iskorištenjima od 58,4%, 71,9% i 40%.



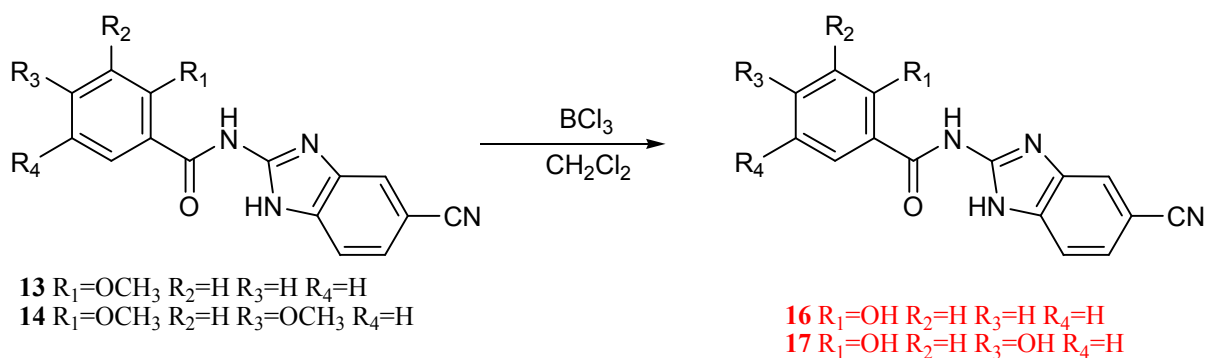
Shema 25.

Strukture priređenih spojeva **13**, **14** i **15** potvrđene su korištenjem  $^1\text{H}$  NMR spektroskopije. Na Slici 5 prikazan je  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **15** u kojem se mogu uočiti signali koji odgovaraju protonima tri metoksi skupine. Signal za 6 protona od dvije ekvivalentne metoksi skupine nalazi se na 3,90 ppm, a signal za 3 protona preostale metoksi skupine uočljiv je na 3,76 ppm. U nezasjenjenom dijelu spektra vidljiva su dva signala na 12,75 i 12,26 koja odgovaraju protonima vezanim na amidni i benzimidazolski atom dušika. U aromatskom dijelu spektra od 7,94 do 7,51 ppm nalazi se odgovarajući broj signala karakterističnih za aromatske protone.



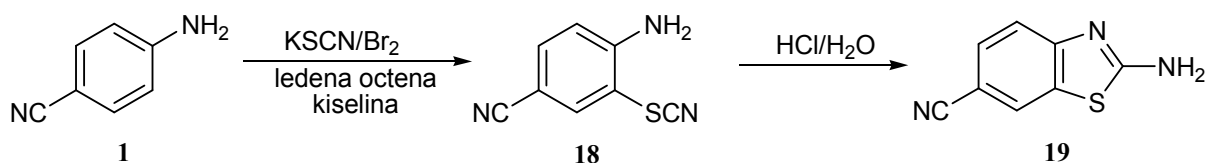
Slika 5.

Sljedeći stupanj je uklanjanje metoksi zaštite da bi dobili hidroksi supstituirane derivate. Amidi **13** i **14** otopljeni su u apsolutnom diklormetanu i ohlađeni na 0 °C te je u atmosferi argona dodan reagens BCl<sub>3</sub>. Nakon miješanja na sobnoj temperaturi tijekom noći, reakcija je prekinuta smjesom metanol-diklormetan nakon čega je tankoslojnom kromatografijom utvrđeno da željeni produkti nisu izolirani. Uzrok tome može biti nedovoljno agresivan reagens.



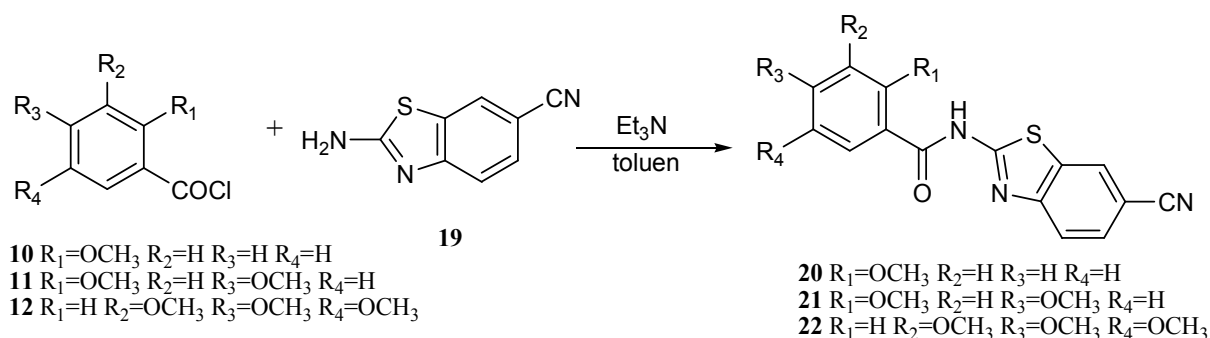
Shema 26.

Za sintezu amida benzotiazolskog reda prekursor 2-amino-6-cijanobenzotiazol **19** priređen je u dva stupnja (Shema 27). U prvom stupnju sinteze spoja **19** iz 4-aminobenzonitrila priređen je 4-amino-3-tiocijanatobenzonitril **18** koji zatim ciklizacijom u kiselom mediju daje 2-amino-6-cijanobenzotiazol **19**. Produkt je dobiven u iskorištenju od 53%.



Shema 27.

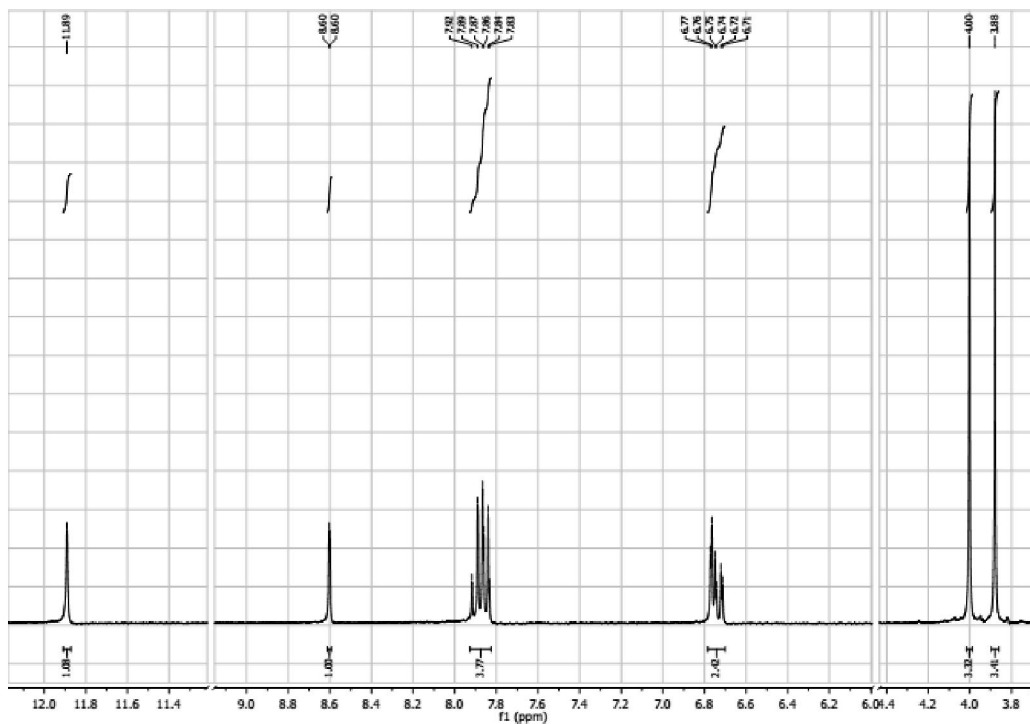
Prema već opisanom postupku priređeni su amidi kondenzacijom metoksi supstituiranih klorida benzojeve kiseline i 2-amino-6-cijanobenzotiazola **19** (Shema 28). Dobiveni su spojevi 2-metoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamid **20**, 2,4-dimetoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamid **21** i 3,4,5-trimetoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamid **22** u iskorištenjima 67,2%, 78,5% i 68,7%, a strukture dobivenih spojeva potvrđene su korištenjem  $^1\text{H}$  NMR spektroskopije.



Shema 28.

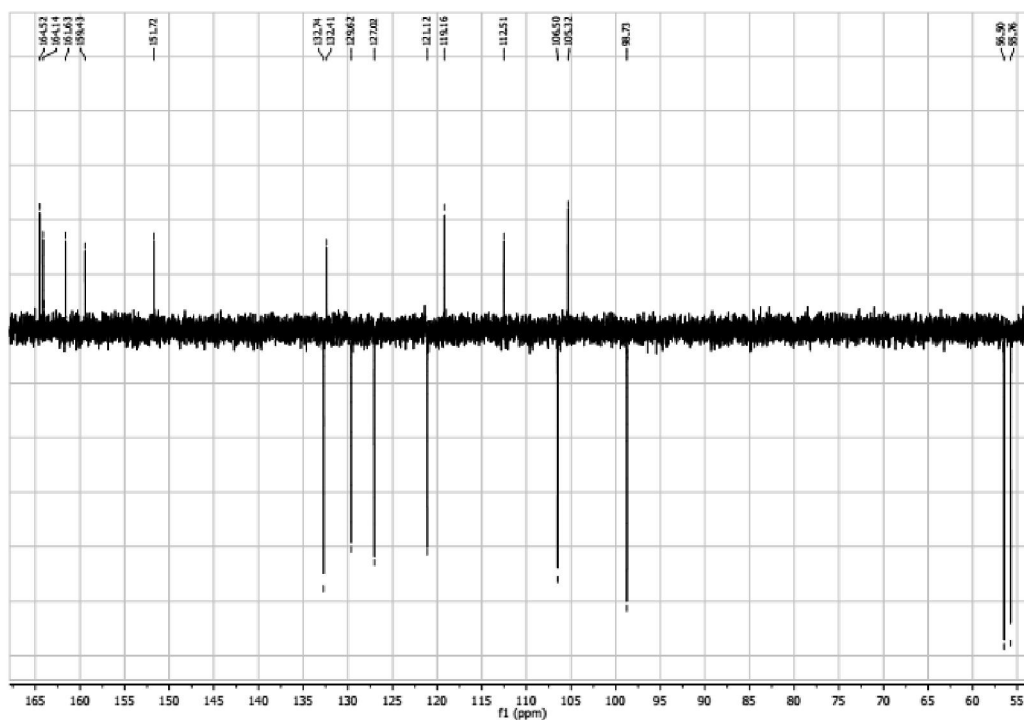
Na Slici 6 prikazan je  $^1\text{H}$  NMR spektar 2,4-dimetoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida **21**. Signali protona metoksi skupina nalaze se na 3,88 ppm i 4,00 ppm i prema broju protona odgovaraju protonima dvije metoksi skupine. Signal na 11,89 ppm pripada protonu amidne veze. Ostali signali u području od 8,70 do 6,70 ppm odgovaraju aromatskim protonima.





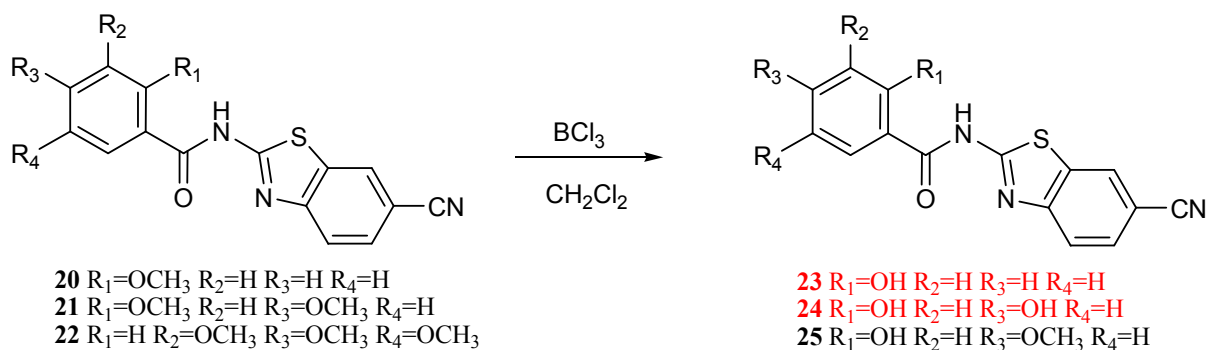
Slika 6.

Dodatnu potvrdu strukture dobivenog 2,4-dimetoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida **21** dao je  $^{13}\text{C}$  NMR spektar prikazan na Slici 7 u kojem se može uočiti odgovarajući broj signala kvaternih i aromatskih CH ugljikovih atoma te signali dviju metoksi skupina na 56,50 i 55,76 ppm.



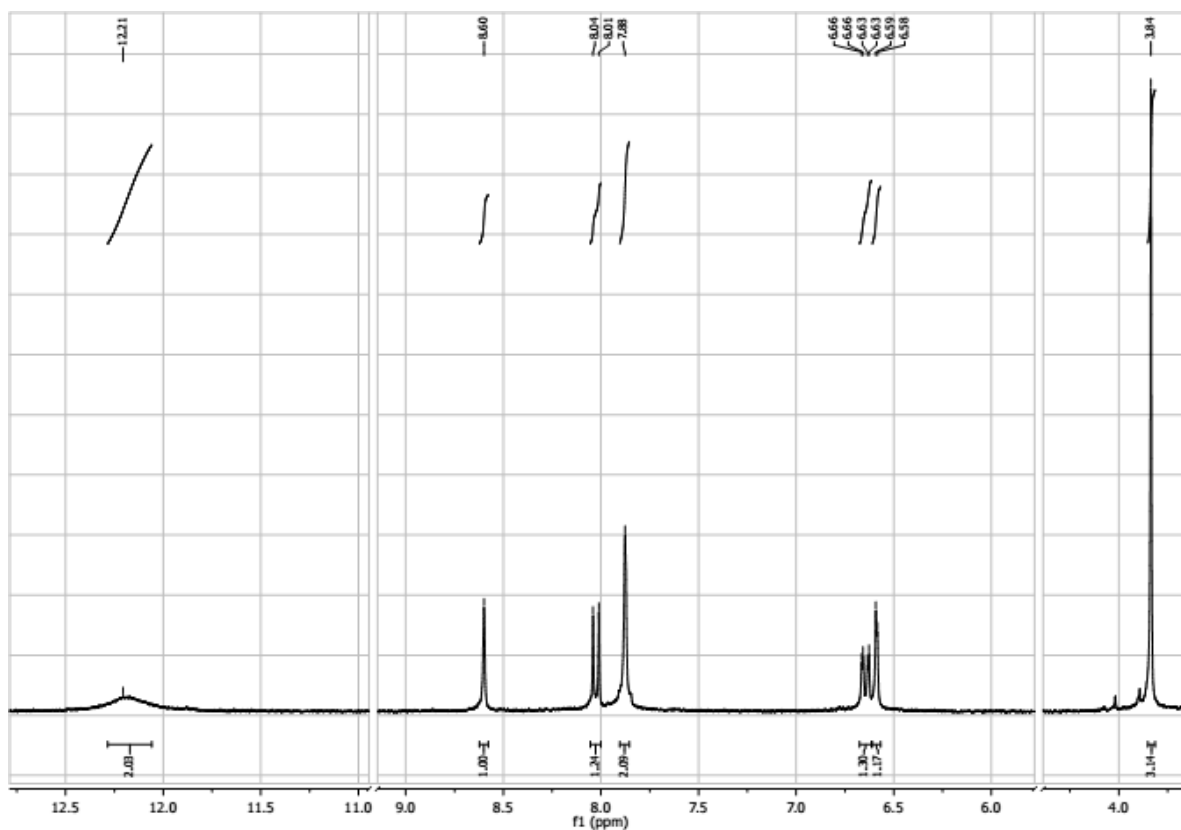
Slika 7.

Sljedeći korak prema sintezi hidroksi supstituiranih derivata je uklanjanje metoksi zaštite na već opisan način. Uspješno je dobiven samo produkt 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamid **25** (76,0%) gdje je uklonjena jedna metoksi zaštitna skupina. Tankoslojnom kromatografijom utvrđeno je da metoksi zaštitne skupine na preostalim spojevima nisu uspješno uklonjene.



Shema 29.

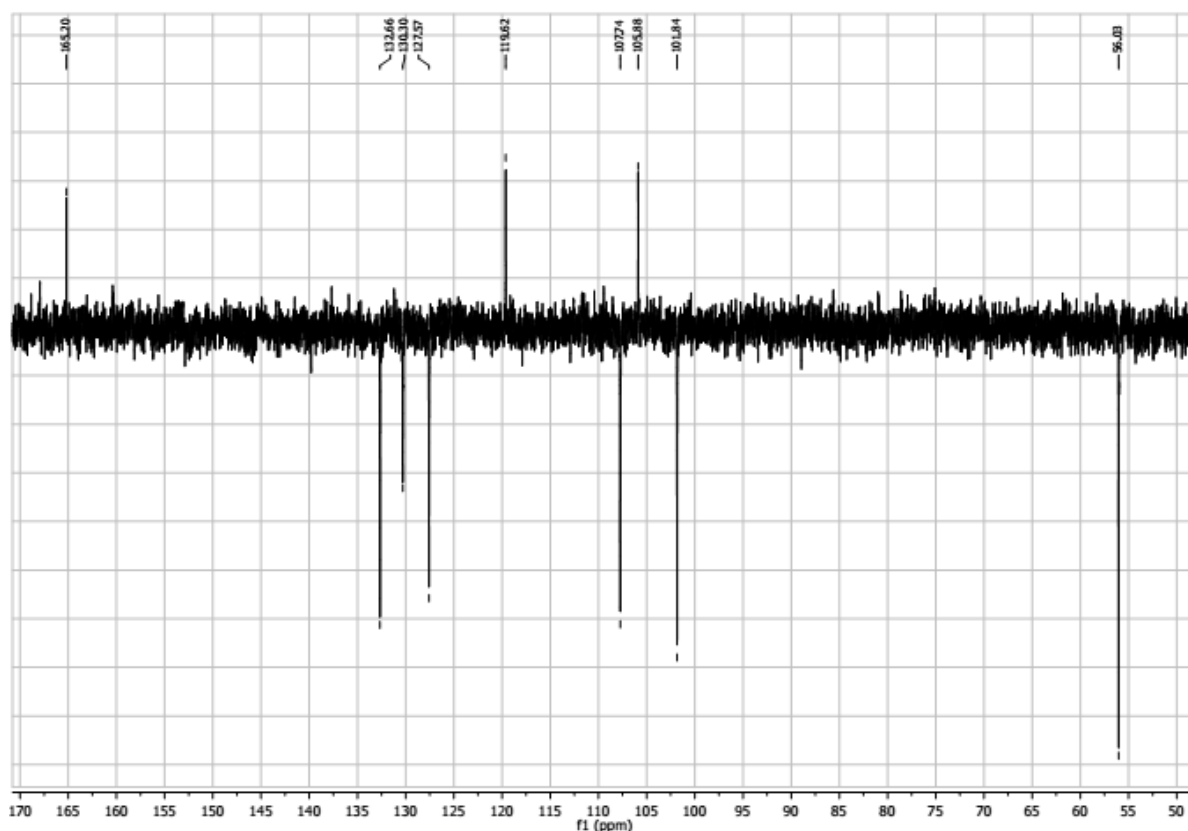
Na Slici 8 prikazan je <sup>1</sup>H NMR spektar 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida **25**.



Slika 8.

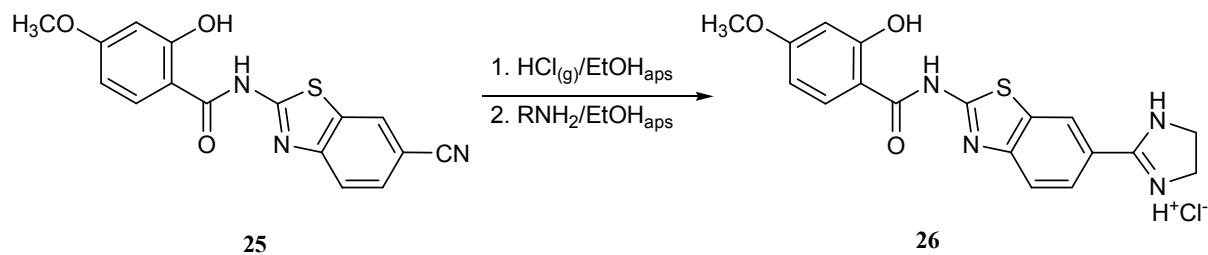
Uočava se samo jedan signal na 3,84 ppm koji odgovara protonima metoksi skupine za razliku od  $^1\text{H}$  NMR spektra 2,4-dimetoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida **21** koji je prikazan na Slici 6, gdje su vidljivi signali koji odgovaraju protonima dvije metoksi skupine, što ukazuje na to da je jedna metoksi zaštitna skupina uklonjena. U području od 8,60 do 6,59 ppm uočavaju se karakteristični signali aromatskih protona. Signal na 12,21 ppm odgovara protonima amidne veze i hidroksilne skupine.

Vrlo lako uočljiva potvrda uklanjanja jedne metoksi zaštite vidljiva je u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida **25** koji je prikazan na Slici 9. U odnosu na  $^{13}\text{C}$  NMR spektar 2,4-dimetoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida **21** koji je prikazan na Slici 7, jasno se uočava nestanak jednog signala u alifatskom području spektra. Signal na 56,03 ppm odgovara ugljikovom atomu preostale metoksi skupine.



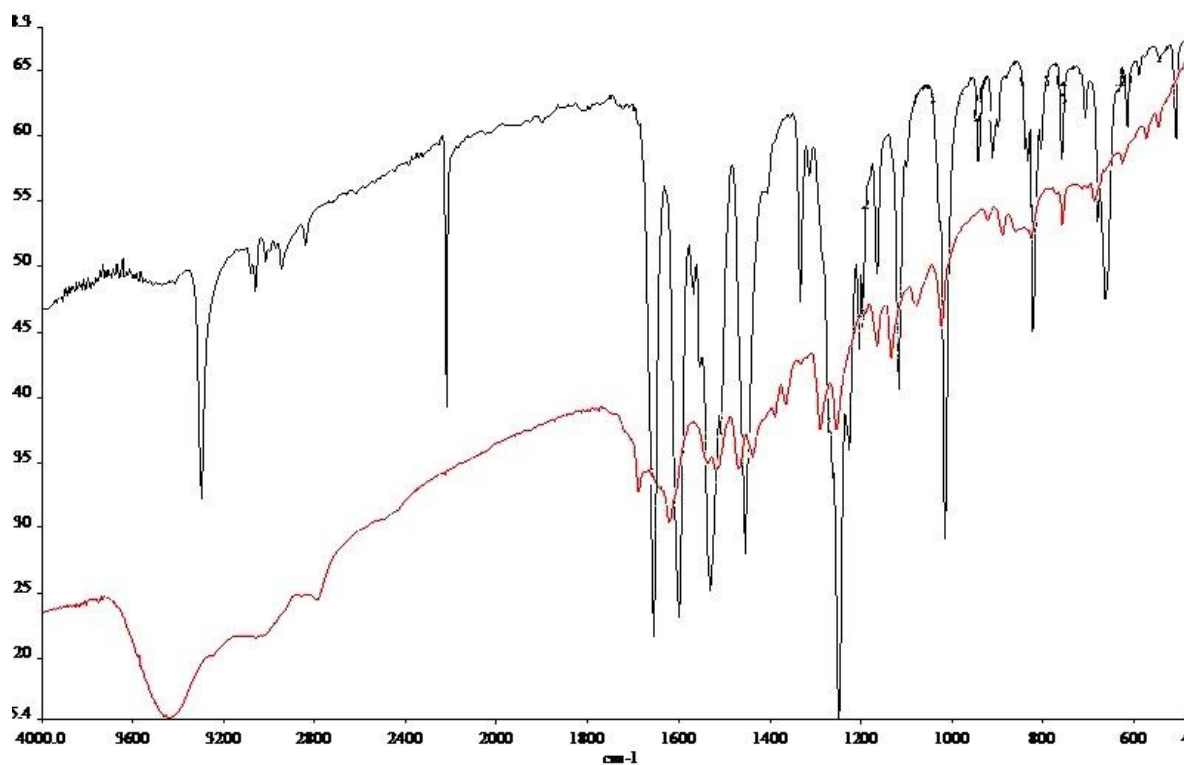
Slika 9.

Posljednji korak sinteze je prevođenje cijano supstituiranog derivata **25** u amidino supstituirani derivat **26** Pinnerovom reakcijom u kiselom mediju prema Shemi 30.



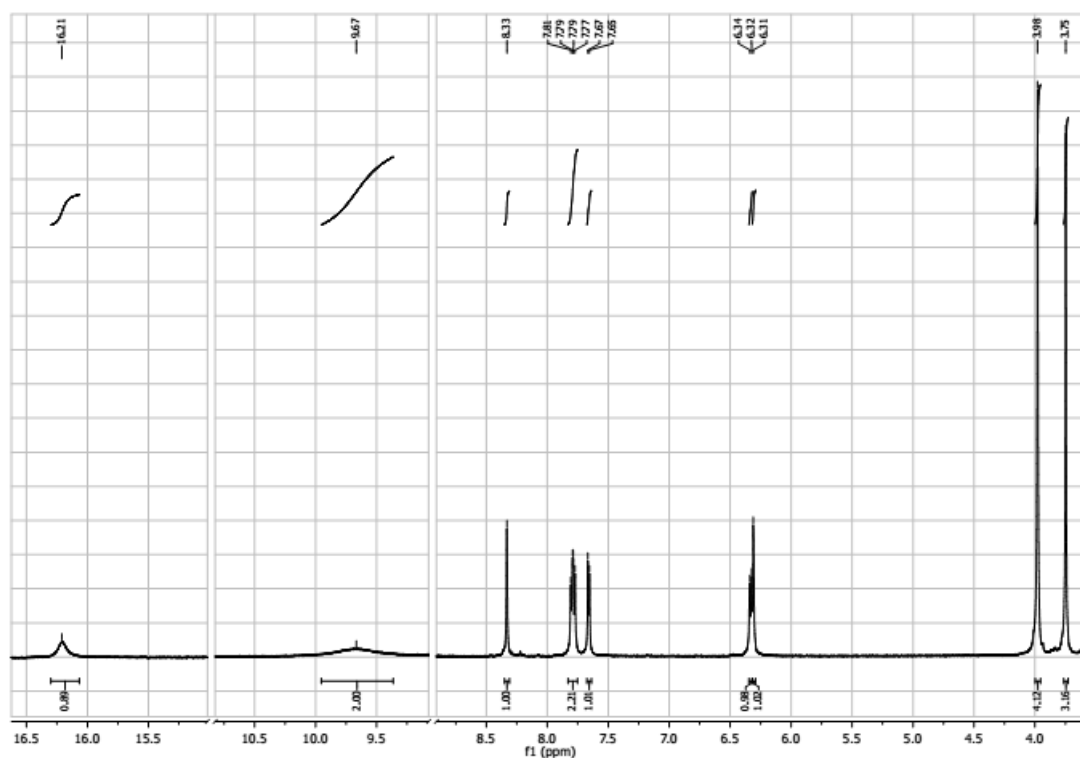
**Shema 30.**

U prvom stupnju Pinnerove reakcije, uvođenjem plinovitog HCl-a u etanolnu otopinu spoja **25**, nakon 14 dana miješanja reakcijske smjese na sobnoj temperaturi, priređen je međuprodukt iminoester. Tijek reakcije praćen je IR spektroskopijom. Završetak reakcije potvrđen je nestankom vrpce na  $\sim 2200\text{ cm}^{-1}$  u IR spektru koja je karakteristična za -CN skupinu. Na Slici 10 prikazan je IR spektar cijano supstituiranog amida **21** (crno) i izoliranog iminoestera (crveno).



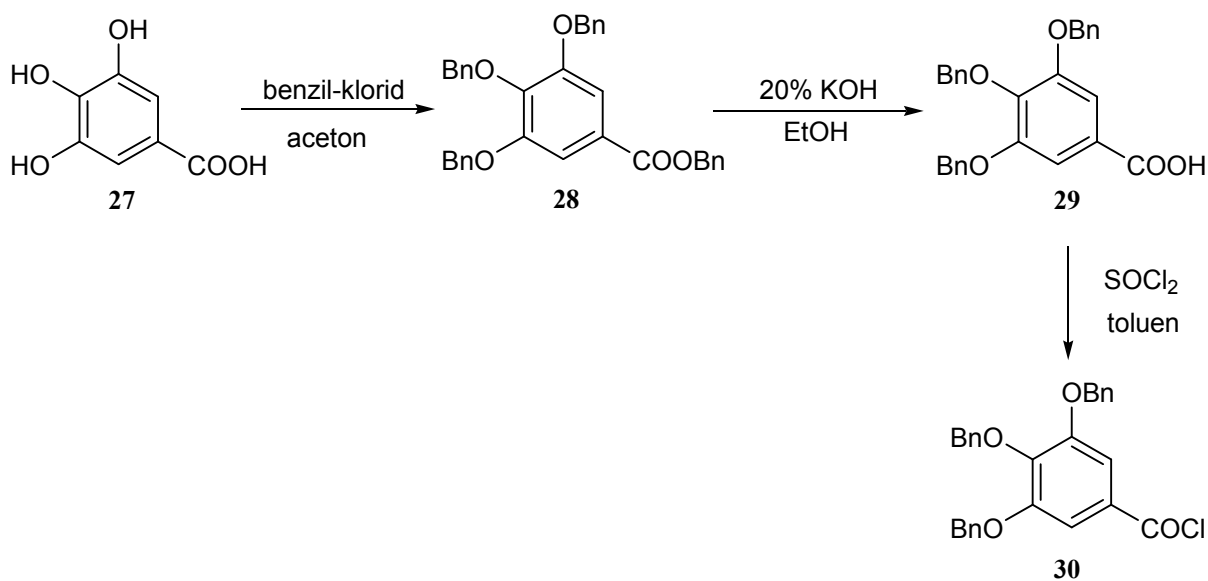
**Slika 30.**

U drugom stupnju Pinnerove reakcije, izolirani iminoester u reakciji sa suviškom etilendiamina u apsolutnom etanolu dao je 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-[6-(2-imidazolilil)-benzotiazol-2-il]benzamid **26** (73%) čija je struktura potvrđena <sup>1</sup>H NMR spektroskopijom, a spektar je prikazan na Slici 11. Signal na 3,75 ppm ukazuje na prisutnost metoksi skupine, a signal na 3,98 ppm odgovara protonima dvije CH<sub>2</sub> skupine imidazolinskog prstena. U aromatskom dijelu spektra vidljiv je odgovarajući broj signala aromatskih protona u području od 8,33 do 6,31 ppm. Proton amidne veze daje signal na 16,21 ppm, a preostali signal na 9,67 ppm daju protoni amidina.



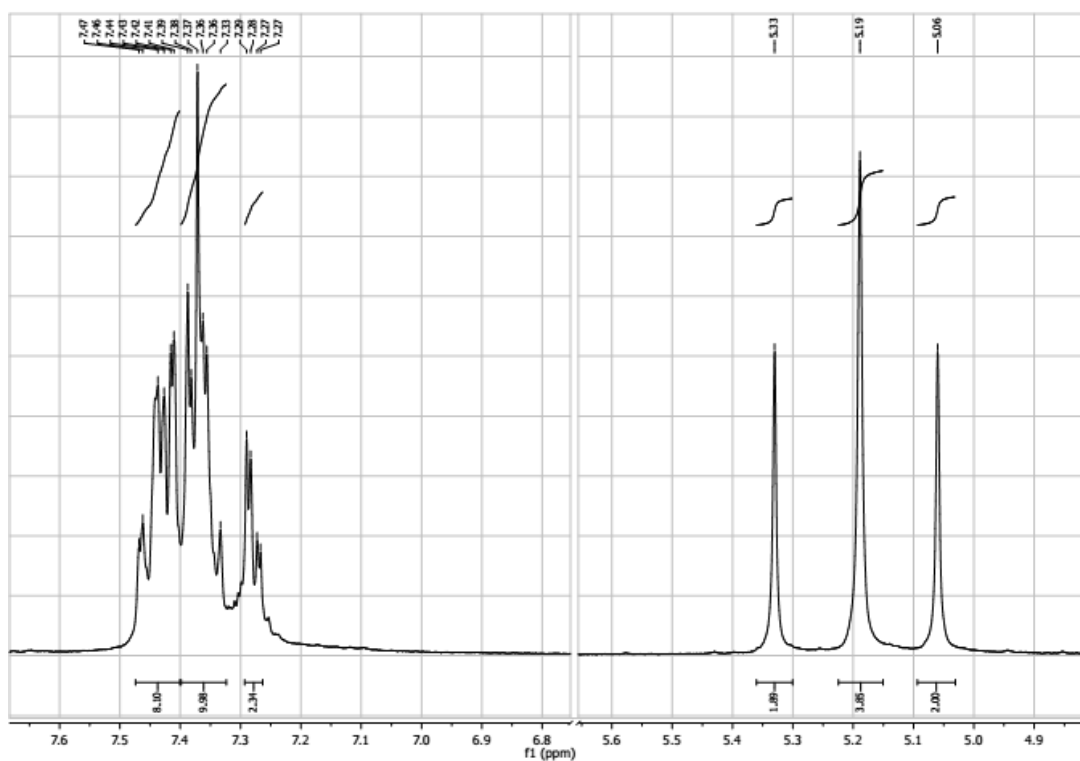
Slika 11.

Drugi sintetski put za sintezu hidroksi supstituiranih derivata benzamida korišten u ovom radu je metoda gdje se hidroksilna skupina zaštićuje sa benzilnom zaštitnom skupinom. U tri stupnja sintetiziran je kiselinski klorid odgovarajuće kiseline sa zaštitama (Shema 31). U prvom stupnju sve OH skupine galne kiseline **27**, uključujući i karboksilnu OH skupinu, zaštićene su benzilnim skupinama. Reakcija je provedena u acetonu uz benzil-klorid kao reagens. Produkt je pročišćen kromatografijom na koloni, a kao eluens je korišten sustav otapala *n*-heksan-etil acetat 10:1. Dobiven je bijeli praškasti produkt, benzil-3,4,5-tri(benziloksi)benzoat **28** u vrlo niskom iskorištenju (9,58%) čija je struktura potvrđena <sup>1</sup>H NMR spektroskopijom.



Shema 31.

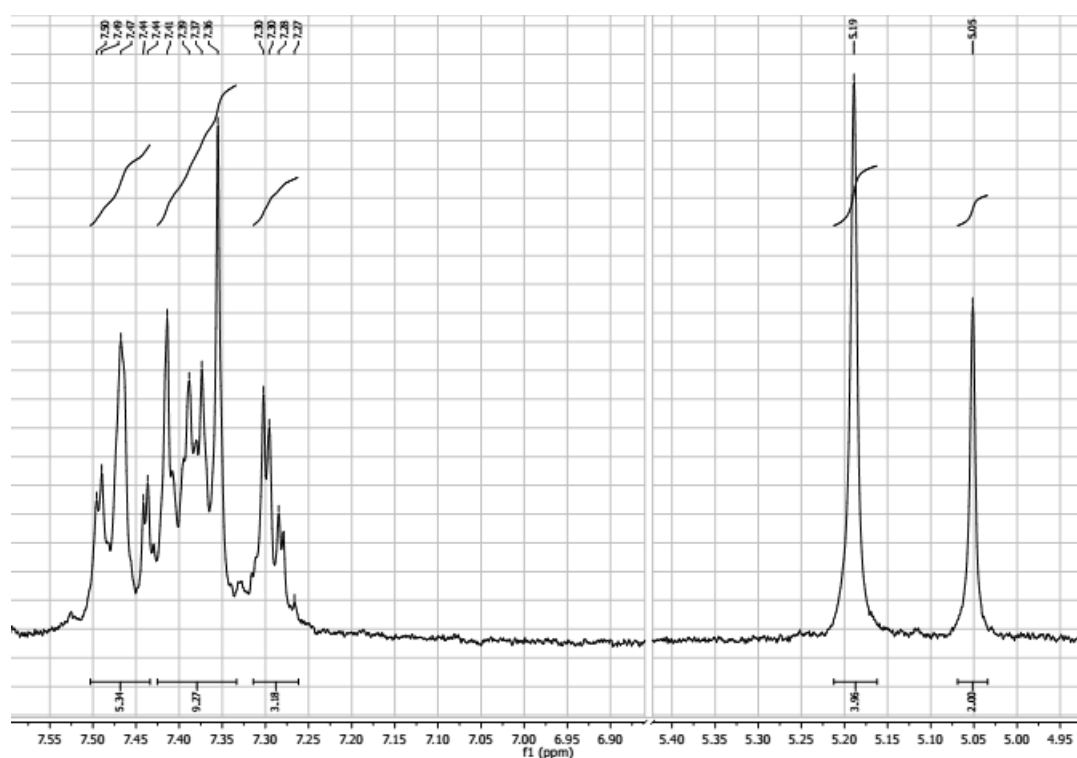
Na Slici 12 prikazan je spektar benzil-3,4,5-tri(benziloksi)benzoata **28**. U području od 5,33 do 5,06 ppm vidljiva su tri signala koji odgovaraju protonima 4 metilenske skupine benzilne zaštitne skupine. Preostali signali u području od 7,47 do 7,27 ppm odgovaraju aromatskim protonima kiseline i benzilnih zaštitnih skupina.



Slika 14.

U sljedećem stupnju uklonjena je zaštitna skupina s karboksilne skupine kako bi mogla reagirati u sljedećem stupnju. Mogućnost uklanjanja isključivo zaštite sa karboksilne skupine rezultat je različite jakosti veze zaštitne skupine i kisika vezanog na benzensku jezgru i kisika iz karboksilne skupine. Reakcija je provedena u etanolu uz 20% vodenu otopinu kalijevog hidroksida. Dobivena je 3,4,5-tri(benziloksi)benzojeve kiselina **29** (63,7%) čiji je  $^1\text{H}$  NMR spektar prikazan na Slici 13.

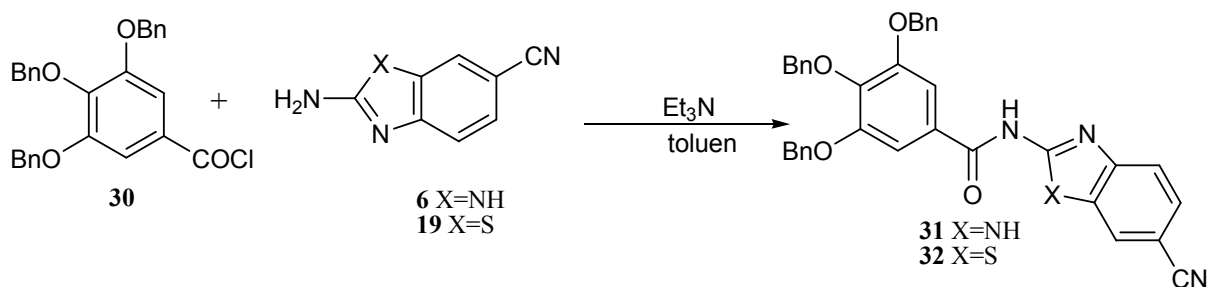
U odnosu na prethodni spektar prikazan na Slici 12, uočava se jedan signal manje karakterističan za metilenske protone te 5 protona manje u aromatskom dijelu spektra što potvrđuje uklanjanje jedne benzilne zaštite.



Slika 15.

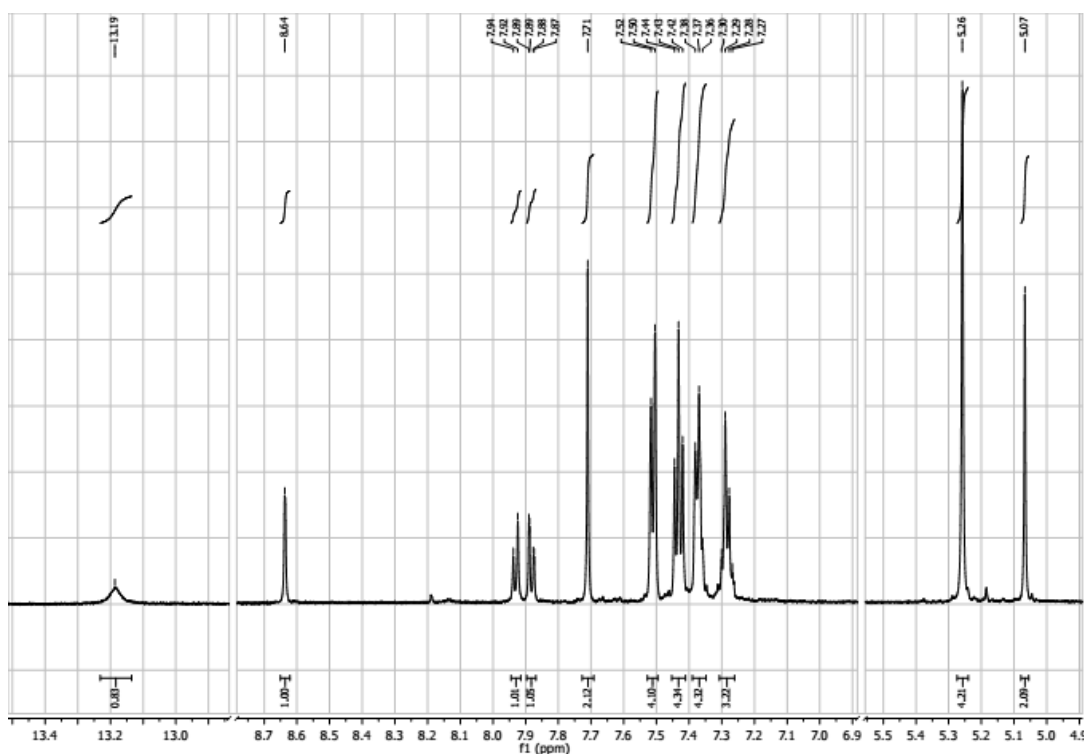
3,4,5-tri(benziloksi)benzoil-klorid **30** priređen je već spomenutom metodom u visokom iskorištenju (83,52%).

Reakcije kondenzacije 2-amino-5-cijanobenzimidazola **6** i 2-amino-6-cijanobenzotiazola **19** s 3,4,5-tri(benziloksi)benzoil-kloridom **30** provedena je već opisanom metodom prema Shemi 32. Strukture spojeva 3,4,5-tri(benziloksi)-*N*-(5-cijanobenzimidazol-2-il)benzamida **31** (78,9%) i 3,4,5-tri(benziloksi)-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida **32** (28,1%) potvrđene su  $^1\text{H}$  NMR spektroskopijom.



**Shema 32.**

Spektar 3,4,5-tri(benziloksi)-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida **32** prikazan je na Slici 14. Na 5,26 ppm vidljivi su signali četiri ekvivalentna protona dvije metilenske skupine dok se signal protona treće metilenske skupine nalazi na 5,07 ppm. Signali odgovarajućih aromatskih protona nalaze se u području od 8,64 do 7,27 ppm. Proton amidne veze dao je signal vidljiv na 13,19 ppm.

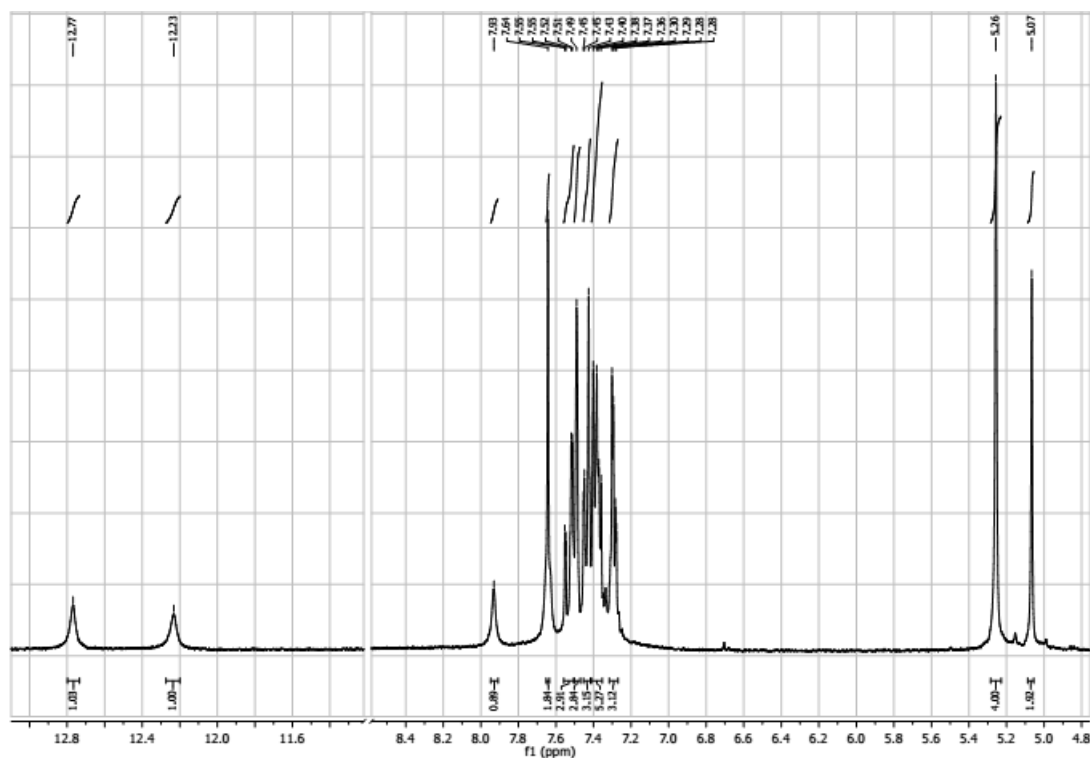


**Slika 14.**

U  $^1\text{H}$  NMR spektru spoja 3,4,5-tri(benziloksi)-*N*-(5-cijanobenzimidazol-2-il)benzamida **31** prikazanog na Slici 15, u zasjenjenom dijelu spektra vidljiv je signal na 5,07 ppm koji odgovara protonima dvije metilenske skupine te na 5,07 ppm koji daju protoni preostale metilenske skupine benzilnih zaštitnih skupina. U području od 7,93 do 7,29 ppm nalaze se signali za odgovarajuć broj aromatskih protona. U nezasjenjenom dijelu spektra vidljiva su

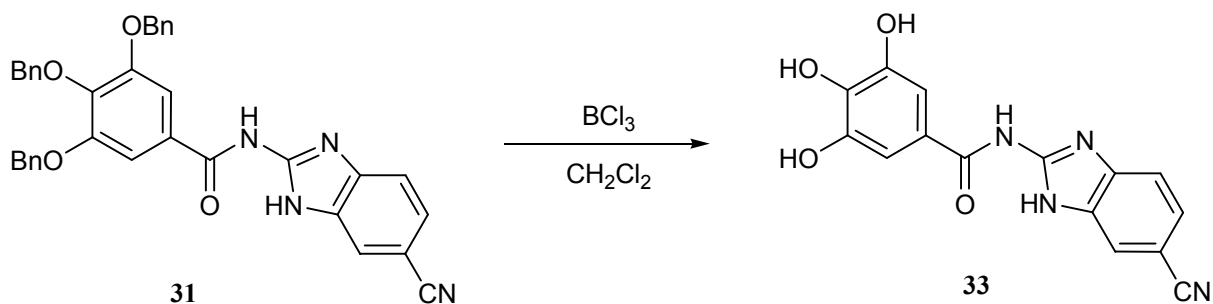


dva signala na 12,77 i 12,23 koja odgovaraju protonima vezanim na amidni i benzimidazolski atom dušika.



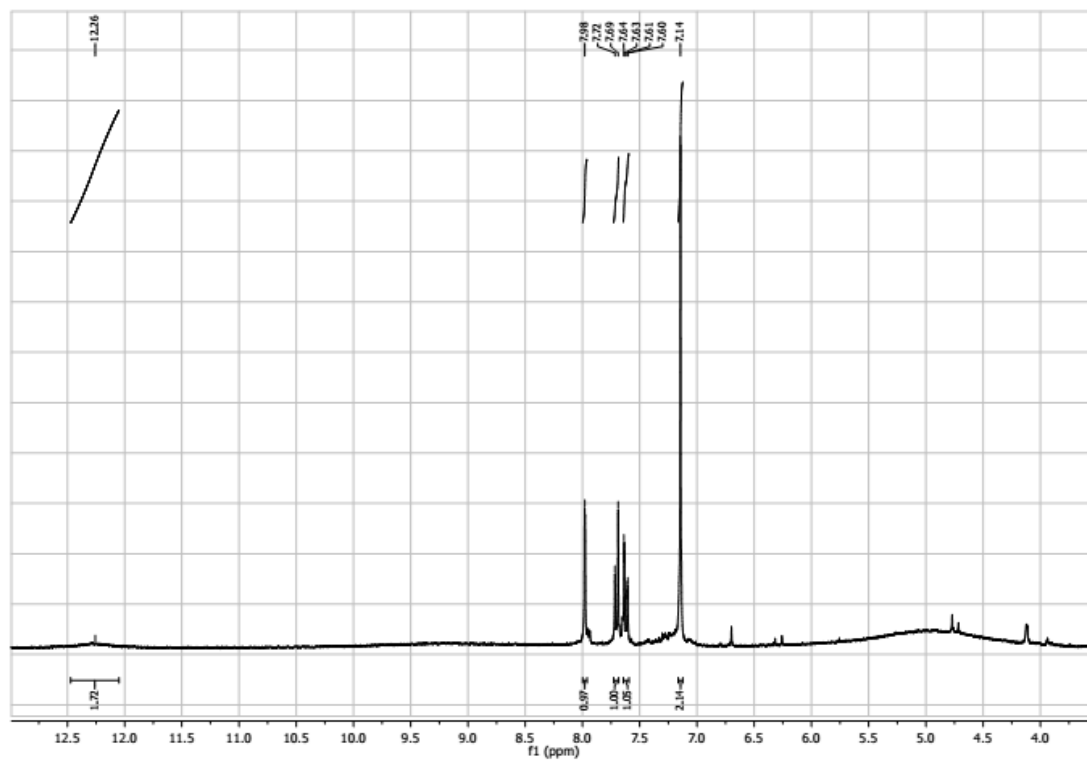
Slika 15.

Zbog vrlo male količine spoja **32**, uklanjanje zaštitne skupine provedeno je samo na spoju **31** prema Shemi 33. Postupak uklanjanja benzilne zaštite identičan je onome za uklanjanje metoksi zaštitne skupine. Dobiven je produkt 3,4,5-trihidroksi-*N*-(6-cijanobenzimidazol-2-il)benzamid **33** u vrlo visokom iskorištenju (96,7%). Struktura spoja potvrđena je  $^1\text{H}$  NMR spektroskopijom.



Shema 33.

Na Slici 16 prikazan je  $^1\text{H}$  NMR spektar 3,4,5-trihidroksi-*N*-(6-cijanobenzimidazol-2-il)benzamida **33** na kojem je jasno vidljivo da su benzilne zaštitne skupine uklonjene. Signal na 12,26 ppm dao je proton amidne veze dok ostali signali u području od 7,98 do 7,14 ppm pripadaju protonima aromatske jezgre.



Slika 16.

## **4. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### 4. 1. Opće napomene

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

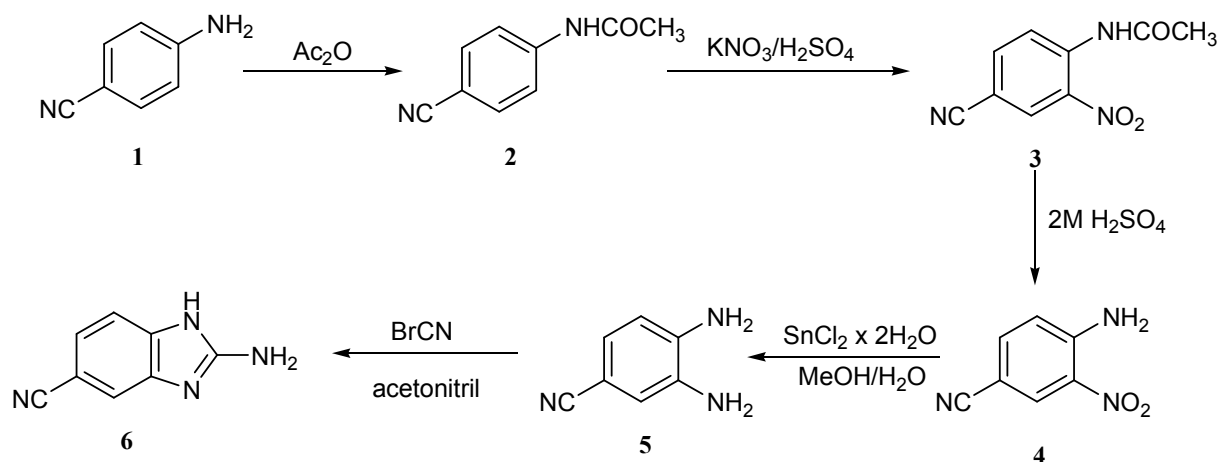
IR spektri snimljeni su na spektrometru Bruker Vertex 70 spektrofotometru s dijamantnim kristalom direktnim nanošenjem uzorka na dijamantnu podlogu.

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

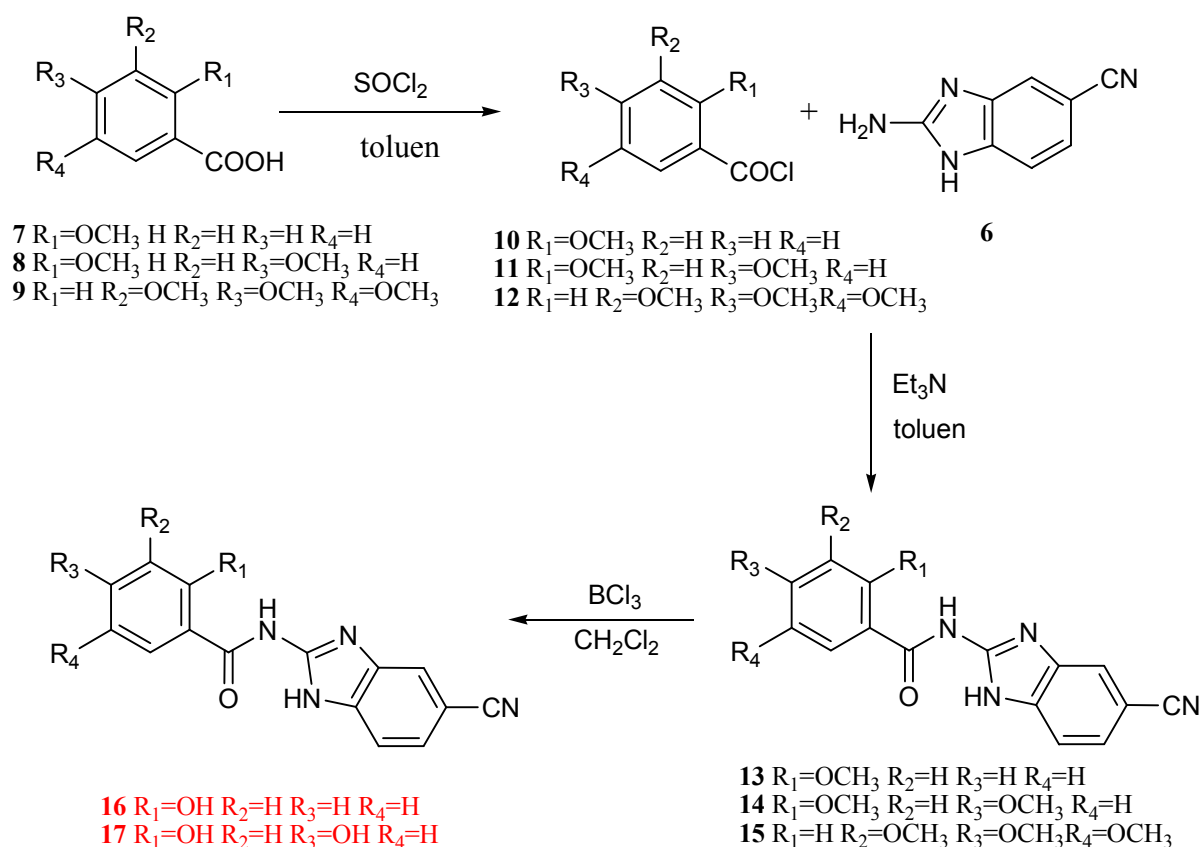
Reakcije su provedene uobičajenim sintetskim metodama. Svi spojevi su rutinski provjeravani tankoslojnom kromatografijom (TLC) koristeći ploče presvučene silikagelom Merck 60F-254 te detektirani pod UV svjetlom (254 nm).

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

## 4.2. Priprava 6-supstituiranih 2-aminobenzimidazola



Shema 3. Priprava 2-amino-5-cijanobenzimidazola



Shema 4. Priprava 6-supstituiranih 2-aminobenzimidazola

#### 4.2.1. Priprava 4-acetamidobenzonitrila 2

4-aminobenzonitril **1** (2 g, 0,017 mol) se dodaje polako (kroz 1 sat) u anhidrid octene kiseline (16 ml), tako da temperatura ne prijeđe 35 °C. Nakon što je dodana sva količina 4-aminobenzonitrila **1**, suspenzija se miješa 1 sat, pazeći da pritom temperatura ne prijeđe 35 °C. Suspenzija se zatim ohladi u ledenoj kupelji i izlije na usitnjeni led. Nastali produkt se profiltrira, ispere vodom do neutralnog i prekrystalizira iz etanola. Dobiveno je 2,47 g (91%) bijelog kristaliničnog produkta. T.t.= 202-205 °C. (T.t.lit. 205-206 °C).<sup>26</sup>

#### 4.2.2. Priprava 4-acetamido-3-nitrobenzonitrila 3

2,6 g 4-acetamidobenzonitrila **2** (2,6 g; 0,026 mol) KNO<sub>3</sub> otopi se u koncentriranoj sulfatnoj kiselini (13 ml) uz hlađenje u ledenoj kupelji. Kada se sav KNO<sub>3</sub> otopi, dodaje se polako 2,5 g (0,016 mol) 4-acetamidobenzonitrila **2** (kroz 1 sat), uz održavanje temperature oko 0 °C. Suspenzija se miješa na 0 °C 3 sata, te se zatim izlije na usitnjeni led (oko 500 ml). Nastali se produkt profiltrira i dobro ispere hladnom vodom. Dobiveni su žuti praškasti produkt.

#### 4.2.3. Priprava 4-amino-3-nitrobenzonitrila 4

Prethodno dobiveni spoj **3** (1,51 g,  $7,36 \times 10^{-3}$  mol) se suspendira u 39 ml 2M sulfatne kiseline. Suspenzija se zagrijava na temperaturi vrenja 3 sata. Nakon hlađenja, nastali se produkt profiltrira i ispere malom količinom hladne vode. Dobiveno je 0,9 g (75%) žutog praškastog produkta. T.t =. 159-161 °C. (T.t.lit. 160-161 °C).<sup>26</sup>

#### 4.2.4. Priprava 3,4-diaminobenzonitrila 5

4-amino-3-nitrobenzonitril **4** (2 g, 0,012 mol) se suspendira u prethodno pripremljenoj otopini 22 g SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O u smjesi 33 ml koncentrirane HCl i 33 ml metanola. Reakcijska smjesa se zagrijava na temperaturi vrenja pola sata. Nakon hlađenja metanol i HCl se odvoje destilacijom pod sniženim tlakom, doda se 110 ml vode i zaluži s 20%-tnom vodenom otopinom NaOH do pH 14. Ekstrahira se s etil-acetatom, organski sloj se upari pod sniženim tlakom, a dobiveni produkt se prekrystalizira iz etanola. Dobiveno je 1,18 g (74%) svijetlo smeđeg praškastog produkta. T.t =. 142-145 °C. (T.t.lit. 144-146 °C).<sup>26</sup>

#### 4.2.5. Priprava 2-amino-5-cijanobenzimidazola 6

U smjesi vode (81 ml) i metanola (81 ml) otopi se 3,4-diaminobenzonitrila **5** (5 g; 0,038 mol) te se doda prethodno pripremljena otopina BrCN (3,9 g, 0,037 mol) u 7,4 ml acetonitrila. Reakcijska smjesa se miješa 24 sata na sobnoj temperaturi. Zatim se doda aktivni ugljen, otopina se profiltrira i zaluži s koncentriranom vodenom otopinom amonijaka do pH >9.

Nastali produkt se profiltrira i ispere malom količinom hladne vode. Dobiveno je 5,96 g (97%) bijelog praškastog produkta. T.t.= 212-215 °C. (T.t.<sub>lit.</sub> 213-215 °C).<sup>26</sup>

#### 4.2.6. Priprava 2-metoksibenzoil-klorida 10

2-metoksibenzojeva kiselina **7** (5 g; 0,033 mol) otopi se u apsolutnom toluenu (70 ml) i doda se tionil-klorid (3,6 g; 0,030 mol). Reakcijska smjesa zagrijava se na temperaturi vrenja preko noći nakon čega se suvišak tionil-klorida ukloni destilacijom pod sniženim tlakom, a dobiveni produkt se nekoliko puta ispere apsolutnim toluenom. Dobiveno je 5,38 g (95,9%) bijelog praškastog produkta.

#### 4.2.7. Priprava 2-metoksi-*N*-(5-cijanobenzimidazol-2-il)benzamida 13

U okruglu tikvicu stavi se 2-amino-5-cijanobenzimidazol **6** (1,98 g; 0,013 mol) te se doda apsolutni toluen (30 ml), 2-metoksibenzoil-klorid **10** (2,14 g; 0,013 mol) te Et<sub>3</sub>N (1,77 g; 0,018 mol). Reakcijska smjesa se zagrijava na sobnoj temperaturi vrenja preko noći. Nakon hlađenja smjesa se filtrira te ispere s razrijeđenom HCl i vodom. Dobiveno je 2,22 g (58,4%) svijetlosivog praškastog produkta. T.t. = 234-237 °C.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) (δ/ppm): 11,55 (s, 1H, NH<sub>amid</sub>), 7,92 (d,  $J = 0,7$  Hz, 1H, H<sub>arom</sub>), 7,79 (dd,  $J_1 = 7,6$ ,  $J_2 = 1,6$  Hz, 1H, H<sub>arom</sub>), 7,63 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H, H<sub>arom</sub>), 7,55 (dt,  $J_1 = 9,0$ ,  $J_2 = 1,4$  Hz, 1H, H<sub>arom</sub>), 7,25 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H, H<sub>arom</sub>), 7,13 (t,  $J = 7,5$  Hz, 1H, H<sub>arom</sub>), 3,96 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO) (δ/ppm): 165,13, 157,11, 148,65, 133,58, 130,18, 125,07, 121,94, 120,71, 120,15, 112,34, 56,16.

#### 4.2.8. Priprava 2,4-dimetoksibenzoil-klorida 11

2,4-dimetoksibenzojeva kiselina **8** (5 g; 0,027 mol) otopi se u apsolutnom toluenu (70 ml) i doda se tionil-klorid (4,9 g; 0,041 mol). Reakcijska smjesa zagrijava se na temperaturi vrenja preko noći nakon čega se suvišak tionil-klorida ukloni destilacijom pod sniženim tlakom, a dobiveni produkt se nekoliko puta ispere apsolutnim toluenom. Dobiveno je 3,63 g (67,0%) bijelog praškastog produkta.

#### 4.2.9. Priprava 2,4-dimetoksi-*N*-(5-cijanobenzimidazol-2-il)benzamida 14

U okruglu tikvicu stavi se 2-amino-5-cijanobenzimidazol **6** (1,33 g;  $8,42 \times 10^{-3}$  mol) te se doda apsolutni toluen (30 ml), 2,4-dimetoksibenzoil-klorid **11** (1,69 g;  $8,42 \times 10^{-3}$  mol) te Et<sub>3</sub>N (1,19 g;  $1,79 \times 10^{-3}$  mol). Reakcijska smjesa se zagrijava na temperaturi vrenja preko noći. Nakon hlađenja smjesa se filtrira te ispere s razrijeđenom HCl i vodom. Dobiveno je 1,95 g (71,9%) svijetlosivog praškastog produkta. T.t. = 230-255 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO) ( $\delta$ /ppm): 12,67 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{bi}}$ ), 11,08 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{amid}}$ ), 7,93 – 7,88 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7,62 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7,52 (dd,  $J_1 = 8,3$ ,  $J_2 = 1,5$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6,78-6,73 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 4,02 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,88 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO) ( $\delta$ /ppm): 164,77, 164,35, 159,68, 133,10, 120,69, 113,58, 107,04, 99,21, 57,03, 56,24.

#### 4.2.10. Priprava 3,4,5-trimetoksibenzoil-klorida 12

3,4,5-trimetoksibenzojeva kiselina **9** (5 g; 0,023 mol) otopi se u apsolutnom toluenu (70 ml) i doda se tionil-klorid (4,16 g; 0,035 mol). Reakcijska smjesa zagrijava se na temperaturi vrenja preko noći nakon čega se suvišak tionil-klorida ukloni destilacijom pod sniženim tlakom, a dobiveni produkt se nekoliko puta ispere apsolutnim toluenom. Dobiveno je 4,47 g (92,0%) bijelog praškastog produkta.

#### 4.2.11. Priprava 3,4,5-trimetoksi-*N*-(5-cijanobenzimidazol-2-il)benzamida 15

U okruglu tikvicu stavi se 2-amino-5-cijanobenzimidazol **6** (1,65 g; 0,011 mol) te se doda apsolutni toluen (30 ml) 3,4,5-trimetoksibenzoil-klorid **12** (2,4 g; 0,011 mol) te  $\text{Et}_3\text{N}$  (1,47 g; 0,015 mol). Reakcijska smjesa se zagrijava na temperaturi vrenja preko noći. Nakon hlađenja smjesa se filtrira te ispere s razrijeđenom HCl i vodom te se prekrizalizira iz etanola. Dobiveno je 1,55 g (40,0%) svijetlosmeđeg praškastog produkta. T.t. = 259-261 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO) ( $\delta$ /ppm): 12,75 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{bi}}$ ), 12,26 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{bi}}$ ), 7,94 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7,65 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7,54 (dd,  $J_1 = 8,3$ ,  $J_2 = 1,5$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7,51 (s, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 3,90 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 3,76 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

#### 4.2.12. Opći postupak priprave hidroksi supstituiranih benzamida 16-17

Odgovarajući metoksi supstituirani amid **13**, **14** otopi se u apsolutnom diklormetanu. Reakcijska smjesa se ohladi na 0 °C te se u atmosferi argona doda  $\text{BCl}_3$  nakon čega se miješa preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcija se prekida dodatkom smjese metanol:diklormetan (1 : 1) Prema tankoslojnoj kromatografiji u većini reakcija nije nastao željeni produkt.

##### 4.2.12.1. Pokušaj priprave 2-hidroksi-*N*-(5-cijanobenzimidazol-2-il)benzamida 16

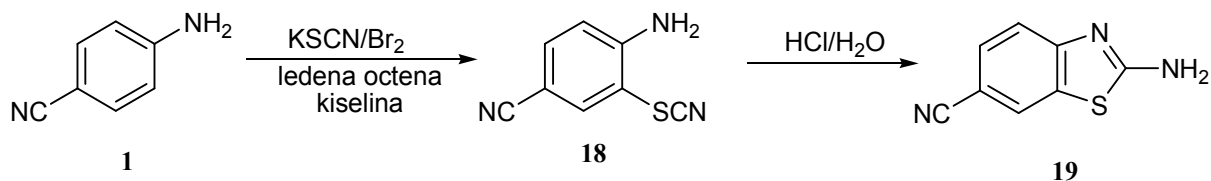
0,500 g ( $1,7 \times 10^{-3}$  mol) **13** i  $\text{BCl}_3$  (0,8 g;  $6,84 \times 10^{-3}$  mol) u apsolutnom diklormetanu (30 ml) u atmosferi argona miješa se na sobnoj temperaturi 24 sata. Željeni produkt nije izoliran.

##### 4.2.12.2. Pokušaj priprave 2,4-hidroksi-*N*-(5-cijanobenzimidazol-2-il)benzamida 17

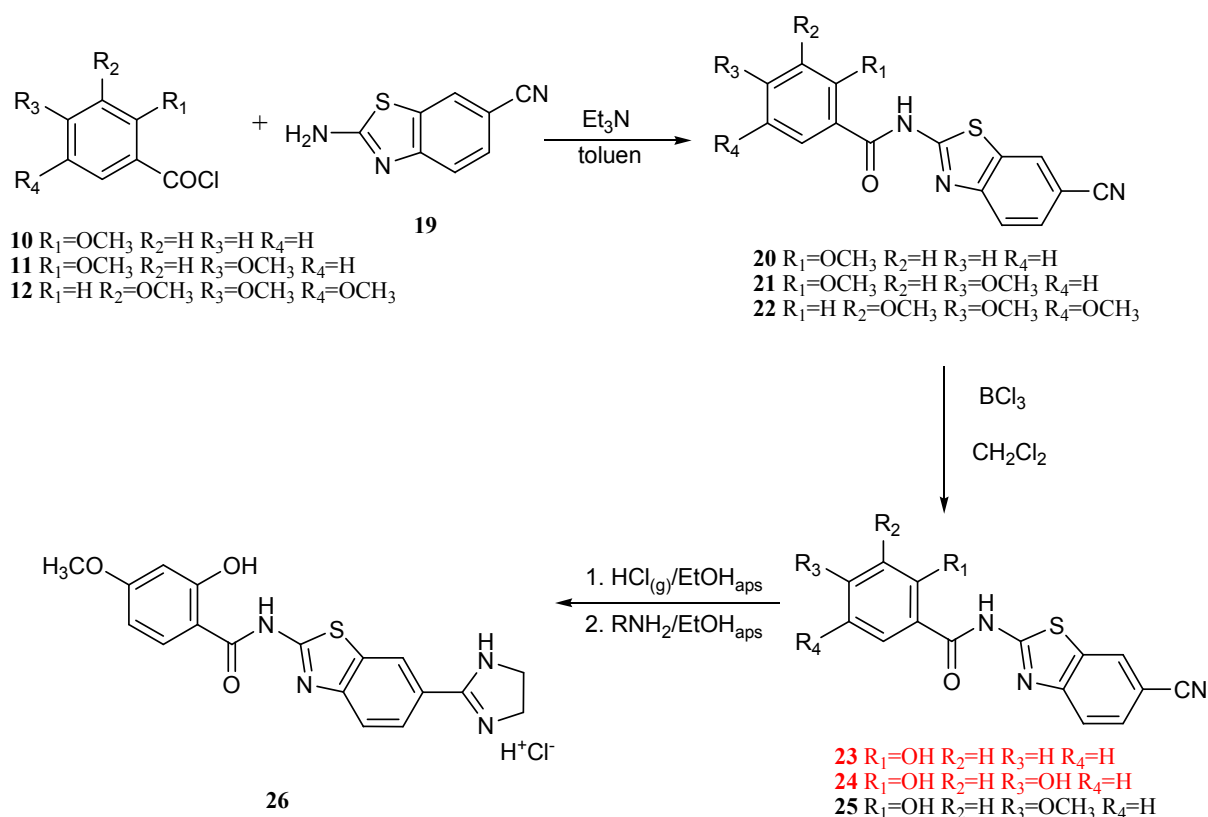
0,500 g ( $1,55 \times 10^{-3}$  mol) **14** i  $\text{BCl}_3$  (0,73 g;  $6,2 \times 10^{-3}$  mol) u apsolutnom diklormetanu (30 ml) u atmosferi argona miješa se na sobnoj temperaturi 24 sata. Željeni produkt nije izoliran.



### 4.3. Priprava 6-supstituiranih 2-aminobenzotiazola



#### Shema 5. Priprava 2-amino-6-cijanobenzotiazola



#### Shema 6. Priprava 6-supstituiranih 2-aminobenzotiazola

##### 4.3.1. Priprava 4-amino-3-tiocijanatobenzonitrila 18

U otopinu KSCN (23,38 g; 0,24 mol) i ledene octene kiseline (116 ml) doda se *p*-aminobenzonitril **1** (7 g; 0,06 mol). Reakcijska smjesa se ohladi na 0 °C te se polagano dokapava smjesa Br<sub>2</sub> (5,90 ml) i ledene octene kiseline (11,60 ml). Tijekom dokapavanja Br<sub>2</sub> temperatura reakcijske smjese održava se u intervalu od 0-10 °C. Nakon što se dokapa cijela količina Br<sub>2</sub> reakcijska smjesa se miješa na sobnoj temperaturi 1 sat. Zatim se izlije na hladnu vodu (700 ml) te se nastali produkt odsiše i posuši na vakuumu. Dobiveno je 10,24 g žutog praškastog sirovog produkta.

#### 4.3.2. Priprava 2-amino-6-cijanobenzotiazola 19

Sirovi 4-amino-3-tiocijanatobenzonitril **18** se otopi u smjesi konc. HCl (48,2 ml) i vode (96,3 ml). Reakcijska smjesa se zagrijava na temperaturi vrenja 2 sata nakon čega se izlije na vodu (1200 ml) te se profiltrira. Filtrat se zaluži 20%-tnom vodenom otopinom NaOH. Nastali talog se filtrira. Dobiveno je 9,28 g (53%) bijelog praškastog produkta. T.t. = 213-216 °C. (T.t.lit. = 217-218 °C).<sup>27</sup>

#### 4.3.3. Priprava 2-metoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida 20

U okruglu tikvicu stavi se 2-amino-6-cijanobenzotiazol **19** (3,36 g; 0,019 mol) te se doda apsolutni toluen (30 ml) 2-metoksibenzoil-klorid **13** (3,27 g; 0,019 mol) te Et<sub>3</sub>N (2,72 g; 0,027 mol). Reakcijska smjesa se zagrijava na temperaturi vrenja preko noći. Nakon hlađenja smjesa se filtrira te ispere s razrijeđenom HCl i vodom. Dobiveno je 3,95 g (67,2%) svijetlosivog praškastog produkta. T.t. = 238-241 °C.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) (δ/ppm): 12,40 (s, 1H, NH<sub>amid</sub>), 8,62 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, H<sub>arom</sub>), 7,92 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, H<sub>arom</sub>), 7,86 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8,4, *J*<sub>2</sub> = 1,6 Hz, 1H, H<sub>arom</sub>), 7,75 (dd, *J*<sub>1</sub> = 7,7, *J*<sub>2</sub> = 1,7 Hz, 1H, H<sub>arom</sub>), 7,62 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H, H<sub>arom</sub>), 7,25 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, H<sub>arom</sub>), 7,13 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H, H<sub>arom</sub>), 3,95 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO) (δ/ppm): 165,90, 162,09, 157,78, 152,20, 134,39, 132,84, 130,84, 130,13, 127,56, 121,74, 121,18, 119,64, 112,83, 105,95, 56,6.

#### 4.3.4. Priprava 2,4-dimetoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida 21

U okruglu tikvicu stavi se 2-amino-6-cijanobenzotiazol **19** (1,70 g; 9,69×10<sup>-3</sup> mol) te se doda apsolutni toluen (30 ml), 2,4-dimetoksibenzoil-klorid **14** (1,94 g; 9,69×10<sup>-3</sup> mol) te Et<sub>3</sub>N (1,37 g; 13,56×10<sup>-3</sup> mol). Reakcijska smjesa se zagrijava na temperaturi vrenja preko noći. Nakon hlađenja smjesa se filtrira te ispere s razrijeđenom HCl i vodom. Dobiveno je 2,58 g (78,5%) bijelog praškastog produkta. T.t. >280 °C.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) (δ/ppm): 11,89 (s, 1H, NH<sub>amid</sub>), 8,60 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H, H<sub>arom</sub>), 7,93 – 7,82 (m, 3H, H<sub>arom</sub>), 6,78 – 6,70 (m, 2H, H<sub>arom</sub>), 4,00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,88 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) (δ/ppm): 164,52, 164,14, 161,63, 159,43, 151,72, 132,74, 132,41, 129,62, 127,02, 121,12, 119,16, 112,51, 106,50, 105,32, 98,73, 56,50, 55,76.

#### 4.3.5. Priprava 3,4,5-trimetoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida 22

U okruglu tikvicu stavi se 2-amino-6-cijanobenzotiazol **19** (2,24 g; 0,013 mol) te se doda apsolutni toluen (30 ml), 3,4,5-trimetoksibenzoil-klorid **15** (2,95 g; 0,013 mol) te Et<sub>3</sub>N (1,88 g; 0,013 mol). Reakcijska smjesa se zagrijava na temperaturi vrenja preko noći. Nakon hlađenja smjesa se filtrira te ispere s razrijeđenom HCl i vodom te se prekrizalizira iz etanola. Dobiveno je 3,30 g (68,7%) svijetlosivog praškastog produkta. T.t. = 251-253 °C.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO) (δ/ppm): 13,16 (s, 1H, NH<sub>amid</sub>), 8,62 (s, 1H, H<sub>arom</sub>), 7,92 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, H<sub>arom</sub>), 7,87 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8,4, *J*<sub>2</sub> = 1,5 Hz, 1H, H<sub>arom</sub>), 7,54 (s, 2H, H<sub>arom</sub>), 3,90 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 3,77 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

#### 4.3.6. Opći postupak priprave hidroksi supstituiranih amida 23 i 24

Odgovarajući metoksi supstituirani amid **20**, **21** otopi se u apsolutnom diklormetanu. Reakcijska smjesa se ohladi na 0 °C te se u atmosferi argona doda BCl<sub>3</sub> nakon čega se miješa preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcija se prekida dodatkom smjese metanol:diklormetan (1 : 1) Prema tankoslojnoj kromatografiji u većini reakcija nije nastao željeni produkt.

##### 4.3.6.1. Pokušaj priprave 2-hidroksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida 23

0,500 g ( $1,61 \times 10^{-3}$  mol) **20** i BCl<sub>3</sub> (0,76 g;  $6,46 \times 10^{-3}$  mol) u apsolutnom diklormetanu (30 ml) u atmosferi argona miješa se na sobnoj temperaturi 24 sata. Željeni produkt nije izoliran.

##### 4.3.6.2. Pokušaj 2,4-dihidroksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida 24

0,500 g ( $1,41 \times 10^{-3}$  mol) **21** i BCl<sub>3</sub> (0,66 g;  $5,63 \times 10^{-3}$  mol) u apsolutnom diklormetanu (30 ml) u atmosferi argona miješa se na sobnoj temperaturi 24 sata. Željeni produkt nije izoliran.

##### 4.3.6.3. Priprava 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida 25

0,500 g ( $1,49 \times 10^{-3}$  mol) spoja **21** i BCl<sub>3</sub> (0,65 g;  $5,6 \times 10^{-3}$  mol) u apsolutnom diklormetanu (30 ml) u atmosferi argona miješa se na sobnoj temperaturi 24 sata. Žuti praškasti produkt izoliran je kromatografijom na koloni gdje je kao eluens korišten sustav diklormetan:metanol 100:1. Dobiveno je 0,012 g žutog praškastog produkta.

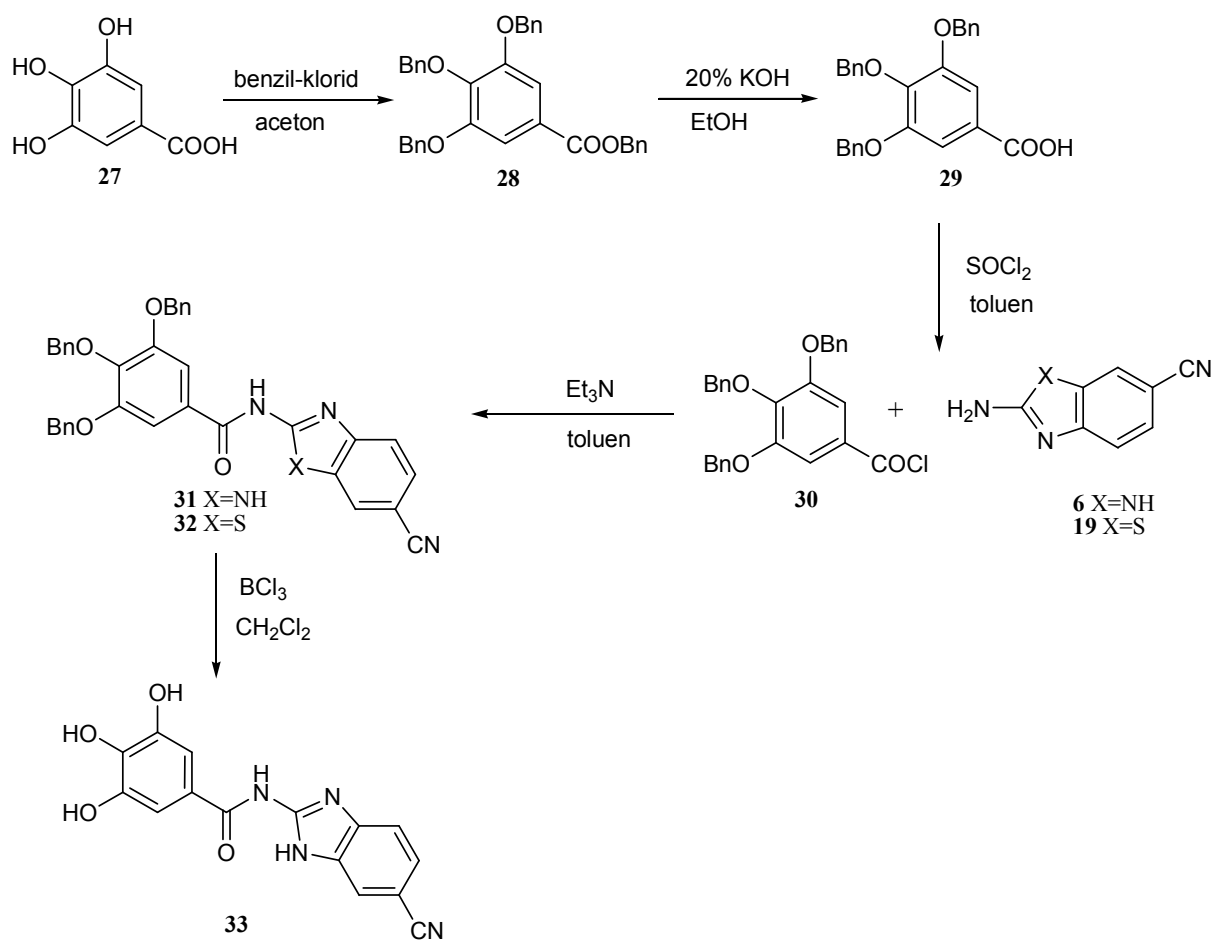
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) (δ/ppm): 12,21 (s, 2H, NH, OH), 8,60 (s, 1H, H<sub>arom</sub>), 8,03 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, H<sub>arom</sub>), 7,88 (s, 2H, H<sub>arom</sub>), 6,65 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8,9, *J*<sub>2</sub> = 2,2 Hz, 1H, H<sub>arom</sub>), 6,59 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, H<sub>arom</sub>), 3,84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO) (δ/ppm): 165,20, 132,66, 130,30, 127,57, 119,62, 107,74, 105,88, 101,84, 56,03.

#### 4.3.7. Priprava 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-[6-(2-imidazolinil)-benzotiazol-2-il]benzamida **26**

U okruglu tikvicu stavi se 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida **25** (0,012 g;  $2,85 \times 10^{-3}$  mol) i doda apsolutni etanol (25 ml), a zatim se na ledenoj kupelji uvodi plinoviti HCl do zasićenja otopine. Nakon toga reakcijska smjesa se miješa 14 dana na sobnoj temperaturi dok nije utvrđen nestanak –CN vrpce u IR spektru. Dodatkom etera taloži svijetložuti talog koji se zatim profiltrira i ispere eterom. U okruglu tikvicu stavi se sirovi produkt i doda apsolutni etanol (15 ml) te etilendiamin (0,018 g;  $0,3 \times 10^{-3}$  mol). Reakcijska smjesa se zagrijava na temperaturi vrenja preko noći. Smjesa se profiltrira i ispere dietil-eterom. Dobiveno je 0,021 g (76%) bež praškastog produkta. T.t. > 280 °C.

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO) ( $\delta$ /ppm): 16,21 (s, 1H, NH), 9,67 (s, 2H,  $\text{NH}_{\text{amidin}}$ ), 8,33 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7,79 (dd,  $J_1 = 12,0$ ,  $J_2 = 8,8$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7,66 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6,33 (d,  $J = 8,7$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6,31 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 3,98 (s, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 3,75 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

## 4.5. Priprava hidroksi supstituiranih amida



Shema 7. Priprava hidroksi supstituiranih amida

### 4.5.1. Priprava benzil-3,4,5-tri(benziloksi)benzoata 28

U okrugloj tikvici galna kiselina **27** (1 g;  $5,9 \times 10^{-3}$  mol) otopi se u acetonu (30 ml) te se doda  $K_2CO_3$  (3,6 g;  $29 \times 10^{-3}$  mol) i benzil-klorid (5,95 g;  $47 \times 10^{-3}$  mol). Reakcijska smjesa miješa se na sobnoj temperaturi preko noći. Reakcijska smjesa se profiltrira, talog se dobro ispere acetonom a filtrat se upari do suha. Dobiveni uljeviti produkt se otopi u etil acetatu, pere se vodom (2x10 ml) i zasićenom otopinom NaCl (2x10 ml) te se suši iznad  $MgSO_4$ . Sirovi produkt pročisti se kromatografijom na koloni. Kao eluens koristi se sustav otapala *n*-heksan:etil acetat 10:1. Dobiven je 0,300 g (9,58%) bijeli praškasti produkt.

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO) ( $\delta$ /ppm): 7,47 - 7,33 (m, 18H,  $H_{arom}$ ), 7,29 - 7,27 (m, 4H,  $H_{arom}$ ), 5,33 (s, 2H,  $CH_2$ ), 5,19 (s, 4H,  $CH_2$ ), 5,06 (s, 2H,  $CH_2$ ).

#### 4.5.2. Priprava 3,4,5-tri(benziloksi)benzojeve kiseline 29

0,300 g benzil-3,4,5-tri(benziloksi)benzoata **28** otopi se u etanolu (20 ml), doda se 20% vodena otopina KOH (5 ml) te se zagrijava 2 sata na temperaturi vrenja. Etanol se ukloni destilacijom pod sniženim tlakom. KOH se ukloni ekstrakcijom s etil acetatom te se organski sloj ispire otopinom NaCl te se suši iznad MgSO<sub>4</sub>. Dobiveno je 0,240 g (63,7%) bijeli praškasti produkt.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO) (δ/ppm): 7,50 - 7,43 (m, 5H, H<sub>arom</sub>), 7,41 - 7,36 (m, 9H, H<sub>arom</sub>), 7,30 - 7,27 (m, 3H, H<sub>arom</sub>), 5,19 (s, 4H, CH<sub>2</sub>), 5,05 (s, 2H, CH<sub>2</sub>).

#### 4.5.3. Priprava 3,4,5-tri(benziloksi)benzoil-klorida 30

3,4,5-tri(benziloksi)benzojeva kiselina **29** (0,240 g; 0,54×10<sup>-3</sup> mol) otopi se u apsolutnom toluenu (10 ml) i doda se tionil-klorid (0,012 g; 0,108×10<sup>-3</sup> mol). Reakcijska smjesa zagrijava se na temperaturi vrenja 36 sati nakon čega se suvišak tionil-klorida ukloni destilacijom pod sniženim tlakom, a dobiveni produkt se nekoliko puta ispire apsolutnim toluenom. Dobiveno je 0,207 g (83,52%) žutog uljevitog produkta.

#### 4.5.4. Priprava 3,4,5-tri(benziloksi)-N-(5-cijanobenzimidazol-2-il)benzamida 31

U okruglu tikvicu stavi se 2-amino-5-cijanobenzimidazola **6** (0,252 g; 0,55×10<sup>-3</sup> mol) te se doda apsolutni toluen (15 ml) 3,4,5-tri(benziloksi)benzoil-klorida **30** (0,087 g; 0,55×10<sup>-3</sup> mol) te Et<sub>3</sub>N (0,15 ml g; 1,1×10<sup>-3</sup> mol). Reakcijska smjesa se zagrijava na temperaturi vrenja preko noći. Nakon hlađenja smjesa se filtrira te ispere s razrijeđenom HCl i vodom. Sirovi produkt pročisti se kromatografijom na koloni. Kao eluens koristi se sustav otapala diklormetan:metanol 100:1. Dobiveno je 0,125 g (78,9%) bijelog praškastog produkta.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) (δ/ppm): 12,77 (s, 1H, NH), 12,23 (s, 1H, NH), 7,93 (s, 1H, H<sub>arom</sub>), 7,64 (s, 2H, H<sub>arom</sub>), 7,53 (d, *J*<sub>1</sub> = 10,3, *J*<sub>2</sub> = 1,6 Hz, 3H, H<sub>arom</sub>), 7,49 (s, 3H, H<sub>arom</sub>), 7,45 - 7,42 (m, 3H, H<sub>arom</sub>), 7,38 (dd, *J*<sub>1</sub> = 7,9, *J*<sub>2</sub> = 4,7 Hz, 5H, H<sub>arom</sub>), 7,29 (dd, *J*<sub>1</sub> = 5,1, *J*<sub>2</sub> = 1,8 Hz, 3H, H<sub>arom</sub>), 5,26 (s, 4H, CH<sub>2</sub>), 5,07 (s, 2H, CH<sub>2</sub>).

#### 4.5.5. Priprava 3,4,5-tri(benziloksi)-N-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida 32

U okruglu tikvicu stavi se 2-amino-6-cijanobenzotiazola **19** (0,023 g; 0,136×10<sup>-3</sup> mol) te se doda apsolutni toluen (10 ml) 3,4,5-tri(benziloksi)benzoil-klorida **30** (0,06 g; 0,136×10<sup>-3</sup> mol) te Et<sub>3</sub>N (0,019 g; 0,19×10<sup>-3</sup> mol). Reakcijska smjesa se zagrijava na temperaturi vrenja preko noći. Nakon hlađenja smjesa se filtrira te ispere s razrijeđenom HCl i vodom. Dobiveno je 0,022 g (28,1%) smeđeg praškastog produkta. T.t. = 259-261 °C.

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO) ( $\delta$ /ppm): 13,19 (s, 1H, NH), 8,64 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7,93 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7,88 (dd,  $J_1 = 8,41$ ,  $J_2 = 1,4$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7,71 (s, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7,51 (d,  $J = 7,3$  Hz, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7,43 (t,  $J = 7,5$  Hz, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7,38 - 7,36 (m,  $J = 6,7$  Hz, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7,30 - 7,27 (m,  $J = 6,3$  Hz, 3H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 5,26 (s, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 5,07 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ).

#### 4.5.5. Priprava 3,4,5-trihidroksi-*N*-(6-cijanobenzimidazol-2-il)benzamida 33

Spoj **32** (0,125 g,  $0,2 \times 10^{-3}$  mol) otopi se u apsolutnom diklormetanu. Reakcijska smjesa se ohladi na 0 °C te se u atmosferi argona doda  $\text{BCl}_3$  (0,014 g;  $1,2 \times 10^{-3}$  mol) nakon čega se miješa preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcija se prekida dodatkom smjese metanol : diklormetan (1:1). Dobiveni talog se profiltrira i ispere diklormetanom. Dobiveno je svijetlosmeđi talog 0,06 g (96,7%). T.t. > 280 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO) ( $\delta$ /ppm): 12,26 (s, 2H, NH), 7,98 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7,70 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7,62 (dd,  $J_1 = 8,4$ ,  $J_2 = 1,4$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7,14 (s, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ).

## **5. ZAKLJUČAK**



- U ovom radu priređeni su sljedeći spojevi: 2-metoksi-*N*-(5-cijanobenzimidazol-2-il)benzamid **13**, 2,4-dimetoksi-*N*-(5-cijanobenzimidazol-2-il)benzamid **14**, 3,4,5-trimetoksi-*N*-(5-cijanobenzimidazol-2-il)benzamid **15**, 2-metoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)-benzamid **20**, 2,4-dimetoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamid **21**, 3,4,5-trimetoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamid **22**, 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamid **25**, 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-[6-(2-imidazolinil)-benzotiazol-2-il]benzamid **26**, 3,4,5-tri(benziloksi)-*N*-(5-cijanobenzimidazol-2-il)benzamid **31**, 3,4,5-tri(benziloksi)-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamid **32**, 3,4,5-trihidroksi-*N*-(6-cijanobenzimidazol-2-il)benzamid **33**.
- Amidi **13**, **14**, **15**, **20**, **21** i **22** priređeni su kondenzacijom 2-amino-5-cijanobenzimidazola **6** odnosno 2-amino-6-cijanobenzotiazola **19** s odgovarajućim metoksi zaštićenim kiselinskim kloridima.
- Amidi **31** i **32** priređeni su kondenzacijom istih spojeva s 3,4,5-tri(benziloksi)benzoil-kloridom **30**.
- Spoj 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamid **25** priređen je metodom uklanjanja metoksi skupine pomoću reagensa BCl<sub>3</sub> u atmosferi argona.
- 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-[6-(2-imidazolinil)-benzotiazol-2-il]benzamid **26** priređen je Pinnerovom reakcijom u kiselom mediju iz 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida **25**.
- Tijek Pinnerove reakcije praćen je IR spektroskopijom.
- 3,4,5-trihidroksi-*N*-(6-cijanobenzimidazol-2-il)benzamid **33** priređen je postupkom uklanjanja benzilne zaštitne skupine pomoću reagensa BCl<sub>3</sub> u atmosferi argona.
- Novopriređeni spojevi strukturno su okarakterizirani korištenjem <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR i IR spektroskopije.

## **6. LITERATURA**

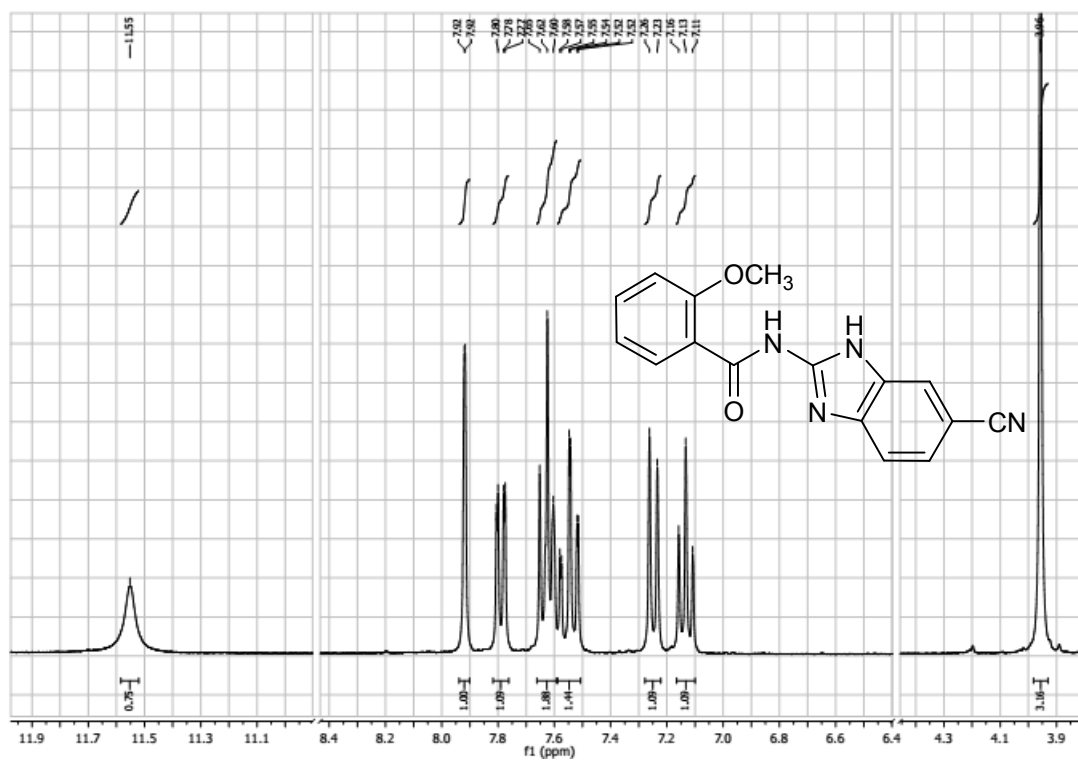
1. A. K. Ghose, V. N. Viswanadhan and J. J. Wendoloski, *Combinatorial Chemistry* **1** (1999) 55–68.
2. S. D. Roughley, A. M. Jordan, *J. Med. Chem.* **54** (2011) 3451-3479.
3. H. Lundberg, F. Tinnis, N. Selander, H. Adolfsson, *Chem. Soc.* **43** (2014) 2714.
4. A. Cynthia, B. E. Maryanoff, *ARKIVOC* **7** (2010) 190.
5. C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **61** (2005) 10828-10831.
6. K. Venkataraman,.; D. R. Wagle, *Tetrahedron* **32** (1979) 3037-3040.
7. H. M. Meshram, G. S. Reddy, M. M. Reddy, J. S. Yadav, *Tetrahedron* **39** (1998) 4103-4106.
8. F. I. Luknitskii, B. A. Vovsi, *Usp. Khim.* **38** (1969) 1072–1088.
9. A. Khatkar, A. Nanda, P. Kumar, B. Narasimhan, *Arabian Journal of Chemistry* (2014) 1-11.
10. E. Rivero-Buceta, P. Carrero, E. G. Doyagüez, A. Madrona, E. Quesada, M. J. Camarasa, M.J. Pérez, P. Leyssen, J. Paeshuyse, J. Balzarini, J. Neyts, A. San-Félix, *European Journal Of Medicinal Chemistry* **92** (2015) 656 – 663.
11. K.J. Winstanley, D.K. Smith, *J.Org. Chem.* **72** (2007) 2803-2815.
12. E. Veraková, M. Mečiarnová, Š. Toma, J. Balko, *Monatshefte für Chemie* **134** (2003) 1215-1217.
13. J. Matyk, K. Waissner, K. Dražková, J. Kuneš, V. Klimešová, K. Palát, J. Kaustová, *Il Farmaco* **60** (2005), 399-401.
14. L. Goldberg, W. Lawson, R. Robinson, *Nature* **141** (1938) 247–248.
15. A. Calderelli, P. Minazzi, P. L. Canonico, A. A. Genazzani, G.B. Giovenaza, *Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry*, **28** (2013) 148-152.
16. B.D. Palmer, S. Trumpp-Kallmeyer, D.W. Fry, J.M. Nelson, H.D.H. Showalter, W.A. Denny, *J. Med. Chem* **40** (1997) 1519–1529.

17. C. Liechti, U. Séquin, G. Bold, P. Furet, T. Meyer, P. Traxler, *European Journal Of Medicinal Chemistry* **39** (2004) 11-15.
18. Z. Zhu, L. Shi, X. Ruan, Y. Yang, H. Li, S. Xu, H. Zhu, *Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry*, **26** (2001) 37-44.
19. D.J. Burkhart, B.L. Barthel, G.C. Post, B.T. Kalet, J. W. Nafie, R. K. Shoemaker, T. H. Koch *J Med Chem* **49** (2006) 7002–7012.
20. P.W. Hsieh, F.R. Chang, C.C. Wu, K.Y. Wu, C.M. Li, S.L. Chen, YC Wu. *J. Nat. Prod.* **67** (2004) 1522–1527.
21. S. Kamath, J.K. Buolamwini, *J. Med Chem* **46** (2003) 4657-4668.
22. D.H. Boschelli, *Drugs Future* **24** (1999) 515–537.
23. P.J. Mannon, I. J. Fuss, L. Mayer, C. O. Elson, W. J. Sandborn, D. Present, B. Dolin, N. Goodman, C. Groden, R. L. Hornung, M. Quezado, M. F. Neurath, J. Salfeld, G. M. Veldman, U. Schwertschlag, W. Strober, *New Engl. J. Med.* **351** (2004) 2069–2079.
24. A. M. Cooper, S. A. Khader, *Trends Immunol.* **28** (2007) 33–38.
25. M. E. Brown, J. N. Fritzner, T. Stevens; W. Chin, C. D. Wright, J.P. Boyce, *Bioorganic & Medical Chemistry*, **16** (2008) 8760-8764.
26. K. Starčević, I. Čaleta, D. Cinčić, B. Kaitner, M. Kralj, K. Ester, G. Karminski-Zamola, *Heterocycles* **68** (11) (2006) 2285.
27. I. Čaleta, M. Grdiša, D. Mrvoš-Sermek, M. Cetina, V. Tralić-Kulenović, K. Pavelić, G. Karminski-Zamola, *Il Farmaco* **59** (2004) 297.

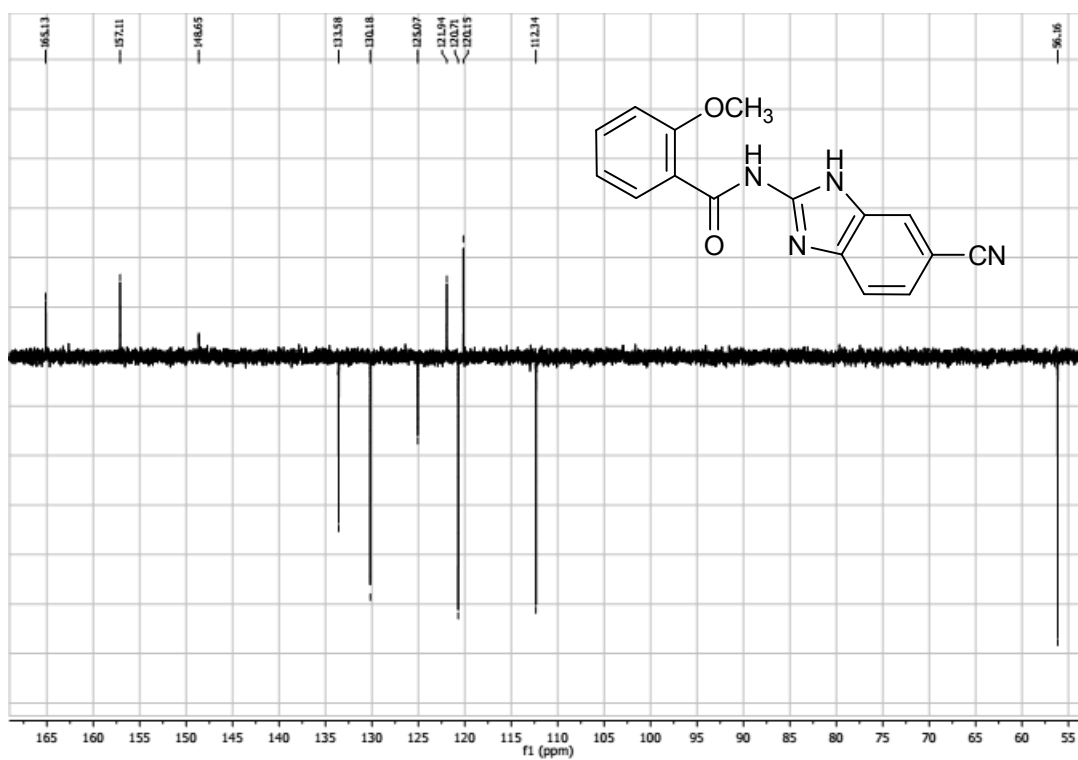
## **7. PRILOZI**

## Prilog 1.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar 2-metoksi-*N*-(5-cijanobenzimidazol-2-il)benzamida **13**

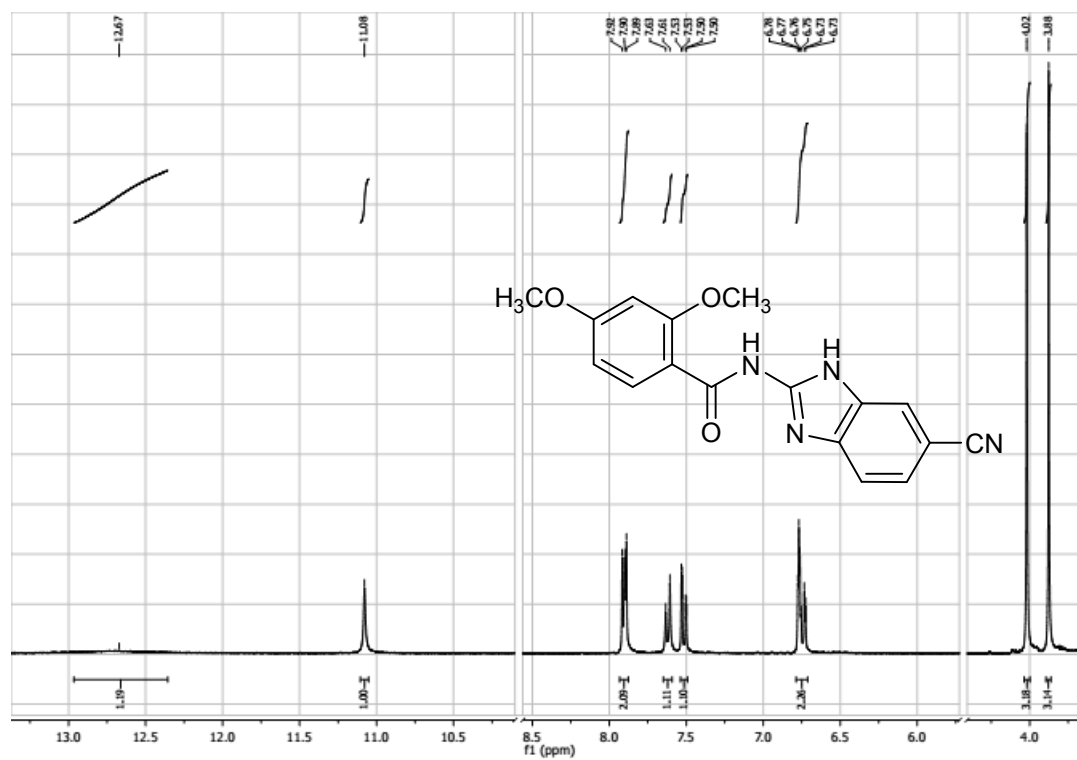


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar -metoksi-*N*-(5-cijanobenzimidazol-2-il)benzamida **13**

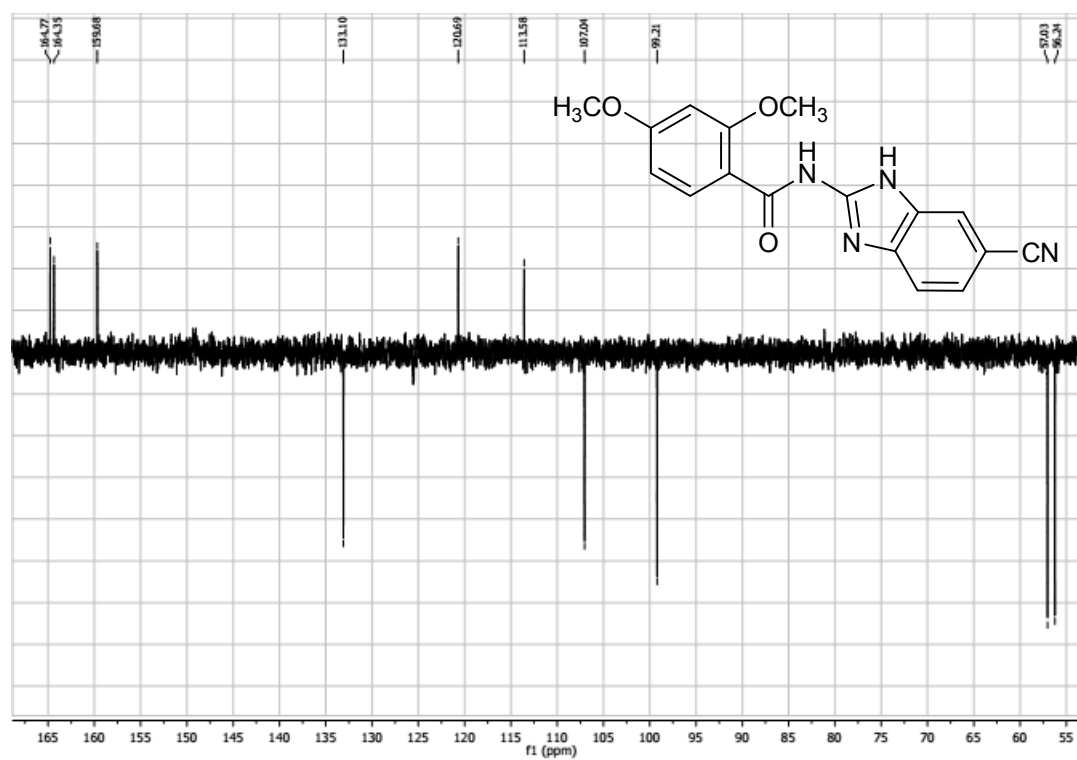


## Prilog 2.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar 2,4-dimetoksi-*N*-(5-cijanobenzimidazol-2-il)benzamid **14**

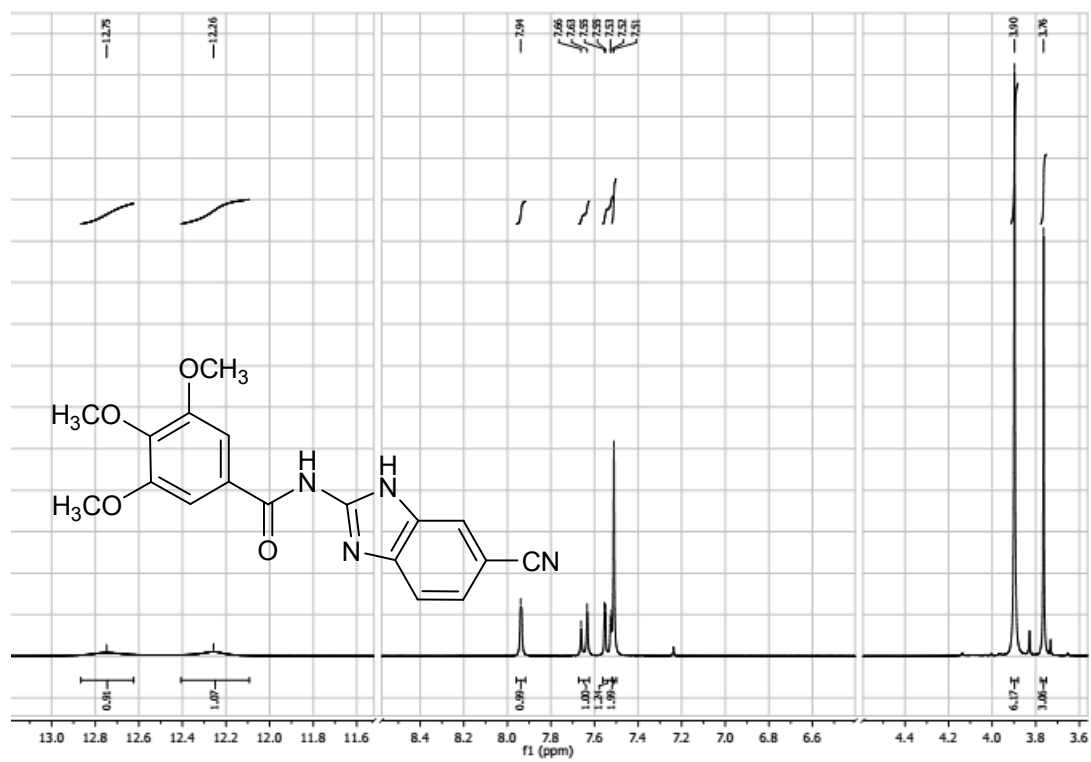


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar 2,4-dimetoksi-*N*-(5-cijanobenzimidazol-2-il)benzamid **14**



### Prilog 3.

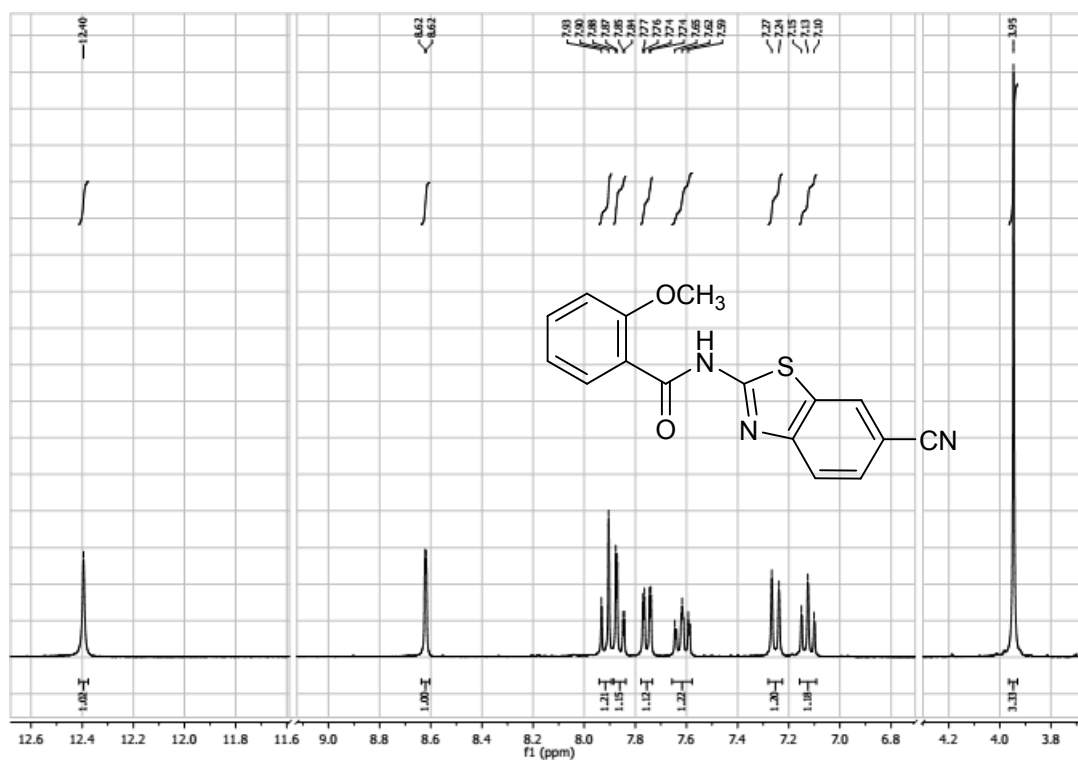
a)  $^1\text{H}$  NMR spektar 3,4,5-trimetoksi-*N*-(5-cijanobenzimidazol-2-il)benzamida **15**



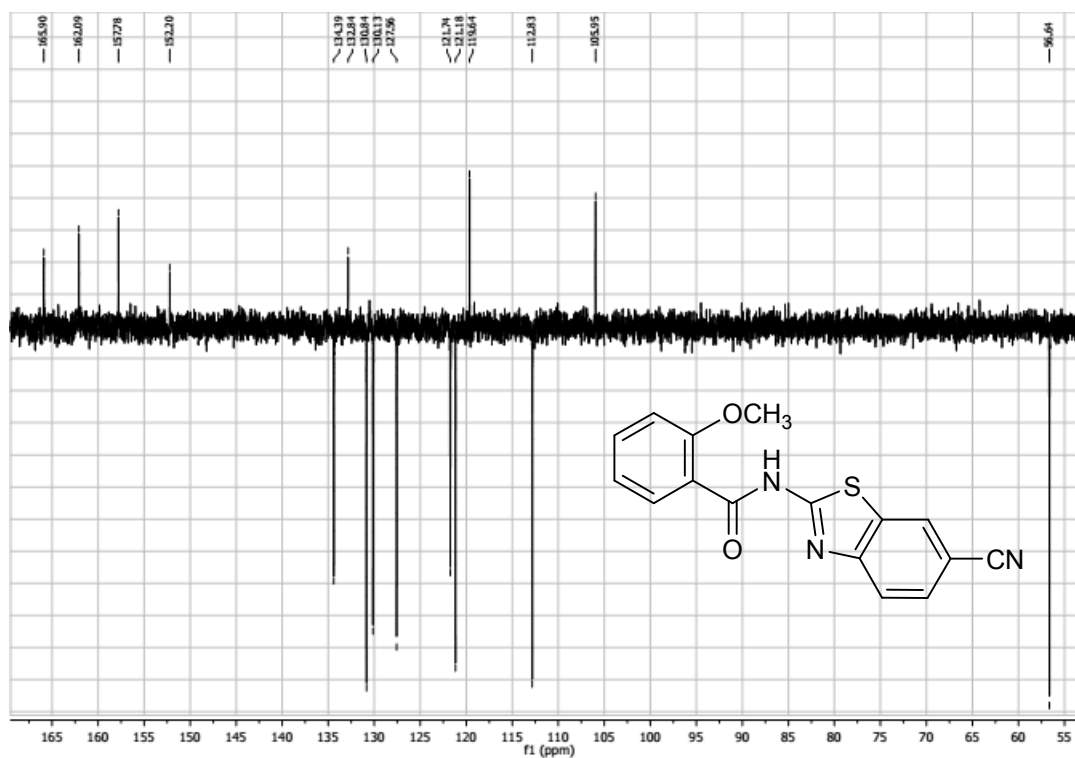


## Prilog 4.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar 2-metoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida **20**

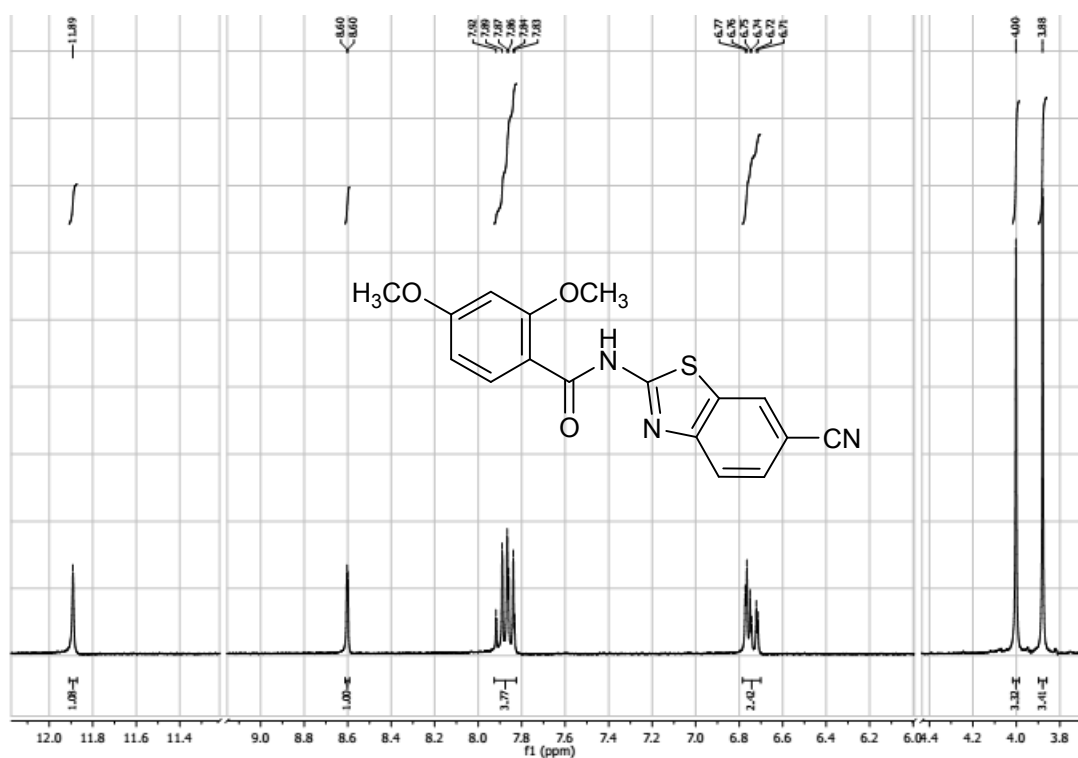


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar 2-metoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida **20**

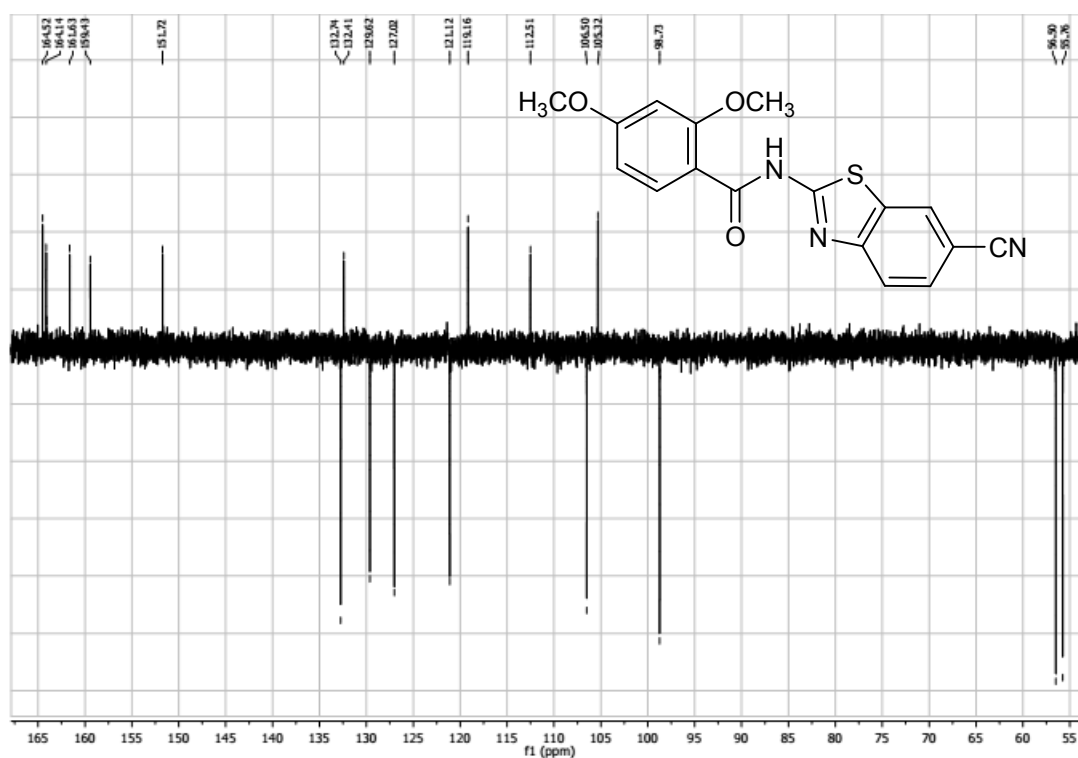


## Prilog 5.

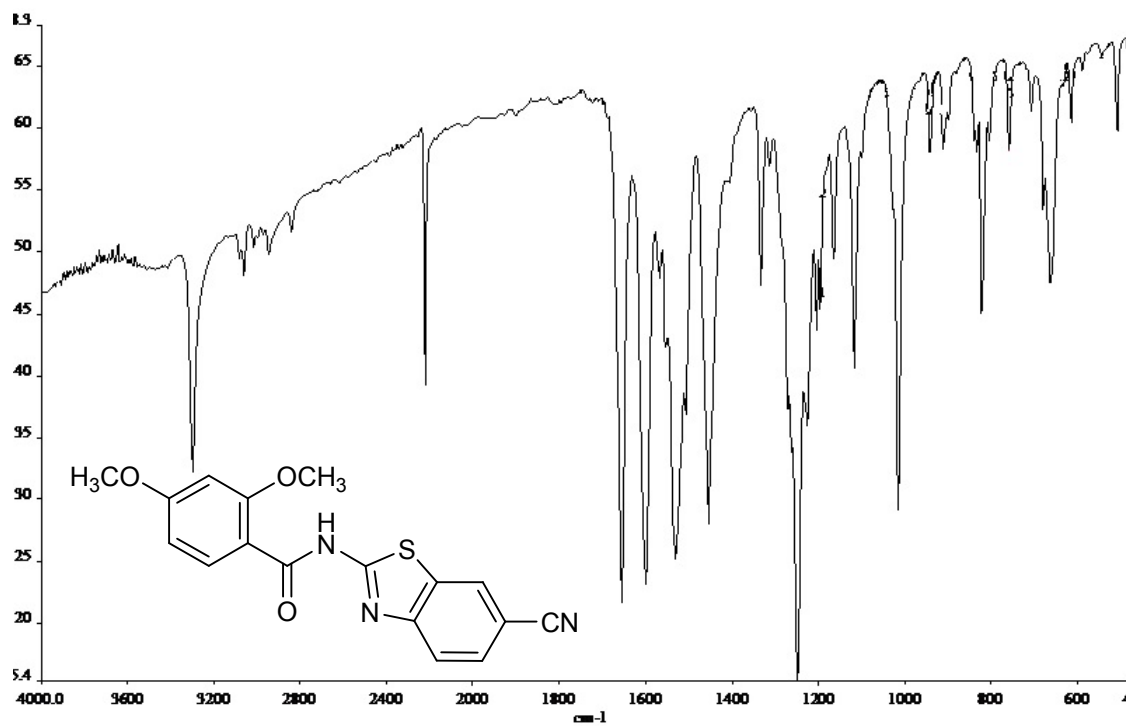
a)  $^1\text{H}$  NMR spektar 2,4-dimetoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida **21**



b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar 2,4-dimetoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida **21**

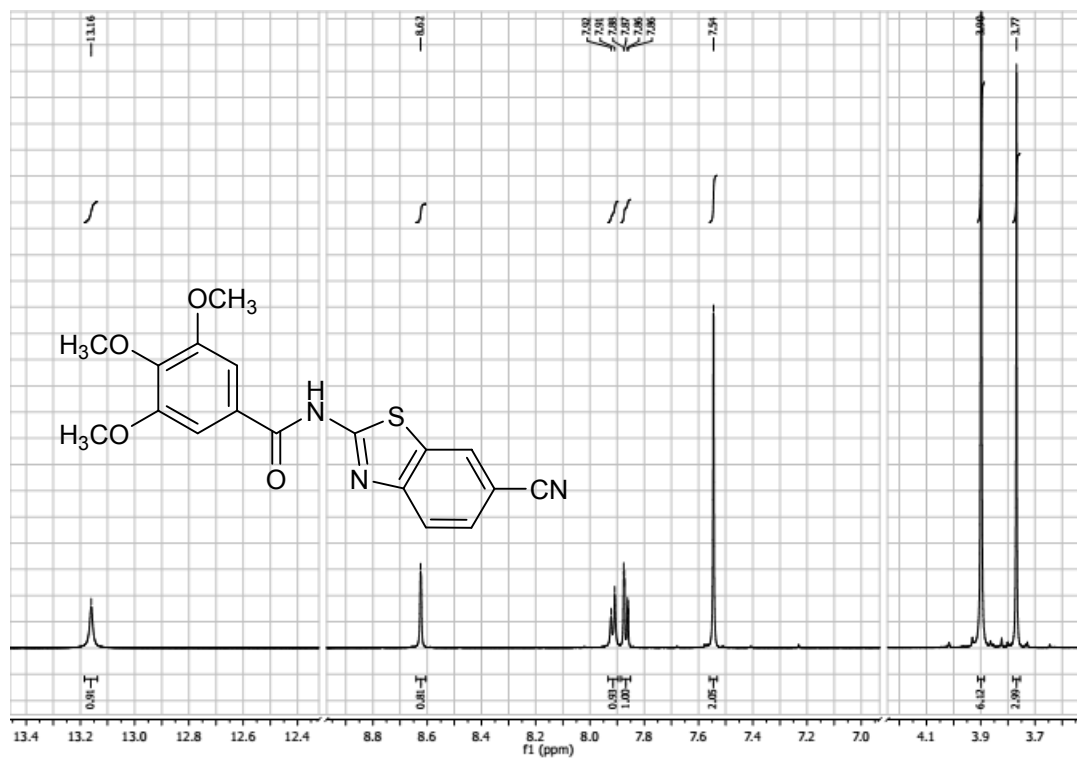


c) IR spektr 2,4-dimetoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida **21**



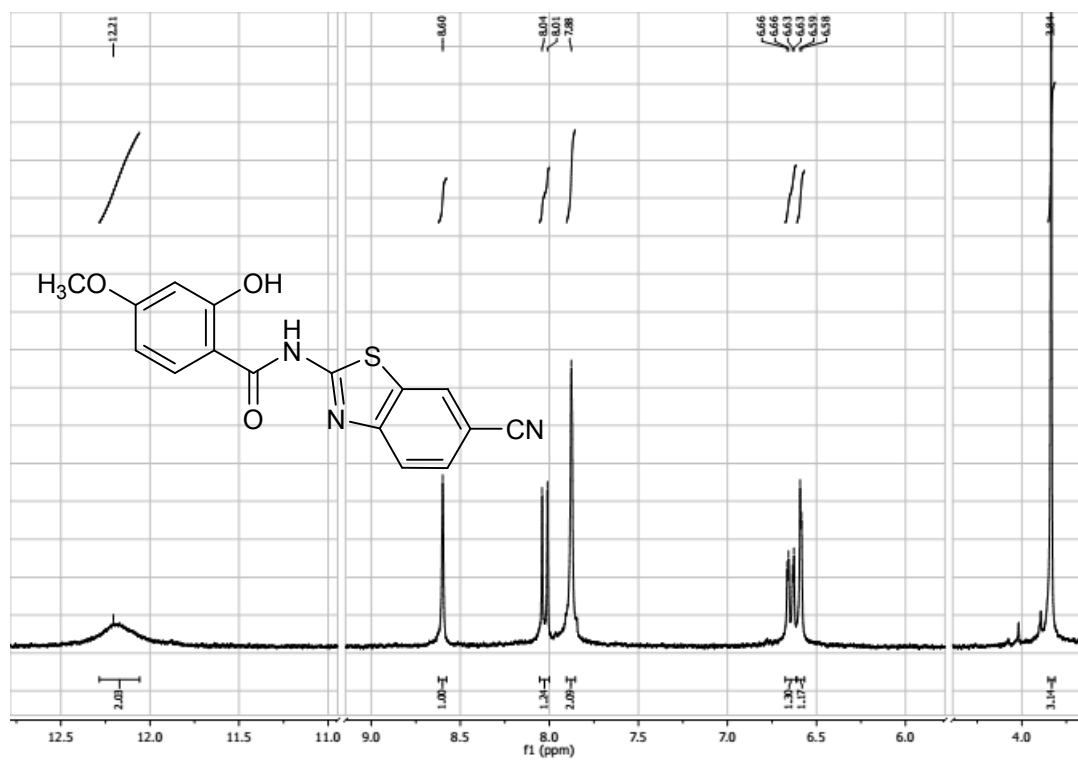
## Prilog 6.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar 3,4,5-trimetoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida **22**

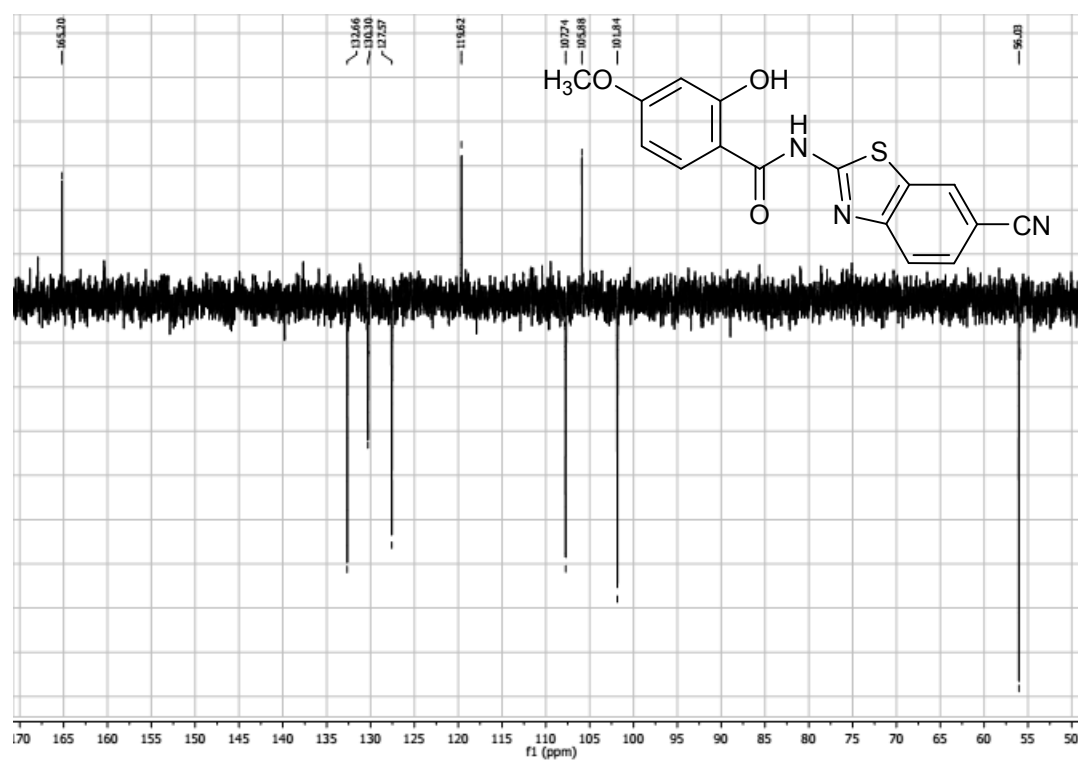


## Prilog 7.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida **25**

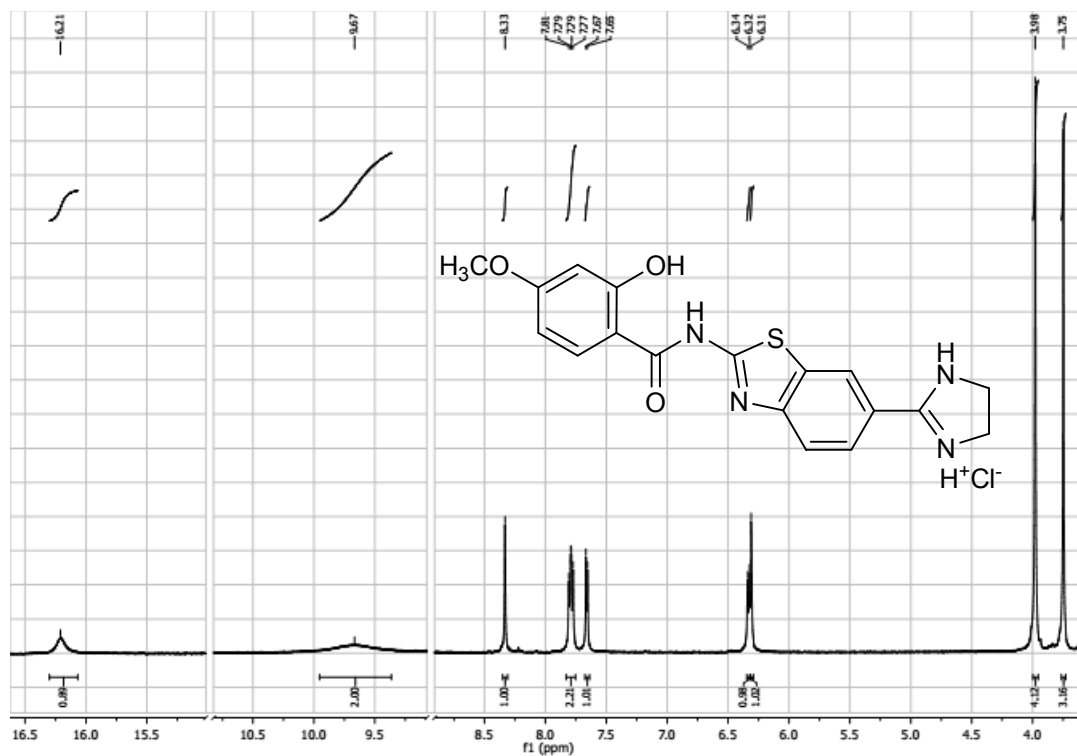


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida **25**

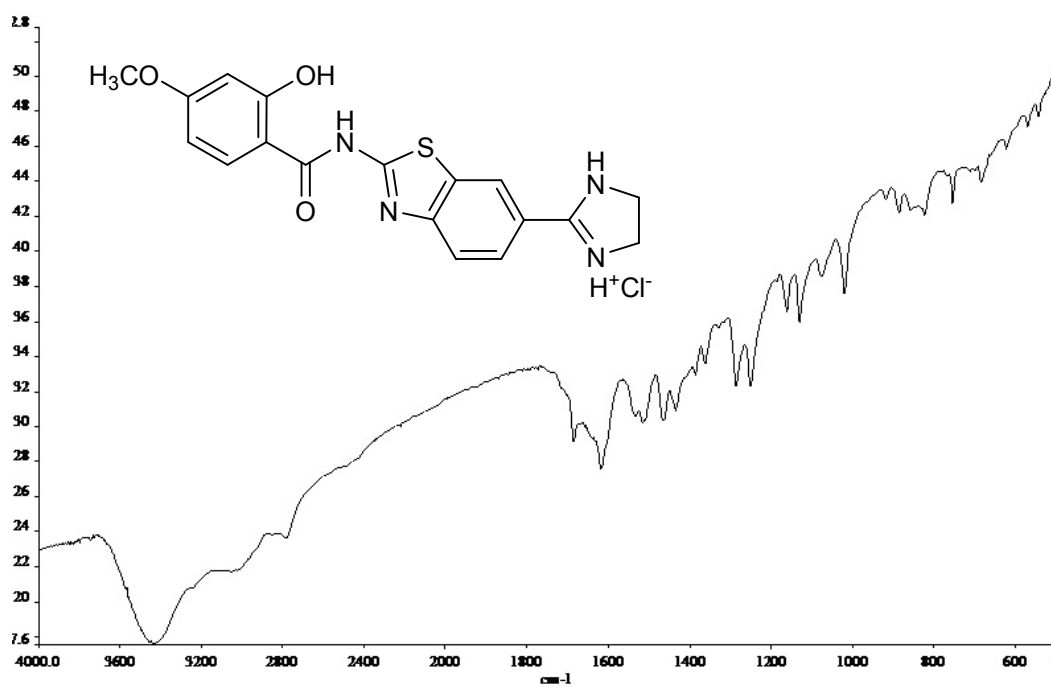


## Prilog 8.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-[6-(2-imidazolil)-benzotiazol-2-il]benzamida **26**

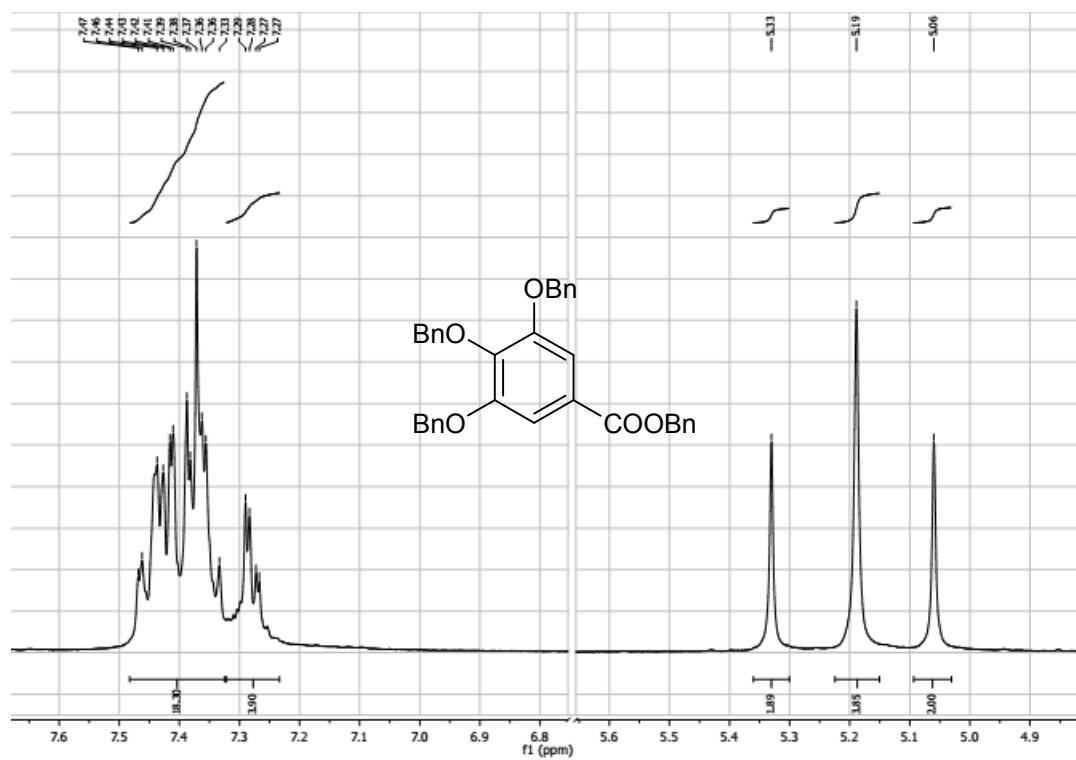


c) IR spektar 2-hidroksi-4-metoksi-*N*-[6-(2-imidazolil)-benzotiazol-2-il]benzamida **26**



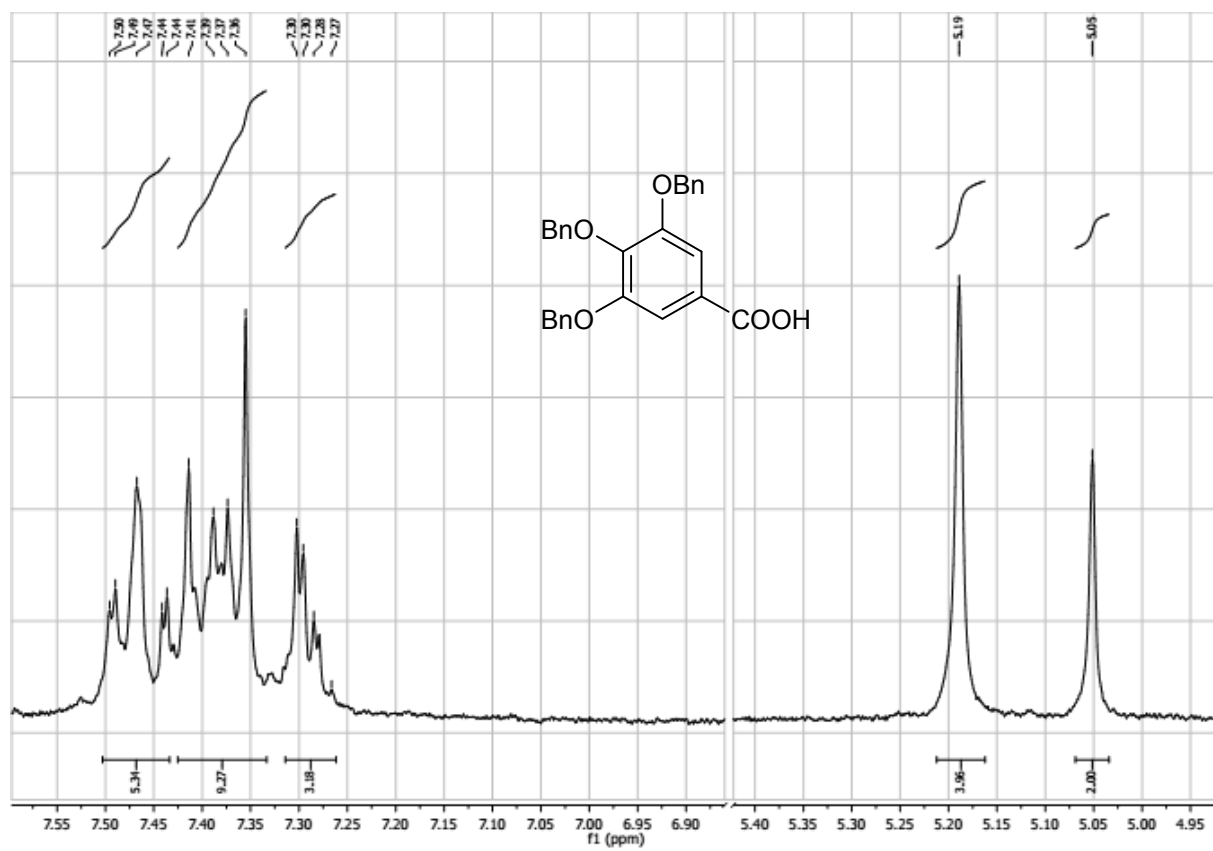
## Prilog 9.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar benzil-3,4,5-tri(benziloksi)benzoata **28**



## Prilog 10

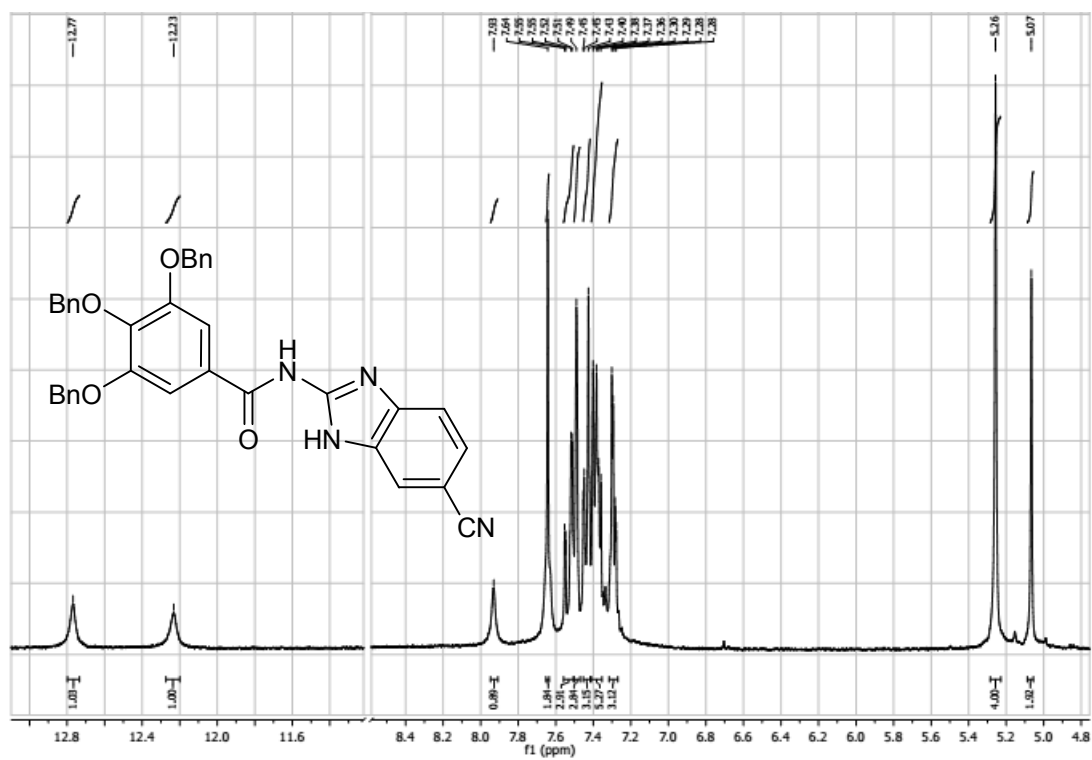
a)  $^1\text{H}$  NMR spektar 3,4,5-tri(benziloksi)benzojeve kiseline **29**





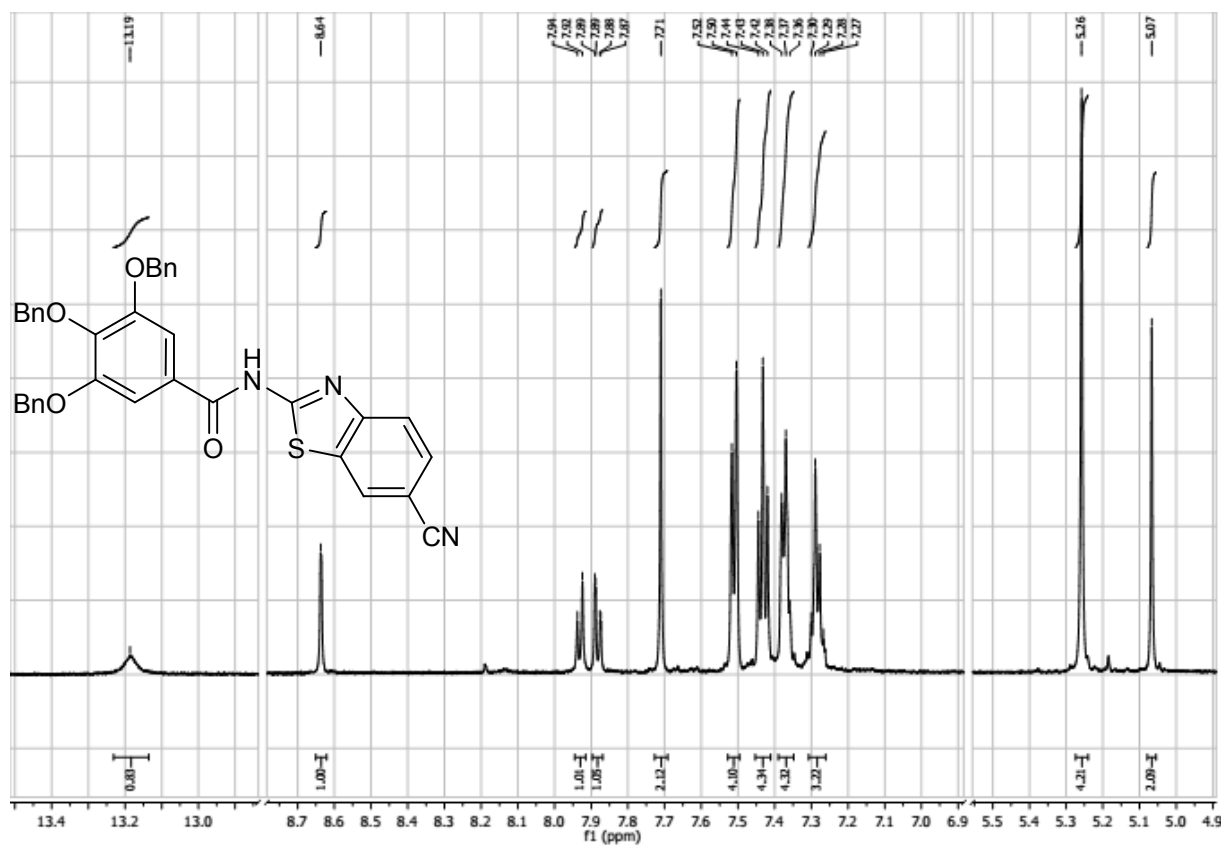
## Prilog 11.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar 3,4,5-tri(benziloksi)-*N*-(5-cijanobenzimidazol-2-il)benzamida **31**



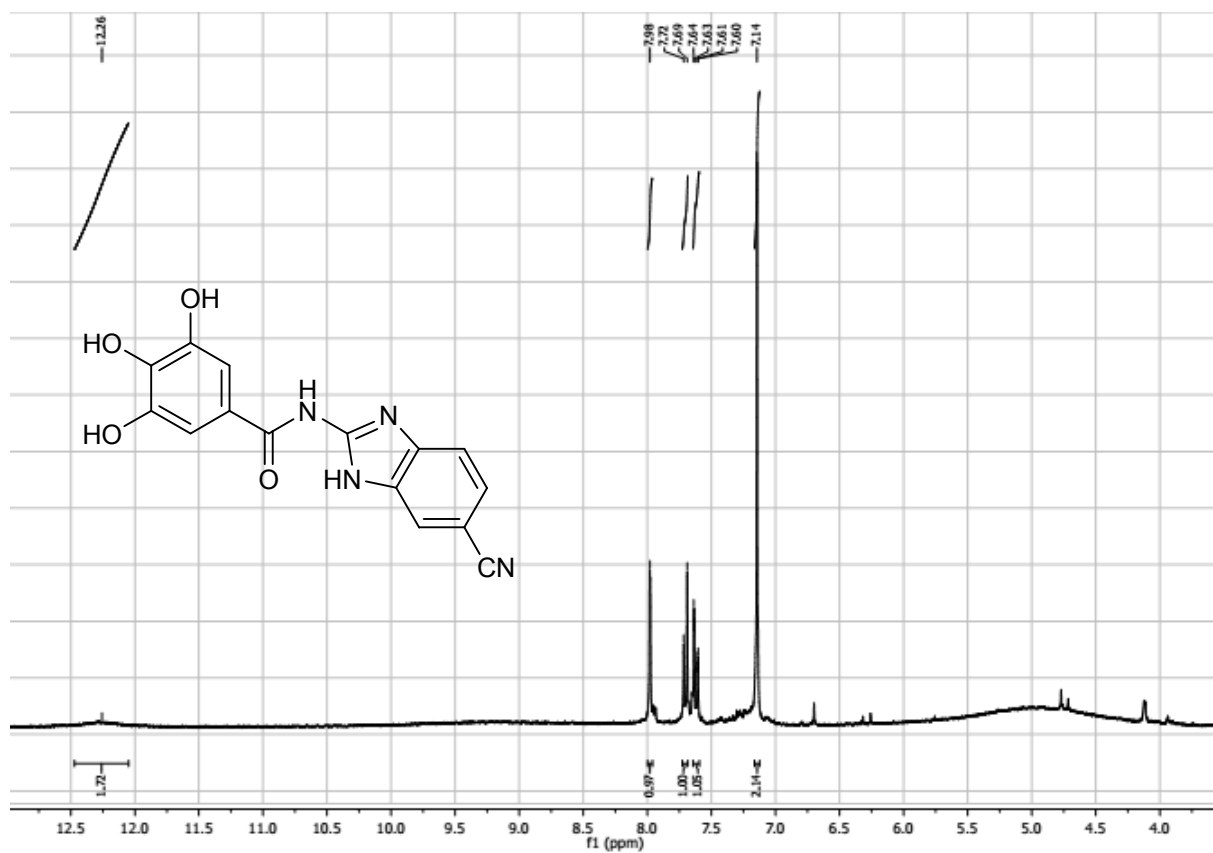
## Prilog 12.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar 3,4,5-tri(benziloksi)-*N*-(6-cijanobenzotiazol-2-il)benzamida **32**



### Prilog 13.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar 3,4,5-trihidroksi-*N*-(6-cijanobenzimidazol-2-il)benzamida **33**



## **8. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 07.07.1992. godine u Sisku. Osnovnu školu završila sam 2007. godine u OŠ Ivana Kukuljevića nakon čega sam upisala Gimnaziju Sisak. Maturirala sam 2011. godine. U razdoblju od 2000. do 2010. godine pohađala sam osnovnu i srednju glazbenu školu Fran Lhotka Sisak i stekla zvanje glazbenika flautista 2010. godine. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Primijenjena kemija upisala sam 2011. godine. Tijekom dosadašnjeg obrazovanja osposobljena sam za rad na računalu, aktivno se služim engleskim jezikom i pismom, a poznajem i osnove njemačkog jezika. Osposobljeni sam ronilac s bocama kategorije R1 po CMAS-u.