

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
ZAVOD ZA ORGANSKU KEMIJU

Mirna Dragić

**Novi hidroksi supstituirani akrilonitrili imidazo[4,5-*b*]piridina
kao potencijalni antioksidansi i pH senzori**

Zagreb, lipanj 2022

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije pod mentorstvom prof. dr. sc. Marijane Hranjec i neposrednim voditeljstvom Ide Boček, mag. appl. chem., u sklopu projekata Hrvatske nacionalne zaklade IP-2018-01-4379 *Istraživanje antioksidativnog djelovanja benzazolskog skeleta u dizajnu novih antitumorskih agensa* i IP-2020-02-8090 *Dizajn, sinteza i računalna analiza novih optičkih kemijskih pH osjetilnih derivata benzazola*.



POPIS KRATICA I SIMBOLA

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

ROS - reaktivne kisikove vrste

ATP - adenzin trifosfat

BHA - butilirani hidroksianisol

BHT - butilirani hidroksitoluen

TBHQ - *tert*-butilni hidrokinon

PG - propil-galat

OG - oktil-galat

SOD - superoksid dismutaze

CAT - katalaze

GPx - glutation peroksidaze

GRd - glutation reduktaze

CAT- katalaza

HAT - metode prijenosa atoma vodika

SET - prijenosa jednog elektrona

MeOH - metanol

RNS - reaktivne čestice dušika

LOO^{*} - lipidne peroksilne radikale

AURAK - Aurora A kinaze

ANP - aciklički nukleozidni fosfonati

RNA - ribonukleinska kiselina

RT - reverzna transkriptaza

HIV - virus humane imunodeficijencije

TNF- α - faktor nekroze tumora- α

IL-6 - interleukin-6

ICAM-1 i VCAM-1 - adhezijske molekule

NOS - sintaza dušikovog oksida

COX - ciklooksigenaza

DPPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

SAR - odnos strukture i aktivnosti

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Opći dio	3
2.1. Antioksidansi.....	4
2.1.1. Podjela antioksidansa.....	4
2.1.2. Primjeri antioksidansa	6
2.2. Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti	9
2.3. Slobodni radikali	11
2.4. Mehanizam djelovanja antioksidansa.....	12
2.5. Imidazo[4,5- <i>b</i>]piridini	15
2.6. Biološki potencijal derivata imidazo[4,5- <i>b</i>]piridina	18
2.6.1. Antitumorska aktivnost	18
2.6.2. Antimikrobna aktivnost.....	21
2.6.3. Antivirusna aktivnost	23
2.6.4. Antiinflatorna aktivnost	25
2.6.5. Antidijabetička aktivnost	27
2.7. Antioksidativna aktivnost derivata imidazo[4,5- <i>b</i>]piridina	28
3. Eksperimentalni dio	39
3.1. Opće napomene	40
3.2. Sintaza akrilonitrilnih derivata imidazo[4,5- <i>b</i>]piridina.....	41
3.3. Opći postupak pripreme 2-cijanometilimidazo[4,5- <i>b</i>]piridina.....	44
3.4. Opći postupak pripreme akrilonitrilnih derivata	46
3.5. Antioksidativna aktivnost.....	53
3.5.1. DPPH metoda.....	53
3.5.2. FRAP metoda.....	53
3.5.3. ABTS metoda	54
3.6. pH titracije.....	55
4. Rasprava i rezultati	56
4.1. Cilj rada	57
4.2. Sintaza ciljanih spojeva.....	58
4.3. Antioksidativna aktivnost derivata imidazo[4,5- <i>b</i>]piridina	72
4.4. Spektroskopska karakterizacija UV/Vis spektroskopijom.....	77
4.5. Utjecaj pH na spektroskopska svojstva ispitivanih spojeva.....	84

5. Zaključak.....	90
6. Zahvala	93
7. Literatura	95
8. Sažetak.....	101
9. Summary	103
10. Životopis	105
11. Prilozi	107

1. Uvod

U posljednjih nekoliko godina, uočen je porast istraživanja antioksidansa zbog njihove zaštitne uloge u prehrani i farmaceutskim proizvodima u kojima sprječavaju oksidativno propadanje, te u tijelu gdje inhibiraju patološke procese uzrokovane oksidativnim stresom. Provedena su brojna istraživanja koristeći različite metode koje procjenjuju antioksidativnu aktivnost u hrani i stanicama. Izrazito su važni zbog sposobnosti redukcije slobodnih radikala koji prirodno nastaju iz životnih procesa, primjerice iz kisika kojeg udišemo, a u čijoj je prirodi nanošenje štete tkivu i stanicama u kojima nastaju. Osim prirodno, slobodni radikali nastaju od raznih onečišćenja koje unosimo u organizam hranom ili drugim putem. Održavanje ravnoteže između slobodnih radikala i antioksidansa, ključan je preduvjet u održavanju zdravlja ljudi. Stoga se kontrola oksidativnog stresa pokazala temeljnim procesom u prevenciji i liječenju mnogih bolesti, kao što su dijabetes, ateroskleroza, koronarna arterijska bolest, rak, upalne bolesti, bolesti jetre, itd. Kako bi se održala redoks homeostaza, višak slobodnih radikala neutralizira se enzimskim i neenzimskim antioksidansima koje, uz određene iznimke, proizvodi samo tijelo. Također, postoje i sintetski antioksidansi koji se nastoje zamijeniti s prirodnim jer predstavljaju potencijalni zdravstveni rizik zbog stvaranja opasnih nusprodukata, kontaminacije kemijskim prekursorima i otrovnim otapalima.¹

Dušikovi heterocikli poput imidazo[4,5-*b*]piridina od velikog su značaja u medicinskoj kemiji zbog svoje strukturne sličnosti s purinima. To saznanje kemičarima je omogućilo optimizaciju tih struktura prema učinkovitijim molekulama koje su pokazale različitu biološku aktivnost.² Jedna od brojnih bioloških aktivnosti koje vežemo za ove spojeve, upravo je i antioksidativna aktivnost. Smatra se da je još uvijek nedovoljno istražena s obzirom na brojne mogućnosti i potencijal ovih struktura. Kroz niz znanstvenih radova, autori ispituju antioksidativna svojstva derivata imidazo[4,5-*b*]piridina s različitim vrstama i brojem supstituenata smještenim na fenilnom prstenu. Također, osim vrste i broja supstituenta, istražuje se i utjecaj položaja supstituenta na antioksidativna svojstva.³ Akrlonitirili kao jedni od derivata imidazo[4,5-*b*]piridina, u posljednje su vrijeme privukli pažnju mnogih medicinskih kemičara zbog svog izraženog antioksidativnog potencijala koji bi se mogao iskoristiti u liječenju mnogih bolesti.⁴

2. Opći dio

2.1. Antioksidansi

Pod pojmom antioksidansa podrazumijevaju se molekule, ioni ili stabilni radikali koji pri niskoj koncentraciji usporavaju ili inhibiraju oksidaciju proteina, ugljikohidrata, lipida, DNK i sličnih makromolekula. Antioksidansi se također koriste kao aditivi za sprječavanje oksidacije nestabilnih sastojaka u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Oksidacijski stres je rezultat neravnoteže između reaktivnih kisikovih čestice (*eng.* reactive oxygen species, ROS) i antioksidativne obrane. Oksidacijski stres uzrokuje poremećaj niza staničnih funkcija i dovodi do različitih patoloških stanja kao što su, starenje, artritis, astma, autoimune bolesti, kancerogeneza, kardiovaskularna disfunkcija, dijabetes, neurodegenerativne bolesti, Alzheimerova bolest, Parkinsonova demencija itd. Antioksidansi su u najvećoj koncentraciji pronađeni u različitim vrstama voća i povrća. Mogu djelovati kroz različite mehanizme, osim uklanjanja radikala, mogu i razdvajati ione prijelaznih metala, razgraditi vodikov peroksid ili hidroperokside, deaktivirati prooksidanse te poboljšati endogenu antioksidativnu obranu, kao i popravljati nastalo oštećenje stanica.⁴

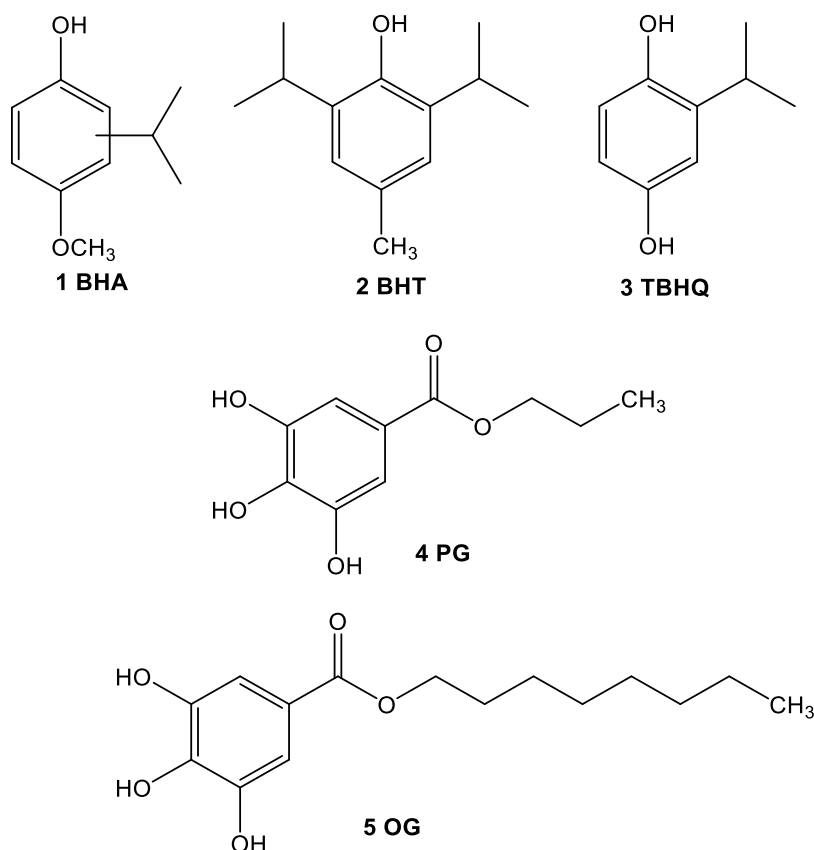
Kada se govori o kisiku kao metalu, treba naglasiti da je to izrazito reaktivan nemetal te relativno snažno oksidacijsko sredstvo koje lako stvara okside s većinom elemenata. U atmosferi je prisutan u svom osnovnom stabilnom stanju kao tripletni biradikal ($^3\text{O}_2$) te kao takav prolazi kroz proces postupne redukcije. Molekula kisika, u osnovnom stanju, sadrži dva nesparena elektrona sa suprotnim spinovima u dvije odvojene protuvezne orbitale. U te orbitale može prihvatiti par elektrona. Kisik je duboko integriran u procese oksidacije i redukcije u živim organizmima, te može prenositi elektrone s jednog atoma na drugi. Važan je dio aerobnog života našeg metabolizma, budući da je konačni akceptor elektrona, u sustavu protoka elektrona koji proizvodi energiju u obliku ATP-a. Međutim, problemi mogu nastati kada protok elektrona postane nesparen (prijenos nesparenih pojedinačnih elektrona), čime dolazi do stvaranja slobodnih radikala.

2.1.1. Podjela antioksidansa

Najopćenitija podjela antioksidansa je na prirodne i sintetske antioksidanse. Sintetski antioksidansi u organizam se unose u obliku dodataka prehrani. Sintetski oblici antioksidansa su bioekvivalentni njihovim prirodnim oblicima, npr. vitamin C u odnosu na kemijski sintetiziranu L-askorbinsku kiselinu. Kada se govori o sintetskim antioksidansima, uglavnom se misli na antioksidanse s fenolnom strukturom, slika 1.

To su:

1. Butilirani hidroksianisol (BHA),
2. Butilirani hidroksitoluen (BHT),
3. *Tert*-butilni hidrokinon (TBHQ),
4. Propil-galat (PG), i oktil-galat (OG).



Slika 1. Strukture sintetskih antioksidansa

BHA posebno se ističe u kontroli oksidacije kratkolančanih masnih kiselina, dok je učinkovitost BHT antioksidansa nešto manja, uglavnom zbog prisutnosti dviju *tert*-butilnih skupina koje uzrokuju veće steričke smetnje.⁵ TBHQ vrlo je učinkovit konzervans za mnoge jestive životinjske masti, nezasićena biljna ulja i mesne proizvode. Čuva i stabilizira svježinu, održava nutritivnu vrijednost i boju životinjskih prehrambenih proizvoda. Među sintetskim antioksidansima, TBHQ se pokazao najučinkovitijim zbog prisutnosti dvije hidrosksilne skupine u *para* položaju za koje se smatra da su odgovorne za njegovo snažno antioksidativno djelovanje.⁶

Prirodni antioksidansi dijele se na egzogene i endogene prirodne antioksidanse. U egzogene antioksidanse pripadaju vitamini (vitamini A, C, E), mikroelementi (Se, Zn, Cu, Mn, Fe), karotenoidi (α i β karoten, lutein) i polifenoli (fenolna kiselina, flavonoidi). Najistaknutiji predstavnici egzogenih antioksidansa su vitamin C, tokoferoli, karotenoidi i flavonoidi. Endogeni antioksidansi dijele se na enzimske i ne-enzimske antioksidanse. Među njima su različiti spojevi s različitim načinima i mjestima djelovanja te različitim konačnim učincima. Ova raznolikost određuje individualnu ulogu svakog od njih u tijelu.

1. Enzimski antioksidansi:

- a) superoksid dismutaze (SOD),
- b) katalaze (CAT),
- c) glutacion peroksidaze (GPx),
- d) glutacion reduktaze (GRd).

2. Ne-enzimski antioksidansi:

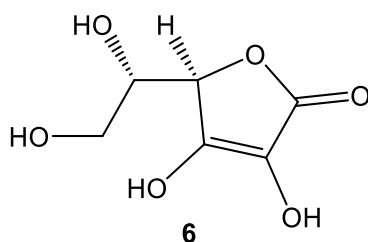
- a) Antioksidansi niske molekulske mase (glutacion, lipoična kiselina),
- b) Metaloproteini (ferritin, albumin).

Većina egzogenih spojeva dobiva se iz prirodnih izvora kao što su biljke (flavonoidi, fenolne kiseline, karotenoidi, kumarini, lignani, vitamini) ili minerali (selen, cink, mangan) koji se u tijelo unose hranom. Kada endogeni antioksidansi, uključeni u obranu od slobodnih radikala, ne mogu zaštititi tijelo od ROS-a, poseže se za egzogenim antioksidansima.⁷

2.1.2. Primjeri antioksidansa

Vitamin C

Vitamin C ili askorbinska kiselina (slika 2), ističe se kao jedan od najsnažnijih antioksidansa. Unos vitamina C izrazito je važan za zaštitu od raka pluća, dojke, gušterače, želuca, cerviksa, rektuma i usne šupljine.⁸ Utvrđeno je da 200 mg vitamina C dnevno može značajno smanjiti razinu hormona stresa. Vitamin C lako „hvata“ reaktivne čestice kisika i dušika, kao što su superoksidni i hidroperoksidni radikali, vodeni peroksidni radikali, peroksintrat, dušikov dioksid i nitroksidni radikali, čime učinkovito štiti druge supstrate od oksidativnog oštećenja. Najveći izvor vitamina C upravo je voće i povrće, među najistaknutijim su citrusi, brokula, zeleno lisnato povrće, krumpir, kupus, itd.⁹



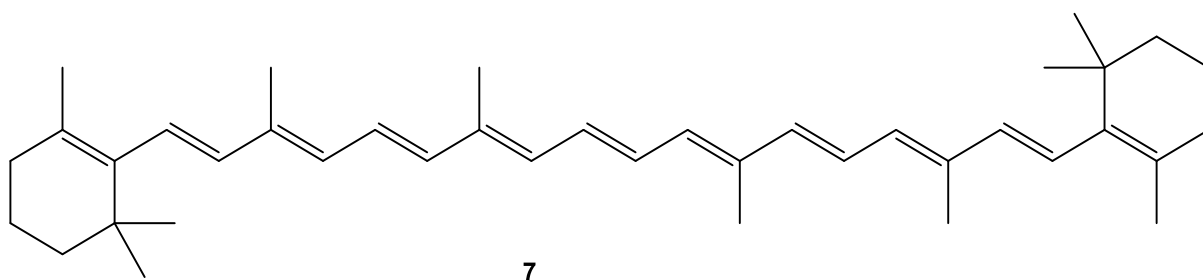
Slika 2. Struktura vitamina C

Selen

Selen je neophodan oligoelement za sintezu i funkciju oko 20-40 enzima, među kojima većina njih pomaže u sprječavanju oštećenja stanica.¹⁰ Selen je također neophodan za pravilnu funkciju imunološkog sustava i poznato je da ima antivirusna i anti-inflamatorna svojstva.¹¹

β -karoten

β -karoten posjeduje antioksidativna svojstva koja mogu pomoći neutralizirati slobodne radikale koje potencijalno oštećuju lipide u staničnim membranama, što posljedično može dovesti do razvoja kardiovaskularnih bolesti i raka.¹² *In vitro* istraživanje pokazalo je da karotenoidi također mogu inhibirati oksidaciju masti pod određenim uvjetima. Oni mogu imati anti aterosklerotski potencijal, ali smatra se da su njihovi učinci na ljudske stanice nešto složeniji.¹³

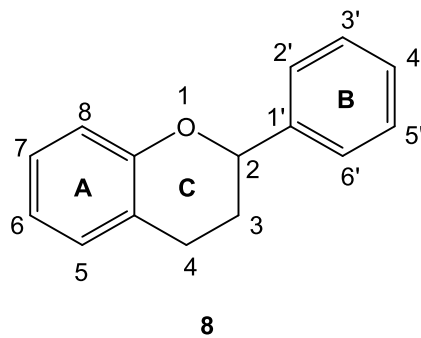


Slika 3. Struktura β -karotena

Polifenolni antioksidansi

Polifenolni antioksidansi doprinose prevenciji kardiovaskularnih bolesti, raka i osteoporoze te imaju značajnu ulogu u prevenciji neurodegenerativnih bolesti i dijabetes melitusa.¹⁴ Najznačajniji napredak postignut je u području kardiovaskularnih bolesti. Polifenoli koji se daju kao dodaci prehrani, poboljšavaju zdravstveno stanje, na što ukazuje nekoliko biomarkera usko povezanih s kardiovaskularnim rizikom.¹⁵

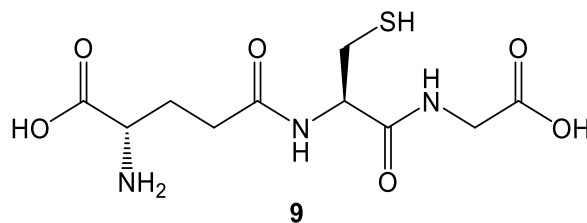
Flavonoidi čine skupinu najistraživanijih polifenola, a otkriveno ih je više od 4000, od kojih je većina odgovorna za boju cvijeća, voća te listova. C6-C3-C6 opća je struktura flavonoida, od kojih su dvije C6 podjedinice (prsten A i prsten B) flavonoidne prirode, slika 4.¹⁶ Flavonoidi potiču antioksidativno djelovanje, stanično zdravlje i normalan rast i obnovu tkiva u cijelom tijelu. U kombinaciji s vitaminom C smanjuju oksidativni stres za dio stanice na bazi vode i mogu usporiti neke od učinaka starenja.



Slika 4. Opća struktura flavonoida

Glutation

Glutation štiti stanice od toksina kao što su slobodni radikali. Ljudsko tijelo proizvodi glutacion tijekom sinteze aminokiselina cisteina, glicina i glutaminske kiseline.¹⁷ Izvori hrane s najvećim količinama prirodnog glutaciona uključuju; šparoge, avokado, grejp, krumpir, dinja, breskva, tikvice, špinat, brokula, lubenica i jagode. Riba, meso i hrana koja daje aminokiseline koje sadrže sumpor, (npr. jaja) poželjni su izvori za održavanje i povećanje tjelesne razine glutaciona.



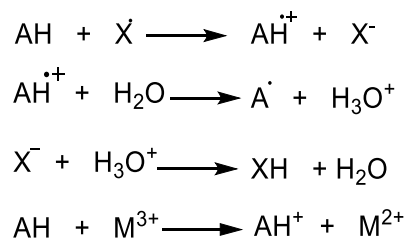
Slika 5. Struktura glutaciona

2.2. Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti

Uvedene su različite antioksidativne metode kako bi se izmjerila i istražila antioksidativna svojstva i kapacitet komercijalnih antioksidansa, prehrambenih, medicinskih, farmaceutskih i bioloških uzoraka. Standardizirana metoda za određivanje antioksidativnog djelovanja komponenta treba zadovoljiti sljedeće idealne zahtjeve:

- korištenje biološki relevantnog izvora radikala,
- trebala bi biti jednostavna,
- koristiti metodu s definiranom krajnjom točkom i kemijskim mehanizmom,
- kemikalije i instrumenti trebali bi biti lako dostupni,
- imati dobru ponovljivost unutar ciklusa,
- trebala bi biti prilagodljiva za ispitivanje hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa i korištenje različitih izvora radikala,
- trebala bi se prilagoditi analizi visoke propusnosti za rutinske analize kontrole kvalitete.¹⁸

Također, antioksidativno djelovanje ne treba procjenjivati na temelju jednog testnog modela. Potrebno je provesti nekoliko *in vitro* antioksidativnih postupaka za procjenu antioksidativnih aktivnosti.¹⁹ Metode se mogu podijeliti prema reakcijskim mehanizmima na metode prijenosa atoma vodika (eng. *hydrogen atom transfer*, HAT) i prijenosa jednog elektrona (eng. *single electron transfer*, SET). Metode temeljene na SET-u otkrivaju sposobnost potencijalnog antioksidansa da prenese jedan elektron i tako reducira bilo koji spoj, uključujući metale, karbonile i radikale. Tijekom redukcije dolazi do promjene boje, čime se dokazuje da se smanjuje oksidacijski broj. Reaktivnost u SET metodama prvenstveno se temelji na deprotonacijskom i ionizacijskom potencijalu reaktivne funkcionalne skupine. Princip reakcije SET metode prikazan je na shemi 1.



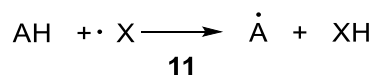
10

Shema 1. SET mehanizam reakcije

Metode temeljene na SET-u uključuju sljedeće analize:

- Analiza ukupnih fenola pomoću Folin-Ciocalteu reagens testa,
- TEAC metoda (eng. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)
- FRAP metoda (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*)
- Analiza ukupnog antioksidativnog potencijala, korištenjem Cu^{2+} kompleksa kao oksidansa,
- DPPH metoda,
- ABTS metoda,
- DMPD metoda,
- CUPRAC metoda (eng. *Cupric ion reducing antioxidant capacity*).

Metode temeljene na HAT-u mjere sposobnost antioksidansa da „ugasi“ slobodne radikale doniranjem vodika. HAT reakcije su neovisne o otapalu i pH i obično su prilično brze. Prisutnost redukcijskih sredstava, uključujući metale, komplikacija je u HAT testovima i može dovesti do pogrešno visoke prividne reaktivnosti. Princip HAT reakcije prikazan je na shemi 2.²⁰



Shema 2. Princip HAT reakcije

Metode temeljene na HAT reakciji uključuju:

- ORAC metoda (eng. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*),
- TRAP metoda (eng. *Total Peroxyl Radical trapping antioxidant Parameter*),
- Inhibicija inducirane LDL oksidacije,
- Metoda ukupnog kapaciteta uklanjanja radikala (eng. TOSCA),
- Metoda izbjeljivanja β -karotena,
- Kemiluminiscentni test.

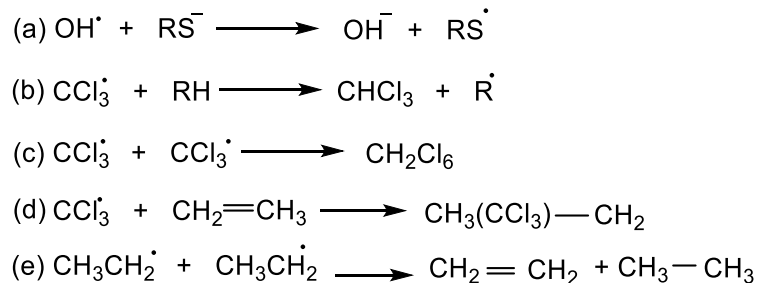
2.3. Slobodni radikali

Slobodni radikali mogu se definirati kao visoko reaktivne čestice koje sadrže nestabilne nesparene elektrone u valentnoj ljusci koji su aktivni prema drugim molekulama u kemijskim reakcijama. Oni mogu donirati elektron, ali i prihvatiti ga od drugih molekula, te tako djelovati kao oksidans ili reducens.²¹ U ljudskom tijelu reaktivni oblici (RS) dolaze iz metaboličkih procesa uključenih u respiratorni lanac, fagocitozu, sintezu prostaglandina i sustav citokroma.²² Najreaktivnije vrste koje se nalaze u biološkim sustavima uključuju hidroksilni radikal (OH^\bullet), koji nastaje spajanjem tri elektrona u molekuli kisika, (npr. kao rezultat Fentonove reakcije) i superoksidni radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$), koji nastaje uglavnom u mitohondrijima, kao nusprodukt transporta elektrona u respiratornom lancu. Reaktivne čestice koje nastaju iz kisika nazivamo ROS česticama. Osim ROS čestica, postoje i reaktivne čestice dušika, RNS (eng. *reactive nitrogen species*). ROS i RNS reaktivne čestice neophodne su u regulaciji ekspresije gena, proliferacije stanica, apoptoze, procesa fosforilacije proteina ili održavanja koncentracije kalcija u stanicama, aktivacije proteina koji kontroliraju diobu stanica i eliminacije mikroorganizama. U našim stanicama postoji ravnoteža između nastanka RS čestica i njihove neutralizacije pomoću obrambenog sustava. Svaki poremećaj ove ravnoteže može dovesti do razvoja stanja u kojem se oksidacijski potencijal povećava do razine koja ugrožava stabilnost staničnih struktura, tzv. oksidativni stres.²³ Ukoliko u stanicama dođe do oksidativnog stresa, makromolekule, poput ugljikohidrata, lipida i proteina, mogu doživjeti značajna oštećenja. Smatra se da oksidativni stres ima značajan negativan utjecaj i na upalne bolesti, rak, sindrom imunodeficijencije, hipertenziju, alkoholizam, bolesti povezane s pušenjem i mnoge druge.²⁴



Slika 6. Prikaz utjecaja slobodnih radikala na stanicu²⁵

Slobodni radikali imaju različite mehanizme reakcije. Mogu reagirati s okolnim molekulama doniranjem elektrona, prihvaćanjem elektrona, redukcijским radikalima i oksidacijskim radikalima (a), apstrakcijom vodika (b), reakcijama samouništenja (c), reakcijama adicije (d) i disproporcioniranjem (e).

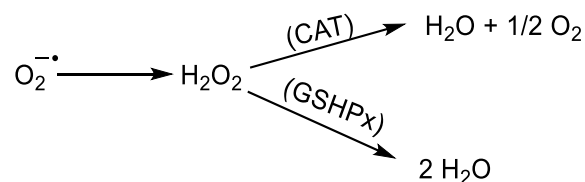


Slika 7. Mehanizmi reakcija slobodnih radikala²⁶

2.4. Mehanizam djelovanja antioksidansa

U borbi protiv negativnih utjecaja ROS čestica, korištenjem enzimskih antioksidativnih mehanizama, tijelo se bori protiv negativnih utjecaja ROS čestica.²⁷ Antioksidativni enzimi smanjuju razinu lipidnog hidroperoksida i H_2O_2 te su važni u prevenciji peroksidacije lipida i održavanju strukture i funkcije staničnih membrana.

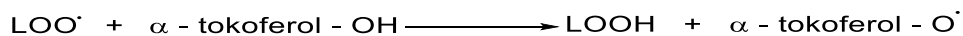
Superoksid dismutaze (SOD), enzimi su koji se nalaze u citosolu i mitohondrijima, te katalitički pretvaraju $\text{O}_2^{\cdot-}$ u kisik i H_2O_2 , u prisutnosti metalnih iona kao što su bakar, cink ili mangan.²⁸ Katalaze koje su prisutne u peroksisomu, pretvaraju H_2O_2 u vodu i kisik.²⁹ GSHPx se nalazi i u citoplazmi i izvanstanično u gotovo svakom ljudskom tkivu, te pretvara H_2O_2 u vodu.



Shema 3. Aktivnost enzima SOD, CAT i HSHPx

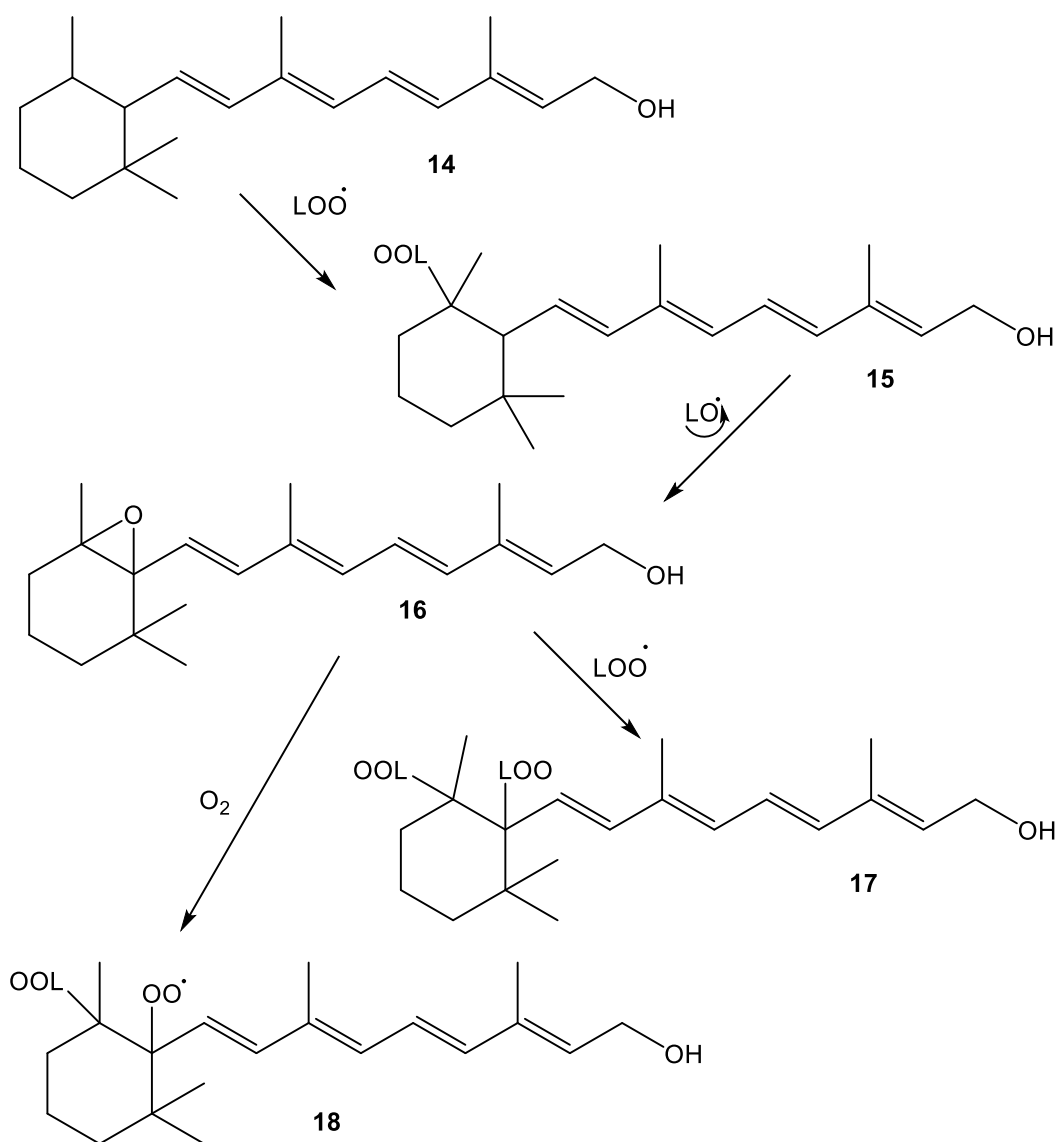
Vitamin E (α -tokoferol), učinkovit je antioksidans koji prekida lančane reakcije tijekom peroksidacije lipida u staničnim membranama i raznim lipidnim česticama uključujući lipoprotein niske gustoće (LDL).

Djeluje tako da presretne lipidne peroksilne radikale (LOO[•]) te na taj način prekine lančanu reakciju. Međutim, vitamin E nije učinkovit pri uklanjanju OH[•] i alkoksil radikala (•OR).³⁰ Mehanizam uklanjanja radikala vitaminom E prikazan je na shemi 4.



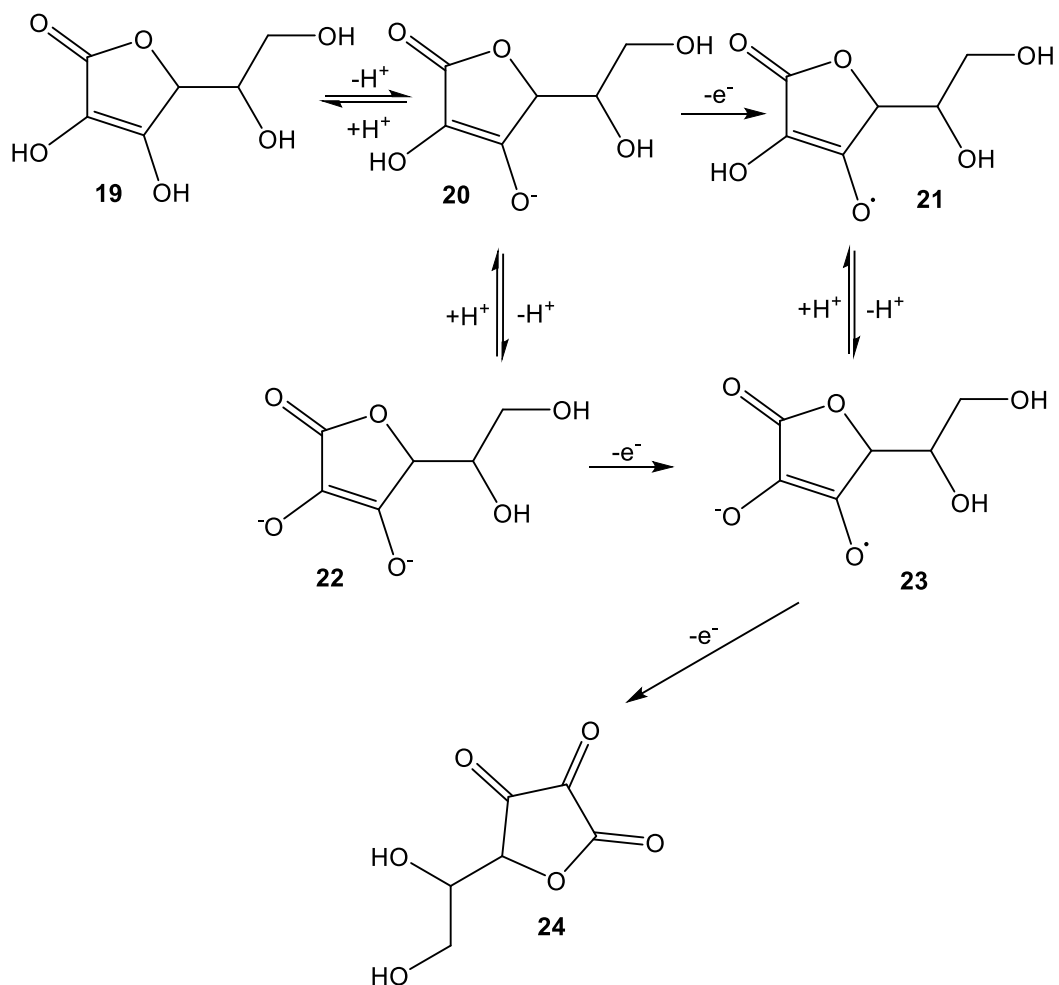
Shema 4. Mehanizam uklanjanja slobodnih radikala vitaminom E

Vitamin A daje značajan antioksidativni doprinos u zaštiti ljudskog LDL-a od oksidacije potaknute bakrom. Također, u nekoliko radova prikazan je i njegov potencijal kao antioksidans u borbi protiv srčanih bolesti. Mehanizam uklanjanja radikala prikazan je na shemi 5.³¹



Shema 5. Mehanizam uklanjanja radikala vitaminom A

Vitamin C mijenja se u askorbatni radikal **21** doniranjem elektrona lipidnom radikalu kako bi se prekinula lančana reakcija peroksidacije lipida. Parovi askorbatnih radikala brzo reagiraju i proizvode jednu molekulu askorbata **20** i jednu molekulu dehidroaskorbata **24**. Dehidroaskorbat nema nikakav antioksidativni kapacitet, stoga se dehidroaskorbat dodatkom dva elektrona pretvara natrag u askorbat. U posljednjoj fazi, dodavanje dva elektrona dehidroaskorbatu provodi se oksidoreduktazom.³²

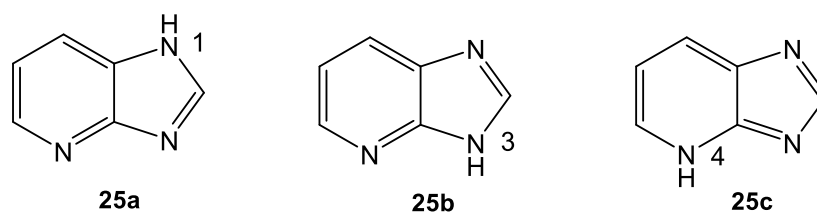


Shema 6. Mehanizam djelovanja vitamina C

2.5. Imidazo[4,5-*b*]piridini

Strukturna sličnost između imidazo-piridinskog heterocikličkog prstenastog sustava i purina potaknula je mnogobrojna biološka istraživanja kako bi se procijenilo njihovo potencijalno terapijsko značenje. Imidazo[4,5-*b*]piridini istaknuli su se kao dvostruki inhibitori FLT3/aurora kinaza za liječenje akutne mijeloične leukemije (A) kao i jaki blokatori receptora angiotenzina tipa II. Derivati imidazo[4,5-*b*]piridina također posjeduju potencijal za brojne primjene u procesima prijenosa protona i naboja u organometalnoj kemiji i u znanosti o materijalima zbog svojih posebnih strukturnih karakteristika.

Imidazo-piridini sadrže imidazolni prsten spojen s piridinskim dijelom. Aktivnost derivata ovisi o položaju i vrsti supstituenata na obje heterocikličke jezgre. NH skupina prisutna u imidazo-piridinima je kisela i slabo bazična. Ova skupina pokazuje brzi prototropni-tautomerizam, što dovodi do nastajanja ravnotežnih smjesa (slika 8). Ovisno o položaju vodikovog atoma, razlikuju se *1H*, *3H* i *4H* tautomeri. Ova migracija se ne opaža kada je imidazolni vodik zamijenjen drugim supstituentima kao što je alkilna skupina ili u posebnim okolnostima u kojima na migraciju vodika utječu intramolekularne vodikove veze.³³

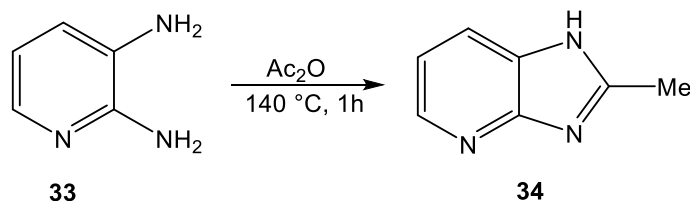


Slika 8. Struktura imidazo[4,5-*b*]piridina, **25a** - *1H*, **25b** - *3H* i **25c** - *4H*

U slučaju imidazo[4,5-*b*]piridina, većina metoda sinteze temelji se na reakciji aminacije 2-halo-3-acilaminopiridina s aminima, katalizirane paladijem ili bakrom. Međutim, unatoč jedinstvenosti i raznolikosti ovih metoda, postoji nekoliko nedostataka povezanih s njima, koji uključuju sudjelovanje toksičnog i skupog Pd ili Cu katalizatora u prisutnosti specifičnih i skupih liganada i odgovarajućih baza.

Najkorisniji polazni spojevi za sintezu imidazo[4,5-*b*]piridina su lako dostupni derivati 2,3-diaminopiridina, koji se obično proizvodi u dva stupnja od komercijalno dostupnog 2-klor-3-nitropiridina³⁴ ili 2-fluor-3-nitropiridina.³⁵ Prva faza uključuje nukleofilnu supstituciju halogena u piridinskom prstenu, aktiviranu nitro skupinom.

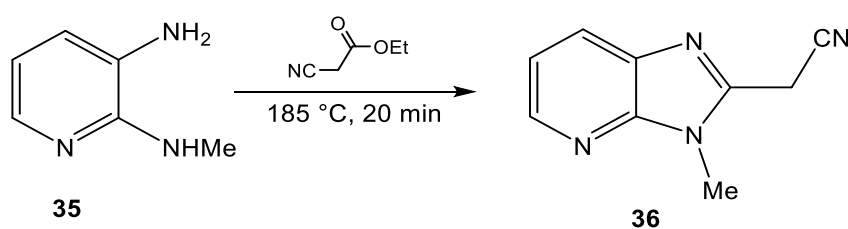
Chichibabina i Kirsanova, 1927. godine, prvi put objavljuju rad o sintezi derivata 2-metilimidazo[4,5-*b*]piridina (shema 9).



Shema 9. Sinteza ciljanog spoja

U početku djelovanje octenog anhidrida dovodi do aciliranja 2,3-diaminopiridina **33**, a nakon grijanja na temperaturi vrenja slijedi ciklizacija u imidazo[4,5-*b*]piridin **34**.³⁹

Kao izvori ugljikovodika za stvaranje peteročlanog prstena imidazo[4,5-*b*]piridina najčešće se koriste različiti derivati karboksilnih kiselina.⁴⁰ Kao što je prikazano u prethodnom primjeru, takvi derivati mogu biti anhidridi karboksilnih kiselina. Također, za pripravu derivata, mogu se koristiti i esteri. U odnosu na reakciju diaminopiridina s anhidridima i kloridima, esteri reagiraju u znatno težim uvjetima, shema 10.⁴¹



Shema 10. Sinteza ciljanog spoja

Nedavno je otkriveno da vezanjem fluora ili trifluorometila na strateškom položaju organske molekule mijenja svojstva derivata. Poboljšava topljivosti u lipidima, oksidativnu toplinsku stabilnost, propusnost i oralnu bioraspoloživost čime se poboljšava transportni mehanizam.⁴²

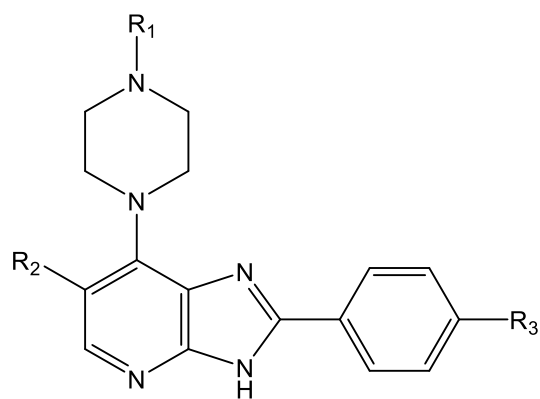
2.6. Biološki potencijal derivata imidazo[4,5-*b*]piridina

Istraživanje imidazo-piridina proizlazi iz njihove raznolike biološke aktivnosti. Djeluju kao analgetici⁴³, nesteroidni protuupalni agensi, pokazuju antidepresivno, kardiotonično⁴⁴, hipotenzivno, antitumorsko, antiaritmičko⁴⁵ i antisekretorno djelovanje. Osim toga, određeni broj derivata imidazo[4,5-*b*]piridina posjeduje antivirusno djelovanje, antimikrobno i citotoksično djelovanje. Poznati su i drugi aspekti praktične primjene derivata imidazo-piridina. U poljoprivredi se koriste kao sredstva za tretiranje izdanaka širokolisnih biljaka te u borbi protiv glodavaca.⁴⁶

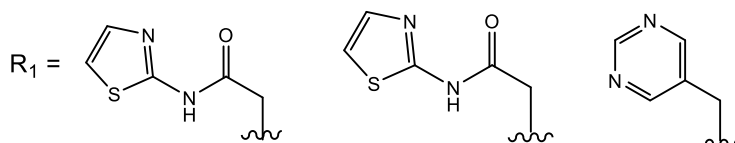
2.6.1. Antitumorska aktivnost

Nakon kardiovaskularnih bolesti, rak se smatra drugim vodećim uzrokom smrti današnjice te predstavlja veliki javnozdravstveni problem. Ciljani kemoterapeutici imaju prednosti u odnosu na tradicionalne zbog svoje selektivnosti prema stanicama raka i manjih nuspojava.⁴⁷ Jedna od ključnih značajki razvoja stanica tumora je brzo stvaranje abnormalnih stanica koje rastu izvan svojih uobičajenih granica. Te stanice tada mogu napasti susjedne dijelove tijela i proširiti se na druge organe. Nove metode liječenja raka koriste lijekove koji djeluju protiv proteina uključenih u proliferaciju stanica raka.⁴⁸

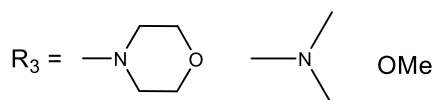
Među mrežom regulatornih proteina u staničnoj diobi, Aurora A kinaze (AURAK) su od posebne važnosti jer kontroliraju segregaciju kromatida. Aurora kinaze, identificirane su 1990. godine⁴⁹, i pripadaju skupini serin/treonin kinaza reguliranih staničnim ciklusom koji je važan za mitozu. Aurora A, koja ima katalitički učinak tijekom mitoze, jedna je od izoformi enzima Aurora kinaza. Znanstvena istraživanja otkrila su prekomjerno stvaranje AURAK-a u različitim vrstama raka, stoga se upravo ona pokazala kao idealna meta za sintezu novih lijekove protiv raka.⁵⁰ Neki od ciljanih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina, koji inhibiraju Aurora A kinazu, prikazani su na slikama 9 i 10.



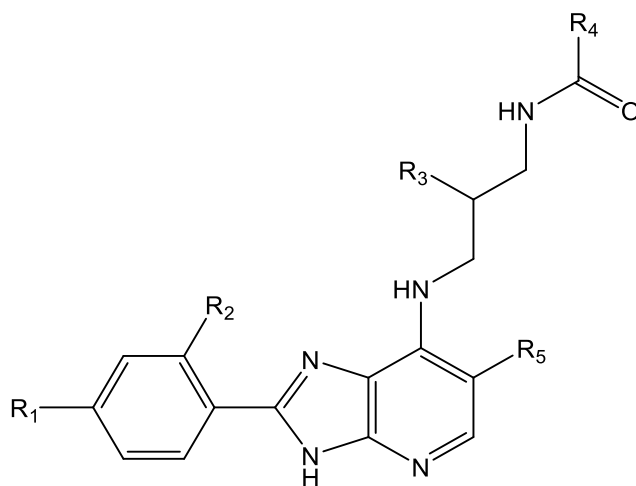
37



$R_2 = \text{Br, Cl}$

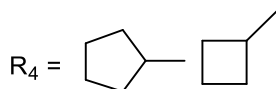


Slika 9. Struktura sintetiziranog spoja s mogućim supstituentima



38

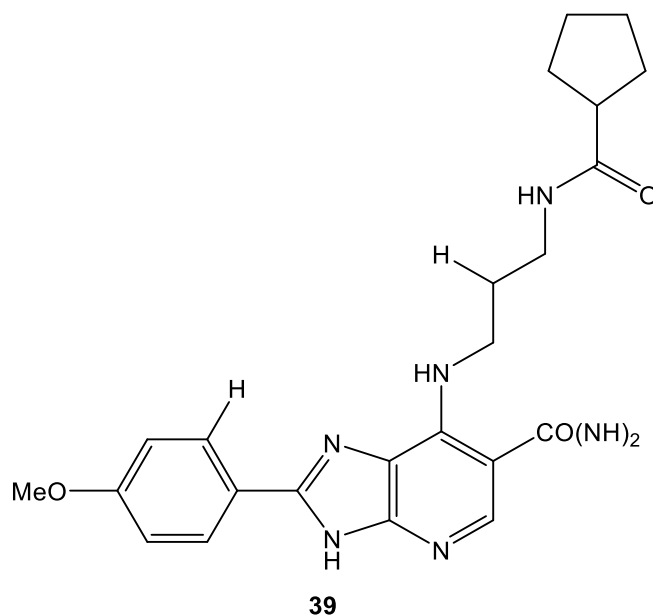
$R_1, R_2 = \text{OMe, H}$
 $R_3 = \text{H, OH}$



$R_5 = \text{CO(NH)}_2, \text{Br,}$

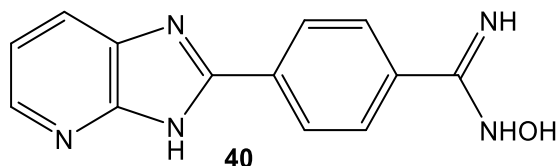
Slika 10. Struktura ciljanog spoja

U skupinu serin/treonin kinaza ubraja se i TBK1 (eng. *TANK-binding kinase 1*) i inhibitor podjedinice nuklearnog faktora kapa-B kinaze, epsilon (IKK- ϵ), koje se koriste prilikom istraživanja antitumorskih lijekova. Njihova uloga je aktivacije NF- κ B stanica u procesu fosforilacije, tijekom koje može doći do pojave abnormalnih stanica te razvoja tumora.⁵¹ Upravo se razvoj antitumorskih lijekova, temelji na inhibiciji ovih enzima. Struktura spoja koji je pokazao inhibitornu snagu u rasponu od 0,004-0,046 μ M i dobru selektivnost prema CDK2 kinazi i Aurora B enzimu, prikazan je na slici 11.⁵²



Slika 11. Struktura ciljanog spoja

Provedeno je i istraživanje citotoksične aktivnosti derivata imidazo[4,5-*b*]piridina s *N*-hidroksi-karboksimidamidnom skupinom na fenilnom prstenu, na staničnoj liniji adenokarcinoma dojke MCF-7. Na slici 12 prikazan je navedeni spoj s IC₅₀ vrijednošću 0,082 μ M.⁵³

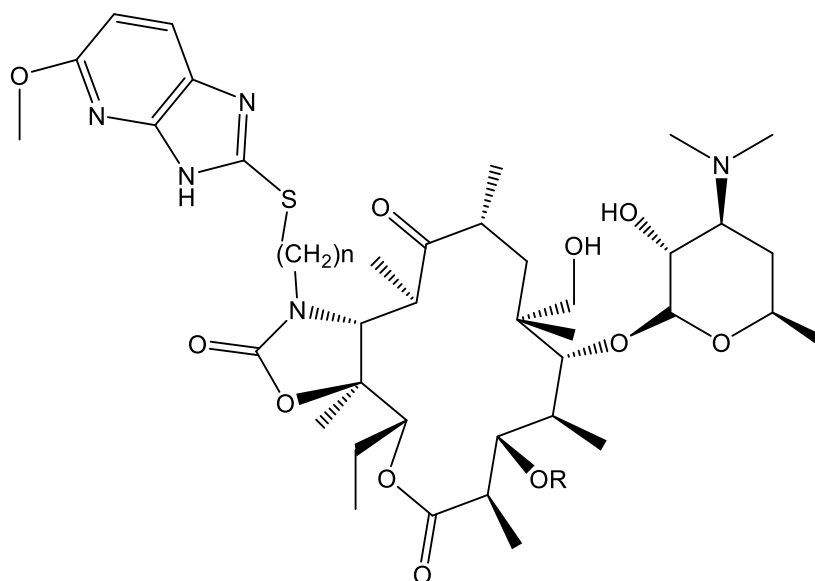


Slika 12. Struktura derivata imidazo[4,5-*b*]piridina s *N*-hidroksi-karboksimidamidnom skupinom na fenilnom prstenu

2.6.2. Antimikrobna aktivnost

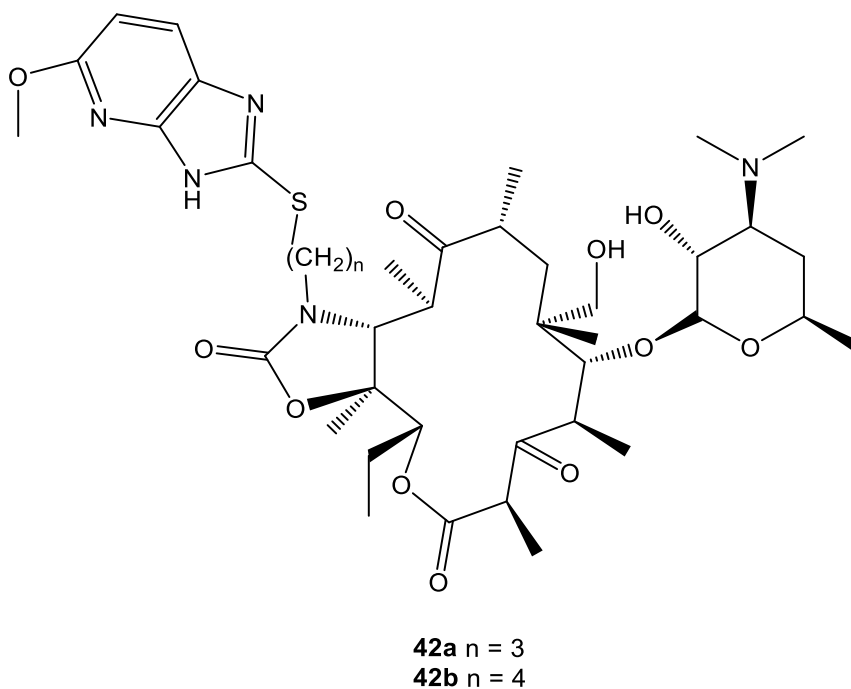
Na učinkovitost antimikrobnih lijekova utječu mnogi čimbenici, kao naprimjer: svojstva bakterije (osjetljivost i rezistencija, tolerancija, postojanost, biofilm) i veličina inokuluma, antimikrobne koncentracije, čimbenici domaćina (učinak seruma i utjecaj na crijevnu mikrobiotu). Istraživanje veze između upotrebe antimikrobnih sredstava, svojstva bakterija i odgovora domaćina omogućuju osmišljavanje novih pristupa u antimikrobnom liječenju, koji istovremeno postižu bolji klinički ishod i minimiziraju pojavu rezistencije. Trenutno su antibiotici neprocjenjivo oružje u borbi protiv zaraznih bolesti. Međutim, antimikrobna rezistencija, zajedno s nedostatkom novo-razvijenih antimikrobnih lijekova, predstavlja veliku prijetnju zdravlju ljudi i životinja.⁵⁴

Novopripremljeni makrolidni derivati **41a** – **41d** testirani su na panelu reprezentativnih patogena respiratornog trakta, zajedno s telitromicinom, azitromicinom i klaritromicinom kao referentnim uzorcima. Navedeni spojevi pokazali su dobru aktivnost protiv svih sojeva otpornih na eritromicin, npr. *S. pneumoniae*.



- 41**
- 41a** $n = 3$ R = 3-piridil acetil
 - 41b** $n = 4$ R = 3-piridil acetil
 - 41c** $n = 3$ R = (3,4-metilendioksi)fenil acetil
 - 41d** $n = 4$ R = (3,4-metilendioksi)fenil acetil

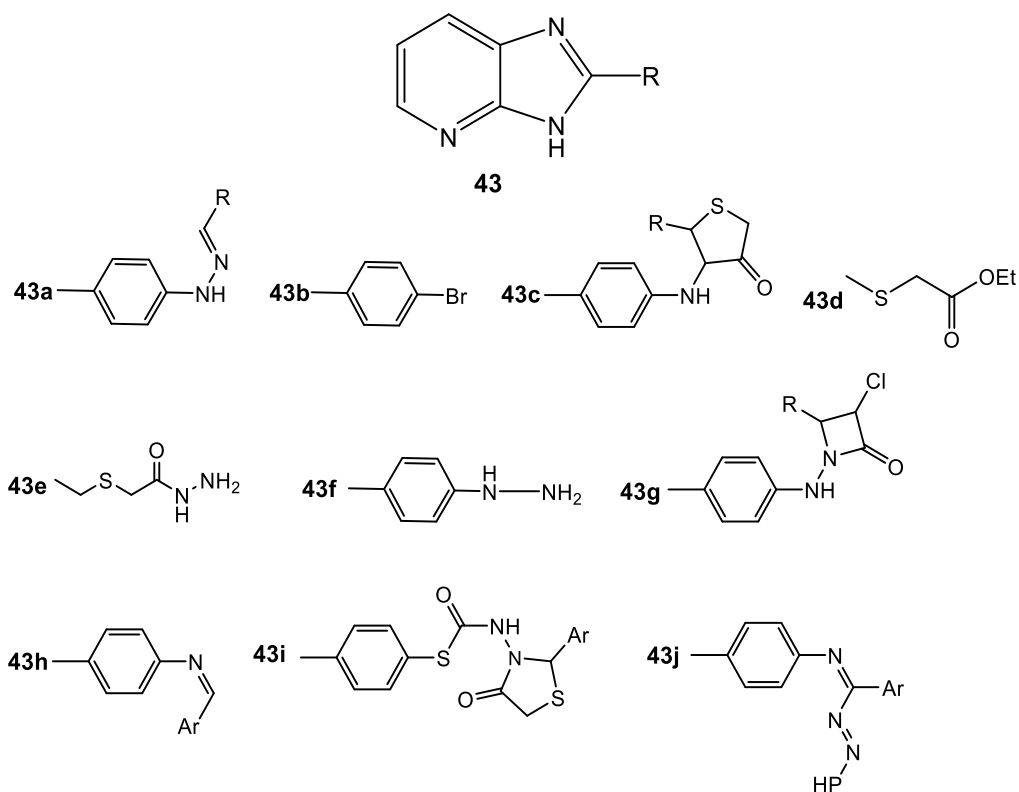
Slika 13. Ciljani spojevi



Slika 14. Struktura ciljanih spojeva

Ketolidi **42a** i **42b** pokazali su se kao vrlo učinkoviti antimikrobni agensi. Oba derivata pokazala su vrlo dobru aktivnost protiv sojeva otpornih na eritromicin. Na sojeve osjetljive na eritromicin također su pokazali snažno antibakterijsko djelovanje. Također, uspoređujući telitromicin (antibiotik) s ciljanim spojem **42a**, dokazala se nešto veća aktivnost protiv sojeva osjetljivih na eritromicin i sojeva otpornih na eritromicin.

Još jedno antimikrobno ispitivanje provedeno je na spojevima **43a-43j**. Svi spojevi ispitani su *in vitro* u svrhu određivanja antibakterijskog djelovanja protiv *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *klebsiella pneumoniae*, *Salmonella paratyphi A*, *Escherichia coli*, *Bacillus magatetium*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogeus*. Tetraciklin (100 µg/ml) korišten je kao standardni lijek za usporedbu.



Slika 15. Prikaz strukture ciljanih spojeva

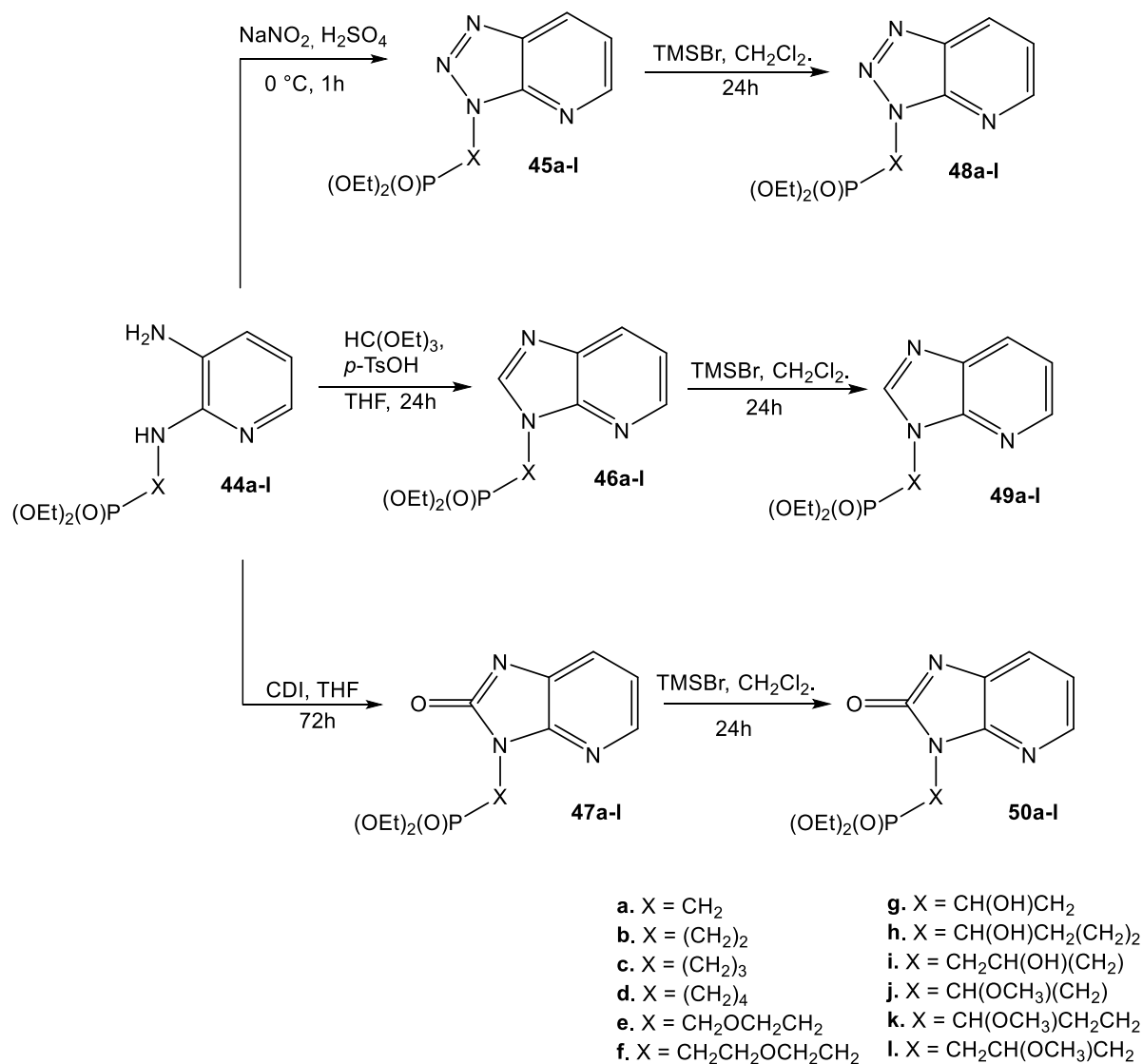
Iz ispitivanja na svih šest sojeva bakterija, utvrđeno je da su derivati, koji kao supstituent sadrže metoksi skupinu, pokazali veću toksičnost od spojeva s prisutnom hidroksilnom skupinom ili klorom. Također je utvrđeno da su oksazoli pokazali veću antimikrobnu aktivnost prema bakterijama od Schiffovih baza. Spojevi koji kao supstituent sadrže klor, pokazuju veću antimikrobnu aktivnost u slučaju kada je uz klor vezana i metoksi skupina. Derivati koji imaju klor u *para* položaju, pokazali su veću aktivnost prema svim bakterijama, osim *Salmonella paratyphi B* i *Klebsiella pneumonia*. Između derivata s tio skupinom, spojevi sa supstituiranim hidrazinom pokazali su se kao svestrani antimikrobni agensi.⁵⁵

2.6.3. Antivirusna aktivnost

Pojava mutagenih virusa nakon dugotrajnog liječenja antivirusnim lijekovima može rezultirati manjom osjetljivošću virusa na kemoterapeutike, što predstavlja veliki problem u liječenju virusnih infekcija. Iz tog razloga, uočava se povećani interes za razvijanjem novih antivirusnih spojeva.⁵⁶

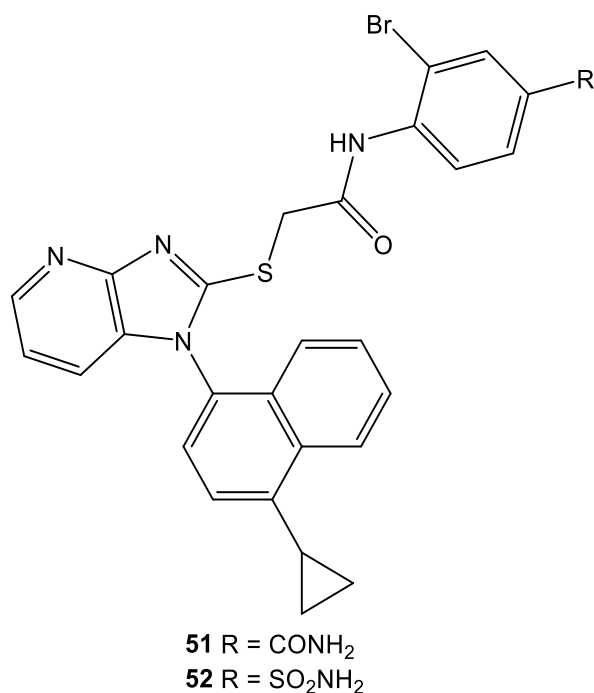
U jednom od istraživanja znanstvenici su sintetizirali analoge acikličkih fosfonatnih nukleozida u kojima je prirodna purinska nukleobaza zamijenjena derivatima imidazo[4,5-*b*]piridina.

Aciklički nukleozidni fosfonati (ANP) strukturni su analozi nukleozidnih monofosfata u kojima alifatski lanac ima ulogu furanoznog prstena, a izosterični i izoelektronički oksimetilfosfonatni (fosforilmetoksi) dio $[(HO)_2P(O)CH_2-O]$ zamjenjuje prirodni, labilni fosfatni dio $[(HO)_2P(O)-O-C(5')]$. Derivati su sintetizirani u svrhu istraživanja njihove antivirusne aktivnosti prema velikom broju DNA i RNA virusa, a testirani su na embrionalnim matičnim stanicama pluća. Antivirusno djelovanje protiv citomegalovirusa ($EC_{50}=76,47 \mu M$) u embrionalnim matičnim stanicama pluća opaženo je za spoj **50f**. Fosfonske kiseline u spojevima **48g** i **50g** pokazale su marginalnu aktivnost protiv virusa Varicella-zoster ($EC_{50} = 52,53 \mu M$ za **48g** i $EC_{50} = 61,70 \mu M$ za **50g**). Sinteza navedenih spojeva prikazan je na shemi 11.⁵⁷



Shema 11. Sinteza derivata imidazo[4,5-*b*]piridina s antivirusnim djelovanjem

Reverzna transkriptaza (RT) virusa humane imunodeficijencije tipa 1 (HIV-1) trenutno je jedan od primarnih terapijskih ciljeva za istraživanje visoko učinkovitih lijekova protiv HIV-a zbog svoje funkcije tijekom procesa replikacije. Međutim, rezistencija na lijekove zbog brzih RT mutacija i ozbiljnih nuspojava, neizbježno se pojavila nakon dugotrajne kliničke uporabe, stoga znanstvenici razvijaju nove lijekove usmjerene ka virusu HIV-a. Nova serija derivata imidazo[4,5-*b*]piridina dizajnirana je kombiniranjem bioizosterične zamjene i dizajna lijekova koji se temelji na strukturi (slika 16). Procjena antivirusne aktivnosti i citotoksičnosti spojeva u MT-4 stanicama provedena je pomoću MTT testa. Spojevi **51** i **52** pokazali su najveće inhibitorno djelovanje prema stanicama HIV-a. (**51**: EC₅₀ = 0.059 μm; **52**: EC₅₀ = 0.073 μm). Najbolja aktivnost uočena je kod spojeva u kojima je amidna i sulfonamidna skupina u *para* položaju anilidne skupine.⁵⁸

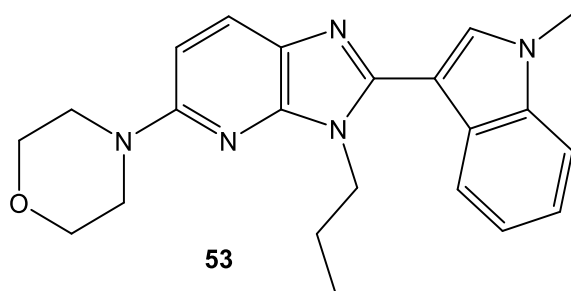


Slika 16. Struktura derivata imidazo[4,5-*b*]piridina

2.6.4. Antiinflatorna aktivnost

Upala je glavna patogena komponenta mnogih bolesti različite etiologije i jedan od najvažnijih problema opće patologije i klinike. Ova reakcija tijela na oštećenja, sudjeluje u nastanku mnogih bolesti. U posljednje vrijeme posebno se istražuju ne steroidni protuupalni lijekovi, koji kombiniraju čitav niz svojstava, pokazujući protuupalno, analgetsko i antipiretičko djelovanje. Kronična upala može dovesti do štetnih učinaka na tijelo i razvoja drugih bolesti kao što su rak i neuropatija.

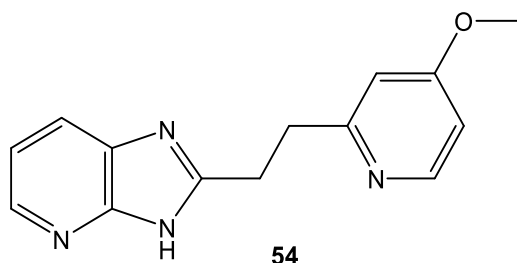
Okluzija retinalne vene zaustavljanje je dotoka krvi u mrežnicu. Trajna okluzija retinalne vene dovodi do aktivacije medijatora upale, daljnje degeneracije mrežnice i oštećenja vida. Faktor nekroze tumora- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) i adhezijske molekule ICAM-1 i VCAM-1, uočeni su kod pacijenata koji boluju od navedene bolesti. Spoj **53** (slika 17) s imidazo[4,5-*b*]piridinskom strukturom proučavan je kao potencijalni protuupalni spoj u liječenju ove bolesti. Navedeni spoj smanjuje upalu induciranu tert-butil hidroperoksidom u stanicama ARPE-19 (pigmentni epitel ljudske retine).⁵⁹



Slika 17. Struktura derivata imidazo[4,5-*b*]piridina

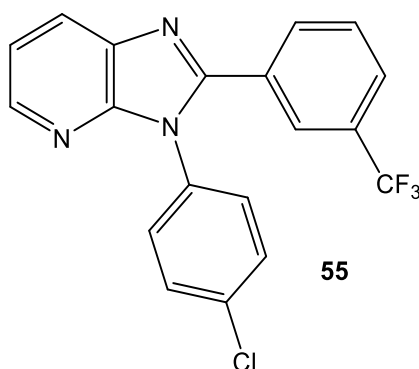
Također je testirana i sposobnost spoja **53** da inhibira upalne reakcije povezane s pretilošću. Testirani spoj utjecao je na aktivaciju transkripcijskih faktora Nrf2 i NF- κ B odgovornih za regulaciju oksidativnog stresa koji uzrokuje ozljedu arterija tijekom pretilosti.

Sintaza dušikovog oksida (NOS) enzim je koji proizvodi dušikov(II)oksid koji obavlja mnoge biološke funkcije u ljudskom tijelu. Jednu od inducibilnih izoformi iNOS, aktiviraju proinflamatorni čimbenici. Prekomjerna ekspresija iNOS-a može dovesti do nuspojava kao što je moždani udar. Spoj **54** (slika 18) karakteriziran je selektivnošću za iNOS s pIC₅₀ vrijednošću od 7,09 i dobrim farmakološkim parametrima. Postojanje metoksi skupine u strukturi, pokazalo se izrazito bitnim za svojstvo selektivnosti.⁶⁰



Slika 18. Struktura spoja koja pokazuje selektivnost na iNOS enzim

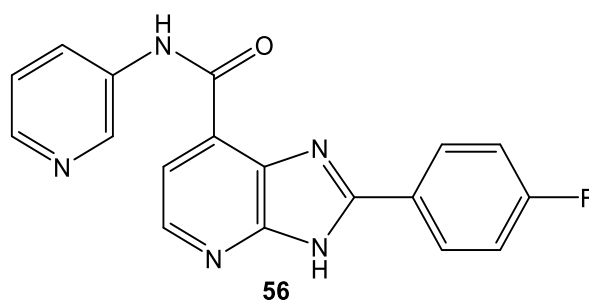
Ciklooksigenaza (COX) je protein uključen u stvaranje prostaglandina, tromboksana i prostaciklina i dio je upalnog odgovora. Većina nesteroidnih protuupalnih lijekova inhibira aktivnost obje izoforme enzima, COX-1 i COX-2. Brojne nuspojave, posebice vezane uz želučanu ovojnicu i stvaranje želučane kiseline, povezane su s inhibicijom COX-1, stoga su prihvatljiviji i manje štetni selektivni inhibitori enzima COX-2. Kirwen i suradnici istraživali su selektivne inhibitore COX-2 s imidazo-piridinskom strukturom. Dobiveni imidazo[4,5-*b*]piridini sadrže diarilni farmakofor koji je ključni strukturni element mnogih kemijskih molekula s protuupalnim djelovanjem. Najveću aktivnost i selektivnost pokazao je spoj **55** (slika 19).⁶¹



Slika 19. Struktura spoja koji inhibiraju djelovanje COX-1 i COX-2 proteina

2.6.5. Antidijabetička aktivnost

Dijabetes je jedna od najčešćih nezaraznih bolesti. Progresivna je bolest i s vremenom zahtijeva provedbu kombinirane terapije. Najčešće korišteni lijekovi uključuju sulfoniluree, agoniste GLP-1 receptora, agoniste PPAR- α , inhibitore DPP-IV i nedavno uvedene glinide.⁶² Inhibicija GSK-3 proteina, dovodi do smanjenja sinteze glikogena u jetri i mišićima, zajedno s povećanom glukozom u krvi ili hiperglikemijom. S ciljem traženja novih metoda liječenja, razvijeni su novi inhibitori glikogen sintaze kinaza 3 (GSK-3). 7-hidroksibenzimidazol pokazao je relativno dobru inhibitornu aktivnost prema proteinu GSK-3, međutim ukoliko se benzimidazolna jezgra zamijeni s imidazo-piridinskom, dobiva se spoj **56**, koji pokazuje puno veću inhibitornu moć prema proteinu GSK-3. Navedeni spoj karakterizira dobra stabilnost, visoka aktivnost, ali i dobra fizikalno-kemijska svojstva.⁶³

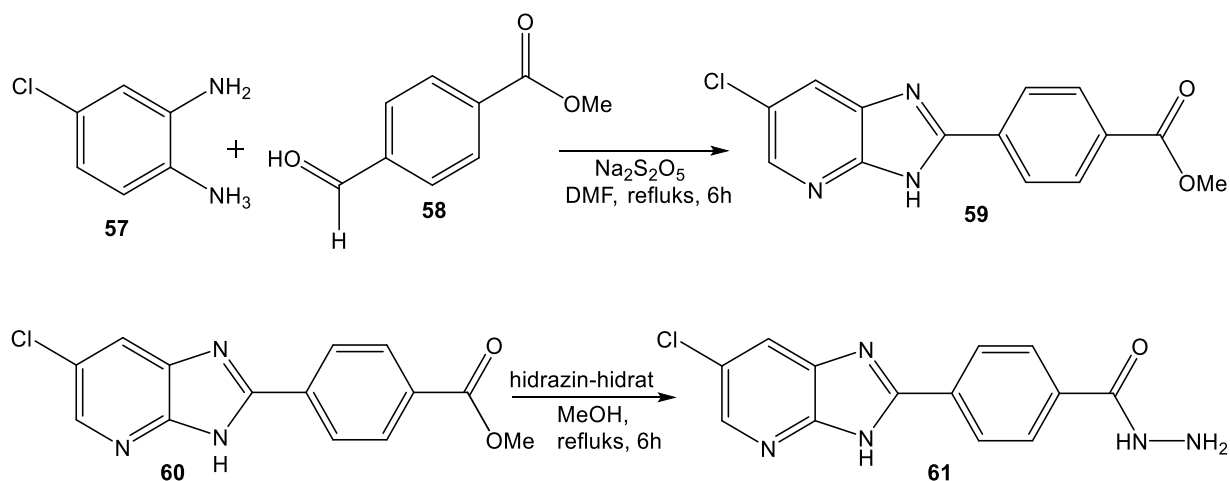


Slika 20. Derivat imidazo[4,5-*b*]piridina s antidijabetičkom aktivnosti

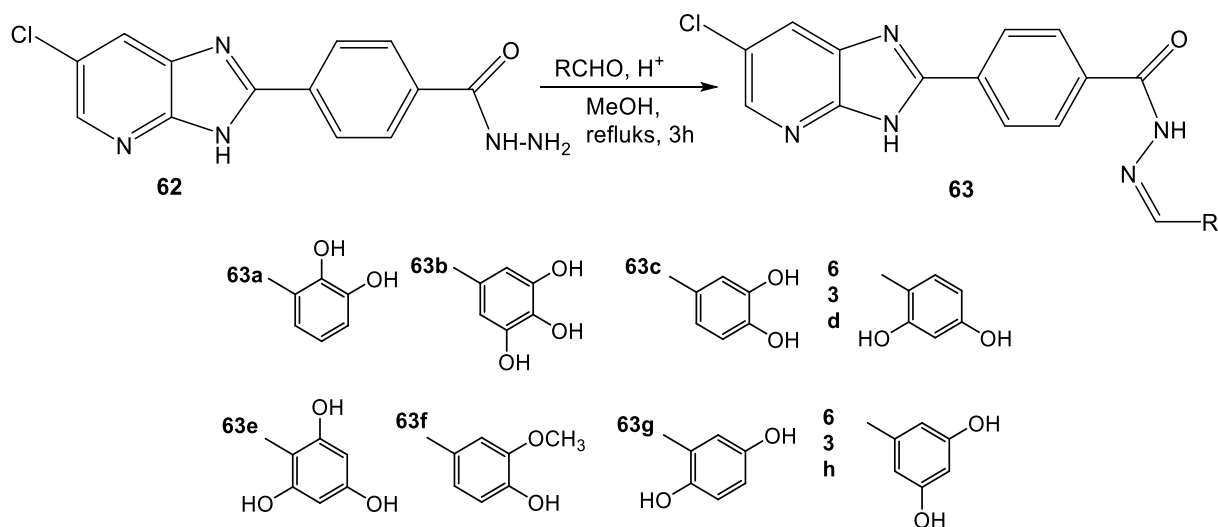
2.7. Antioksidativna aktivnost derivata imidazo[4,5-*b*]piridina

Proces glikoziliranja nastaje tijekom reakcije reducirajućih šećera i slobodnih aminokiselina. Intermedijar, poznat kao *Amadori proizvod*, proizvodi se u ranim fazama procesa glikoziliranja. Oksidacija proizvoda Amadori daje druge međuprodukte koji bi mogli reagirati sa slobodnom amino skupinom u blizini i stvoriti umrežavanje između proteina.⁶⁴ Poprečno povezivanje koje se događa u proteinima, poput kolagena, uzrokuje krutost arterija i smanjenu usklađenost miokarda, a često se nalazi kod starijih pacijenata koji boluju od dijabetesa.⁶⁵ Derivati **63a-63h** imaju antioksidativni učinak na proizvodnju *Amadori proizvoda* i sposobni su inhibirati proizvodnju naprednih završnih proizvoda glikacije (eng. *advanced glycation end Products*, AGE) i potencijalno bi se mogli koristiti za liječenje bolesti povezanih sa starenjem i dijabetesom. Na shemi 13 prikazan je sintetski put pripreve derivata imidazo[4,5-*b*]piridin benzohidrazona. Benzohidrazid **61**, pripremljen prethodnom sintezom, reagira s različitim benzaldehidima (shema 14) u prisutnosti octene kiseline kako bi se formirali konačni derivati **63a-63h**. Ispitivanje antioksidativnih svojstava FRAP i DPPH metodama pokazalo je da su spojevi s tri hidroksilne skupine, najmoćniji zbog svog svojstva doniranja elektrona. S druge strane spojevi sa supstituentima koji ne doniraju elektrone, pokazali su vrlo slabu ili nikakvu aktivnost. Utvrđeno je da spojevi koji imaju više od jedne hidroksilne skupine imaju veću sposobnost uklanjanja radikala. Rezultati pokazuju da niti jedan od mono-hidroksi supstituiranih spojeva ne daje bolju aktivnost u usporedbi s galnom kiselinom. Supstitucija u *para* položaju, kod spojeva s jednom hidroksilnom skupinom, daje najbolji inhibicijski učinak u usporedbi s drugim položajima. Uspoređujući inhibicijsku aktivnost, uočena je manja aktivnost u slučaju prisutnosti hidroksilne skupine u *meta* položaju u odnosu na *ortho* položaj.

Antiglikacijsko djelovanje za supstituirane spojeve pokazuje da hidroksilna skupina u *ortho* i *para* položaju lako može formirati hemiacetalnu vezu s metilglioksalom u usporedbi s hidroksilnom u *meta* položaju. Spoj **63e** pokazao je najveću sposobnost uklanjanja radikala s vrijednošću EC_{50} od $26,12 \pm 0,15 \mu\text{M}$.⁶⁶



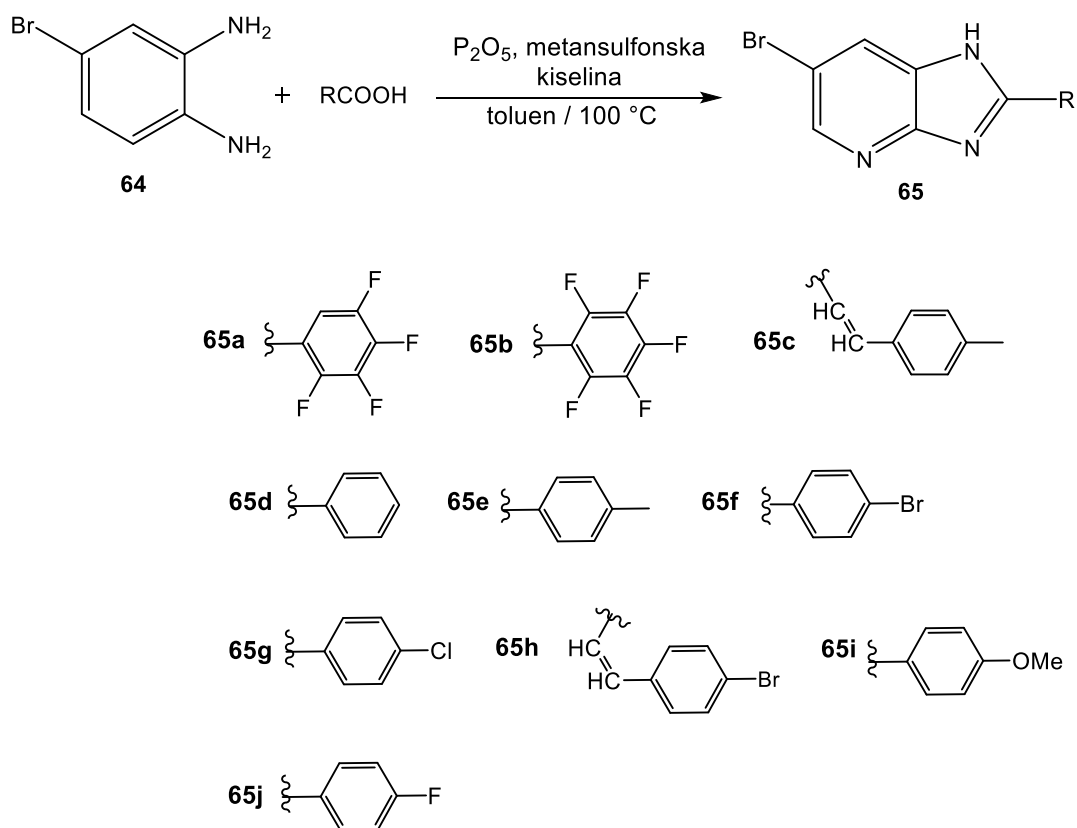
Shema 12. Sintetski put pripreve derivata imidazo[4,5-*b*]piridina benzohidrazona



Shema 13. Sinteza ciljanih derivata

Lavanya i suradnici, testirali su antioksidativnu aktivnost derivata imidazo[4,5-*b*]piridina koji sadrže supstituent u C-2 položaju. Ispitani spojevi pokazali su potencijalnu aktivnost uklanjanja slobodnih radikala kao što su dušikov(I) oksid i DPPH u odgovarajućim standardnim lijekovima (Vitamin E i *Curcumin*). Na temelju rezultata, spoj **65h** pokazao je najveću potencijalnu aktivnost, dok su spojevi **65a** i **65f** pokazali umjerenu, a spoj **65c** dobru aktivnost.

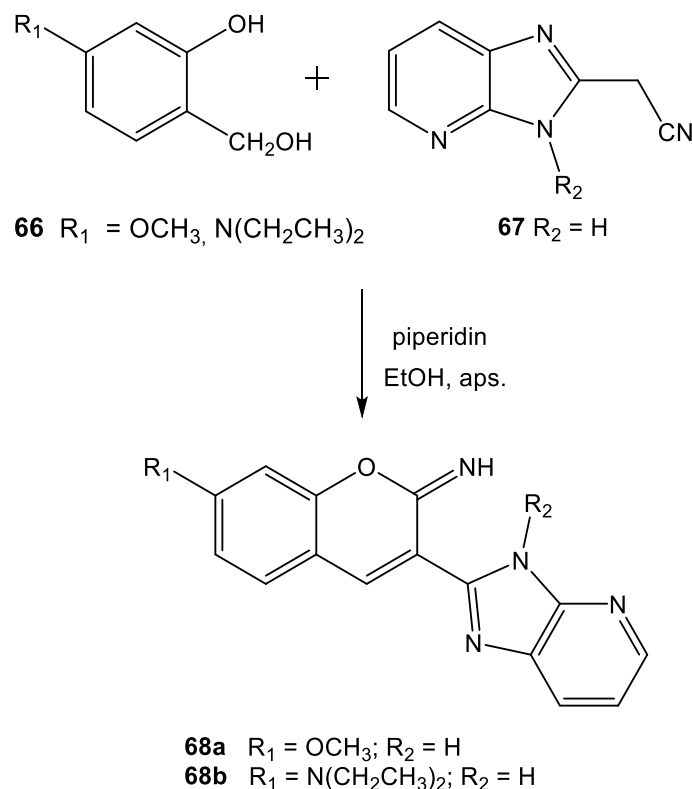
Ovaj rezultat pokazuje da biološka aktivnost ovisi o strukturi molekula kao i prirodni supstituenti. Za pripremu ciljanih spojeva, 5-brom-2,3-diaminopiridin **64** podvrgnut je kondenzaciji s različitim derivatima aromatske karboksilne kiseline u prisutnosti Eaton-ovog reagensa. Refluksiran je i dobiveni su odgovarajući derivati (shema 14). Ove reakcije su jednostavne, lako se izvode u normalnim reakcijskim uvjetima.⁶⁷



Shema 14. Sinteza derivata supstituiranih u C-2 položaju

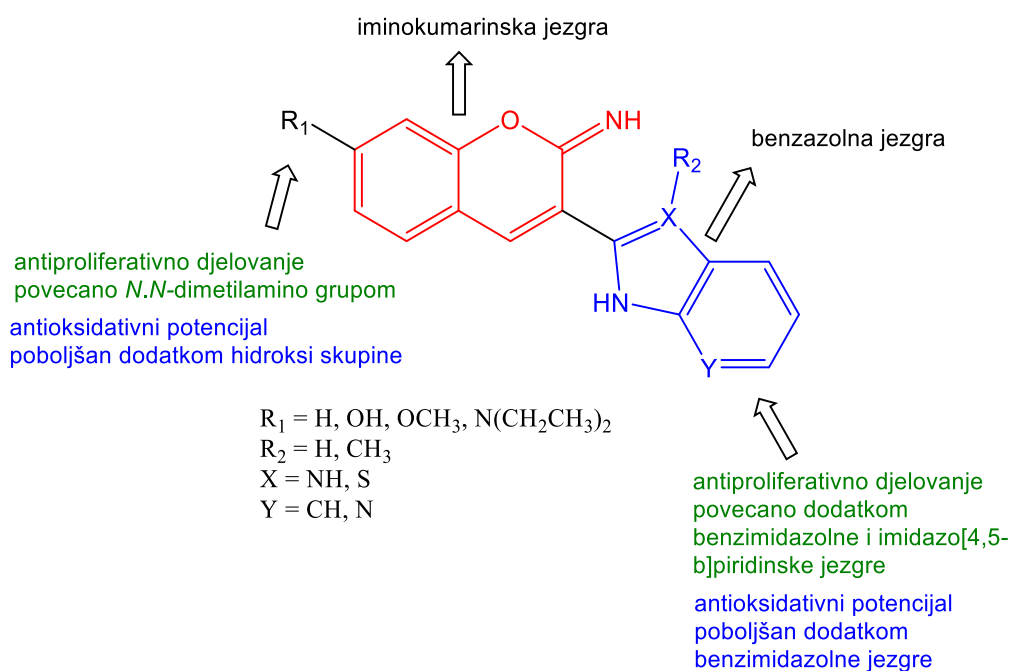
Sintetiziran je i niz derivata kumarina koji u svojoj strukturi sadrže strukturnu jedinicu benzazola u C-2 položaju te je procijenjen njihov antioksidativni kapacitet (shema 15). Sinteza uključuje reakciju ciklokondenzacije, počevši od komercijalno dostupnog 4-(dietilamino)-2-hidroksibenzaldehida s odgovarajućim acetonitrilnim derivatom imidazo[4,5-*b*]piridina uz dodatak apsolutnog etanola i nekoliko kapi piperidina. Njihova molekularna struktura uključuje skupinu elektron-donora na poziciji 7, s elektron-odvlačećim skupinama, kao što je benzimidazol, benzotiazol i imidazo-piridin na poziciji 3.

Većina sintetskih i prirodnih derivata kumarina poznati su kao dobri antioksidansi koji imaju sposobnost uklanjanja slobodnih radikala, poput hidroksilnih radikala i superoksidnih anionskih radikala.⁶⁸ Antioksidativna svojstva ispitana su ABTS i FRAP metodama. Iz dobivenih rezultata, spojevi **68a** i **68b** pokazali su umjereno dobru antioksidativnu aktivnost.⁶⁹



Shema 15. Struktura derivata s antioksidativnom aktivnosti

Na slici 21 prikazan je uvid u SAR za antiproliferativno djelovanje i antioksidativni potencijal derivata iminokumarina. Uvođenje *N,N*-dietilamino skupine na benzimidazolskom supstituentu kao i supstitucija benzimidazalnog prstena s benzotiazolnim, rezultiralo je smanjenjem antioksidativnog potencijala. Redukcijska moć prikazanih spojeva je vrlo niska u odnosu na standard i nije bilo prevelike razlike između različitih derivata iminokumarina. Ispitani iminokumarini supstituirani benzazolom pokazali su umjereni do vrlo nizak antioksidativni kapacitet u ABTS testu u usporedbi s BHT standardom. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da spoj s nesupstituiranim benzimidazolom i hidroksilnom skupinom na iminokumarinskoj jezgri pokazuje najizraženiji antioksidativni potencijal.



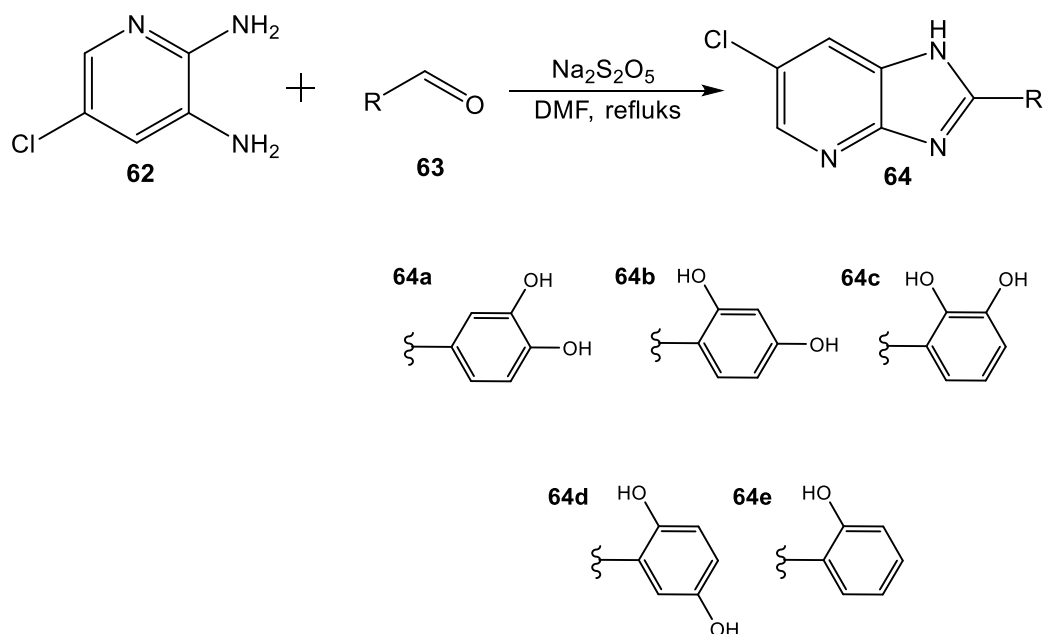
Slika 21. Uvid u SAR za antiproliferativno djelovanje i antioksidativni potencijal derivata iminokumarina

Sintetiziranim iminokumarinima ispitana je i antiproliferativna aktivnost *in vitro* prema dvije humane tumorske stanične linije (T-stanične leukemije (CEM) i stanice karcinoma vrata maternice (HeLa)) i humane dermalne mikrovaskularne endotelne stanične linije (HMEC-1). *N,N*-dietilamino supstituirani iminokumarini koji sadrže imidazo[4,5-*b*]piridinsku jezgru pokazali su selektivnu aktivnost prema CEM i HeLa stanicama uz submikromolarnu inhibitornu koncentraciju. Derivati benzimidazola, benzotiazola i imidazo[4,5-*b*]piridina pokazali su umjereno antiproliferativno djelovanje bez ikakve selektivnosti između ispitivanih stanica raka.

Najnovija istraživanja pokazuju ubrzani porast bolesti dijabetesa tipa 2 koji predstavlja 90% svih slučajeva dijabetesa.⁷⁰ Dijabetes tipa 2 uzrokuje brojne štetne učinke, a jedan od njih je proizvodnja završnih proizvoda napredne glikacije (AGEP). Provedena su brojna istraživanja kako bi se usporio ili zaustavio proces glikacije korištenjem potencijalnih novih antiglikacijskih sredstava.⁷¹ Neki inhibitori djeluju tako da cijepaju AGEP-ove poprečne veze i na taj način smanjuju mogućnost dijabetičkih komplikacija.⁷² Osim toga, AGEP se vežu na receptor i induciraju proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Uzrokuje aktivaciju pleiotropnog transkripcijskog nuklearnog faktora NF- κ B i uzrokuje različite patološke promjene u ekspresiji gena.⁷³ Metaboličke abnormalnosti povezane s dijabetesom rezultiraju prekomjernom proizvodnjom mitohondrijskog superoksida.

Povećana količina superoksidnog aniona uzrokuje oštećenje tkiva. Superoksidni anioni također sudjeluju u aktiviranju različitih puteva koji dovode do komplikacija u patogenezi i inaktivacije anti-aterosklerotskih enzima, prostaciklin-sintaze i eNOS-a.⁷⁴ Osim što sudjeluju u procesu glikoliziranja, slobodni radikali iz hidroksila, vodikovog peroksida, superoksidnih aniona, peroksil i lipidnih peroksida igraju značajnu ulogu u pokretanju raznih bolesti poput bolesti dišnog sustava, kardiovaskularnih bolesti, gihta, raka, starenja i ateroskleroze.⁷⁵

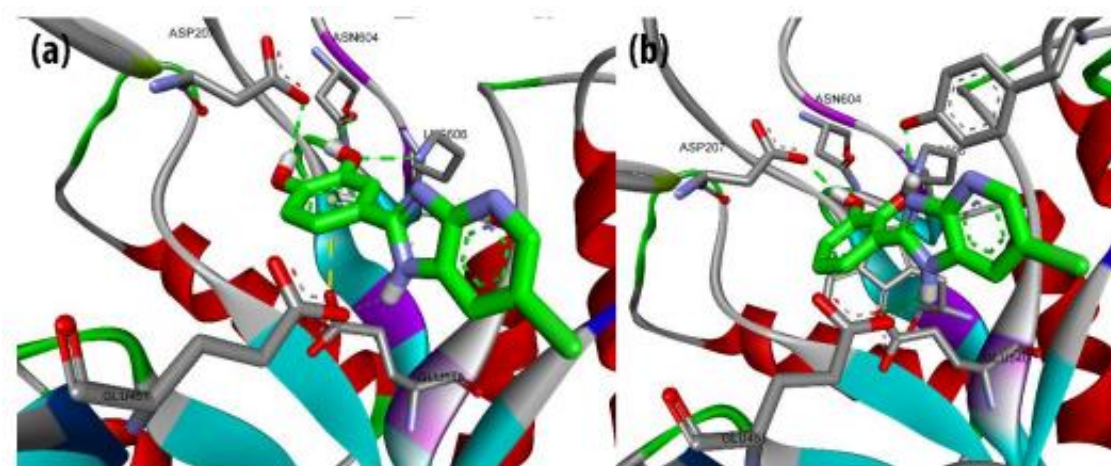
Trenutno je broj učinkovitih antiglikacijskih agenasa vrlo mali, a naponi da se pronađu novi inhibitori još uvijek su neuspješni. Na shemi 16 prikazana je sinteza spojeva koji imaju potencijalno antioksidativno djelovanje prema reaktivnim kisikovim česticama. Ciljani spojevi dobiveni su reakcijom 5-klor-2,3-diaminopiridina i različitih aldehida u *N,N*-dimetilformamidu.



Shema 16. Sinteza ciljanih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina

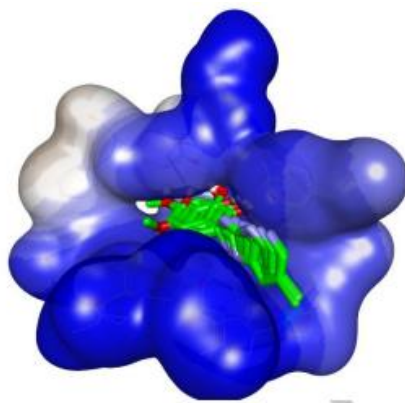
Uočeno je da svi spojevi s antioksidativnom aktivnosti sadrže više od jedne hidroksilne skupine, tako da je aktivnost izravno povezana s brojem hidroksilnih skupina. Usporedbom ovih aktivnih derivata, ustanovljeno je da je spoj **64b**, 2,4-dihidroksi derivat, najaktivniji spoj ove serije. Pad antioksidativne aktivnosti uočen je ukoliko se jedna od hidroksilnih skupina zamijeni s H ili OCH₃ skupinom. Za procjenu antioksidativnog djelovanja spojeva korištena je DPPH metoda.⁷⁶

Svi sintetizirani spojevi procijenjeni su i na β -glukuronidazu i uspoređeni sa standardnim D-saharinska kiselina-1,4-laktonom. Spojevi **64a** ($IC_{50} = 30,10 \mu M$), **64c** ($IC_{50} = 29,25 \mu M$) i **64d** ($IC_{50} = 46,10 \mu M$) pokazali su se kao najaktivniji spojevi. Također, provedene su studije molekularnog spajanja koristeći strukturu proteina humane β -D-glukuronidaze kako bi se predvidio povoljan način vezanja derivata imidazo[4,5-*b*]piridina. Vizualni pregled rezultata interakcija, dobivenih za ove aktivne spojeve, sugerira da amin (NH) na imidazo[4,5-*b*]piridinskom prstenu, za oba spoja **64a** i **63c**, stupa u interakciju s okosnicom (OE1) Glu451 na udaljenosti od 2,33 i 2,39 Å. Još jedna interakcija koja se može uočiti između ova dva spoja je hidroksilna skupina u *meta* položaju spoja **64a** i vodikova veza između kisika hidroksilne skupine u *ortho* položaju spoja **64c** s okosnicom (NZ) Lys606 na udaljenosti od 2,60 i 2,83 Å. U ovom slučaju, rezultati jasno sugeriraju da dvije hidroksilne skupine na fenilnom dijelu derivata imidazo[4,5-*b*]piridina moraju biti smještene na susjednom ugljiku jedan do drugog jer će im to omogućiti interakciju s aktivnim ostacima poput Asp207 i Lys606. Položaj vezivanja za spojeve **64a** i **64c** prikazan je na slici 22.



Slika 22. Položaj vezanja za spojeve **64a** i **64c**

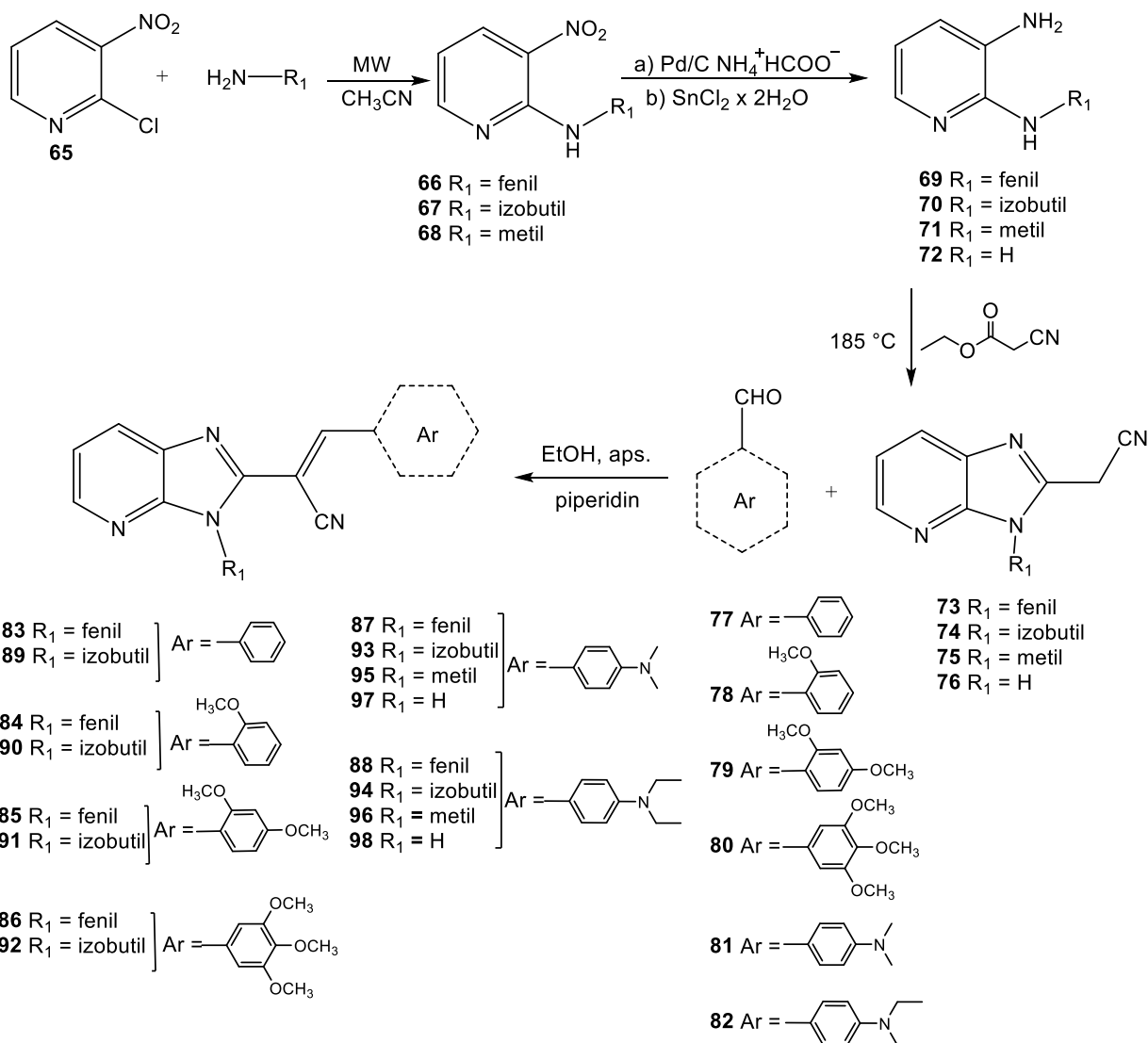
Također, na slici 23 prikazano je da se spojevi savršeno uklapaju u mjesto vezanja i da djeluju kroz različite interakcije vodikove veze s ostacima aktivnog mjesta koje uključuje Asp207, His385, Glu451, Tyr504 i Glu540. Uočeno je da su fenilni krajevi svih spojeva orijentirani prema unutarnjoj jezgri aktivne vezne šupljine, dok je imidazo[4,5-*b*]piridinska jezgra uklještena između polarnih ostataka Glu451, Asn484, Asn502, Tyr504 i Tyr508.



Slika 23. Vezivanje derivata na aktivnom mjestu β -glukuronidaze.

Antioksidativna aktivnosti ispitana je i na seriji akrilonitrila, FRAP, DPPH i ABTS metodom. Sinteza akrilonitrila dobivenih iz *N*-supstituiranog imidazo[4,5-*b*]piridina prikazana je na shemi 17. Sinteza započinje reakcijom 2-klor-3-nitropiridina s metilaminom u suvišku. Reakcija se provodi u acetonitrilu i potpomognuta je mikrovalnim zračenjem. Zatim slijedi redukcija kako bi se dobili diamino supstituirani prekursori. Glavni prekursori, *N*-supstituirani 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridini, pripremljeni su u reakciji termičke ciklokondenzacije s etil-cijanoacetatom pri 185 °C, a posljednji korak sinteze uključuje kondenzaciju aromatskih benzaldehida s priređenim cijanometilima u apsolutnom etanolu uz nekoliko kapi piperidina.

Ispitani derivati pokazali su obećavajući antioksidativni potencijal prema rezultatima dobivenim FRAP metodom, dok su u testovima uklanjanja radikala samo tri spoja pokazala određenu aktivnost. Najveću aktivnost uklanjanja radikala pokazao je derivat **83** s *N*-fenilnom jezgrom na N atomu imidazo[4,5-*b*]piridinske jezgre i nesupstituiranim fenilnim prstenom. FRAP metodom dokazano je da svi ispitani spojevi pokazuju poboljšanu aktivnost u usporedbi sa standardnim antioksidansom BHT-om. Izuzetak je spoj **89**, čija je aktivnost slična BHT-u. Kao najaktivniji identificiran je spoj **92** s *N,N*-dimetilamino skupinom u *para* položaju fenilnog prstena i s *N*-izobutilnim supstituentom na N atomu imidazo[4,5-*b*]piridinske jezgre.



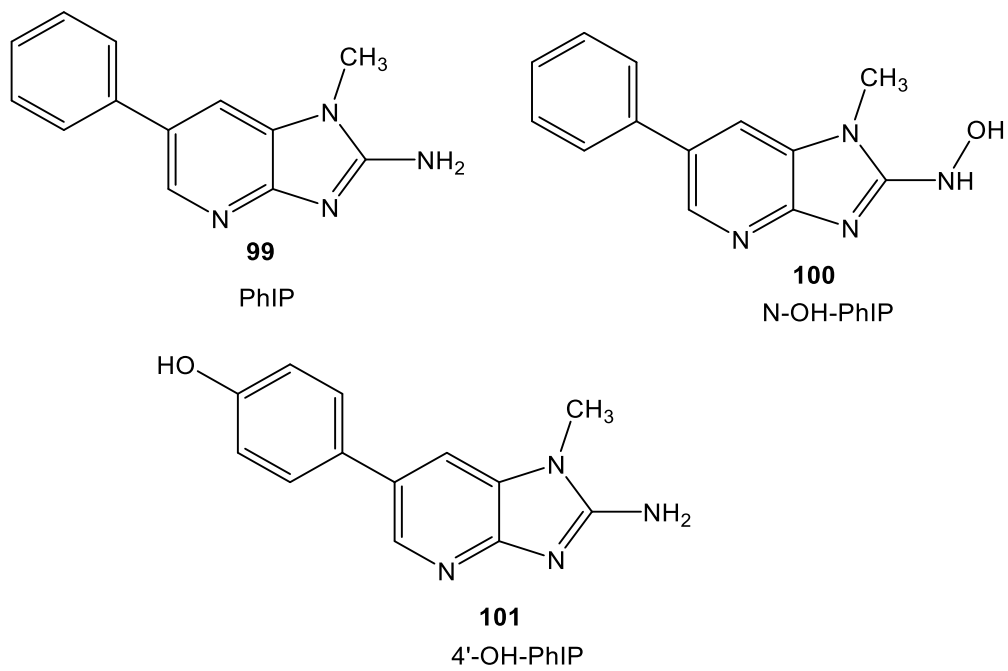
Shema 17. Sinteza akrilonitrilnih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina

Svi derivati s *N,N*-dietilamino skupinom na fenilnom prstenu **88**, **94**, **96** i **98** pokazali su značajnu aktivnost u odnosu na referentni BHT. Također je provedena voltometrija kvadratnih valova za procjenu antioksidativnog djelovanja na temelju vrijednosti njihovog elektrokemijskog oksidacijskog potencijala. *N*-supstitucija imidazo[4,5-*b*]piridinskog prstena, kao u derivatima **88**, **94** i **96**, pomaknula je oksidacijski potencijal prema pozitivnijim vrijednostima, oko +0,250 V u odnosu na oksidacijski potencijal **98** (što znači da se ti spojevi teže oksidiraju). Zamjena *p*-*N,N*-(CH₂CH₃)₂ s *p*-*N,N*-(CH₃)₂ grupom, imala je zanemariv učinak na oksidacijski potencijal. Metoksi skupina na fenilnoj jezgri (**85**, **86**, **91** i **92**), pomaknula je oksidacijske potencijale na visoke pozitivne vrijednosti, pozitivnije od + 1,2 V. Uspoređujući oksidacijske potencijale s FRAP aktivnošću, spojevi s nižim oksidacijskim potencijalima, bili su učinkovitiji u redukciji Fe³⁺.

Dobra linearna korelacija između FRAP aktivnosti i elektrooksidacijskih potencijala, ukazuje da su učinci uklanjanja radikala proučavanih spojeva povezani s njihovim elektrokemijskim ponašanjem.⁷⁷

Griggs i suradnici istražili su neurotoksične učinke 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-*b*]piridina (PhIP, slika 24). To je heterociklički amin koji se u velikoj količini izolira iz kuhanog mesa i ribe. Ispitana je toksičnost PhIP-a i dva glavna metabolita faze I, N-OH-PhIP i 4-OH-PhIP, koristeći primarne mezencefalne kulture iz embrija štakora. Utvrđeno je da je izloženost PhIP-u ili N-OH-PhIP selektivno toksična za dopaminergičke neurone u primarnim kulturama, što rezultira smanjenim postotkom dopaminergičkih neurona. PhIP tretman također je povećao stvaranje markera oksidativnog oštećenja, 4-hidroksi-2-nonenala (HNE) i 3-nitrotirozina u dopaminergičkim neuronima. Liječenje ekstraktom borovnice, prehrambenim čimbenikom s poznatim antioksidansima i drugim zaštitnim mehanizmima, spriječilo je toksičnost uzrokovanu PhIP-om. Autori po prvi put, sugeriraju da je PhIP selektivno toksičan za dopaminergičke neurone kroz izazivanje oksidativnog stresa. Etiologija Parkinsonove bolesti nije u potpunosti shvaćena, ali je povezana s brojnim raznolikim čimbenicima, uključujući genetiku i izloženost okoliša pesticidima, otapalima i raznim teškim metalima, ali niti jedan nije definitivno impliciran kao glavni uzrok bolesti.⁷⁸

Međutim, mnogi podaci upućuju na to da su nigralni dopaminski neuroni selektivno osjetljivi na razne povrede, dijelom zbog anatomskih značajki povezanih s dugim, slabo mijeliniziranim procesima, razlikama u signalizaciji stanica povezanih sa selektivnom ekspresijom specifičnih kalcijevih kanala i visokim oksidativnim stresom uzrokovano proizvodnjom i metabolizmom dopamina.⁷⁹ Prehrana bogata zasićenim i životinjskim mastima povezana je s povećanim rizikom za razvoj Parkinsonove bolesti. Priprema mesa koja uključuje kuhanje na visokim temperaturama može proizvesti nekoliko otrovnih spojeva, koje uključuju i heterocikličke amine.



Slika 24. Strukture heterocikličkih amina

3. Eksperimentalni dio

3.1. Opće napomene

^1H i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na spektrometrima Bruker AV300, Bruker AV600 i Bruker Avance III HD 400 MHz/54 mm Ascend. ^1H NMR spektri snimani su pri 300, 400 i 600 MHz, dok su ^{13}C NMR spektri snimani pri 75 i 150 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.

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

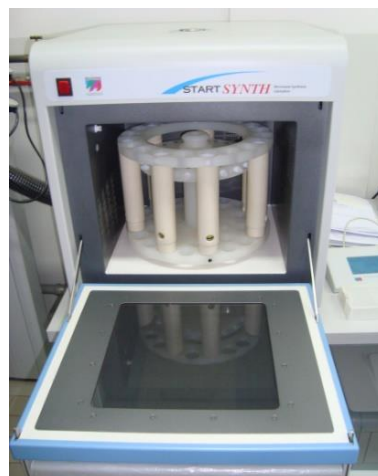
Reakcije potpomognute mikrovalnim zračenjem provedene su u Milestone Start Synth mikrovalnom reaktoru u pyrex i kvarcnim posudama (40 bar).

UV/Vis spektri snimljeni su na Varian Cary 50 spektrofotometru te su korištene kvarcne kivete promjera 0,5 cm te volumena 3 cm^3 .

Sinteza akrilonitrilnih derivata provedena je u reaktoru za paralelnu sintezu Radleys Carousel 12 Plus.

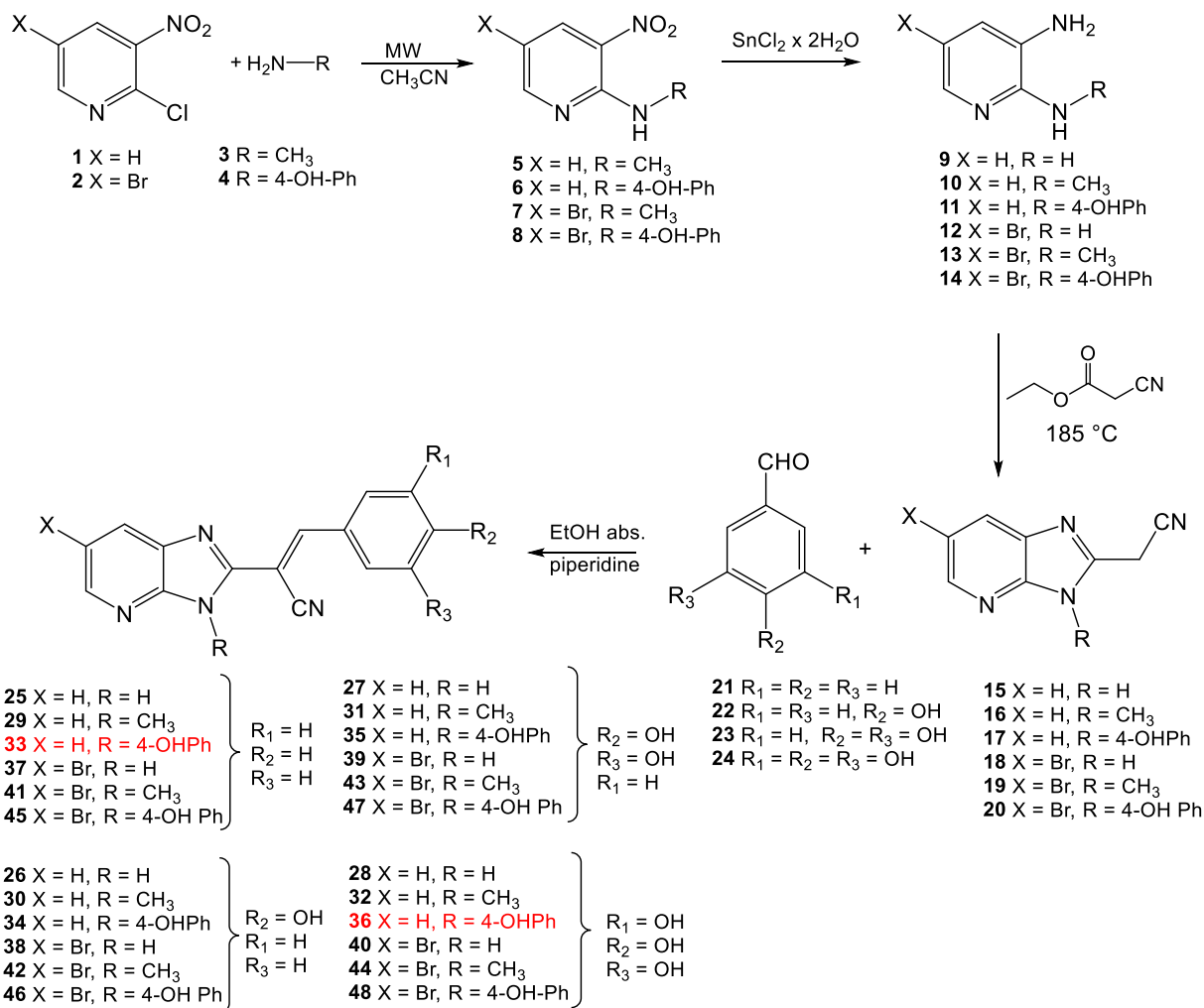
Kromatografska odjeljivanja provedena su na kolonama punjenim silikagelom 0,063–0,2 nm (Kemika, Merck).

Svi spojevi provjeravani su tankoslojnom kromatografijom (TLC) prilikom čega su upotrebene pločice presvučene silikagelom Merck 60F-254, a detektirani su pod UV svjetlom (254 i 366 nm).



Slika 25. Mikrovalni reaktor (slika lijevo) i reaktor za paralelnu sintezu (slika desno)

3.2. Sinteza akrilonitrilnih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina



Shema 18. Sinteza akrilonitrilnih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina

3.2.1. Priprava *N*-metil-3-nitropiridin-2-amina **5**

U kvarcnu kivetu odvaži se 0,500 g (3,15 mmol) 2-klor-3-nitropiridina **1**, doda 10 mL acetonitrila i 1,96 mL (15,75 mmol) metilamina **3**. Reakcija se provodi potpomognuta mikrovalnim zračenjem (800 W) tijekom 2 h na temperaturi 170 °C. Nakon dva sata, otapalo se ukloni destilacijom pod sniženim tlakom te se reakcijska smjesa pročisti kolonskom kromatografijom na silikagelu uz CH₂Cl₂ kao eluens. Dobiveno je 1,510 g (78,2 %) žutog kristaliničnog produkta *N*-metil-3-nitropiridin-2-amina **5**. $T_t = 70-71$ °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 8,50$ (dd, 1H, $J_1 = 4,44$ Hz, $J_2 = 1,74$ Hz, H_{arom.}), 8,47 (s, 1H, NH), 8,41 (dd, $J_1 = 8,34$, $J_2 = 1,74$ Hz, H_{arom.}), 6,75 (dd, 1H, $J_1 = 8,25$, $J_2 = 4,44$ Hz, H_{arom.}), 3,04 (d, 3H, $J = 4,74$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 156,05$, 152,41, 135,09, 127,58 111,48, 28,23.

3.2.2. Priprava 4-((3-nitropiridin-2-il)amino)fenola **6**

U okruglu tikvicu odvaži se 1,630 g (10,00 mmol) 2-klor-3-nitropiridina **1**, doda 10 mL dimetilformamida i 3,340 g (30,00 mmol) 4-aminofenola **4**. Reakcija se zagrijava 40 minuta na temperaturi 100 °C. Nakon hlađenja reakcijska smjesa prenese se u 150 mL destilirane vode te se nastali talog profiltrira. Dobiveno je 1,750 g (74,0 %) narančastog kristaliničnog produkta 4-((3-nitropiridin-2-il)amino)fenola **6**. $T_t = 144-145$ °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 9,83$ (s, 1H, OH), 9,36 (s, 1H, NH), 8,50 (dd, 1H $J_1 = 8,31$, $J_2 = 1,74$ Hz, H_{arom.}), 8,44 (dd, 1H, $J_1 = 4,41$, $J_2 = 1,74$ Hz, H_{arom.}), 7,37-7,34 (m, 2H, H_{arom.}), 6,89 (dd, 1H $J = 8,34$, $J_2 = 4,44$ Hz, H_{arom.}), 6,78-6,75 (m, 2H, H_{arom.}); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 155,94$, 155,04, 150,71, 135,97, 129,96, 128,47, 125,71, 115,56, 114,06.

3.2.3. Priprava 5-brom-*N*-metil-3-nitropiridin-2-amina **7**

U okrugloj tikvici otopi se 3,000 g (12,63 mmol) 5-brom-2-klor-3-nitropiridina **2**, u 120 mL etanola. Reakcija se ohladi u ledenoj kuplji na 0 °C te se u nju doda 4,72 mL (37,90 mmol) metilamina **3**. Reakcija se provodi tijekom 1 h, a kraj reakcije odredi se na temelju TLC kromatografije. Dobiveno je 2,581 g žutog kristaliničnog produkta **7** (88,3 %). $T_t = 150-152$ °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 8,59$ (d, 1H, $J = 2,34$ Hz, H_{arom.}), 8,56 (d, 1H, $J = 3,90$ Hz, H_{arom.}), 8,54 (d, 1H, $J = 2,34$ Hz, NH), 3,02 (d, 3H $J = 4,74$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 155,60$, 150,52, 135,77 127,36, 102,48, 27,85. $T_t = 150-152$ °C.

3.2.4. Priprava 4-((5-brom-3-nitropiridin-2-il)amino)fenola **8**

U okrugloj tikvici otopi se 2,000 g (8,42 mmol) 5-brom-2-klor-3-nitropiridina **2** u 80 mL etanola. Reakcija se ohladi u ledenoj kuplji na 0 °C te se u nju doda 2,76 g (25,27 mmol) 4-aminofenola **4**.

Nakon 4 h miješanja na sobnoj temperaturi, reakcijska smjesa se profiltrira te se nastali talog pročisti kolonskom kromatografijom na silikagelu uz $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ kao eluens. Dobiveno je 1,440 g tamnoljubičastog kristaliničnog produkta **8** (55,2 %). $T_t = 186\text{-}188\text{ }^\circ\text{C}$. ^1H NMR (600 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 9,83$ (s, 1H, OH), 9,40 (s, 1H, NH), 8,63 (d, 1H, $J = 2,34$ Hz, H_{arom}), 8,53 (d, 1H, $J = 2,34$ Hz, H_{arom}), 7,32 – 7,30 (m, 2H, H_{arom}), 6,77 – 6,75 (m, 2H, H_{arom}); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 156,06, 155,34, 149,55, 137,21, 129,57, 128,93, 126,03, 115, 60, 105,54$.

3.2.5. Priprava N^2 -2,3-diamino-metilpiridina **10**

U okruglu tikvicu odvaže se 1,005 g (6,57 mmol) spoja **5** te se doda 20 mL metanola. 5,930 g (26,28 mmol) $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ otopi se u 20 mL HCl te doda u reakcijsku smjesu. Reakcija se zagrijava 30 minuta u uljnoj kupelji uz refluks. Otapalo se ukloni destilacijom pod sniženim tlakom, te se reakcijskoj smjesi doda 20 mL destilirane vode te se zaluži do pH 14 s 20 % NaOH. Zatim se smjesa filtrira, a filtrat ekstrahira s tri obroka od 50 mL etil-acetata. Dobiveno je 0,707 g tamnoljubičastog uljastog produkta **10** (87,4 %). ^1H NMR (600 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 7,38$ (dd, 1H, $J_1 = 4,95, J_2 = 1,50$ Hz, H_{arom}), 6,65 (dd, 1H, $J_1 = 7,35, J_2 = 1,50$ Hz, H_{arom}), 6,32 (dd, 1H, $J_1 = 7,32, J_2 = 4,98$ Hz, H_{arom}), 5,54 (d, 1H, $J = 4,20$ Hz, NH), 4,59 (s, 2H, NH_2), 2,81 (d, 3H, $J = 4,74$ Hz, CH_3); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 148,58, 134,97, 130,25, 117,04, 111,99, 28,10$.

3.2.6. Priprava 4-((3-aminopiridin-2-il)amino)fenola **11**

U okruglu tikvicu odvaže se 1,000 g (4,33 mmol) spoja **6** te se doda 20 mL metanola. 3,908 g (17,32 mmol) $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ otopi se u 20 mL HCl te doda u reakcijsku smjesu. Reakcija se zagrijava 30 minuta u uljnoj kupelji uz refluks. Otapalo se ukloni destilacijom pod sniženim tlakom, te se reakcijskoj smjesi doda 20 mL destilirane vode te se zaluži do pH 14 s 20 % NaOH. Zatim se smjesa profiltrira, a filtrat ekstrahira s tri obroka od 50 mL etil-acetata. Dobiveno je 0,718 g smeđeg kristaliničnog produkta **11** (82,5 %). $T_t = 222\text{-}226\text{ }^\circ\text{C}$. ^1H NMR (600 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 8,86$ (s, 1H, OH), 7,41 – 7,39 (m, 2H, H_{arom}), 7,39 – 7,37 (m, 2H, H_{arom}), 6,82 (dd, 1H, $J_1 = 7,47, J_2 = 1,62$ Hz, NH), 6,71 – 6,63 (m, 2H, H_{arom}), 6,51 (dd, 1H, $J_1 = 7,50, J_2 = 4,86$ Hz, H_{arom}), 4,94 (s, 2H, NH_2); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 151,84, 145,18, 134,85, 134,27, 131,42, 121,15, 119,36, 115,31, 114,90$.

3.2.7. Priprava 5-brom- N^2 -2,3-diamino-metilpiridina **13**

U okruglu tikvicu odvaže se 1,000 g (4,31 mmol) spoja **7** te se doda 25 mL etanola i 3,900 g (17,24 mmol) $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$.

Reakcija se zagrijava 30 minuta u uljnoj kupelji uz refluks. Otapalo se ukloni destilacijom pod sniženim tlakom, doda se voda te se zaluži s 20 % NaOH do pH = 14. Provede se ekstrakcija s tri obroka od 50 mL etil-acetata.

Dobiveno je 0,752 g crvenog uljastog produkta **13** (86,4 %). $T_f = 107-110\text{ }^\circ\text{C}$. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 7,39$ (d, 1H, $J = 2,16\text{ Hz}$, H_{arom}), 6,78 (d, 1H, $J = 2,16\text{ Hz}$, H_{arom}), 5,82 (d, 1H, $J = 4,38\text{ Hz}$, NH), 4,98 (s, 2H, NH_2), 2,80 (d, 3H, $J = 4,68\text{ Hz}$, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 147,79, 134,44, 132,76, 118,52, 106,42, 28,58$.

3.2.8. Priprava 4-((3-amino-5-brompiridin-2-il)amino)fenola **14**

U okruglu tikvicu odvaži se 1,440 g (4,64 mmol) spoja **8** te se doda 25 mL etanola i 4,188 g (18,56 mmol) $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$. Reakcija se zagrijava 30 minuta u uljnoj kupelji uz refluks. Otapalo se ukloni destilacijom pod sniženim tlakom, doda se voda te se zaluži s 20 % NaOH do pH = 14. Provede se ekstrakcija u tri obroka s 50 mL etil-acetata. Dobiveno je 1,190 g bež praškastog produkta **14** (91,5 %). $T_f = 138-140\text{ }^\circ\text{C}$. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 8,94$ (s, 1H, OH), 7,55 (s, 1H, NH), 7,41 (d, 1H, $J = 2,16\text{ Hz}$, H_{arom}), 7,38 – 7,32 (m, 2H, H_{arom}), 6,95 (d, 1H, $J = 2,22\text{ Hz}$, H_{arom}), 6,70 – 6,64 (m, 2H, H_{arom}), 5,31 (s, 2H, NH_2); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 152,35, 143,97, 133,88, 133,47, 133,46, 121,62, 120,22, 115,39, 108,45$.

3.2.9. Opći postupak priprave 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina

Uljna kupelj zagrije se na $190\text{ }^\circ\text{C}$. U okruglu tikvicu odvaži se početni spojevi **9-14** te se doda etil cijanoacetat. Reakcija se provodi 30 minuta, a tijekom reakcije prati se UV/Vis spektroskopijom. Reakcijska smjesa ohladi se i doda joj se dietil-eter. Nastali produkt se profiltrira, te po potrebi, prekrizalizira.

3.2.9.1. Priprava 2-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)acetonitrila **15**

U okruglu tikvicu odvaži se 1,000 g (9,16 mmol) 2,3-diaminopiridina i doda 1,46 mL (13,71 mmol) etil cijanoacetata. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Dobiveno je 1,45 g (95,9 %) tamno smeđeg praškastog produkta **15**. $T_f = 268-271\text{ }^\circ\text{C}$. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 13,04$ (šs, 1H, NH), 8,32 (šs, 1H, H_{arom}), 8,01 (šs, 1H, H_{arom}), 7,24 (dd, 1H, $J = 8,00, 4,80\text{ Hz}$, H_{arom}), 4,44 (s, 2H, CH_2); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 143,73, 118,00, 116,17, 18,73$.

3.2.9.2. Priprava 2-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)acetonitrila 16

U okruglu tikvicu odvaže se 0,700 g (5,68 mmol) spoja **10** i doda 0,91 mL (8,53 mmol) etil cijanoacetata. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Dobiveno je 0,540 g (55,2 %) smeđeg kristaliničnog produkta **16**. $T_f = 148-150\text{ }^\circ\text{C}$. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 8,34$ (dd, 1H, $J_1 = 4,71$, $J_2 = 1,14$ Hz, H_{arom}), 8,05 (dd, 1H, $J_1 = 7,92$, $J_2 = 1,20$ Hz, H_{arom}), 7,28 (dd, 1H, $J_1 = 7,95$, $J_2 = 4,74$ Hz, H_{arom}), 4,58 (s, 2H, CH_2), 3,75 (s, 3H, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 148,10$, 147,50, 143,53, 133,81, 126,66, 118,25, 115,84, 28,23, 17,95.

3.2.9.3. Priprava 2-(3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)acetonitrila 17

U okruglu tikvicu odvaže se 0,702 g (3,50 mmol) spoja **11** i doda 0,56 mL (5,20 mmol) etil cijanoacetata. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Dobiveno je 0,328 g (65,9 %) smeđeg praškastog produkta **17**. $T_f = 290-293\text{ }^\circ\text{C}$. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 9,97$ (s, 1H, OH), 8,30 (dd, 1H, $J_1 = 4,74$, $J_2 = 1,32$ Hz, H_{arom}), 8,16 (dd, 1H, $J_1 = 8,01$, $J_2 = 1,32$ Hz, H_{arom}), 7,36 – 7,33 (m, 3H, H_{arom}), 6,97 – 6,94 (m, 2H, H_{arom}), 4,35 (s, 2H, CH_2); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 158,59$, 149,40, 147,72, 144,68, 134,16, 129,38, 127,48, 124,79, 119,37, 116,50, 116,26, 19,15.

3.2.9.4. Priprava 2-(6-brom-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)acetonitrila 18

U okruglu tikvicu odvaže se 1,000 g (5,32 mmol) spoja **12** i doda 0,85 mL (7,98 mmol) etil cijanoacetata. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Dobiveno je 0,660 g (52,4 %) narančastog praškastog produkta **18**. $T_f = 255\text{ }^\circ\text{C}$. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 13,29$ (šs, 1H, , NH), 8,42 (s, 1H, H_{arom}), 8,30 (s, 1H, H_{arom}), 4,47 (s, 2H, CH_2); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO) $\delta/\text{ppm} = 143,53$, 115,40, 112,36, 18,26.

3.2.9.5. Priprava 2-(6-brom-3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)acetonitrila 19

U okruglu tikvicu odvaže se 0,737 g (3,65 mmol) spoja **13** i doda 0,58 mL (5,47 mmol) etil cijanoacetata. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Dobiveno je 0,644 g (70,8 %) tamnosmeđeg praškastog produkta **19**. $T_f = 165-170\text{ }^\circ\text{C}$. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 8,46$ (d, 1H, $J = 2,04$ Hz, H_{arom}), 8,39 (d, 1H, $J = 2,04$ Hz, H_{arom}), 4,63 (s, 2H, CH_2), 3,75 (s, 3H, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 149,90$, 147,45, 144,33, 135,53, 129,30, 118,56, 116,14, 113,53, 29,00, 18,63.

3.2.9.6. Priprava 2-(6-brom-3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)acetonitrila **20**

U okruglu tikvicu odvažuje se 1,180 g (4,19 mmol) spoja **14** i doda 0,67 mL (6,29 mmol) etil cijanoacetata. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Dobiveno je 0,644 g (49,0 %) crnog praškastog produkta **20**. $T_f = 229$ °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 10,00$ (s, 1H, OH), 8,48 (d, 1H, $J = 2,10$ Hz, H_{arom}), 8,40 (d, 1H, $J = 2,04$ Hz, H_{arom}), 7,36 – 7,34 (m, 2H, H_{arom}), 6,96 – 6,94 (m, 2H, H_{arom}), 4,37 (s, 2H, CH_2).

3.2.10. Opći postupak priprave akrilonitrilnih derivata

U kivete reaktora za paralelnu sintezu odvažuje se 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridini **15-20** pripremljeni u prethodnom koraku i odgovarajući aldehidi **21-24** te se doda odgovarajući volumen apsolutnog etanola i kap piperidina. Reakcija se zagrijava 2 h u reaktoru za paralelnu sintezu, uz refluks. Nakon hlađenja nastali talog se profiltrira, te po potrebi prekrystalizira.

3.2.10.1. Priprava (*E*)-2-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-fenilakrilonitrila **25**

U kivetu se odvažuje 0,100 g (0,63 mmol) 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **15** i doda 0,064 mL benzaldehida. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Nastali talog pročisti se kolonskom kromatografijom na silikagelu uz CH_2Cl_2 kao eluens. Dobiveno je 0,074 g (47,2 %) žutog praškastog produkta **25**. $T_f = 281-283$ °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 13,56$ (šs, 1H, , NH), 8,44 – 8,39 (m, 2H, H_{arom}), 8,17 – 7,92 (m, 3H, H_{arom}), 7,62 (dd, 3H, $J_1 = 4,96$, $J_2 = 1,36$ Hz, H_{arom}), 7,31 (dd, 1H, $J_1 = 8,00$, $J_2 = 4,76$ Hz, H_{arom}); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) $\delta/\text{ppm} = 147,28$, 145,37, 133,01, 132,51, 130,19, 129,85, 119,09, 116,32.

3.2.10.2. Priprava (*E*)-2-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(4-hidroksifenil)akrilonitrila **26**

U kivetu se odvažuje 0,100 g (0,63 mmol) 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **15** i doda 0,077 g 4-hidroksibenzaldehida. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Dobiveno je 0,115 g (69,3 %) smeđeg praškastog produkta **26**. $T_f = > 300$ °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO) $\delta/\text{ppm} = 13,43$ (šs, 1H, NH), 10,67 (šs, 1H, OH), 8,37 (dd, 1H, $J_1 = 4,92$, $J_2 = 1,24$ Hz, H_{arom}), 8,30 (s, 1H, CH), 8,03 (d, 1H, $J = 7,60$ Hz, H_{arom}), 7,93 (d, 2H, $J = 8,76$ Hz, H_{arom}), 7,27 (dd, 1H, $J_1 = 8,00$, $J_2 = 4,76$ Hz, H_{arom}), 7,01 – 6,96 (m, 2H, H_{arom}); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) $\delta/\text{ppm} = 161,46$, 146,69, 132,39, 123,62, 118,39, 116,57, 116,34.

3.2.10.3. Priprava (*E*)-2-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4-dihidroksifenil)akrilonitrila 27

U kivetu se odvažuje 0,100 g (0,63 mmol) 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **15** i dodaje 0,087 g 3,4-dihidroksibenzaldehida. Reakcija se provodi prema općem postupku pripreme. Dobiveno je 0,112 g (63,6 %) smeđeg praškastog produkta **27**. $T_f = >250$ °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO) $\delta/\text{ppm} = 8,36$ (dd, 1H, $J_1 = 4,76$, $J_2 = 1,32$ Hz, H_{arom}), 8,20 (s, 1H, CH), 8,02 (d, 1H, $J = 7,40$ Hz, H_{arom}), 7,61 (d, 1H, $J = 2,16$ Hz, H_{arom}), 7,34 (dd, 1H, $J_1 = 8,38$, $J_2 = 2,12$ Hz, H_{arom}), 7,27 (dd, 1H, $J = 8,00$, $J_2 = 4,80$ Hz, H_{arom}), 6,93 (d, 1H, $J = 8,28$, H_{arom}); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) $\delta/\text{ppm} = 150,68$, 150,16, 146,94, 145,82, 144,24, 124,60, 123,91, 118,33, 116,59, 116,08, 115,81, 96,76.

3.2.10.4. Priprava (*E*)-2-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4,5-trihidroksifenil)akrilonitril 28

U kivetu se odvažuje 0,100 g (0,63 mmol) 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **15** i dodaje 0,0970 g 3,4,5-trihidroksibenzaldehida. Reakcija se provodi prema općem postupku pripreme. Dobiveno je 0,164 g (88,2 %) smeđeg praškastog produkta **28**. $T_f = >300$ °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO) $\delta/\text{ppm} = 9,62$ (šs, 2H, OH), 8,35 (dd, 1H, $J_1 = 4,88$, $J_2 = 1,16$ Hz, H_{arom}), 8,10 (s, 1H, CH), 8,01 (d, 1H, $J = 7,64$ Hz, H_{arom}), 7,26 (dd, 2H, $J_1 = 7,98$, $J_2 = 4,76$ Hz, H_{arom}), 7,10 (s, 1H, CH); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) $\delta/\text{ppm} = 150,44$, 147,17, 146,13, 144,10, 139,99, 122,18, 118,24, 116,71, 109,70, 96,01.

3.2.10.5. Priprava (*E*)-2-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-fenilakrilonitrila 29

U kivetu se odvažuje 0,100 g (0,58 mmol) 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **16** i dodaje 0,060 mL benzaldehida. Reakcija se provodi prema općem postupku pripreme. Dodatno se spoj pročisti kolonskom kromatografijom na silikagelu uz CH_2Cl_2 kao eluens. Dobiveno je 0,125 g (82,9 %) žutih kristala **29**. $T_f = 143-145$ °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 8,46$ (dd, 1H, $J_1 = 4,72$, $J_2 = 1,32$ Hz, H_{arom}), 8,31 (s, 1H, CH), 8,16 (dd, 1H, $J_1 = 8,02$, $J_2 = 1,32$ Hz, H_{arom}), 8,07 (dd, 2H, $J_1 = 6,54$, $J_2 = 2,12$ Hz, H_{arom}), 7,67 – 7,57 (m, 3H, H_{arom}), 7,38 (dd, 1H, $J = 8,00$, 4,72 Hz, H_{arom}), 4,07 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 151,18$, 148,94, 148,90, 145,17, 134,54, 133,12, 132,60, 130,34, 129,70, 127,70, 119,60, 116,92, 101,35, 30,67.

3.2.10.6. Priprava (*E*)-3-(4-hidroksifenil)-2-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitrila 30

U kivetu se odvažuje 0,100 g (0,58 mmol) 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **16** i dodaje 0,071 g 4-hidroksibenzaldehida. Reakcija se provodi prema općem postupku pripreme.

Dobiveno je 0,113 g (70,6 %) svijetlo zelenog praškastog produkta **30**. $T_t = 262\text{ }^\circ\text{C}$. ^1H NMR (400 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 10,59$ (šs, 1H, OH), 8,42 (dd, 1H, $J_1 = 4,72$, $J_2 = 1,36$ Hz, H_{arom}), 8,15 (s, 1H, CH), 8,11 (dd, 1H, $J_1 = 7,98$, $J_2 = 1,36$ Hz, H_{arom}), 8,01 (d, 2H, $J = 8,80$ Hz, H_{arom}), 7,35 (dd, 1H, $J_1 = 7,98$, $J_2 = 4,72$ Hz, H_{arom}), 6,98 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, H_{arom}), 4,03 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 161,57$, 150,60, 149,20, 148,43, 144,16, 134,11, 132,60, 126,77, 123,73, 118,89, 117,19, 116,8, 99,50, 95,48, 30,08.

3.2.10.7. Priprava (*E*)-3-(3, 4-dihidroksifenil)-2-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitrila **31**

U kivetu se odvaže 0,100 g (0,58 mmol) 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **16** i doda 0,080 g 3,4-dihidroksibenzaldehida. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Dobiveno je 0,124 g (73,1 %) tamno zelenog praškastog produkta **31**. $T_t = 263\text{-}265\text{ }^\circ\text{C}$. ^1H NMR (400 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 9,88$ (šs, 1H, OH), 8,42 (dd, 1H, $J_1 = 4,74$, $J_2 = 1,44$ Hz, H_{arom}), 8,11 (dd, 1H, $J_1 = 8,00$, $J_2 = 1,44$ Hz, H_{arom}), 8,05 (s, 1H, CH), 7,68 (d, 1H, $J = 2,20$ Hz, H_{arom}), 7,41 (dd, 1H, $J_1 = 8,50$, $J_2 = 2,20$ Hz, H_{arom}), 7,35 (dd, 1H, $J_1 = 8,00$, $J_2 = 4,76$ Hz, H_{arom}), 6,93 (d, 1H, $J = 8,38$ Hz, H_{arom}), 4,02 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR, (151 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 150,93$, 150,69, 149,39, 148,45, 145,71, 144,07, 134,12, 126,70, 125,02, 124,07, 118,84, 117,19, 115,90, 115,84, 94,83, 30,07.

3.2.10.8. Priprava (*E*)-3-(3,4,5-trihidroksifenil)-2-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitrila **32**

U kivetu se odvaže 0,100 g (0,58 mmol) 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **16** i doda 0,090 g 3,4,5-trihidroksibenzaldehida. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Dobiveno je 0,120 g (67,2 %) tamno zelenog praškastog produkta **32**. $T_t = 265\text{ }^\circ\text{C}$. ^1H NMR (400 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 9,44$ (šs, 2H, OH), 8,41 (dd, 1H, $J_1 = 4,74$, $J_2 = 1,40$ Hz, H_{arom}), 8,10 (dd, 1H, $J_1 = 8,02$, $J_2 = 1,40$ Hz, H_{arom}), 7,93 (s, 1H, CH), 7,35 (dd, 1H, $J_1 = 8,00$, $J_2 = 4,76$ Hz, H_{arom}), 7,15 (s, 2H, H_{arom}), 4,01 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 151,31$, 146,01, 144,02, 139,17, 126,65, 122,75, 118,82, 117,92, 109,95, 99,50, 99,48, 94,63, 30,06.

3.2.10.9. Pokušaj priprave (*E*)-2-(3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-fenilakrilonitrila **33**

U kivetu se odvaže 0,060 g (0,24 mmol) 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **17** i doda 0,024 mL benzaldehida. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Produkt nije izoliran.

3.2.10.10. Priprava (*E*)-3-(4-hidroksifenil)-2-(3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitrila 34

U kivetu se odvaže 0,060 g (0,24 mmol) 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **17** i doda 0,029 g 4-hidroksibenzaldehida. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Dobiveno je 0,057 g (42,8 %) smeđeg praškastog produkta **34**. $T_f = 223-227\text{ }^\circ\text{C}$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 8,29$ (dd, 1H, $J_1 = 4,72\text{ Hz}$, $J_2 = 1,32\text{ Hz}$, H_{arom}), 8,14 (dd, 1H, $J_1 = 8,00\text{ Hz}$, $J_2 = 1,36\text{ Hz}$, H_{arom}), 7,77 (s, 1H, CH), 7,69 (d, 2H, $J = 8,80\text{ Hz}$, H_{arom}), 7,36 (dd, 1H, $J_1 = 8,12\text{ Hz}$, $J_2 = 4,76\text{ Hz}$, H_{arom}) 7,31 (d, 2H, $J = 8,76\text{ Hz}$, H_{arom}), 6,95 (d, 2H, $J = 8,72\text{ Hz}$, H_{arom}), 6,73 (d, 2H, $J = 8,68\text{ Hz}$, H_{arom}); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO) $\delta/\text{ppm} = 158,67$, 150,84, 150,07, 149,94, 144,68, 134,64, 133,32, 129,88, 127,06, 125,91, 121,74, 119,74, 117,73, 117,25, 116,52.

3.2.10.11. Priprava (*E*)-3-(3,4-dihidroksifenil)-2-(3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitrila 35

U kivetu se odvaže 0,060 g (0,24 mmol) 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **17** i doda 0,033 g 3,4-dihidroksibenzaldehida. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Dobiveno je 0,053 g (37,9 %) narančastog praškastog produkta **35**. $T_f = 257-259\text{ }^\circ\text{C}$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 8,23$ (dd, 1H, $J_1 = 4,72\text{ Hz}$, $J_2 = 1,32\text{ Hz}$, H_{arom}), 8,07 (dd, 1H, $J_1 = 7,96\text{ Hz}$, $J_2 = 1,32\text{ Hz}$, H_{arom}), 7,56 (s, 1H, CH), 7,40 (d, 1H, $J = 2,24\text{ Hz}$, H_{arom}), 7,32 (dd, 1H, $J_1 = 8,08\text{ Hz}$, $J_2 = 4,56\text{ Hz}$, H_{arom}) 7,30 (d, 1H, $J = 8,72\text{ Hz}$, H_{arom}), 6,98-6,93 (m, 3H, H_{arom}), 6,47 (d, 2H, $J = 8,40\text{ Hz}$, H_{arom}); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO) $\delta/\text{ppm} = 158,51$, 151,15, 150,69, 150,14, 147,72, 143,98, 134,82, 129,90, 129,01, 126,42, 126,27, 119,48, 118,16, 116,48, 116,04, 111,95.

3.2.10.12. Pokušaj priprava (*Z*)-2-(3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4,5-trihidroksifenil)akrilonitrila 36

U kivetu se odvaže 0,060 g (0,24 mmol) 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **17** i doda 0,037 g 3,4,5-trihidroksibenzaldehida. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Produkt nije izoliran.

3.2.10.13. Priprava (*E*)-2-(6-brom-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-fenilakrilonitrila 37

U kivetu se odvaže 0,100 g (0,42 mmol) 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **18** i doda 0,043 mL benzaldehida. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Dobiveno je 0,063 g (46,0 %) žutog praškastog produkta **37**. $T_f = 289-291\text{ }^\circ\text{C}$.

^1H NMR (600 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 13,87$ (šs, 1H, NH), 8,49 (d, 1H, $J = 1,80$ Hz, H_{arom}), 8,46 (s, 1H, H_{arom}), 8,37 (s, 1H, CH), 8,01 (dd, 2H, $J_1 = 6,42$, $J_2 = 1,74$ Hz, 2H), 7,65 – 7,60 (m, 3H, H_{arom}); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 150,98$, 148,16, 145,74, 132,88, 132,74, 130,31, 129,89, 116,15.

3.2.10.14. Priprava (*E*)-2-(6-brom-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(4-hidroksifenil)akrilonitrila 38

U kivetu se odvaže 0,100 g (0,42 mmol) 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **18** i doda 0,050 g 4-hidroksibenzaldehida. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Dobiveno je 0,081 g (55,9 %) svijetlo narančastog praškastog produkta **38**. $T_{\text{t}} = >300$ °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 13,68$ (s, 1H, NH), 10,64 (s, 1H, OH), 8,44 (d, 1H, $J = 1,68$ Hz, H_{arom}), 8,31 (s, 1H, H_{arom}), 8,30 (s, 1H, CH), 7,93 (d, 2H, $J = 8,64$ Hz, H_{arom}), 6,99 (d, 2H, $J = 8,76$ Hz, H_{arom}); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 162,19$, 151,89, 148,00, 145,14, 133,01, 124,03, 116,93, 116,89, 113,77, 97,40.

3.2.10.15. Priprava (*E*)-2-(6-brom-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4-dihidroksifenil)akrilonitrila 39

U kivetu se odvaže 0,100 g (0,42 mmol) 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **18** i doda 0,058 g 3,4-dihidroksibenzaldehida. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Dobiveno je 0,089 g (58,7 %) narančastog praškastog produkta **39**. $T_{\text{t}} = >300$ °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 9,87$ (šs, 1H, OH), 8,44 (d, 1H, $J = 2,04$ Hz, H_{arom}), 8,29 (s, 1H, H_{arom}), 8,22 (s, 1H, CH), 7,61 (d, 1H, $J = 2,16$ Hz, H_{arom}), 7,35 (dd, 1H, $J_1 = 8,34$, $J_2 = 2,10$ Hz, H_{arom}), 6,94 (d, 1H, $J = 8,28$ Hz, H_{arom}); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 152,13$, 151,26, 148,22, 146,32, 145,03, 125,33, 124,43, 116,92, 116,62, 116,45, 113,70, 96,92.

3.2.10.16. Priprava (*E*)-2-(6-brom-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4,5-trihidroksifenil)akrilonitrila 40

U kivetu se odvaže 0,100 g (0,42 mmol) 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **18** i doda 0,065 g 3,4,5-trihidroksibenzaldehida. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Dobiveno je 0,067 g (42,7 %) tamno narančastog praškastog produkta **40**. $T_{\text{t}} = >300$ °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 9,54$ (šs, 2H, OH), 8,43 (d, 1H, $J = 2,04$ Hz, H_{arom}), 8,28 (s, 1H, H_{arom}), 8,12 (s, 1H, H_{arom}), 7,10 (s, 2H, H_{arom}); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 152,24$, 148,52, 146,62, 144,98, 139,65, 123,18, 116,89, 113,67, 110,42, 96,83.

3.2.10.17. Priprava (*E*)-2-(6-brom-3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-fenilakrilonitrila **41**

U kivetu se odvaži 0,070 g (0,28 mmol) 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **19** i doda 0,03 mL benzaldehida. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Dobiveno je 0,036 g (38,2 %) smeđeg praškastog produkta **41**. $T_f = 192\text{ }^\circ\text{C}$. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 8,55$ (d, 1H, $J = 2,04\text{ Hz}$, H_{arom}), 8,46 (d, 1H, $J = 2,10\text{ Hz}$, H_{arom}), 8,33 (s, 1H, CH), 8,07 (dd, 2H, $J_1 = 6,66$, $J_2 = 3,60\text{ Hz}$, H_{arom}), 7,63 – 7,61 (m, 3H, H_{arom}), 4,04 (s, 3H, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 151,79$, 150,40, 147,73, 145,40, 135,67, 133,00, 132,78, 130,44, 129,85, 129,72, 116,75, 114,29, 101,03, 30,94.

3.2.10.18. Priprava (*E*)-2-(6-brom-3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(4-hidroksifenil)akrilonitrila **42**

U kivetu se odvaži 0,070 g (0,28 mmol) 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **19** i doda 0,034 g 4-hidroksibenzaldehida. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Dobiveno je 0,046 g (46,0 %) žutog praškastog produkta **42**. $T_f = 259\text{--}260\text{ }^\circ\text{C}$. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 10,57$ (šs, 1H, OH) 8,51 (d, 1H, $J = 1,86\text{ Hz}$, H_{arom}), 8,40 (d, 1H, $J = 1,92\text{ Hz}$, H_{arom}), 8,17 (s, 1H, CH), 8,00 (d, 2H, $J = 8,70\text{ Hz}$, H_{arom}), 6,97 (d, 2H, $J = 8,70\text{ Hz}$, H_{arom}), 4,01 (s, 3H, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 161,38$, 150,57, 150,17, 146,75, 143,74, 134,70, 132,23, 128,30, 122,97, 116,49, 115,69, 94,36, 29,78.

3.2.10.19. Priprava (*E*)-2-(6-brom-3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4-dihidroksifenil)akrilonitrila **43**

U kivetu se odvaži 0,070 g (0,28 mmol) 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **19** i doda 0,039 g 3,4-dihidroksibenzaldehida. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Dobiveno je 0,037 g (36,7 %) smeđeg praškastog produkta **43**. $T_f = 267\text{ }^\circ\text{C}$. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 9,42$ (šs, 1H, OH), 8,50 (d, 1H, $J = 2,04\text{ Hz}$, H_{arom}), 8,39 (d, 1H, $J = 2,04\text{ Hz}$, H_{arom}), 8,06 (s, 1H, CH), 7,68 (d, 1H, $J = 2,16\text{ Hz}$, H_{arom}), 7,40 (dd, 1H, $J_1 = 8,43$, $J_2 = 2,22\text{ Hz}$, H_{arom}), 6,91 (d, 1H, $J = 8,28\text{ Hz}$, H_{arom}), 4,00 (s, 3H, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 151,97$, 151,61, 151,46, 147,85, 146,28, 144,72, 135,81, 129,30, 125,90, 124,40, 117,58, 116,42, 114,06, 94,80, 30,86.

3.2.10.20. Priprava (*E*)-2-(6-brom-3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4,5-trihidroksifenil)akrilonitrila **44**

U kivetu se odvaži 0,070 g (0,28 mmol) 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **19** i doda 0,043 g 3,4,5-trihidroksibenzaldehida. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Dobiveno je 0,056 g (51,9 %) tamno smeđeg praškastog produkta **44**. $T_f = >300\text{ }^\circ\text{C}$.

^1H NMR (600 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 8,35$ (d, 1H, $J = 2,10$ Hz, H_{arom}), $8,21$ (d, 1H, $J = 2,04$ Hz, H_{arom}), $7,81$ (s, 1H, CH), $7,10$ (s, 2H, H_{arom}), $3,95$ (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 153,73$, $150,82$, $148,26$, $146,80$, $143,01$, $136,35$, $127,71$, $119,90$, $116,97$, $113,59$, $110,07$, $30,78$.

3.2.10.21. Priprava (*E*)-2-(6-brom-3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-fenilakrilonitrila 45

U kivetu se odvaže 0,100 g (0,30 mmol) 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **20** i doda 0,03 mL benzaldehida. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Dobiveno je 0,038 g (30,2 %) smeđeg praškastog produkta **45**. $T_f = 219$ °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 8,54$ (d, 1H, $J = 2,08$ Hz, H_{arom}), $8,47$ (d, 1H, $J = 2,08$ Hz, H_{arom}), $8,01$ (s, 1H, CH), $7,84$ (dd, 2H, $J_1 = 7,96$ Hz, $J_2 = 1,88$ Hz, H_{arom}), $7,57$ (d, 3H, $J = 7,28$ Hz, H_{arom}), $7,41$ (d, 2H, $J = 8,76$ Hz, H_{arom}), $6,96$ (d, 2H, $J = 8,76$ Hz, H_{arom}); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) $\delta/\text{ppm} = 158,94$, $151,99$, $149,84$, $148,53$, $145,91$, $135,67$, $132,85$, $132,68$, $130,24$, $130,05$, $129,85$, $129,77$, $125,13$, $116,62$, $115,56$, $114,80$, $100,91$.

3.2.10.22. Priprava (*E*)-2-(6-brom-3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(4-hidroksifenil)akrilonitrila 46

U kivetu se odvaže 0,100 g (0,30 mmol) 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **20** i doda 0,037 g 4-hidroksibenzaldehida. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Dobiveno je 0,037 g (45,6 %) narančastog praškastog produkta **46**. $T_f = 233-240$ °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 8,30$ (d, 1H, $J = 2,04$ Hz, H_{arom}), $8,27$ (d, 1H, $J = 2,08$ Hz, H_{arom}), $7,56$ (s, 1H, CH), $7,39$ (d, 1H, $J = 2,28$ Hz, H_{arom}), $7,31$ (d, 2H, $J = 8,76$ Hz, H_{arom}), $6,94$ (d, 4H, $J = 8,72$ Hz, H_{arom}), $6,38$ (d, 1H, $J = 8,48$ Hz, H_{arom}); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) $\delta/\text{ppm} = 158,66$, $153,27$, $150,68$, $148,02$, $143,58$, $136,31$, $130,55$, $129,92$, $128,04$, $125,96$, $118,38$, $116,51$, $116,16$, $114,13$, $110,92$.

3.2.10.23. Priprava (*E*)-2-(6-brom-3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4-dihidroksifenil)akrilonitrila 47

U kivetu se odvaže 0,100 g (0,30 mmol) 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **20** i doda 0,042 g 3,4-dihidroksibenzaldehida. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Dobiveno je 0,043 g (31,6 %) crvenog praškastog produkta **47**. $T_f = 220-223$ °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO): $\delta/\text{ppm} = 8,42$ (d, 1H, $J = 2,00$ Hz, H_{arom}), $8,37$ (d, 1H, $J = 2,00$ Hz, H_{arom}), $7,80$ (s, 1H, CH), $7,71$ (s, 1H, H_{arom}), $7,69$ (s, 1H, H_{arom}), $7,35$ (d, 2H, $J = 8,68$ Hz, H_{arom}), $6,94$ (d, 2H, $J = 8,68$ Hz, H_{arom}), $6,74$ (d, 2H, $J = 8,80$ Hz, H_{arom});

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ/ppm = 163,25, 161,90, 158,85, 156,16, 151,54, 151,31, 148,82, 144,78, 135,93, 133,51, 132,60, 129,88, 129,11, 125,46, 121,85, 117,74, 117,00, 116,56, 114,46.

3.2.10.24. Priprava (*E*)-2-(6-brom-3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4,5-trihidroksifenil)akrilonitrila **48**

U kivetu se odvaže 0,100 g (0,30 mmol) 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **20** i doda 0,047 g 3,4,5-trihidroksibenzaldehida. Reakcija se provodi prema općem postupku priprave. Dobiveno je 0,038 g (27,0 %) crvenog praškastog produkta **48**. T_f = 220-225 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO): δ/ppm = 8,24 (d, 1H, J = 2,04 Hz, H_{arom}), 8,22 (d, 1H, J = 2,08 Hz, H_{arom}), 7,41 (s, 1H, CH), 7,29 (d, 2H, J = 8,76 Hz, H_{arom}), 6,94 (d, 2H, J = 8,68 Hz, H_{arom}), 6,81 (s, 1H, H_{arom}), 6,52 (s, 1H, H_{arom}); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ/ppm = 169,26, 158,57, 150,15, 149,29, 147,17, 146,73, 143,24, 136,43, 129,93, 127,74, 126,14, 116,49, 114,04, 109,73, 109,03.

3.3. Antioksidativna aktivnost

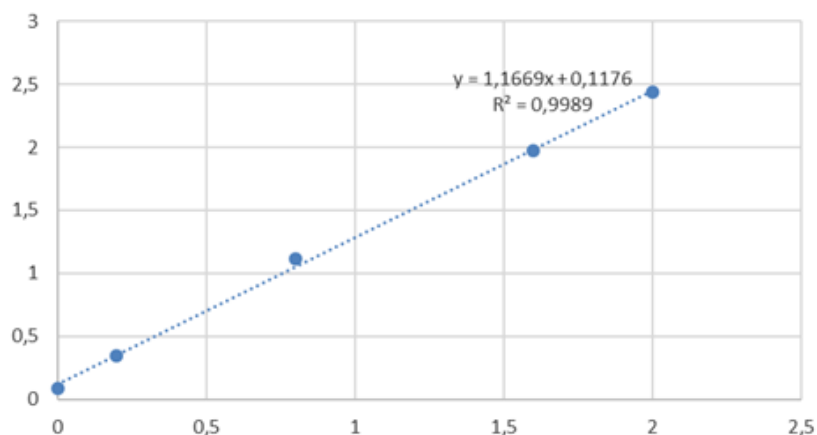
3.3.1. DPPH metoda

Mjerenje se izvodi korištenjem višekanalnog čitača mikrotitarskih pločica (ELISA, bio-tek instruments inc.) s automatskim miješanjem i snimanjem podataka na računaru. U 100 μL otopine spojeva različitih koncentracija dodano je 100 μL DPPH ($c(\text{DPPH}) = 200 \mu\text{mol/mL}$) i ostavljeno je 30 minuta na tamnom mjestu na sobnoj temperaturi. Koncentracija DPPH je ista u svakom uzorku i iznosi 100 $\mu\text{mol/mL}$. Promjena apsorbancije očitana je na ELISA čitaču na 517nm. 96%-tni etanol uzet je kao slijepa proba. Rezultati su izraženi kao IC_{50} vrijednost, odnosno koncentracija antioksidansa koja uzrokuje 50% inhibicije DPPH. Niža vrijednost IC_{50} predstavlja veću efikasnost antioksidansa. Sva mjerenja rađena su u triplikatu.

3.3.2. FRAP metoda

FRAP reagens predstavlja smjesu od 20 mL acetatnog pufera (300 mM, pH = 3,6), 2 mL otopine 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (10 mM), 2 mL otopine FeCl_3 (20 mM) te 2,4 mL destilirane vode. U mikrotitarskoj ploči se pomiješa 10 μL otopine spoja koncentracije 4mM i 200 μL FRAP reagensa te se nakon 4 minute izmjeri apsorbancija pri 593 nm.

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mmol/mL), određuje se antioksidacijska aktivnost u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom provedeno je u tri paralelene probe, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja u mmol Fe^{2+} /mg spoja. Za izradu baždarnog pravca pripremljena je otopina $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ u etanolu u pet različitih koncentracija.



Slika 46. Baždarni pravac za FRAP metodu

3.5.3. ABTS metoda

Za standardni TEAC test, kation radikala ABTS_+ (2,20-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)), pripremljen je miješanjem standardne temeljne otopine ABTS (7 mM u vodi) s 2,45 mM kalijevoeg persulfata koji je zatim ostavljen 12-16 h na sobnoj temperaturi u mraku dok se ne postigne stabilno oksidativno stanje. Na dan analize, otopina ABTS_+ razrijeđena je s PBS (pH 7,4) do apsorbancije od $0,700 \pm 0,01$ na 734 nm. Čuvanjem u mraku, radikal je u ovom obliku bio stabilan više od dva dana. Standardi i otopine testiranih spojeva (10 mL) pomiješani su s radnim ABTS_+ (200 mL) u jažicama mikroploče i inkubirani su na sobnoj temperaturi 5 min. Smanjenje apsorbancije na 734 nm zabilježio je mQuant (Biotec Inc.). Sposobnost uklanjanja slobodnih radikala izračunata je pomoću sljedeće formule:

$$\left[\frac{A_s - A_c}{A_c} \right] * 100$$

gdje A_s i A_c predstavljaju apsorbanciju ABTS_+ s uzorkom, odnosno bez njega.

Vrijednosti IC_{50} za svaki spoj izračunate su iz krivulja *dose-response* korištenjem nelinearne regresijske analize kroz GraphPad Prism 8 Ink. program. Sva mjerenja ponovljena su tri puta, a u tablici 1 prikazana je njihova prosječna vrijednost.

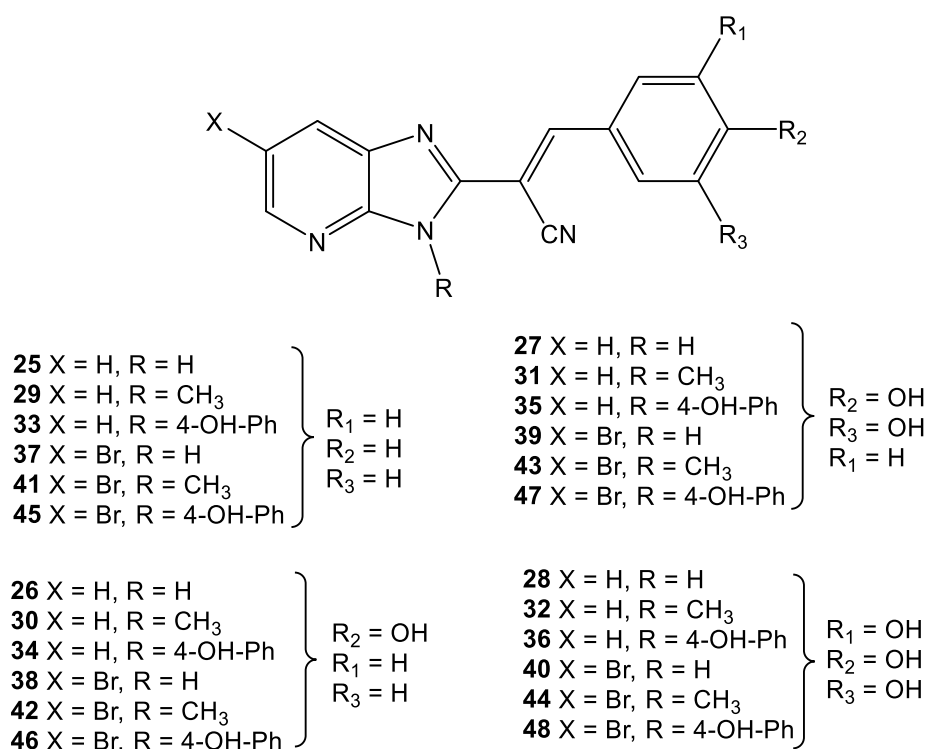
3.4. pH titracije

pH titracije provedene su korištenjem univerzalnog pufera pH vrijednosti od 1 do 13 na sobnoj temperaturi UV/Vis spektroskopijom. Koncentracije svih ispitivanih spojeva bile su $2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Univerzalni pufer pripremljen je korištenjem borne, limunske i fosforne kiseline te natrijevog hidroksida. pH vrijednosti puferskih otopina namještene su korištenjem $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ klorovodične kiseline te $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ otopine natrijevog hidroksida.

4. Rasprava i rezultati

4.1. Cilj rada

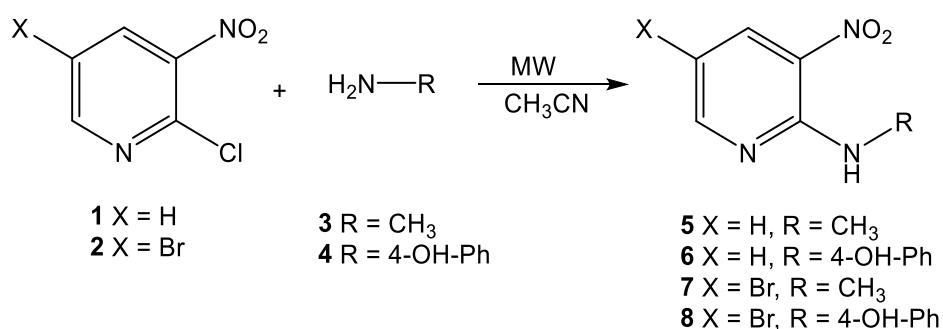
Cilj ovog rada bila je sinteza novih akrilonitrilnih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina. Također, cilj je bio i provesti antioksidativna ispitivanja te ispitati utjecaj položaja i broja hidroksilnih skupina na aktivnost spojeva. Provedena je i spektroskopska karakterizacija spojeva **25**, **26**, **27**, **28** i **32** korištenjem UV/Vis spektroskopije u šest otapala prema rastućoj polarnosti: toluen, etil-acetat, acetonitril, etanol, metanol i voda, a pH titracije provedene su u 13 različitih pH vrijednosti. Sinteza započinje aminacijom komercijalno dostupnog 2-klor-3-nitropiridina i 5-brom-2-klor-nitropiridina s metil-aminom i 4-aminofenolom. Nakon redukcije dobivenih amina, slijedi postupak zatvaranja prstena. U završnom koraku sinteze provodi se aldolna kondenzacija cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina s određenim benzaldehidima te se dobivaju akrilonitrilni derivati. Strukture izoliranih spojeva potvrđene su ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom, a nekim je spojevima struktura dodatno okarakterizirana i masenom spektrometrijom. Svim priređenim spojevima ispitana je i antioksidativna aktivnost.



Slika 26. Struktura pripremljenih spojeva

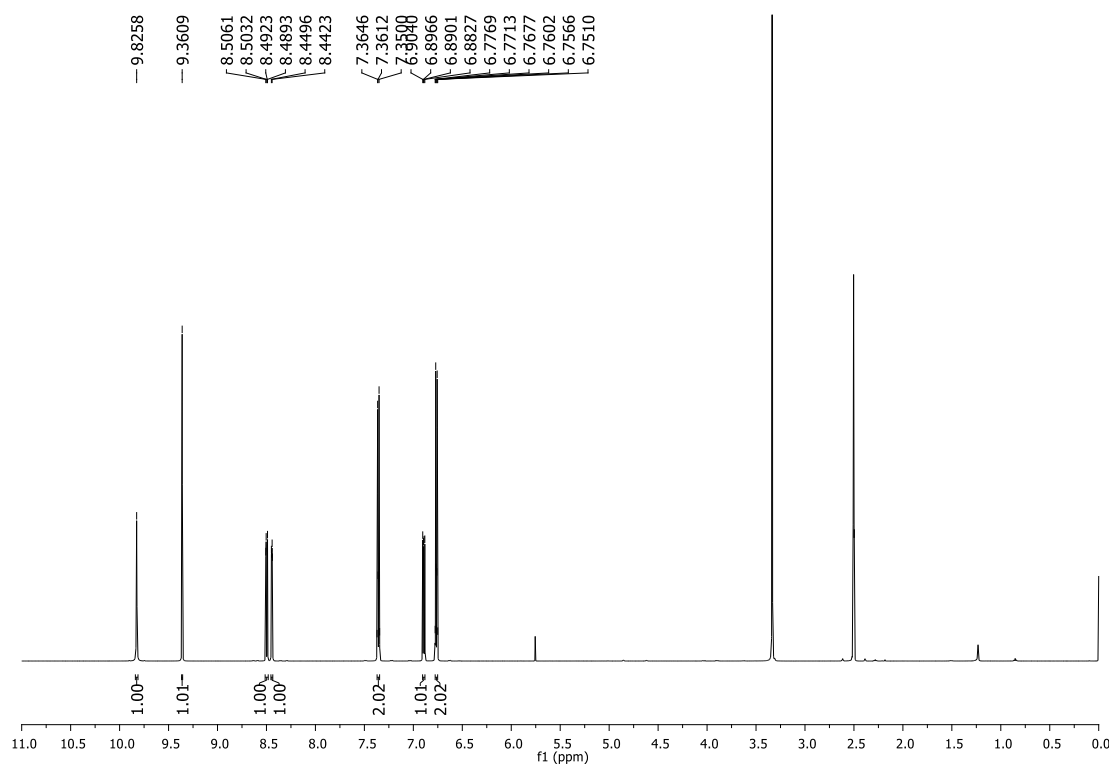
4.2. Sinteza ciljanih spojeva

Prvi korak sinteze ciljanih spojeva obuhvaćao je pripremu amino supstituiranih piridina **5-8** iz komercijalno dostupnih 2-klor-3-nitropiridina **1** i 5-brom-2-klor-3-nitropiridina **2**. Reakcija je provedena korištenjem mikrovalnog zračenja uz prisutnost acetonitrila na temperaturi od 170 °C. Spoj **5** izoliran je u iskorištenju od 78,2 %, spoj **6** u iskorištenju od 74,1 %, spoj **7** u iskorištenju od 88,3 % i spoj **8** izoliran je u iskorištenju od 74,0 %, a na shemi 19 prikazana je njihova sinteza.



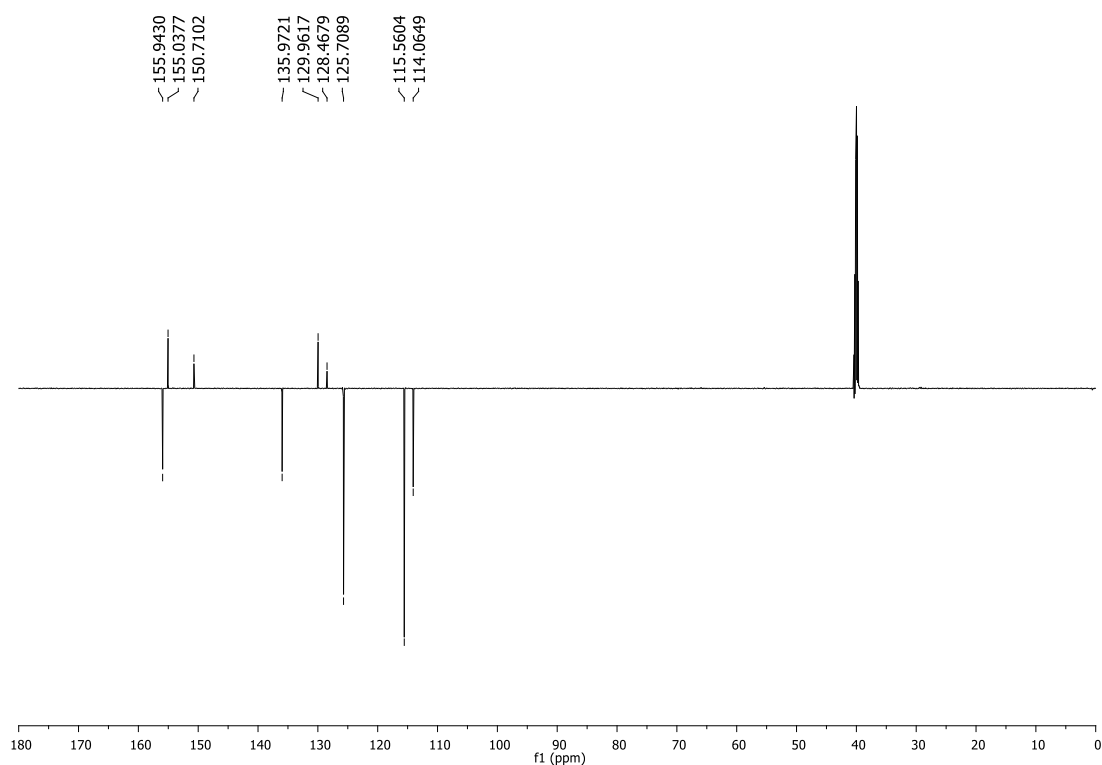
Shema 19. Sinteza amino supstituiranih piridina **5-8**

Struktura priređenog spoja **6** potvrđena je ¹H i ¹³C NMR spektroskopijom (prilog 2), a na slici 27 prikazan je i njegov ¹H NMR spektar.



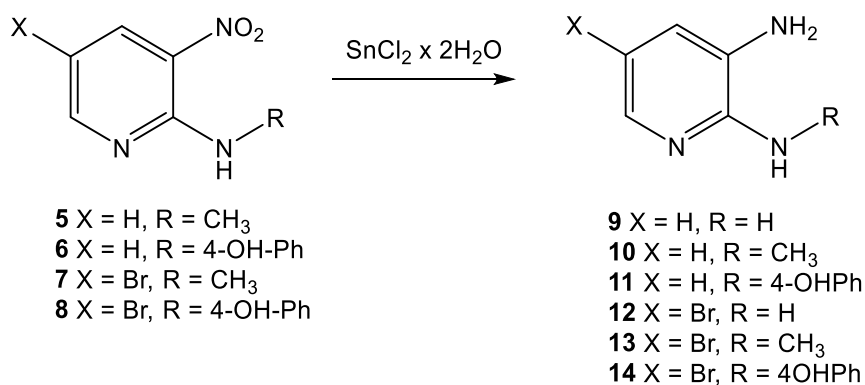
Slika 27. ¹H NMR spektar spoja **6**

U spektru se mogu uočiti dubleti dubleta koji odgovaraju protonima na piridinskoj jezgri jer se sva tri međusobno sprežu s konstantama $J = 8, 31$ Hz, $J = 4, 41$ Hz i $J = 8, 34$ Hz. Njihov kemijski pomak pomaknut je prema nižem magnetskom polju. To je u skladu s ponašanjem aromata pod utjecajem vanjskog magnetskog polja. Naime, njihovi protoni osjećaju vanjsko magnetsko polje u istom smjeru kao i struju elektrona te su zbog toga nezasjenjeni. Također, na 9,83 i 9,36 ppm uočavaju se singleti koji odgovaraju NH i OH skupinama. Dobivena struktura spoja **6** potvrđena je i ^{13}C NMR spektroskopijom (prilog 2). Na ^{13}C NMR spektru (slika 28) spoja **8**, u području od 114 – 155 ppm mogu se vidjeti signali koji pripadaju ugljicima na aromatskoj jezgri.



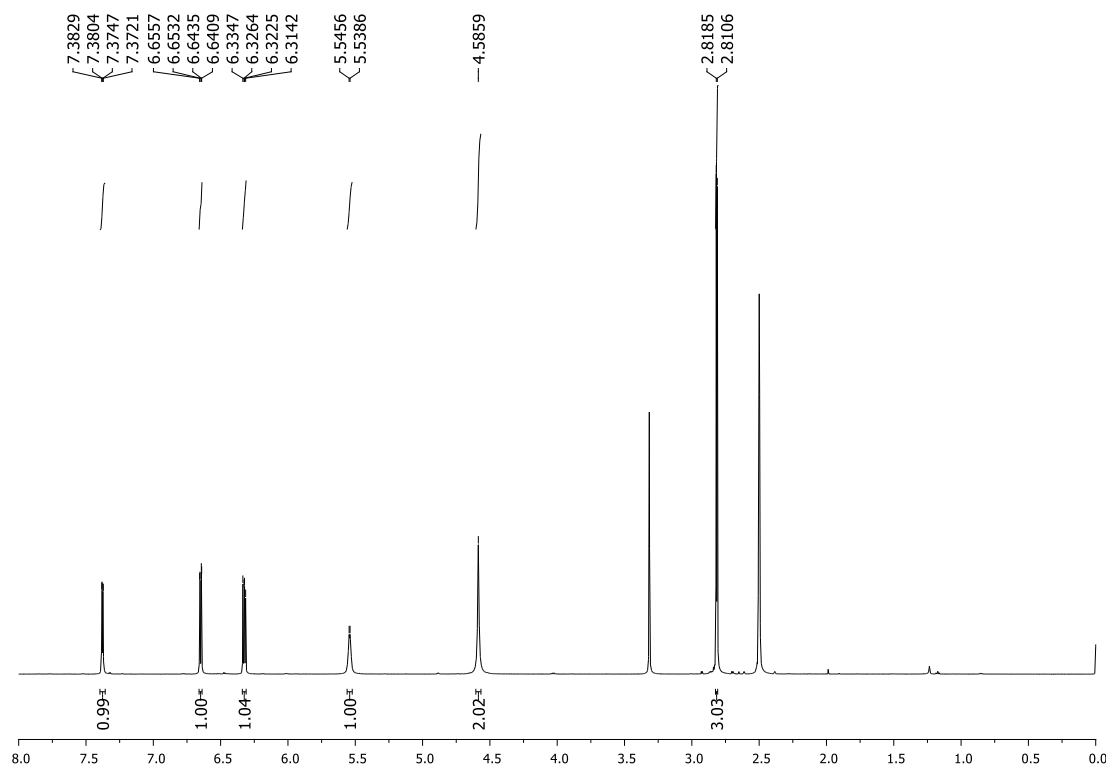
Slika 28. . ^{13}C NMR spektar spoja **6**

Sljedeći korak sinteze obuhvaćao je redukciju nitro skupine u amino skupinu na piridinskoj jezgri.^{80,81} Redukcija spojeva koji ne sadrže brom u C-5 položaju, provedena je u metanolu i $\text{HCl}_{\text{konc.}}$, dok su reakcije spojeva sa susptituiranim bromom provedene samo u etanolu. Kao redukcijsko sredstvo korišten je $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$. U ovoj reakciji važno je dovoljno zalužiti reakcijsku smjesu prije ekstrahiranja kako bi istaložile kositrene soli, a produkt bio izoliran u što većem iskorištenju.



Shema 20. Prikaz redukcije amina

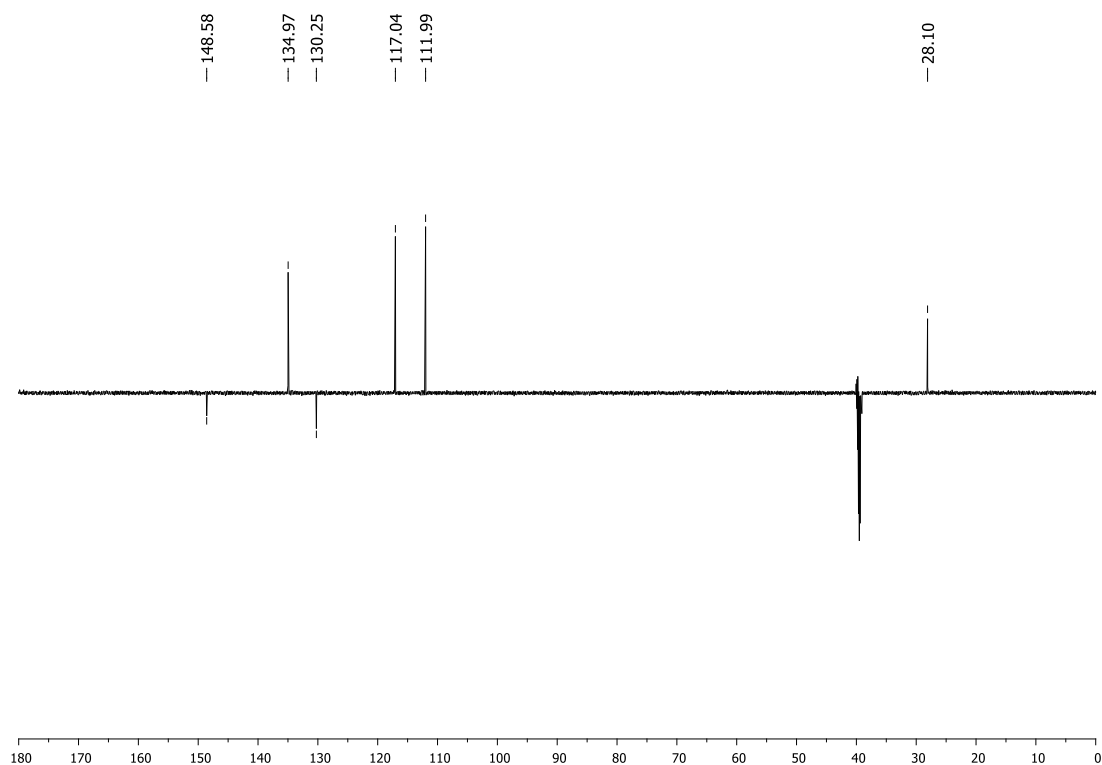
Spoj **10** izoliran je u iskorištenju od 87,4 %, spoj **11** izoliran je u iskorištenju od 82,5 %, spoj **12** u iskorištenju od 86,4 %, spoj **13** u iskorištenju od 88,3 % i spoj **14** u iskorištenju od 91,5 %, a njihova sinteza prikazana je na shemi 20. Struktura spoja **10** potvrđena je ¹H i ¹³C NMR spektroskopijom (prilog 6). Na slici 29 prikazan je ¹H NMR spektar spoja **10**.



Slika 29. ¹H NMR spektar spoja **10**

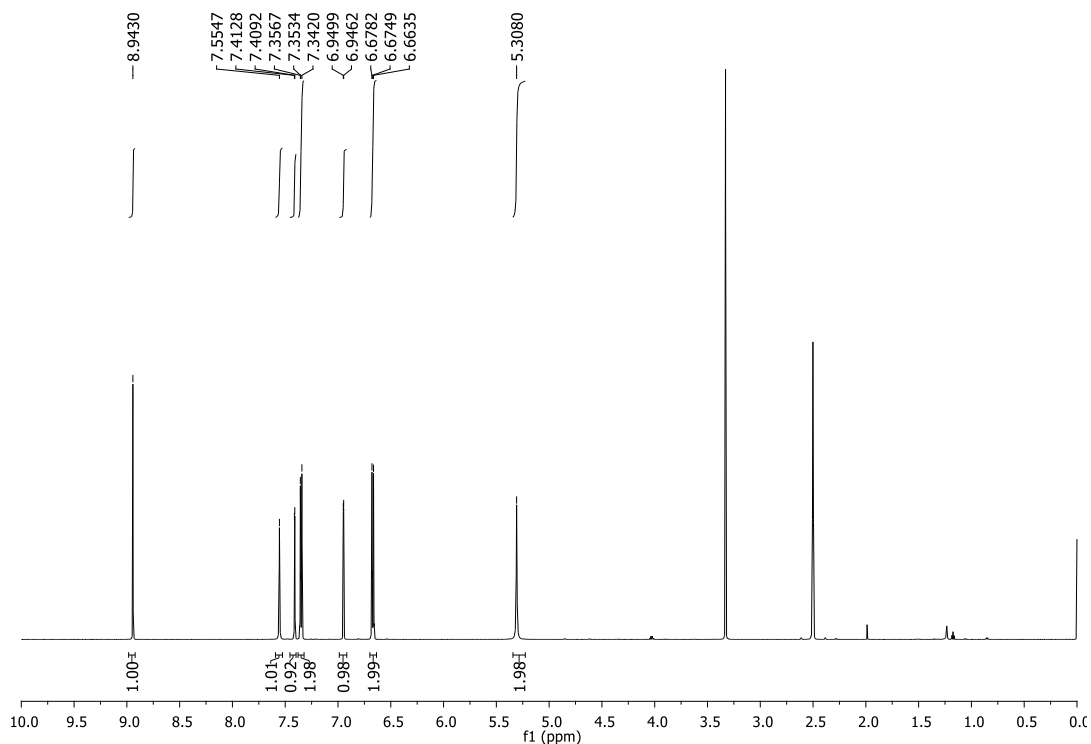
U ¹H NMR spektru uočavaju se dubleti dubleta na 7,38, 6,65 i 6,32 ppm, što odgovara vodikovim atomima na piridinskoj jezgri. U spektru je vidljiv i dublet koji odgovara protonima CH₃ skupine.

Također, na 4,59 ppm nalazi se singlet koji odgovara protonima amino skupine, što potvrđuje da je reakcija redukcije uspješna, odnosno da je nitro skupina uspješno reducirana u amino skupinu. Na slici 30 prikazan je i ^{13}C NMR spektar spoja **10** kojim je dodatno potvrđena struktura dobivenog spoja. Jedan karakterističan signal u alifatskom području spektra odgovara ugljikovom atomu CH_3 skupine. U aromatskom području spektra vidljivo je pet signala koji pripadaju aromatskim ugljicima CH skupina.



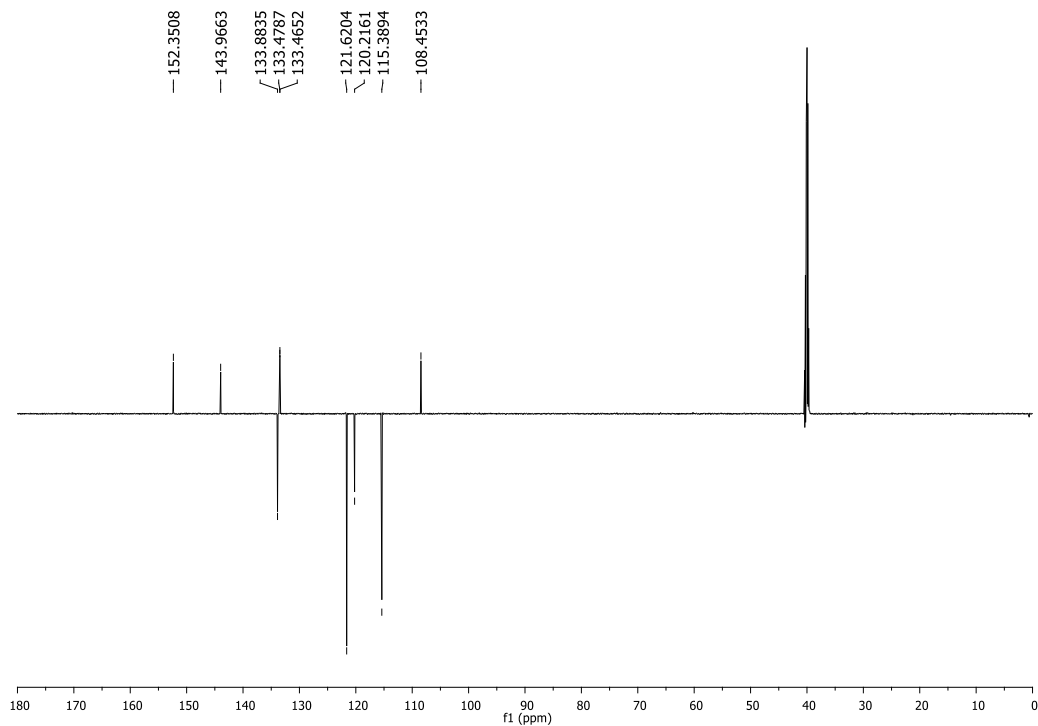
Slika 30. ^{13}C NMR spektar spoja **10**

Redukcija spoja **14**, koji sadrži brom, provedena je isključivo u etanolu uz korištenje redukcijskog sredstva. Njegova struktura potvrđena je i ^1H NMR spektroskopijom (prilog 8). Na slici 31 prikazan je ^1H NMR spektar navedenog produkta. Na 8,94 ppm uočava se široki singlet koji pripada protonu OH skupine. Također se uočavaju dubleti dubleta koji se međusobno sprežu, a pripadaju protonima aromatske jezgre s vezanom OH skupinom u *para*-položaju. Također, vidljiv je i široki singlet na 5,31 ppm koji pripada protonima NH_2 skupine, čime je potvrđeno da je došlo do redukcije nitro skupine u amino.



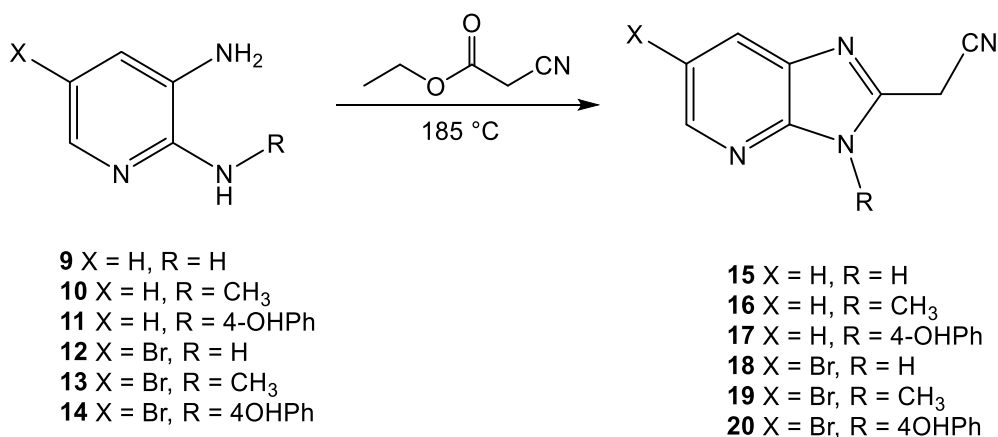
Slika 31. . ^1H NMR spektar spoja **14**

Na slici 32 prikazan je ^{13}C NMR spektar spoja **14** (prilog 8) iz kojeg se uočavaju signali, u području od 108 – 152 ppm, koji pripadaju aromatskim ugljicima CH skupine.



Slika 32. . ^{13}C NMR spektar spoja **14**

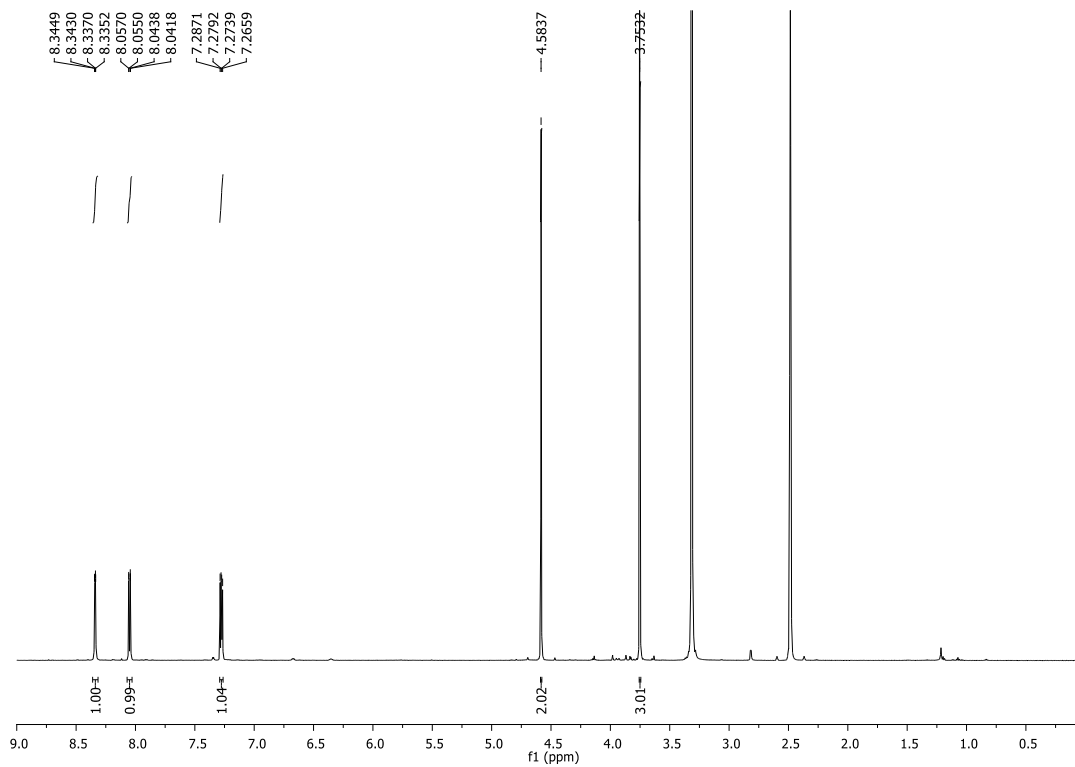
Nakon uspješnih redukcija i pripreve odgovarajućih diamino supstituiranih derivata piridina **9-14**, provedena je reakcija ciklizacije i zatvaranje imidazo[4,5-*b*]piridinskog prstena.⁸² Reakcija je provedena s etil-cijanoacetatom na visokoj temperaturi. Sintaza priređenih 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina prikazana je na shemi 21.



Shema 21. Sintaza imidazo[4,5-*b*]piridina

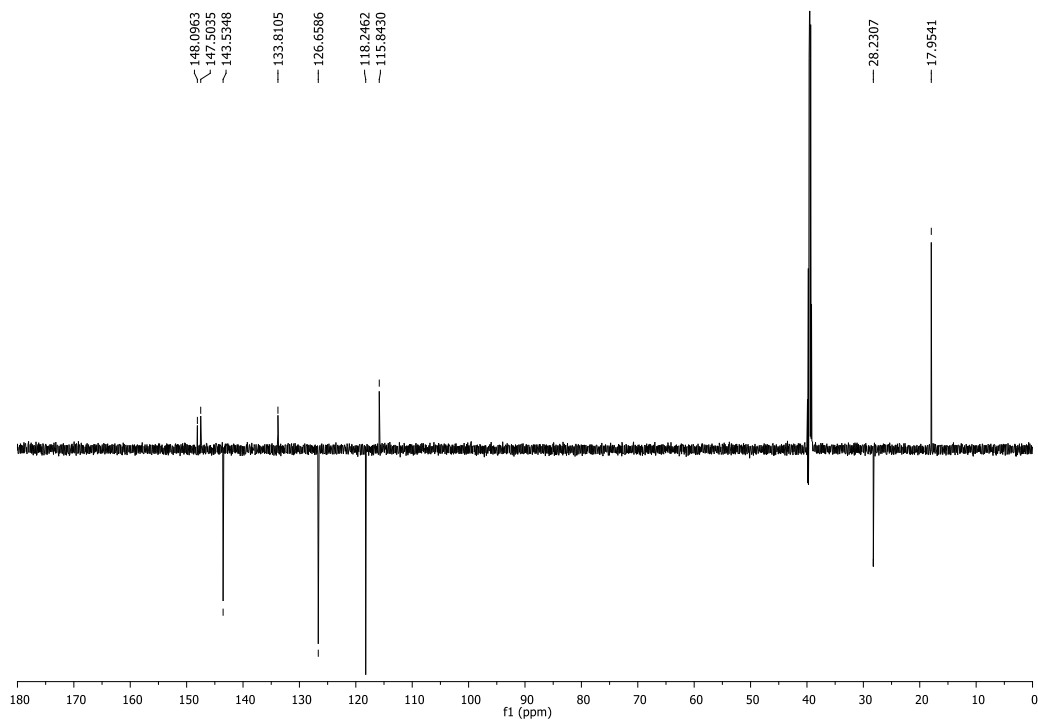
Spoj **15** izoliran je u iskorištenju od 95,9 %, spoj **16** izoliran je u iskorištenju od 55,2 %, spoj **17** u iskorištenju od 65,9 %, spoj **18** u iskorištenju od 52,4 % spoj **19** u iskorištenju od 70,8 % i spoj **20** u iskorištenju od 49,0 %.

Strukture svih derivata 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **15-20** potvrđena su ¹H NMR i ¹³C NMR spektroskopijom. Na slici 33 prikazan je ¹H NMR spektar (prilog 10) priređenog spoja **16** u kojem se uočavaju dubleti dubleta koji pripadaju protonima na piridinskoj jezgri, odnosno, opet dolazi do njihovog međusobnog sprežanja s konstantama sprežanja $J = 4, 71, J = 7, 92$ Hz i $J = 7, 95$ HZ. Na 4,58 ppm uočava se široki singlet koji odgovara protonima CH₂ skupine koja je vezana na cijano skupinu. Kemijski pomak protona CH₂ skupine prema nižem magnetskom polju, uzrokovan je prisutnošću elektron-odvlačeće skupine i kondenziranog aromatskog sustava koji pomiču signale u nezasjenjeno područje. Također, uočava se i singlet koji pripada protonima metilne skupine koja je vezana na jedan od dušikovih atoma imidazo-piridinske jezgre.



Slika 33. ^1H NMR spektar spoja **16**

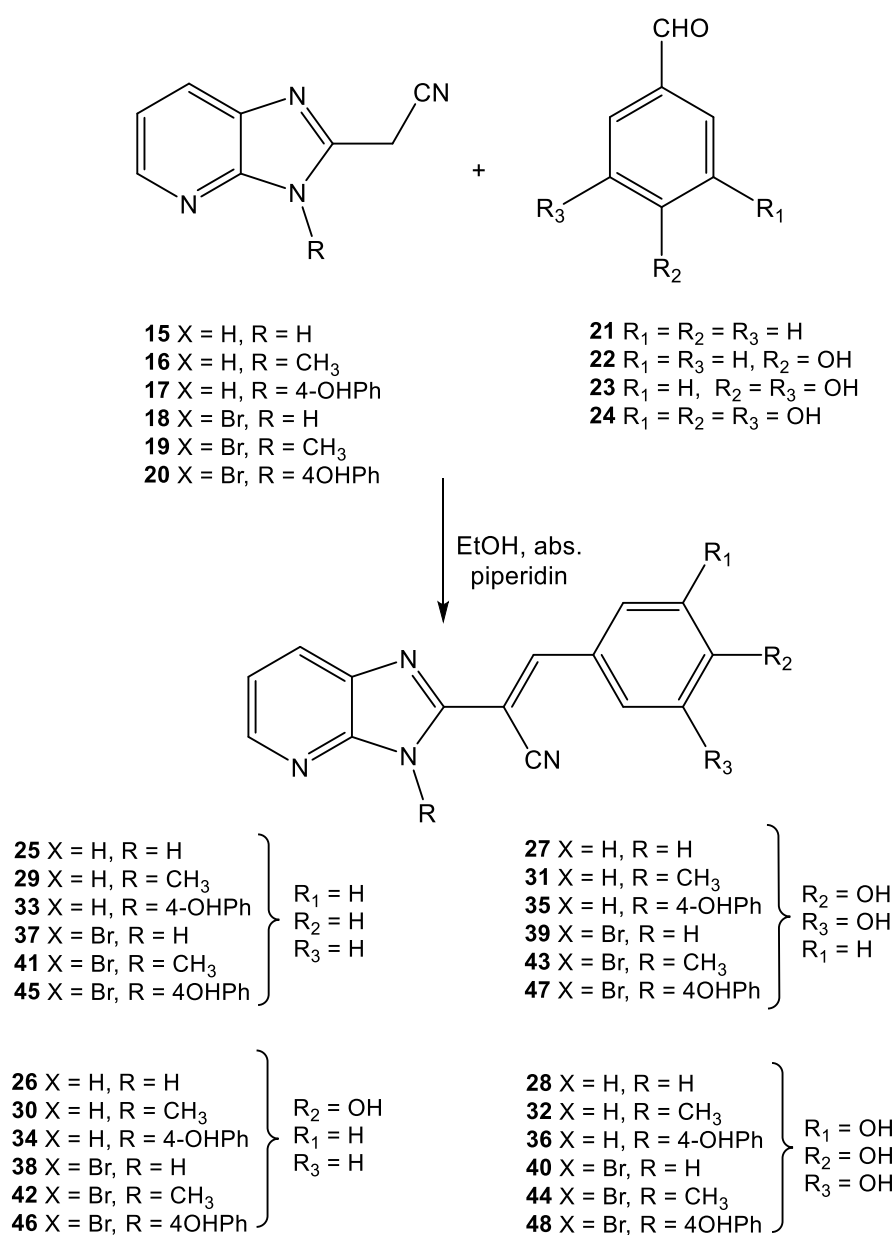
Struktura priređenog spoja potvrđena je i ^{13}C NMR spektroskopijom (slika 34).



Slika 34. ^{13}C NMR spektar spoja **16**

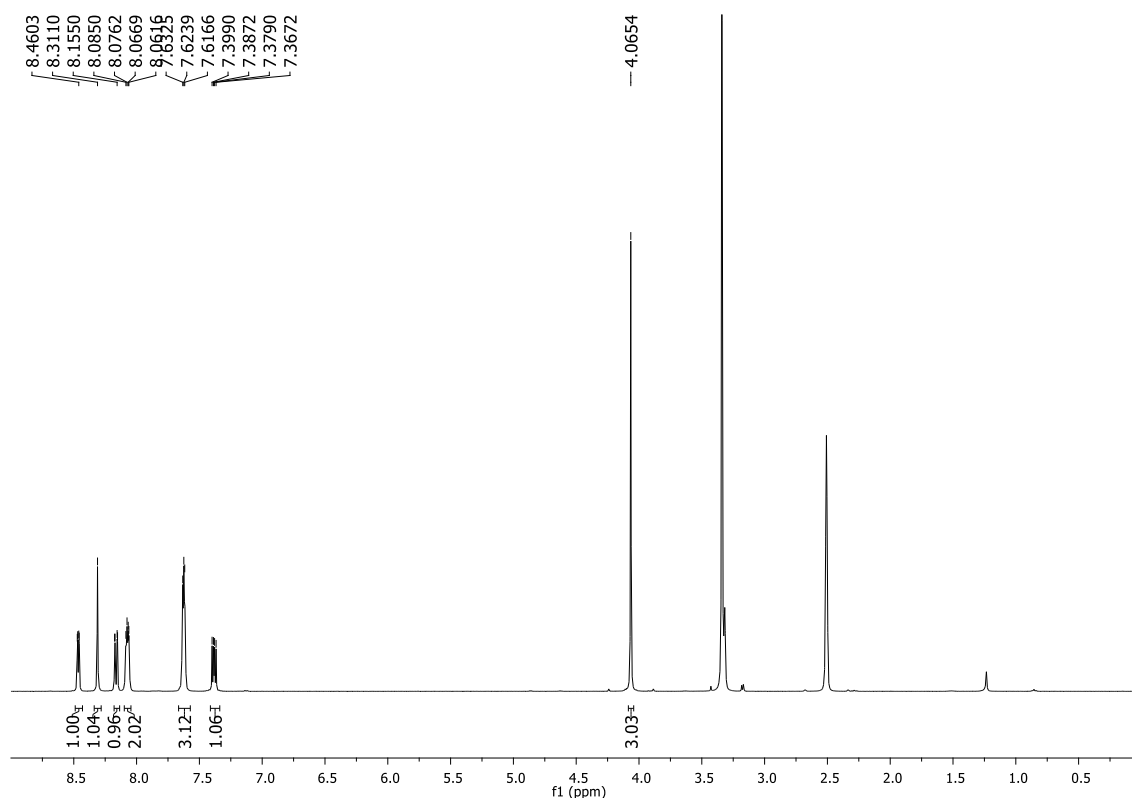
U alifatskom dijelu ^{13}C NMR spektra spoja **16**, uočava se karakterističan signal koji odgovara ugljikovom atomu CH_3 skupine, kao i signal koji pripada ugljikovom atomu CH_2 skupine. U aromatskom području spektra vidljivo je šest signala koji pripadaju aromatskim ugljicima CH skupina te jedan signal koji pripada ugljikovom atomu CN skupine.

Zadnji korak sinteze ciljanih derivata akrilonitrila uključivao je aldolnu kondenzaciju u kojoj dolazi do reakcije između priređenih acetonitrilnih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina **15-20** i odabranih aromatskih benzaldehida **21-24**. Reakcija se provodi u reaktoru za paralelnu sintezu pri $90\text{ }^\circ\text{C}$ u apsolutnom etanolu uz dodatak piperidina. Sinteza priređenih derivata prikazana je na shemi 22.



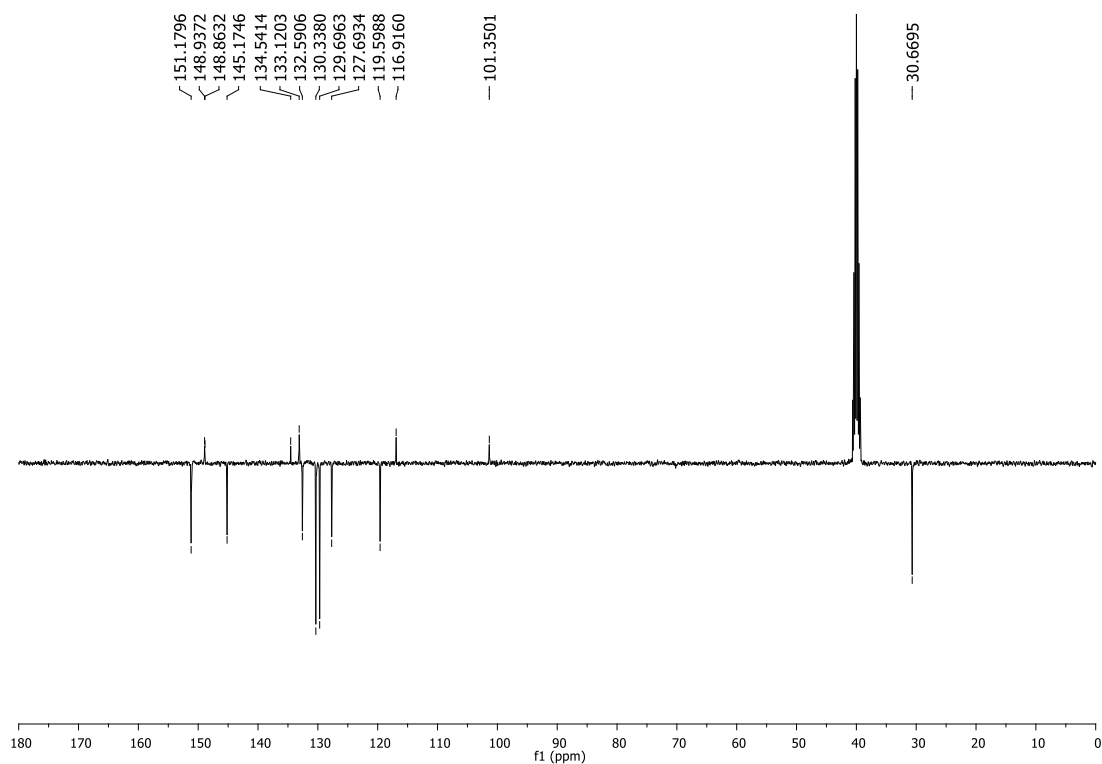
Shema 22. Sinteza akrilonitrilnih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina

Struktura spoja **29** potvrđena je ^1H NMR spektroskopijom i ^{13}C NMR spektroskopijom (prilog 19), a spoj je izoliran u iskorištenju od 82,9 %. Na slici 35 prikazan je ^1H NMR spektar spoja **29**, pri čijoj se pripravi koristio benzaldehid. Na 8,46, 8,16, 8,07, i 7,39 ppm uočavaju se dubleti dubleta koji odgovaraju protonima vezanim na benzenskoj i piridinskoj jezgri. Na 4,07 ppm uočava se singlet koji odgovara protonima metilne skupine vezane na atom dušika na imidazo-piridinskoj jezgri, čiji pomak odstupa od teorijske vrijednosti. Razlog tomu je prisutnost elektron-odvlačećeg atoma dušika koji pomiče protone u niža magnetska polja. Također, na 8,31 ppm uočava se singlet koji odgovara protonima CH skupine koja se nalazi u području cijano skupine i benzenske jezgre.



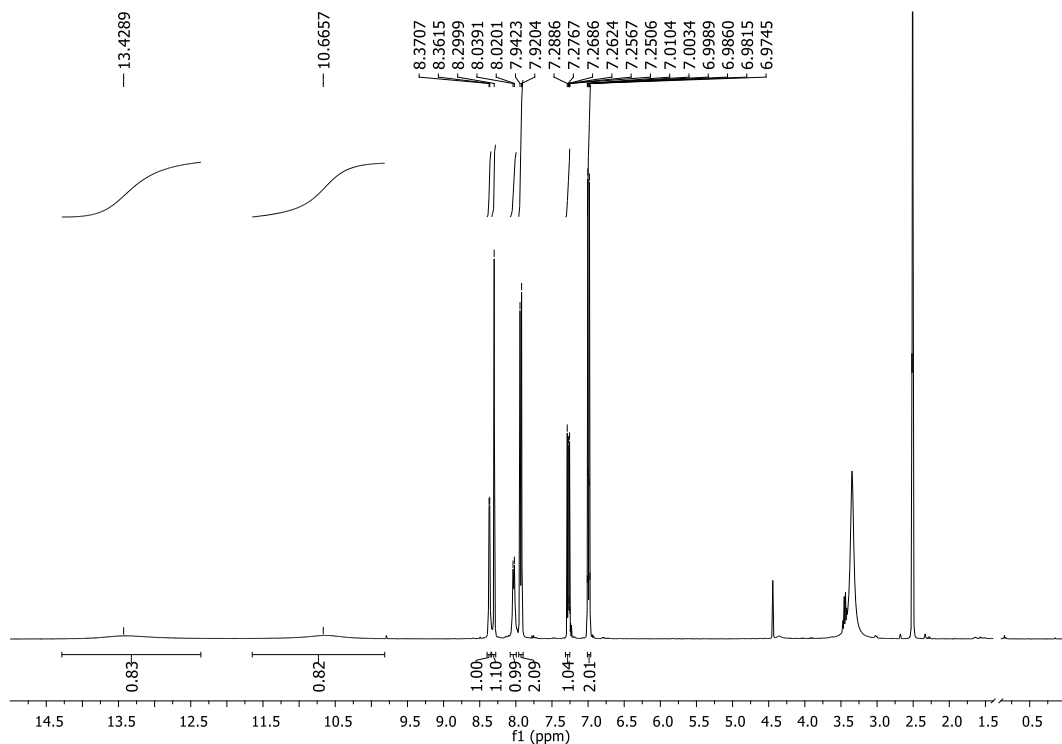
Slika 35. ^1H NMR spektar spoja **29**

Dodatnu potvrdu strukture dobivenog spoja **29** dao je ^{13}C NMR spektar (slika 36). Jedan karakterističan signal u alifatskom području spektra odgovara ugljikovom atomu CH_3 skupine. U aromatskom području spektra vidljivi su signali koji pripadaju aromatskim ugljicima CH skupina te jedan signal koji pripada CN skupini.

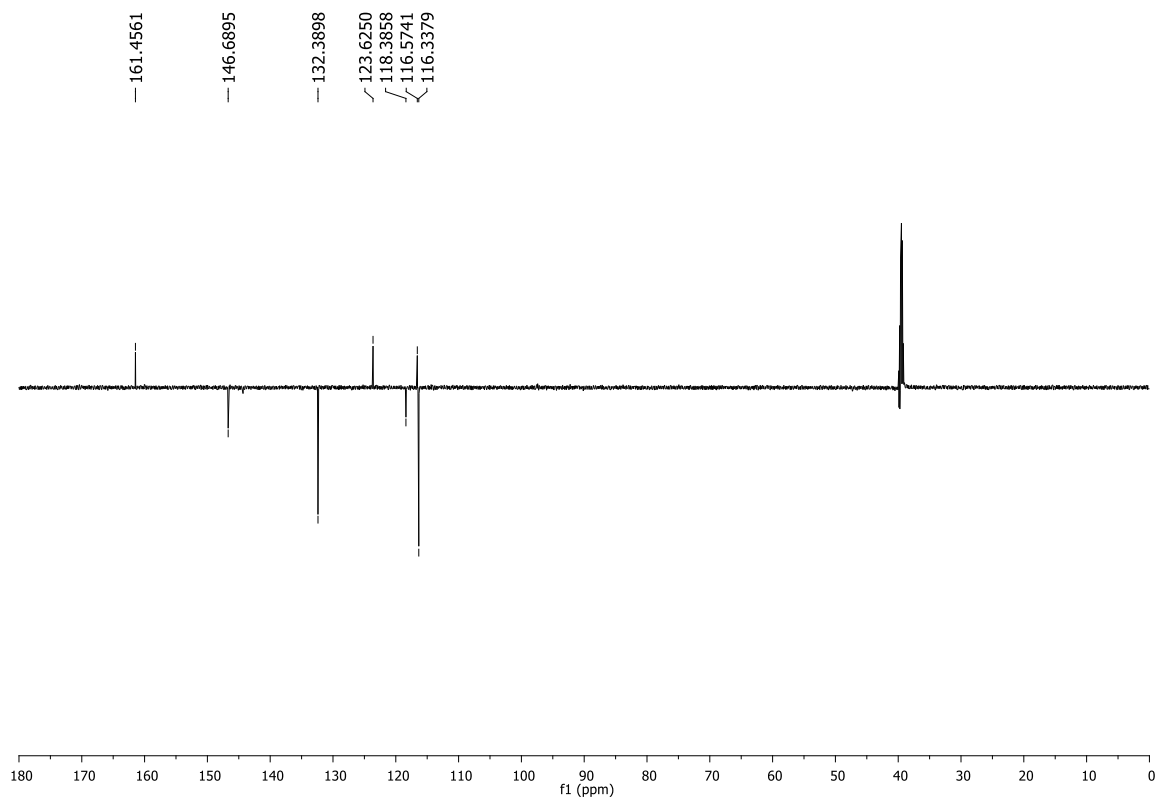


Slika 36. ^{13}C NMR spektar spoja **29**

Na slici 37 prikazan je ^1H NMR spektar spoja **26**, akrilonitrila koji je pripremljen u reakciji s 4-hidroksibenzaldehidom. Spoj je izoliran u iskorištenju od 69,3 %. Na 13,43 ppm uočava se široki singlet koji pripada protonu OH skupine koja je vezana na aromatsku jezgru, a na 8,30 ppm nalazi se široki singlet koji pripada protonu NH skupine. Na 8,37, 8,03 i 7,93 ppm, uočavaju se dubleti koji pripadaju protonima vezanim na piridinsku jezgru. Uočava se i pomak protona CH_2 skupine prema nižem magnetskom polju zbog prisutnosti elektronegativne skupine uz C-H sustav gdje dolazi do smanjenja elektronske gustoće oko protona, pa kažemo da je proton manje zaklonjen i kemijski pomak se povećava. Na slici 38, prikazan je i ^{13}C NMR spektar pripremljenog spoja. U području od 116 – 161 ppm uočavaju se signali ugljika koji pripadaju aromatskoj jezgri.



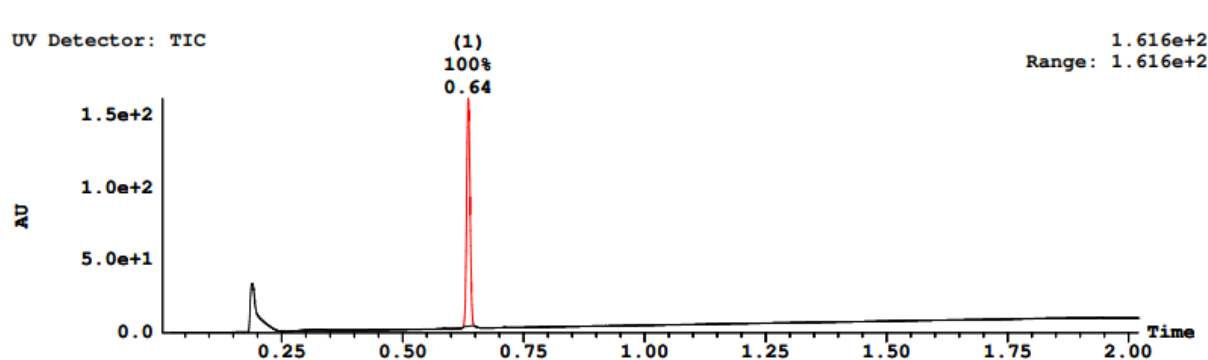
Slika 37. ^1H NMR spektar spoja 26



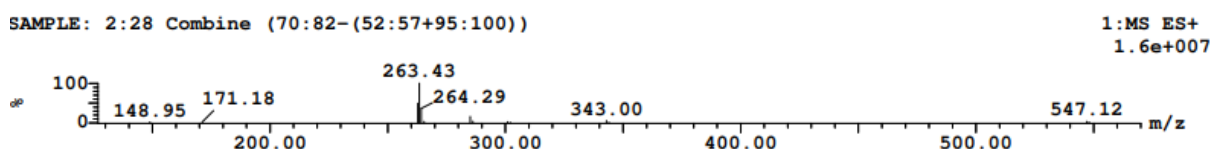
Slika 38. ^{13}C NMR spektar spoja 26

Struktura sintetiziranog spoja **26** dodatno je potvrđena i masenom spektrometrijom, a na slici 39a prikazan je kromatogramom te na slici 39b maseni spektar. Maseni spektar daje molekularni ion na 263,4 m/z čime je potvrđena struktura dobivenog spoja, dok se iz kromatograma vidi da je sintetizirani spoj visoke čistoće.

a)

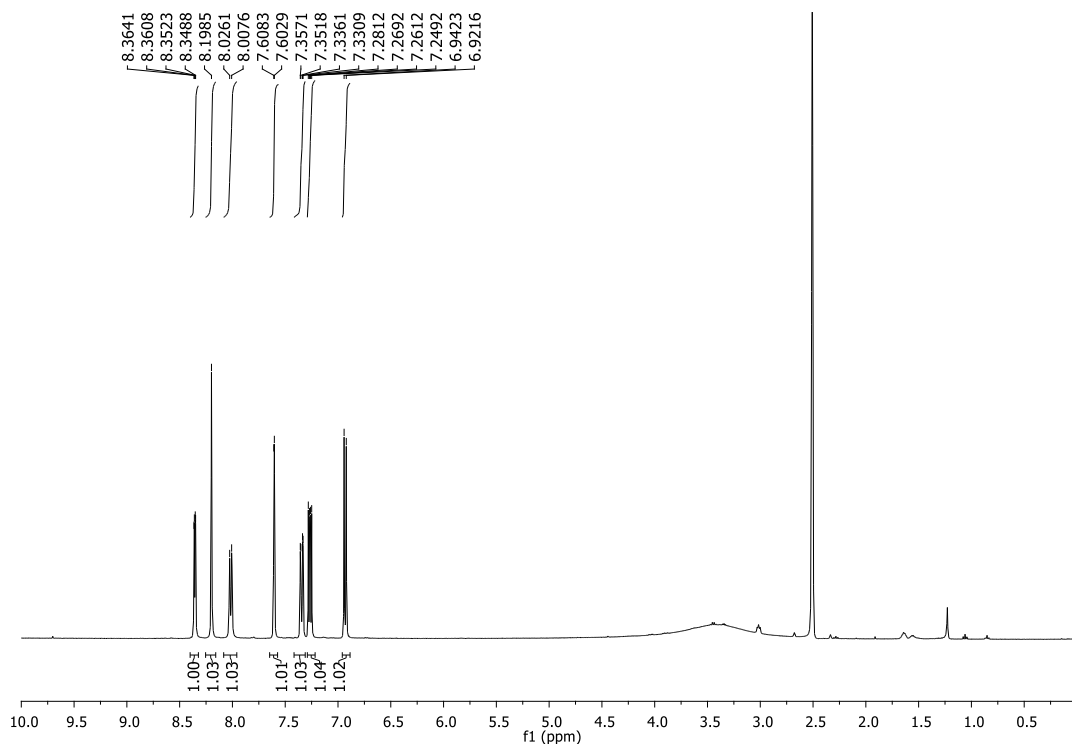


b)



Slika 39. a) Kromatogram i b) maseni spektar spoja **26**

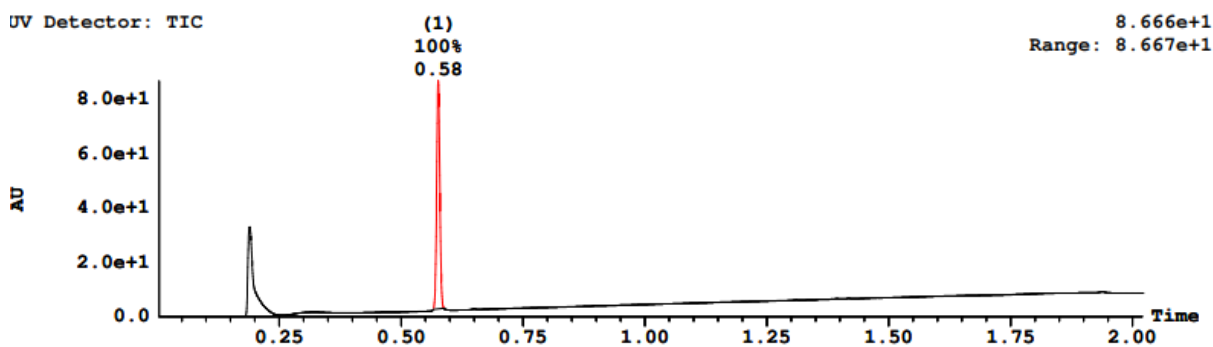
Struktura akrilnitrilnog derivata imidazo[4,5-*b*]piridina susptituiranog s dvije hidroksilne skupine u položajima 3 i 4 fenilne jezgre, **27**, potvrđena je ^1H NMR spektroskopijom (prilog 17) koja je prikazana na slici 40. Spoj je izoliran u iskorištenju od 63,6 %. U području velikih kemijskih pomaka 8,36, 7,34 i 7,27 ppm, nalaze se dubleti dubleta koji pripadaju protonima vezanim na imidazo[4,5-*b*]piridinskoj jezgri, što znači da se sva tri protona međusobno sprežu s konstantama sprezanja $J = 4,76$ Hz, $J = 8,38$ Hz i $J = 8,00$ Hz. Na 8,20 ppm nalazi se široki singlet koji pripada protonu NH skupine. Također, vide se i tri dubleta koji pripadaju protonima aromatske jezgre. Signali protona dvije OH skupine koje se nalaze na aromatskoj jezgri nisu detektirane u spektru zbog toga što padaju zajedno sa signalom vode jer dolazi do stvaranja vodikovih veza.



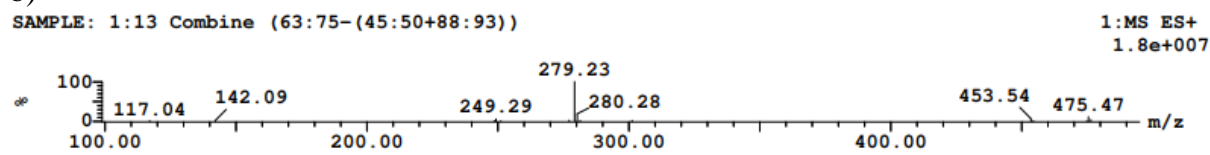
Slika 40. . ^1H NMR spektar spoja **27**

Struktura sintetiziranog spoja **27** dodatno je potvrđena i masenom spektrometrijom, a na slici 41a prikazan je kromatogramom te na slici 41b maseni spektar. Maseni spektar daje molekularni ion na 279,23 m/z čime je potvrđena struktura dobivenog spoja, dok se iz kromatograma vidi da je sintetizirani spoj visoke čistoće.

a)

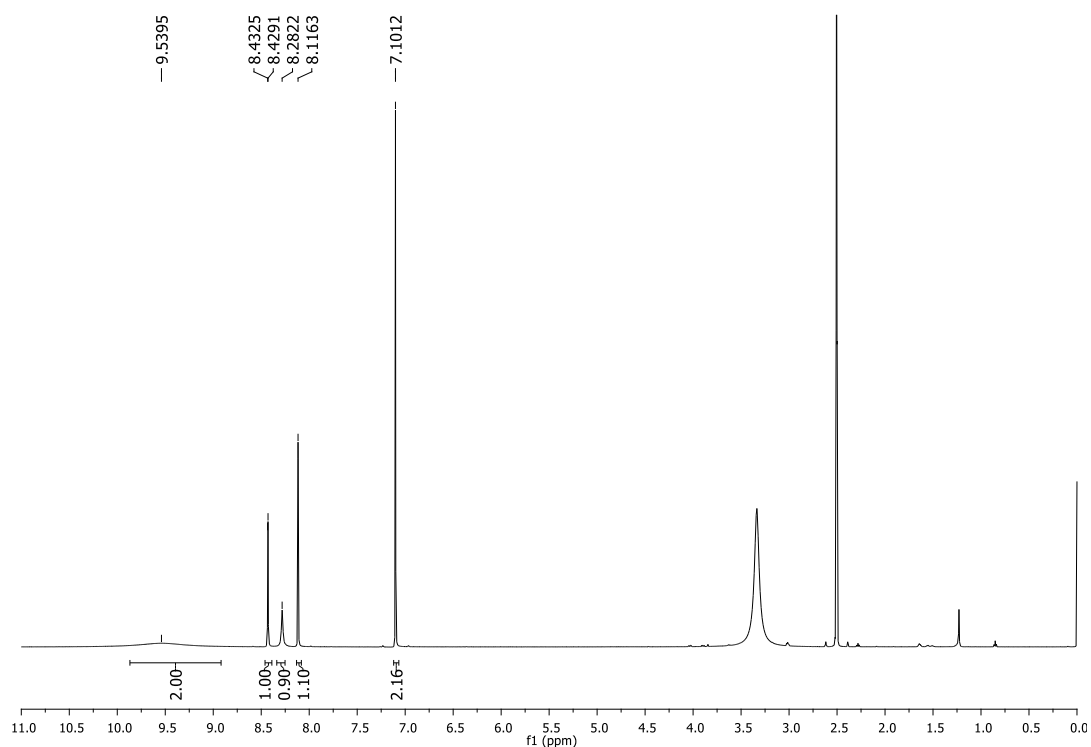


b)



Slika 41. a) Kromatogram i b) maseni spektar spoja **27**

Na slici 42 prikazan je ^1H NMR spektar derivata imidazo[4,5-*b*]piridina supstituiranog s tri hidroksilne skupine **40** koji je izoliran u iskorištenju od 42,7 %. U spektru su vidljivi široki singleti koji pripadaju protonima benzenske jezgre kao i singlet koji pripada protonu NH skupine. Također, na 9,54 ppm vidljiv je singlet koji pripada protonima dvije OH skupine, dok se proton treće OH skupine u spektru ne uočava iz istog razloga koji je naveden u prethodnom primjeru.

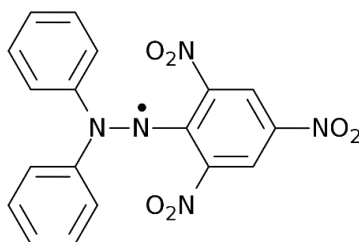


Slika 42. ^1H NMR spektar spoja **40**

4.3. Antioksidativna aktivnost derivata imidazo[4,5-*b*]piridina

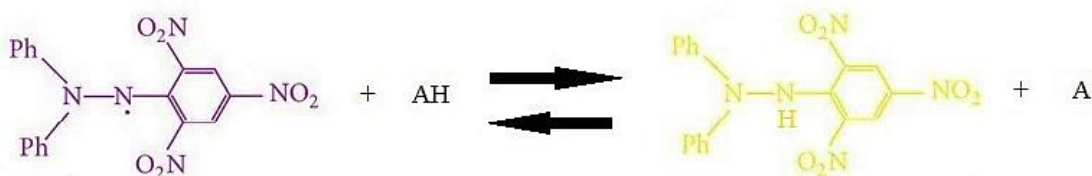
Antioksidativna aktivnost priređenih akrilnitrilnih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina **25-48** određena je korištenjem triju jednostavnih metoda DPPH, ABTS i FRAP u suradnji s doc. dr. sc. Kristinom Starčević s Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.⁸³

DPPH metodu je 1958. godine razvio M. Blois,⁸⁴ a koristi stabilni slobodni radikal, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) prikazan na slici 43.⁸⁵



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

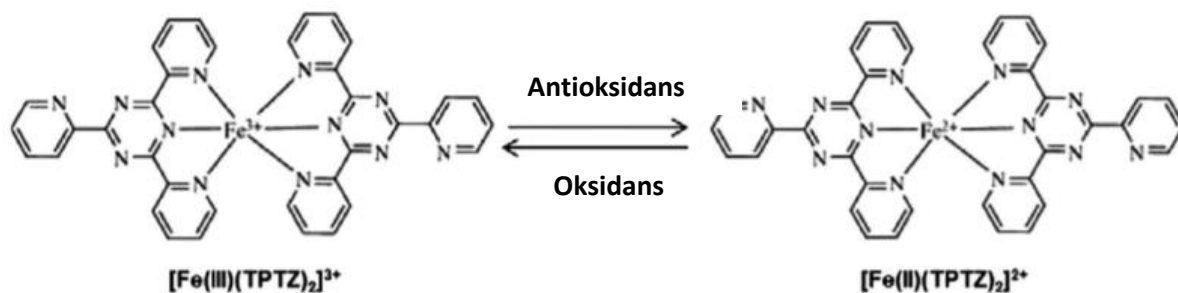
Ova metoda podrazumijeva "hvatanje" slobodnih DPPH \cdot radikala s ispitivanim antioksidansom, a temelji se na redukciji radikala pri čemu se mjeri apsorbancija otopine potencijalnog antioksidansa nakon reakcije s DPPH \cdot radikalom na 517 nm.⁸⁶ Prilikom reakcije antioksidansa s DPPH reagensom dolazi do redukcije nesparenog elektrona jednog dušikovog atoma u DPPH \cdot radikal, te gubitka intenzivno ljubičaste boje DPPH \cdot radikala i promjene boje u žutu (slika 44).⁸⁷



Slika 44. Promjena boje DPPH \cdot radikala pri doniranju vodikovog atoma od strane antioksidansa

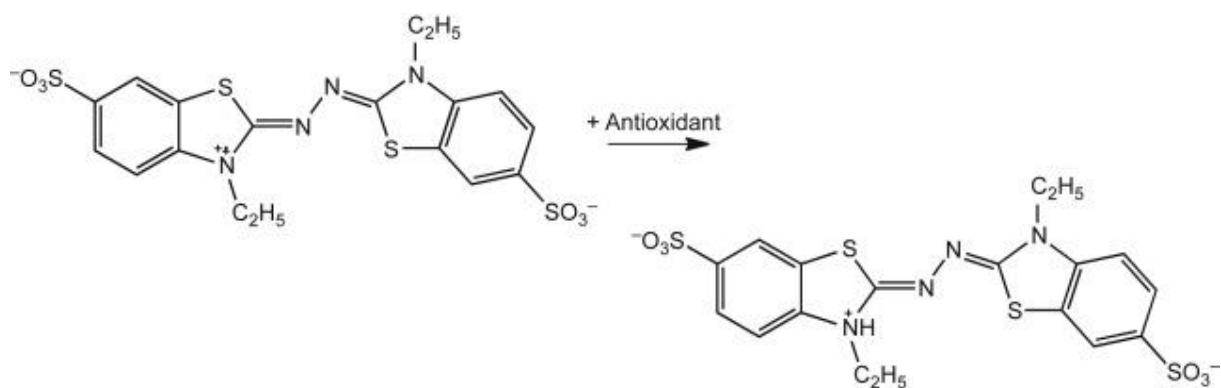
FRAP metoda (eng. *ferric reducing/antioxidant power*) je metoda mjerenja antioksidativne sposobnosti nekog spoja koja se temelji na mjerenju promjene u apsorbanciji pri 593 nm, kao posljedice formiranja plavo obojenog Fe^{II}-tripiridiltriazina (Fe^{II}-TPTZ) iz bezbojnog oksidiranog Fe^{III}-TPTZ oblika procesom prijenosa elektrona s antioksidansa (slika 45).⁸⁸ Promjena u apsorbanciji zatim se uspoređuje sa standardom kako bi se odredio antioksidativni potencijal ispitivanog uzorka.

Reakcija se događa pri niskom pH te je nespecifična. Intenzitet boje je proporcionalan redukcijskoj sposobnosti antioksidansa. Prednosti FRAP testa su jednostavnost, brzina, robusnost i pristupačnost – test nije skup i ne zahtjeva nikakvu specijalnu opremu, osim spektrofotometra. Nedostatak FRAP metode je taj što će svaka komponenta, neovisno o tome ima li antioksidativnu sposobnost ili ne, a posjeduje niži standardni potencijal od redoks-para $(\text{Fe}^{3+} - \text{TPTZ})/(\text{Fe}^{2+} - \text{TPTZ})$, dovest do redukcije kompleksa i tako povećati FRAP vrijednost uzorka.⁸⁹



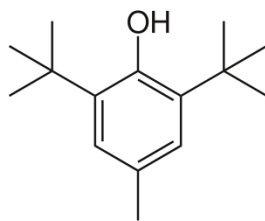
Slika 45. Reakcija prijelaza $[\text{Fe}(\text{III})(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ iona u $[\text{Fe}(\text{II})(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ ion

ABTS metoda se literaturno naziva i TEAC metoda (eng. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), a to je metoda temeljena na prijenosu elektrona koja je dobila ime prema radikalu 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazoline-6-sulfonska kiselina).^{90,91} Navedeni je radikal u otopini plavo-zelenog obojenja, a dodatkom i reakcijom s antioksidansom dolazi do posvijetljenja otopine što se mjeri na valnoj duljini 734 nm (slika 47).⁹²



Slika 47. Reakcija ABTS radikala s antioksidansom

Svim priređenim spojevima određena je antioksidativna aktivnost korištenjem svih triju metoda, a dobiveni su rezultati za spojeve koji pokazuju umjerenu i jako dobru antioksidativnu aktivnost prikazani u Tablici 1. Kao standardni antioksidans korišten je BHT (butilhidroksitoluen), derivat fenola čija je struktura prikazana na slici 48.



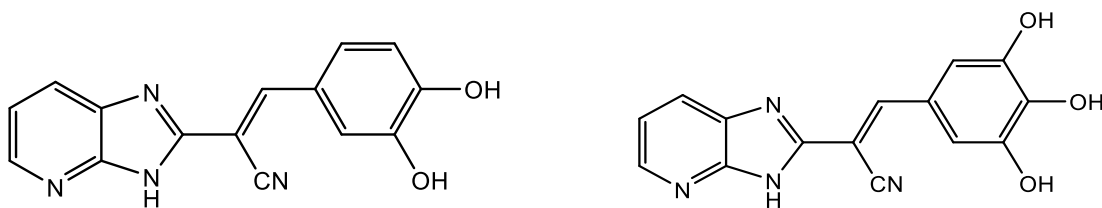
Slika 48. BHT standard

Tablica 1. Antioksidativna aktivnost ispitivanih derivata akrilonitrilnih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina

Spoj	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	X	IC ₅₀		FRAP mmolFe ²⁺ /mg spoja
						DPPH μM	ABTS μM	
						27	H	
28	OH	OH	OH	H	H	0,2093±8,91x10 ⁻⁶	12,985±0,81	4725,02±187,88
30	H	OH	H	CH ₃	H	49,875±6,53	880,6±120	22,43±3,1
31	H	OH	OH	CH ₃	H	3,774±1,36	20,945±3,29	4473,24±167,91
32	OH	OH	OH	CH ₃	H	0,785±3,42x10 ⁻²	15,545±5,71	3967,29±30,85
38	H	OH	H	H	Br	23,035±3,2	106,4±7,07	64,94±6,10
39	H	OH	OH	H	Br	3,732±0,431	100,04±26	4594,38±67,25
40	OH	OH	OH	H	Br	3,744±1,2	70,82±2,42	4166,82±27,67
43	H	OH	OH	CH ₃	Br	9,024±0,906	153,45±30	4223,83±18,28
44	OH	OH	OH	CH ₃	Br	11,325±0,163	33,215±0,898	2597,91±17,82
34	H	OH	H	<i>p</i> -OHPh	H	81,095±5,9	883±120	86,322±0,72
35	H	OH	OH	<i>p</i> -OHPh	H	1,91±0,266	23,54±0,580	2854,45±24,69
46	H	OH	H	<i>p</i> -OHPh	Br	101,3±23,3	101,3±0,707	155,44±1,79
47	H	OH	OH	<i>p</i> -OHPh	Br	1,063±0,332	31,66±0,49	2127,59±32,25
48	OH	OH	OH	<i>p</i> -OHPh	Br	1,474±0,288	54,32±1,92	1374,62±6,54
BHT	-	-	-	-	-	25±4.2	23,12±1,2	2089,34±55.98

Iz prikazanih rezultata može se utvrditi da neki od ispitanih derivata akrilonitrila pokazuju jako dobru antioksidativnu aktivnost koja je bolja od aktivnosti koju ima standard BHT te se stoga opravdano mogu smatrati vrlo obećavajućim antioksidansima. Na temelju dobivenih rezultata i SAR analize (eng. *Structure Activity Relationship*), može se zaključiti da na antioksidativnu aktivnost značajno utječe broj hidroksilnih skupina smještenih na fenilnom prstenu, kao i tip supstituenta na N atomu imidazolne jezgre i piridinskom prstenu.

S obzirom na sve korištene metode, može se zaključiti da najveći antioksidativni potencijal pokazuju 3,4-dihidroksi i 3,4,5-trihidroksi supstituirani derivati midazo[4,5-*b*]piridina **27** i **28** koji nemaju supstituent niti na piridinskoj jezgri niti na N atomu imidazolnog prstena. Njihova antioksidativna aktivnost je puno izraženija i veća kada se uspoređuje s BHT-om (DPPH: IC₅₀ 1,398 i 0,209 μM; ABTS: IC₅₀ 16,7 i 12,99 μM; FRAP: 5366,36 i 4725,02) te su ova dva spoja izabrana kao vodeći spojevi za daljnje optimiranje strukture u svrhu dizajna još potentnijeg i aktivnijeg antioksidansa (slika 49).



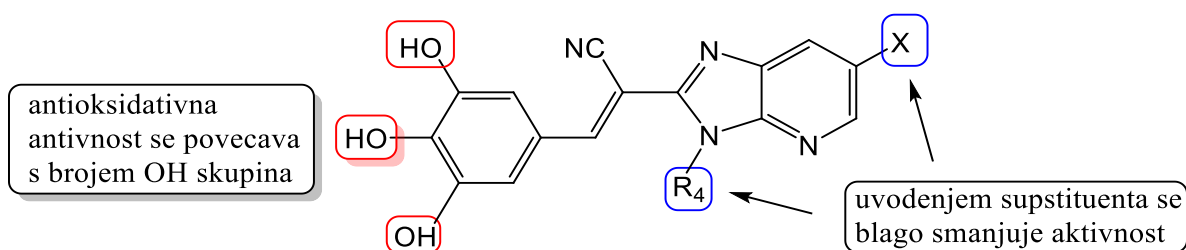
Slika 49. Strukture najaktivnijih spojeva **27** i **28** s obzirom na sve tri metode

Nadalje, razmatrajući rezultate dobivene DPPH metodom, može se utvrdi da jako izraženi antioksidativni potencijal ima i 3,4,5-trihidroksi supstituirani derivat s metilnom skupinom na N atomu imidazolne jezgre (IC₅₀ 0,785 μM) te 3,4-dihidroksi i 3,4,5-trihidroksi supstituirani derivat s *para*-hidroksifenilnom jezgrom na N atomu imidazolne jezgre i bromom na piridinskoj jezgri (IC₅₀ 1,063 i 1,474 μM). Prema DPPH metodi, uspoređujući nesupstituirane derivate i one koji imaju metilnu skupinu na N atomu imidazolne jezgre, može se zaključiti da malo slabiju aktivnost pokazuju N-metilni derivati. Sličan utjecaj ima i uvođenje broma na piridinsku jezgru.

S obzirom na rezultate dobivene ABTS metodom, vrlo dobru aktivnost pokazuju 3,4-dihidroksi i 3,4,5-trihidroksi supstituirani derivat s metilnom skupinom na N atomu imidazolne jezgre (IC₅₀ 20,945 i 15,55 μM) koja je bolja od aktivnosti standarda BHT. Ostali ispitani spojevi pokazuju umjerenu i slabiju aktivnost u usporedbi sa standardom.

Prema FRAP metodi, može se uočiti da najveći broj ispitanih spojeva pokazuje jako dobru antioksidativnu aktivnost, nekoliko puta veću od one standarda BHT. Tu se ističu 3,4-dihidroksi i 3,4,5-trihidroksi supstituirani derivati s metilnom skupinom na N atomu imidazolne jezgre (4473,24 i 3967,29), 3,4-dihidroksi i 3,4,5-trihidroksi supstituirani derivati s bromom na piridinskoj jezgri te 3,4-dihidroksi supstituirani derivat s metilnom skupinom na N atomu imidazolne jezgre i bromom na piridinskoj jezgri (4594,38; 4166,82 i 4223,82). Još nekoliko derivata pokazuje malo bolju aktivnost od BHT standarda.

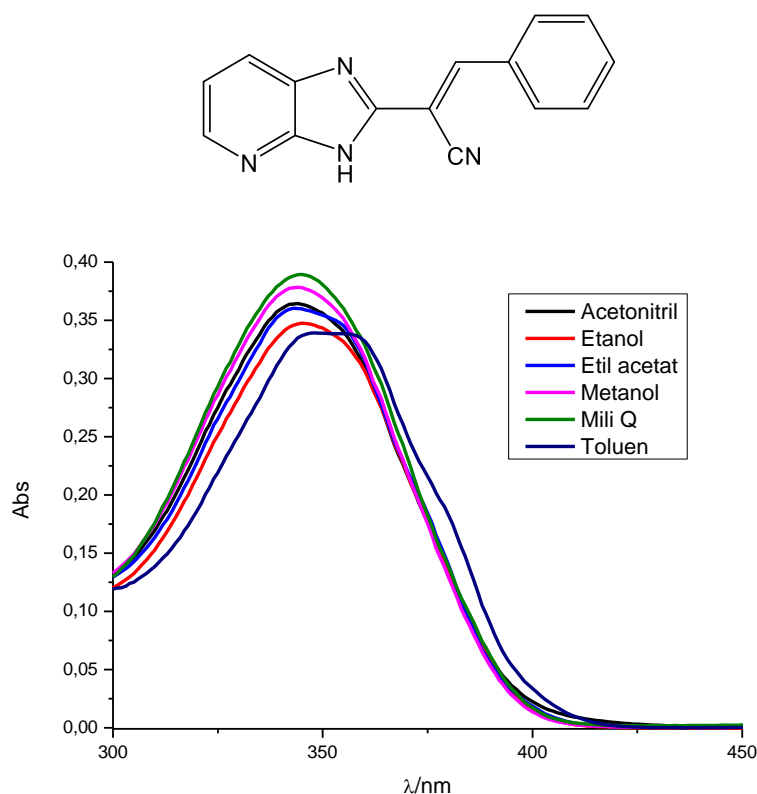
Zaključno, akrilonitrilni derivati imidazo[4,5-*b*]piridina supstituirani s različitim brojem hidroksilnih skupina na fenilnom prstenu, različitim supstuentima na N atomu imidazolne jezgre kao i na položaju 5 piridinske jezgre, pokazuju vrlo izraženi antioksidativni potencijal i aktivnost koja je bolja od aktivnosti korištenog standarda BHT. Daljnjim optimiranjem strukture najaktivnijih derivata mogu se dizajnirati još aktivnije molekule koje bi mogle naći potencijalnu primjenu kao antioksidansi. Iz SAR studije utvrđeno je da na antioksidativnu aktivnost značajno utječe broj hidroksilnih skupina kao i vrsta supstituenta na N atomu imidazolne jezgre i na položaju 5 piridinske jezgre (slika 50). Uvođenje četvrte hidroksilne skupine na fenilnoj jezgri vezanoj na N atom imidazolne jezgre nije poboljšalo antioksidativnu aktivnost.



Slika 50. SAR analiza ispitanih spojeva

4.4. Spektroskopska karakterizacija UV/Vis spektroskopijom

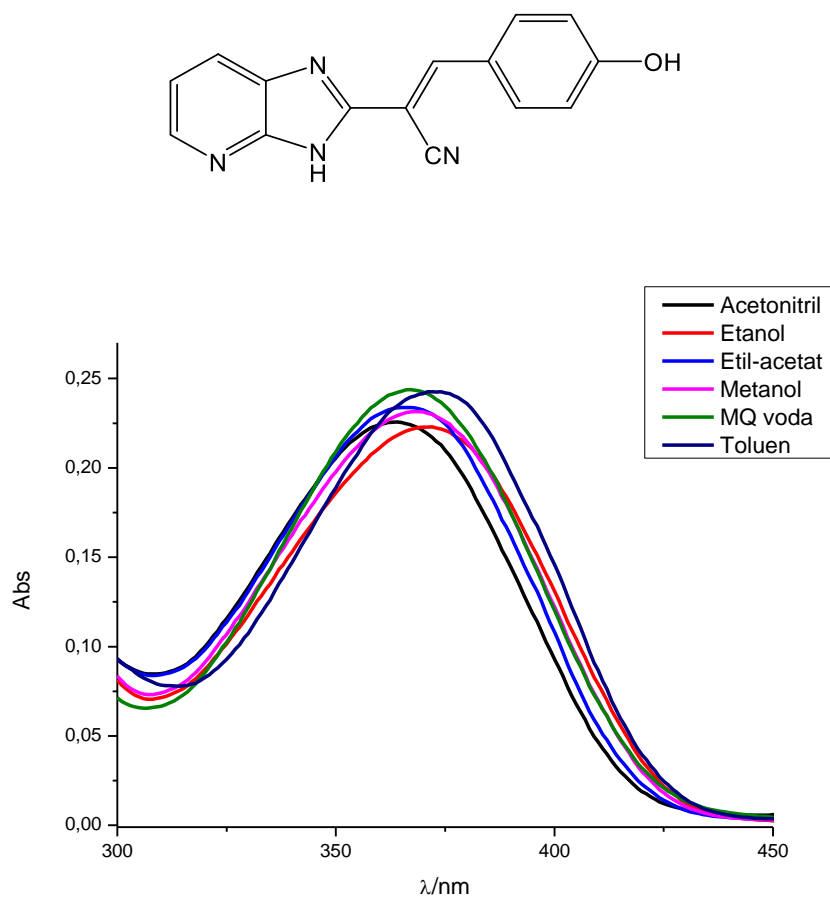
Kvantitativni UV/Vis apsorpcijski spektri derivata **25**, **26**, **27**, **28** i **32** snimljeni su pri istoj koncentraciji od 2×10^{-5} mol/dm³ u acetonitrilu, etanolu, etil-acetatu, metanolu, MQ vodi i toluenu. Navedena otapala razlikuju se po polarnosti (E_T), a svrha spektroskopske karakterizacije je ispitivanje utjecaja promjene polarnosti na spektroskopske karakteristike kako bi se ispitala mogućnost primjene ovakvih spojeva kao optičkih senzora.^{93,94} Na slici 51 prikazani su kvantitativni apsorpcijski spektri spoja **25**.



Slika 51. Apsorpcijski spektar spoja **25** u otapalima različite polarnosti

Usporedbom apsorpcijskih spektara spoja **25** u različitim otapalima u intervalu valnih duljina 300 do 450 nm, može se zaključiti da spoj **25** najveći intenzitet apsorpcije pokazuje u MQ vodi, kao najpolarnijem otapalu, a najmanji u toluenu, najmanje polaranom otapalu. U toluenu je vidljiv batokromni pomak u odnosu na MQ vodu za 6 nm, dok su u ostalim otapalima pomaci, u odnosu na MQ vodu, gotovo neprimjetni. Maksimumi apsorpcije najizraženiji su kod polarnijih otapala kao što su voda i metanol. Intenzitet apsorpcije spoja **25** u različitim otapalima raste u nizu: toluen < etanol < etil-acetat < acetonitril < metanol < MQ voda.

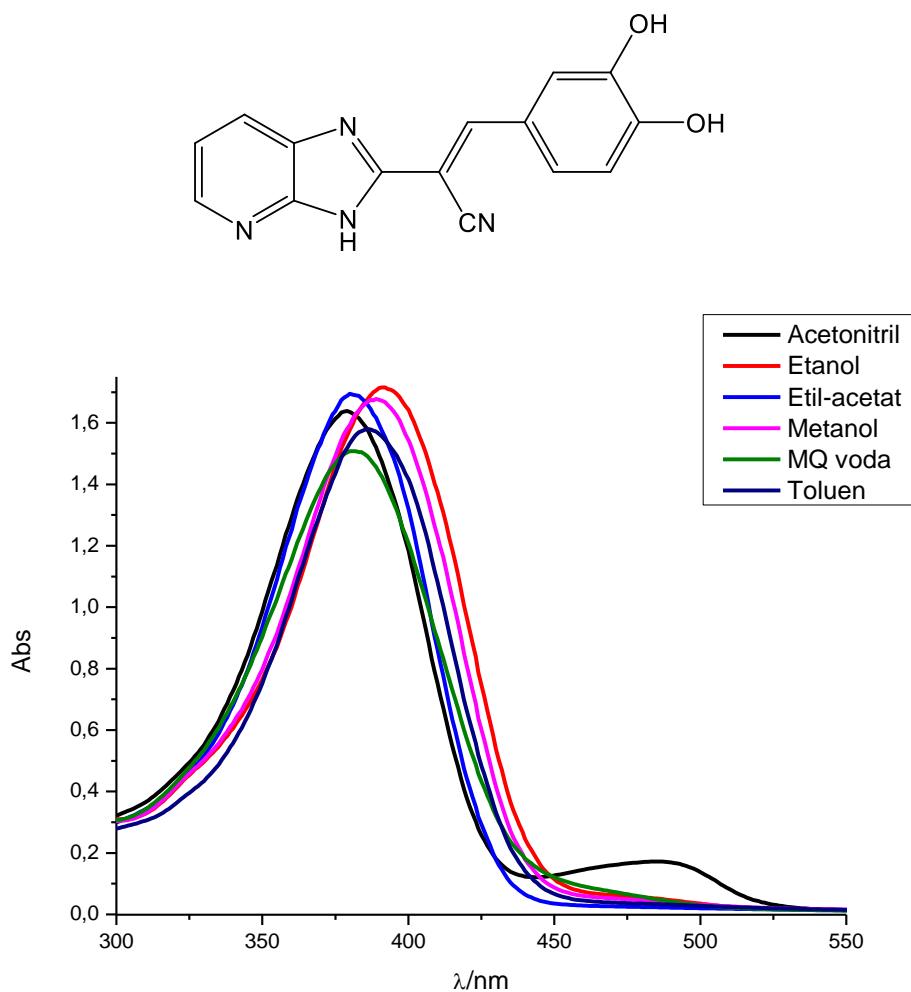
Na slici 52 prikazani su kvantitativni apsorpcijski spektri spoja **26**.



Slika 52. Apсорpcijski spektar spoja **26** u otapalima različite polarnosti

Usporedbom apсорpcijskih spektara spoja **26** u različitim otapalima u intervalu valnih duljina 300 do 450 nm, može se zaključiti da spoj **26** najveći intenzitet apсорbancije pokazuje u MQ vodi i toluenu, a najmanji u etanolu. U odnosu na MQ vodu, vidljivi su mali batokromni pomaci toluena (5 nm), etanola (3 nm) i metanola (2 nm). Također, uočavaju se i hispokromni pomaci acetonitrila za 4 nm i etil-acetata za 2 nm u odnosu na MQ vodu. Intenzitet apсорbancije spoja **26** u različitim otapalima raste u nizu: etanol < acetonitril < metanol < etil-acetat < toluen, MQ voda.

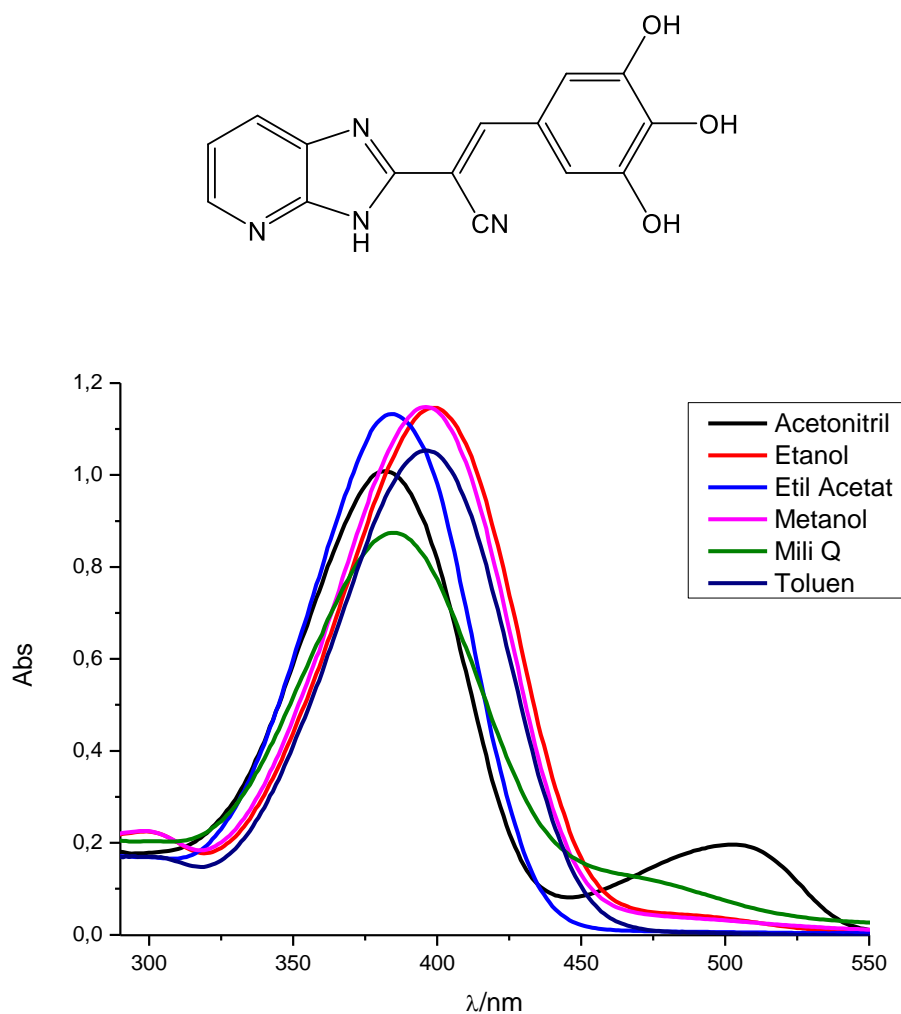
Na slici 53 prikazani su kvantitativni apsorpcijski spektri spoja **27**.



Slika 53. Apсорpcijski spektar spoja **27** u otapalima različite polarnosti

Na temelju dobivenih spektara, možemo zaključiti da najveći apsorpcijski intenzitet spoj pokazuje u etanolu, dok je najniži vidljiv u MQ vodi (hipokromni pomak). U odnosu na MQ vodu, vidljivi su batokromni pomaci maksimuma apsorbanije u slučaju polarnih otapala metanola i etanol za 8 nm, odnosno 11 nm, dok su u slučaju manje polarnih otapala etil-acetata i acetonitrila vidljivi hipsokromni pomaci maksimuma apsorbanija za 1 nm, odnosno 2 nm. U acetonitrilu se javlja dodatni maksimum apsorbanije na 486 nm koji je slabijeg intenziteta od ostalih. Intenzitet apsorbanije spoja **27** u različitim otapalima raste u nizu: MQ voda < toluen < acetonitril < metanol < etil-acetat < etanol.

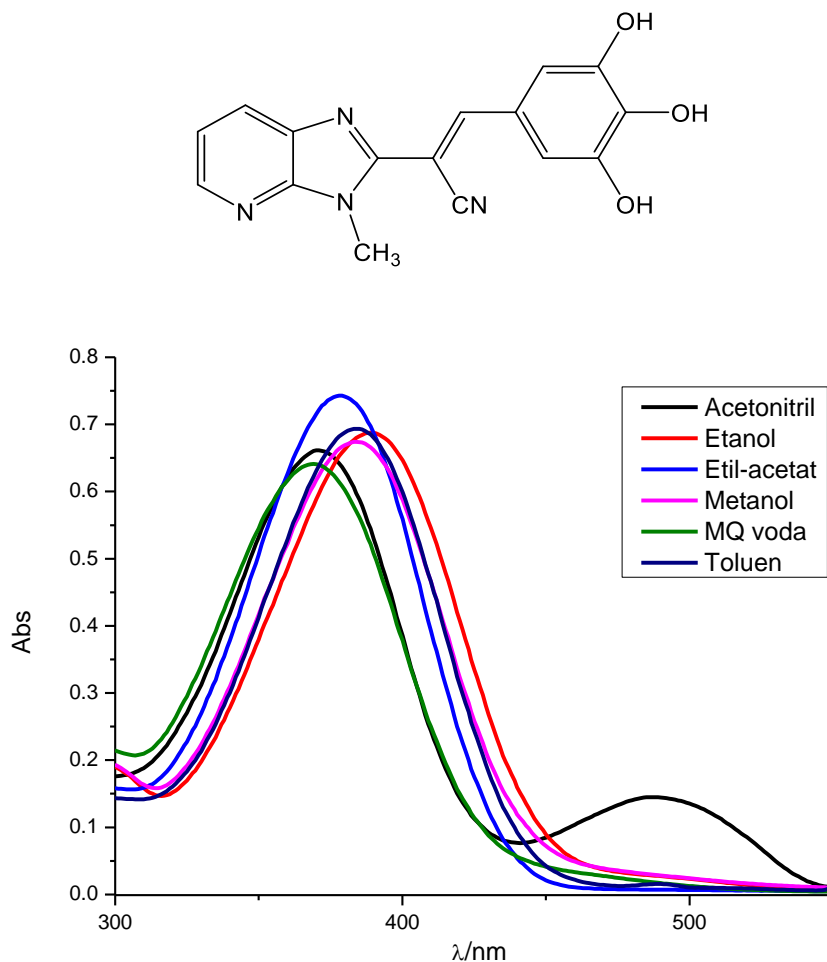
Na slici 54 prikazani su kvantitativni apsorpcijski spektri spoja **28** u različitim otapalima.



Slika 54. Apсорpcijski spektar spoja **28** u otapalima različite polarnosti

Uspoređujući apсорpcijske spektre spoja **28** u rasponu valnih duljina od 300 do 550 nm u različitim otapalima, može se zaključiti da spoj **28** najmanji intenzitet apсорbancije pokazuje u MQ vodi, a najveći u etanolu i metanolu gdje postoji izraženi hiperkromni pomak. Spoj **28** u acetonitrilu (3 nm) i etil-acetatu (1 nm) pokazuje male hipsokromne pomake maksimuma apсорbancije, te nešto veće batokromne pomake, u etanolu (14 nm), metanolu (11 nm) i toluenu (11 nm), u odnosu na MQ vodu. Intenzitet apсорbancije spoja **28** u različitim otapalima raste u nizu: MQ voda < acetonitril < toluen < etil-acetat < metanol, etanol.

Na slici 55 prikazani su kvantitativni apsorpcijski spektri spoja **32** u otapalima različite polarnosti



Slika 55. Apsorpcijski spektar spoja **32** u otapalima različite polarnosti

Usporedbom apsorpcijskih spektara spoja **32** u različitim otapalima u intervalu valnih duljina 300 do 550 nm, može se zaključiti da spoj **32** najveći intenzitet apsorpcije pokazuje u etil-acetatu, a najmanji u MQ vodi. Spoj **32** u svim otapalima pokazuje batokromne pomake maksimuma apsorpcije u odnosu na MQ vodu. Najveći batokromni pomak maksimuma apsorpcije prisutan je u etanolu za 21 nm, dok je u toluenu 16 nm, metanolu 14 nm, etil-acetatu 9 nm i acetonitrilu 1 nm. Intenzitet apsorpcije spoja **32** u različitim otapalima raste u nizu: MQ voda < acetonitril < metanol < etanol < toluen < etil-acetat.

U tablici 2 prikazani su spektroskopski podaci za spojeve **25**, **26**, **27**, **28** i **32** u različitim otapalima.

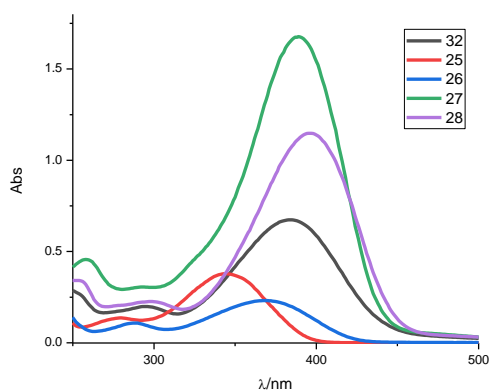
Tablica 2. UV/Vis podaci spojeva **25, 26, 27, 28** i **32** u različitim otapalima

Spoj	Otapalo	toluen	etil-acetat	acetonitril	etanol	metanol	MQ voda
	$E_T / 30$	33,9	38,1	45,6	51,9	55,4	63,1
25	$\epsilon \times 10^3 / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$	18,6	19,4	19,4	19,4	19,4	19,5
	λ / nm	351	344	342	346	343	345
26	$\epsilon \times 10^3 / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$	10,7	11,3	10,9	10,9	11,2	11,3
	λ / nm	372	365	363	370	369	367
27	$\epsilon \times 10^3 / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$	78,5	84,5	81,9	86,0	83,5	75,5
	λ / nm	386	380	379	392	389	381
28	$\epsilon \times 10^3 / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$	52,5	56,5	50,0	57,5	57,5	43,5
	λ / nm	396	384	382	399	396	385
32	$\epsilon \times 10^3 / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$	34,5	37,0	33,0	34,0	33,5	32,0
	λ / nm	385	378	370	390	383	369

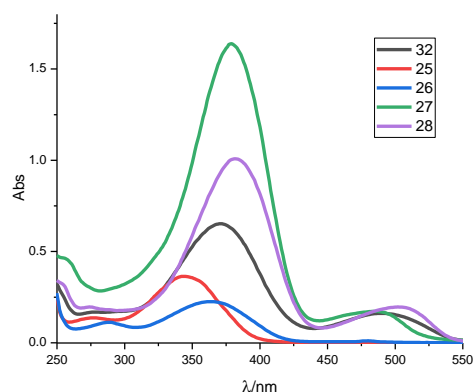
Analizom svih dobivenih rezultata može se utvrditi da vrsta otapala utječe na spektroskopske karakteristike ispitivanih spojeva (solvatokromizam). Solvatokromizam ima dvojadi utjecaj, može biti pozitivan i negativan. Polarnije otapalo većinom uzrokuje negativan solvatokromizam što se očituje hipsokromnim pomakom dok pozitivni solvatokromizam izaziva batokromni pomak. Polarnost otapala izražava se pomoću empirijskog parametra $E_T(30)$. Što je otapalo manje polarno, imat će manje $E_T(30)$.

Na slici 56 prikazani su sumirani spektri svih spojeva u četiri otapala; dva polarna (MQ voda i metanol) i dva manje polarna (acetonitril i toluen). Svi apsorpcijski spektri snimani su pri istim uvjetima i istoj koncentraciji. Ono što se može zaključiti iz prikazanih spektara je da **struktura ispitivanih spojeva te vrsta i broj supstituenata značajno utječe na spektroskopske karakteristike.**

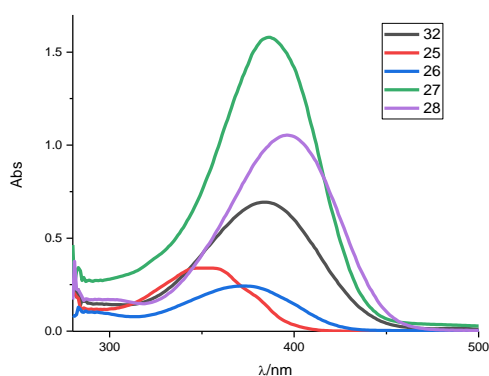
a) metanol



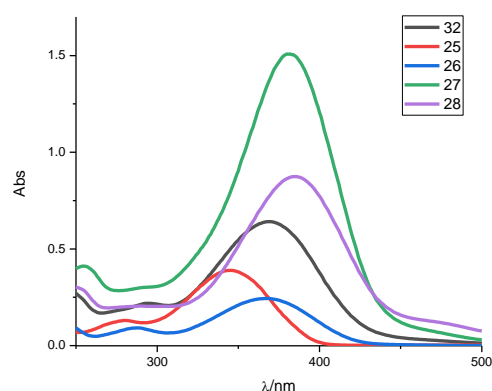
b) acetonitril



c) toluen



d) MQ voda



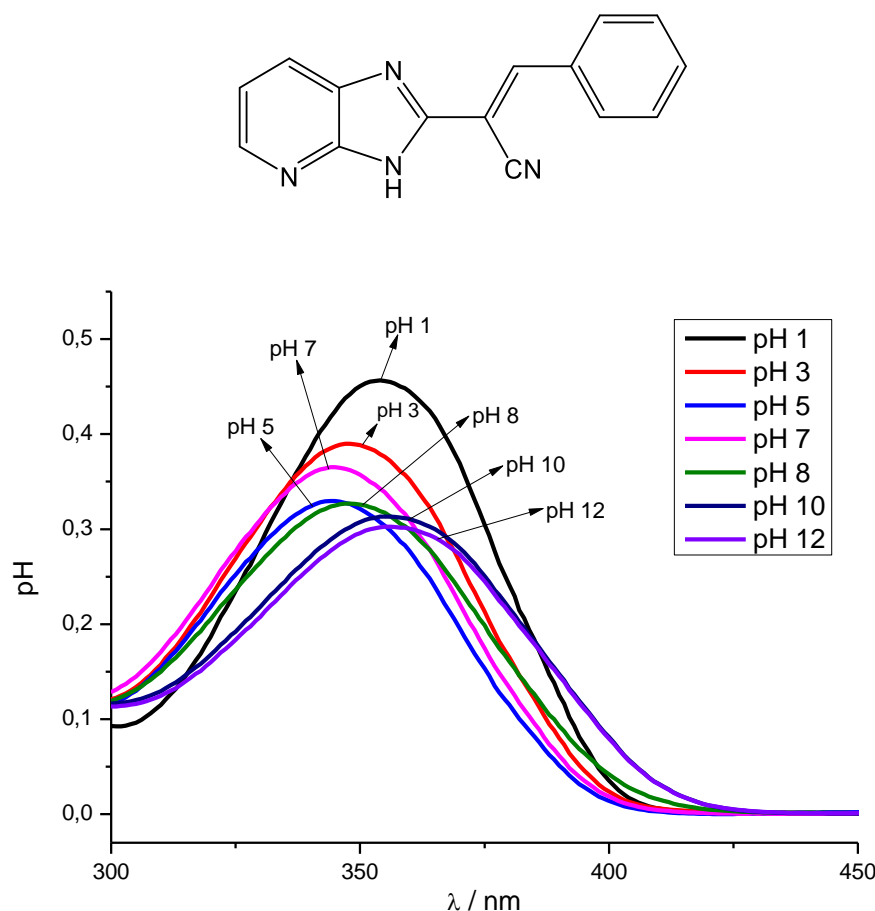
Slika 56. Apsorpcijski spektri svih spojeva u metanolu, acetonitrilu, toluenu i MQ vodi

U svim navedenim otapalima, nesupstituirani derivat akrilonitrila **25** pokazuje hipsokromni pomak maksimuma apsorbancije u odnosu na ostale spojeve. Monohidroksi supstituirani derivat **26** (plava boja) u odnosu na nesupstituirani derivat **32** pokazuje hipokromni pomak intenziteta apsorbancije te batokromni pomak maksimuma apsorbancije. Najizraženiji hiperkromni pomak intenziteta apsorbancije pokazuje dihidroksi supstituirani derivat **27**, dok trihidroksi supstituirani derivat **28** u odnosu na dihidroksi derivat **27** pokazuje hipokromni pomak intenziteta apsorbancije i blagi batokromni pomak maksimuma apsorbancije. N-metil trihidroksi supstituirani derivat **32** u odnosu na analog **28** koji ima slobodnu NH skupinu na imidazolnom prstenu pokazuje hipokromni pomak intenziteta apsorbancije kao i blagi hipsokromni pomak maksimuma apsorbancije.

4.5. Utjecaj pH na spektroskopska svojstva ispitivanih spojeva

Promjene spektroskopskih svojstava spojeva **25**, **26**, **27**, **28** i **32** ovisno o različitim pH vrijednostima otopina pufera ispitivane su UV/Vis spektroskopijom. Apsorpcijski spektri spojeva **25**, **26**, **27**, **28** i **32** snimani su pri koncentraciji 2×10^{-5} mol/dm³ u otopinama pufera različitih pH vrijednosti od 1 do 13.^{95,96} Ova ispitivanja provedena su u svrhu moguće primjene priređenih spojeva kao optičkih pH senzora za detekciju pH u otopinama.

Apsorpcijski spektri spoja **25** u otopinama pufera različitih pH vrijednosti prikazani su na slici 57.

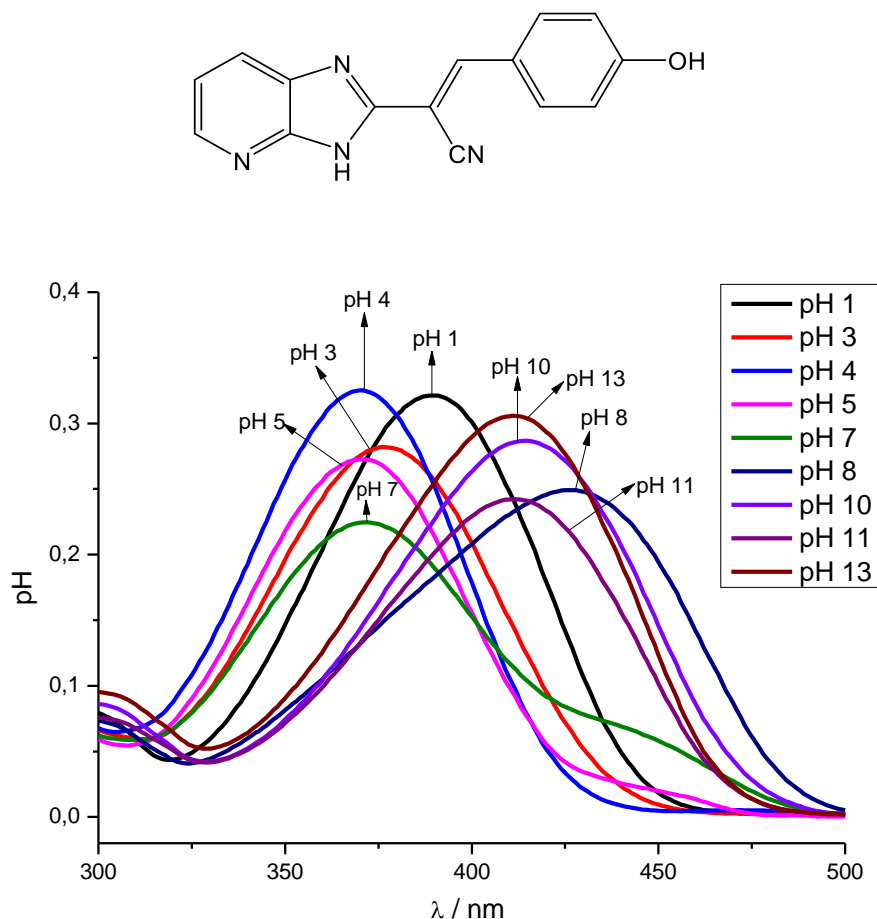


Slika 57. Apsorpcijski spektri spoja **25** u otopinama pufera različitih pH vrijednosti

Uspoređujući dobivene krivulje apsorpcijskog spektra u intervalu valnih duljina od 300 do 450 nm, može se zaključiti da spoj **25** najveći intenzitet apsorpcije pokazuje u otopini pufera pH vrijednosti 1. Pri pH vrijednosti 12, vidljiv je najmanji intenzitet apsorpcije i najizraženiji hipokromni pomak intenziteta.

Pri pH 1, vidljiv je izrazit hiperkromni pomak u odnosu na ostale pH vrijednosti. Porastom pH, intenzitet apsorbancije se smanjuje, da bi pri visokim pH vrijednostima (pH 10 i 12) apsorbancija bila najniža. Porastom pH na 12 dolazi do batokromnog pomaka maksimuma apsorbancija na 357 nm.

Na slici 58 prikazane su apsorpcijske pH krivulje spoja **26**.

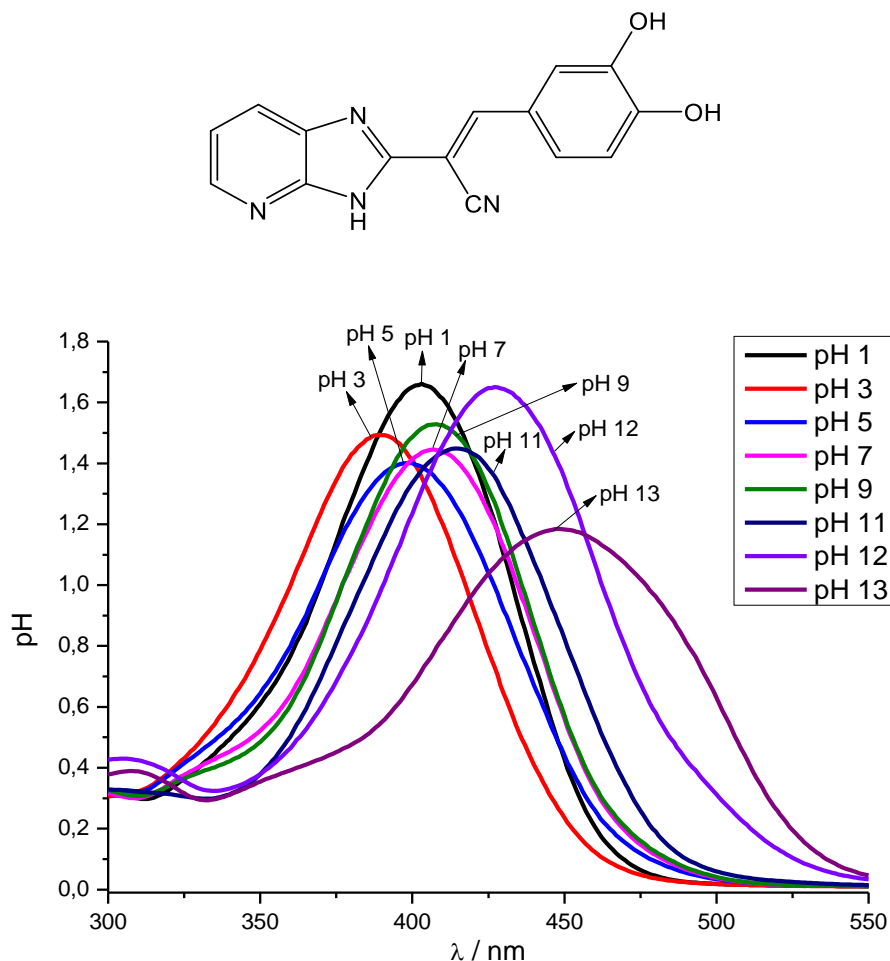


Slika 58. Apсорpcijski spektri spoja **26** u otopinama pufera različitih pH vrijednosti

Uspoređujući dobivene krivulje apсорpcijskog spektra u intervalu valnih duljina od 300 do 500 nm, može se zaključiti da spoj **26** najveći intenzitet apsorbancije pokazuje u otopini pufera pH vrijednosti 1 i 4. Intenzitet apsorbancije od pH 5 opada, a od pH 8 ponovno raste, uz vrlo izraženi batokromni pomak maksimuma apsorbancije na 427 nm. Pri pH vrijednosti 7, vidljiv je najmanji intenzitet apsorbancije i blagi hipsokromni pomak maksimuma apsorbancije na 372 nm. U odnosu na pH 1, pri pH 3 i 4, prisutan je hipsokromni pomak maksimuma apsorbancije.

Pri višim pH vrijednostima, izraženiji je batokromni pomak maksimuma apsorbancije, dok je pri nižim pH vrijednostima izraženiji hipsokromni pomak maksimuma apsorbancije.

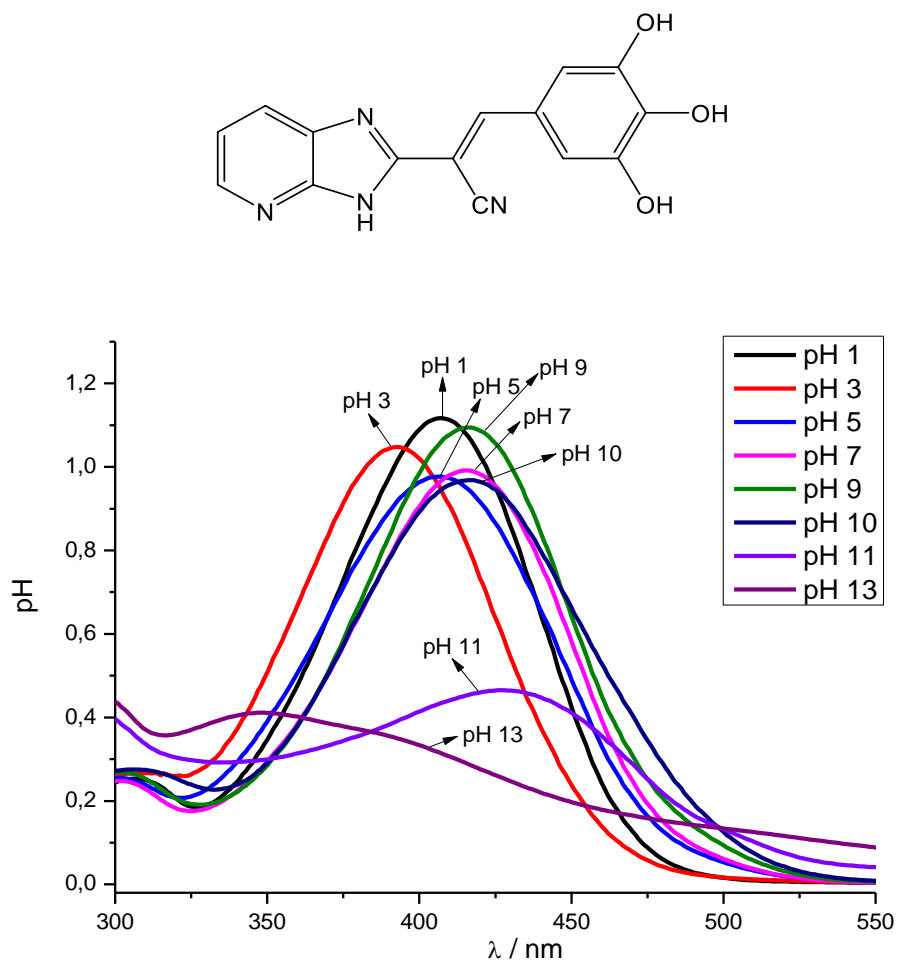
Na slici 59 prikazane su apsorpcijske pH krivulje spoja **27**.



Slika 59. Apсорpcijski spektri spoja **27** u otopinama pufera različitih pH vrijednosti

Uspoređujući dobivene krivulje apсорpcijskog spektra u intervalu valnih duljina od 300 do 550 nm, može se zaključiti da spoj **27** najveći intenzitet apsorbancije pokazuje u otopini pufera pH vrijednosti 1 i 12. Intenzitet apsorbancije od pH 1 opada uz pojavu hipsokromnom pomaka maksimuma apsorbancije, a pri pH 13 vidljiv je najmanji intenzitet apsorbancije te najizraženiji batokromni pomak maksimuma apsorbancije na 449 nm. Pri pH 3 uočava se najveći hipsokromni pomak maksimuma apsorbancije na 388 nm. Pri višim pH vrijednostima (od pH 9), općenito su prisutni batokromni pomaci maksimuma apsorbancije, dok su kod nižih pH vrijednosti (do pH 7) prisutni hipsokromni pomaci maksimuma apsorbancije.

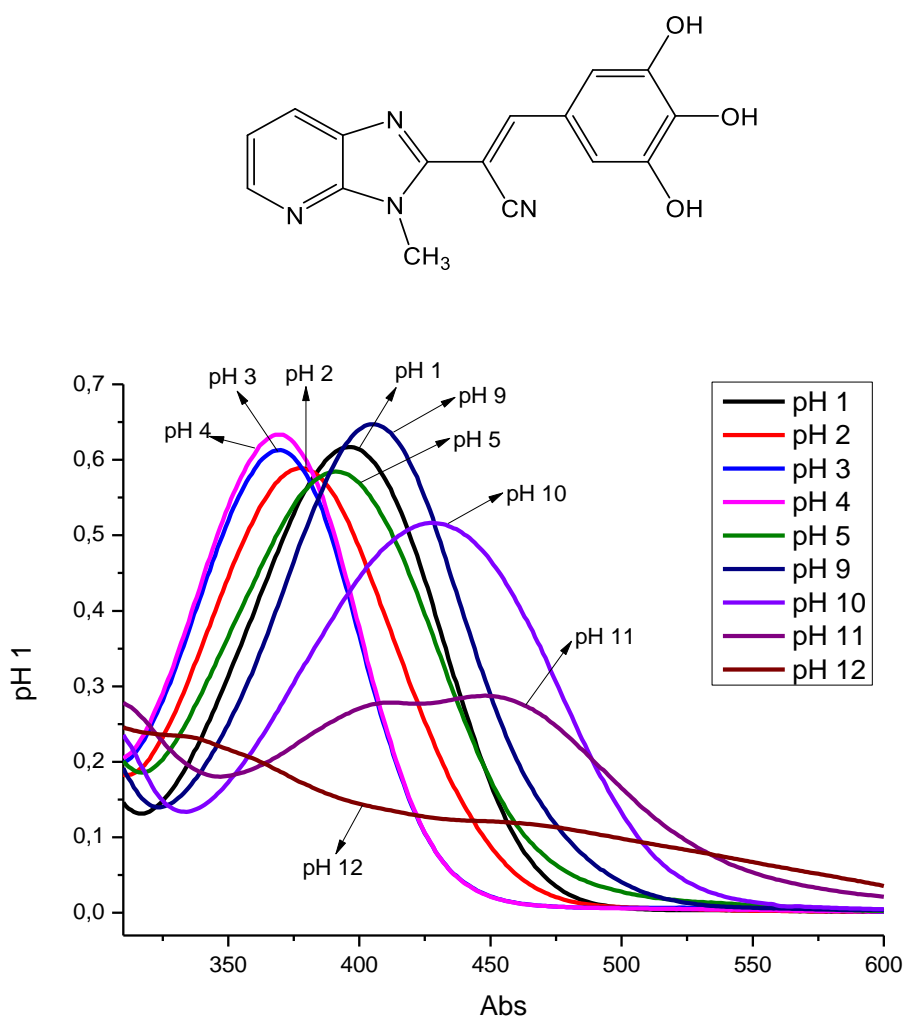
Na slici 60 prikazane su apsorpcijske pH krivulje spoja **28**.



Slika 60. Apсорpcijski spektri spoja **28** u otopinama pufera različitih pH vrijednosti

Uspoređujući dobivene krivulje apсорpcijskog spektra u intervalu valnih duljina od 300 do 550 nm, može se zaključiti da spoj **28** najveći intenzitet apсорbancije pokazuje u otopini pufera pH vrijednosti 1. Intenzitet apсорbancije zatim opada, kod pH 3 dolazi i do hipsokromnog pomaka maksimuma apсорbancije na 392 nm, a u lužnatim otopinama, od pH 11, vidljiv je značajan pad intenziteta apсорbancije tj. vrlo izraženi hipokromni pomak intenziteta apсорbancije uz batokromni pomak maksimuma apсорbancije na 429 nm. Pri nižim pH vrijednostima prisutni su hipsokromni pomaci maksimuma apсорbancije, dok prema višim pH vrijednostima dolazi do batokromnih pomaka maksimuma apсорbancije.

Na slici 61 prikazane su apsorpcijske pH krivulje spoja **32**.



Slika 61. Apсорpcijski spektri spoja **32** u otopinama pufera različitih pH vrijednosti

Uspoređujući dobivene krivulje apсорpcijskog spektra u intervalu valnih duljina od 300 do 600 nm, može se zaključiti da spoj **32** najveći intenzitet apсорbancije pokazuje u otopini pufera pH vrijednosti 9 s batokromnim pomakom maksimuma apсорbancije na 405 nm. Od pH 10 apсорbancija značajno opada, da bi kod pH 11 i 12 bila najniža. Kod pH 11 nastaje apсорpcijska krivulja koja ima dva maksimuma apсорbancije na 408 i 451 nm. Pri nižim pH vrijednostima prisutni su hipsokromni pomaci maksimuma apсорbancije, a najizraženiji hipsokromni pomak vidljiv je pri pH 3 i 4 na 369 nm. U odnosu na pH 1, 3 i 4, uočava se blagi hipokromni pomak maksimuma apсорbancije pri pH 2 i 5.

Da bi se procijenila kiselo-bazna svojstva ispitivanih spojeva, procijenjene su njihove pK_a vrijednosti vodenih otopina iz dobivenih apsorpcijskih krivulja pH titracija. Analiza se bazira na optičkom određivanju koncentracije kisele (HA) i bazične (A^-) forme preko Henderson-Hasselbalchove jednadžbe:⁹⁷

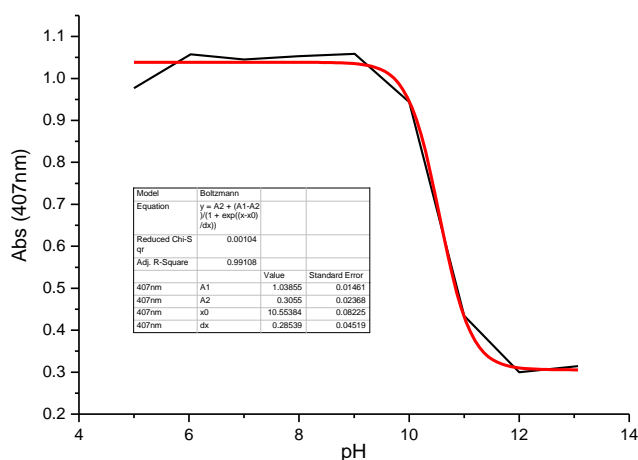
$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Vrijednosti pK_a određene su računanjem iz eksperimentalnih podataka uz korištenje sigmoidalne Boltzmanove krivulje (slika 62) te su vrijednosti prikazane u tablici 3.

Tablica 3. Eksperimentalne vrijednost pK_a

spoj	32	25	26	27	28
pK_a	10,28 (395 nm)	2,99 (354 nm)	7,13 (372 nm)	11,01 (447 nm)	10,55 (407 nm)
r^2	0,986	0,970	0,971	0,900	0,991

Na slici 62 prikazana je apsorpcijska pH titracijska krivulja za spoj **28** iz koje je dobivena eksperimentalna vrijednost pK_a u iznosu od 10,55.



Slika 62. Apсорpcijska pH titracijska krivulja za spoj **28**

Na temelju svih dobivenih rezultata ispitivanja spektroskopskih svojstava odabranih spojeva **25-28** i **32** kod različitih pH vrijednosti pufera od pH 1 do pH 13, **može se zaključiti da svi spojevi pokazuju značajne promjene spektroskopskih karakteristika prilikom promjene pH te su stoga obećavajuće molekule za potencijalnu primjenu kao pH senzori za određivanje pH u otopinama.** Na spektroskopska svojstva značajno utječe broj hidroksilnih skupina na fenilnom prstenu kao i vrsta supstituenta na NH skupini imidazolne jezgre.

5. Zaključak

- U ovom radu priređeni su sljedeći spojevi: (*E*)-2-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-fenilakrilonitril **25**, (*E*)-2-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(4-hidroksifenil)akrilonitril **26**, (*E*)-2-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4-dihidroksifenil)akrilonitril **27**, (*E*)-2-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4,5-trihidroksifenil)akrilonitril **28**, (*E*)-2-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-fenilakrilonitril **29**, (*E*)-3-(4-hidroksifenil)-2-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitrila **30**, (*E*)-3-(3,4-dihidroksifenil)-2-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitril **31**, (*E*)-3-(3,4,5-trihidroksifenil)-2-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitril **32**, (*E*)-3-(4-hidroksifenil)-2-(3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitril **34**, (*E*)-3-(3,4-dihidroksifenil)-2-(3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitril **35**, (*E*)-2-(6-brom-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-fenilakrilonitril **37**, (*E*)-2-(6-brom-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(4-hidroksifenil)akrilonitril **38**, (*E*)-2-(6-brom-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4-dihidroksifenil)akrilonitril **39**, (*E*)-2-(6-brom-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4,5-trihidroksifenil)akrilonitril **40**, (*E*)-2-(6-brom-3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-fenilakrilonitril **41**, (*E*)-2-(6-brom-3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(4-hidroksifenil)akrilonitril **42**, (*E*)-2-(6-brom-3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4-dihidroksifenil)akrilonitril **43**, (*E*)-2-(6-brom-3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4,5-trihidroksifenil)akrilonitril **44**, (*E*)-2-(6-brom-3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-fenilakrilonitril **45**, (*E*)-2-(6-brom-3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(4-hidroksifenil)akrilonitril **46**, (*E*)-2-(6-brom-3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4-dihidroksifenil)akrilonitril **47**, (*E*)-2-(6-brom-3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4,5-trihidroksifenil)akrilonitril **48**.
- Mikrovalovima potpomognutim reakcijama aminacije iz polaznih spojeva 2-klor-3-nitropiridina **1** i 5-brom-2-klor-3-nitropiridina **2**, priređeni su amino supstituirani piridini **5-8**.
- Redukcijom nitro skupine u amino skupinu na piridnskoj jezgri, spojeva **5-8**, priređeni su odgovarajući diamino supstituirani derivati piridina **9-14**.
- Reakcijom ciklizacije spojeva **9-14** s etil-cijanoacetatom, priređeni su odgovarajući 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridini **15-20**.
- Aldolnom kondenzacijom u kojoj dolazi do reakcije između priređenih 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridinskih derivata **15-20** i odabranih aromatskih benzaldehida **21-24** priređeni su akrilonitrilni derivati imidazo[4,5-*b*]piridina **25-48**.

- Strukture svih novosintetiziranih spojeva potvrđene su ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom, a nekim je spojevima struktura dodatno okarakterizirana i masenom spektrometrijom.
- Spojevima **25-48** ispitana je antioksidativna aktivnost korištenjem ABTS, DPPH i FRAP metodama.
- S obzirom na sve korištene metode, najveći antioksidativni potencijal pokazuju 3,4-dihidroksi i 3,4,5-trihidroksi supstituirani derivati midazo[4,5-*b*]piridina **27** i **28** koji nemaju supstituent niti na piridinskoj jezgri niti na N atomu imidazolnog prstena te su značajnije aktivniji od korištenog standardnog antioksidansa BHT.
- Veliki broj spojeva pokazao je izraženiju antioksidativnu aktivnost u sve tri korištene metode u odnosu na standardni antioksidans BHT.
- S obzirom na dobivene rezultate, može se zaključiti da priređeni hidroksi supstituirani **akrilonitrilni derivati imidazo[4,5-*b*]piridina pokazuju jako veliki potencijal kao potencijalni antioksidansi.**
- Spektroskopska karakterizacija derivata **25, 26, 27, 28** i **32** provedena je korištenjem UV/Vis spektroskopijom u otapalima različite polarnosti pri istoj koncentraciji.
- Iz dobivenih rezultata može se uočiti značajan utjecaj položaja i broja OH skupina na spektroskopska svojstva ispitivanih spojeva.
- Promjene spektroskopskih svojstava spojeva **25, 26, 27, 28** i **32**, ovisno o različitim pH vrijednostima otopina pufera (pH 1 do 13), ispitivane su UV/spektroskopijom.
- Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da svi spojevi pokazuju značajne promjene spektroskopskih karakteristika prilikom promjene pH te su stoga **obećavajuće molekule za potencijalnu primjenu kao pH senzori za određivanje pH u otopinama.**
- Iz dobivenih titracijskih krivulja eksperimentalno su određene p*K*_a vrijednosti, dok će se dodatno utvrditi teorijske vrijednosti p*K*_a konstanti te mjesta na molekulama na kojima dolazi do protoniranja/deprotoniranja budući spojevi pokazuju vrlo zanimljive promjene spektroskopskih karakteristika prilikom jako kiselih i jako lužnatih uvjeta.

6. Zahvala

Od srca zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Marijani Hranjec na ukazanom povjerenju, strpljenju, pomoći i stručnom vodstvu koje mi je pružila tijekom izrade i pisanja ovog rada.

Također, veliko hvala i asistentici Idi Boček, mag. app. chem. na susretljivosti, stručnom vodstvu, pomoći i ugodnoj atmosferi tijekom provođenja eksperimentalnog dijela rada.

Zahvala ide i asistentici Anji Beč, mag. app. chem. zbog ugodnog društva u laboratoriju.

Zahvaljujem i dr. sc. Kristini Starčević sa Zavoda za kemiju i biokemiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na pomoći pri određivanju antioksidativne aktivnosti.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na velikoj podršci tijekom perioda izrade rada.

7. Literatura

1. M.H. Yang, H-S. Lin, Y.-M. Choong, *Food Res. Int.* **35**(7) (2022) 627-633.
2. W. Akhtar, M. Faraz, K. Garima, V. M. Shaquiquzzaman, M.A. Rizvi, S. H. Mehdi, M. Akhter, M. M. Alam, *Eur. J. Med. Chem.* **126** (2017) 705-753.
3. K. Neha, R. Haider, A. Pathak, M. S. Yar, *Eur. J. Med. Chem.* **178** (2019) 687-704.
4. J. M. Lü, P. H. Lin, Q. Yao, C. Chen, *J. Cell. Mol. Med.* **14**(4) (2010) 840-860.
5. D. L. Madhavi, S. S. Deshpande, D. K. Salunkhe, Introduction. In *Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives*, (1996) 1–4.
6. L. M. Magalhaes, M. Santos, M. A. Segundo, S. Reis, J. L .F .C. Lima, *Talanta* **77** (2009) 1559–1566.
7. S. Kashanian, J. Dolatabadi, *Food Chem.* **116** (2009) 743-747.
8. J. F. Weiss, M. R. Landauer, *Toxicology* **189** (2003) 1-20.
9. J. A. Simon, E. S. Hudes, J. A. Tice, *J. American. Col. Nutrition.* **20** (2001) 255-263.
10. R. S Birangane, D. G Chole, K. S. P. Reddy, Shivaji, *J. Indian Acad. Oral Med. Radiol.* **23**(5) (2011) 351-353.
11. W.C. Hawkes, Z. Alkan, *Biol. Trace Elem. Res.* **134** (2010) 235-251.
12. J. E. Curran, J. B. Jowett, K.S. Elliott, Y. Gao, K. Gluschenko, J. Wang, D. M. A. Azim, G. Cai, M. C. Mahaney, A. G. Comuzzie, T. D. Dyer, K. R. Walder, P. Zimmet, J.W. MacCluer, G. R. Collier, J. Blangero, *Nat. Genetic.* **37** (2005) 1234-1241.
13. S. A. Pavia, R. M. Russell, *J. American Coll. Nutrition.* **18** (1999) 426-433.
14. A. J. Young, G. M. Low, *Arch. Biochemistry and Biophysics* **385** (2001) 20-27.
15. A. Scalbert, C. Manach, C. Morden, C. Remesy, L. Jimenez, *Sci. Nutri.* **45** (2005) 287-306.
16. J. A. Vita, *American J. Clinical Nutrition.* **81** (2005) 292-307.
17. R. Tsao, *Nutrients* **2**(12) (2010) 1231.
18. D. S. Ashadevi, S. Gotmare, *Pharmacophore* **6** (2015) 25-30.
19. R. L. Prior, X. Wu, K. Schaich, *J. Agric. Food. Chem.* **53** (2005) 4290–4302.
20. N. Alam, N. C. Bristi, M. Rafquzzaman, *Saudi Pharm J.* **21** (2013)143–152.
21. D. Huang, B. Ou, R. L. Prior, *J. Agric. Food. Chem.* **53** (2005) 1841–1856.
22. K. H. Cheeseman, T. F. Slater, *Br. Med. Bull.* **49** (1993) 481–493.
23. T. Liu, A. Stern, L. J. Roberts, J. D. Morrow, *J. Biomed. Sci.* **6** (1999) 226–235.
24. P. C. Hollman, A. Cassidy, B. Comte, M. Heinonen, M. Richelle, E. Richling, M. Serafini, A. Scalbert, H. Sies, S. Vidry, *J. Nutr.* **141** (2011) 989–1009.
25. Z. Z. Chong, F. Li, K. Maiese, *Prog. Neurobiol.* **75** (2005) 207–246.

26. URL:<https://www.eau-thermale-avene.com.hr/novosti/2021-06/utjecaj-slobodnih-radikala-na-kozu> (pristup 24. svibnja 2022.)
27. M. Caroch, I. C. F. R. Ferreira, *Food Chem. Toxicol.* **51** (2013) 15–25.
28. M. Koruk, S. Taysi, M. C. Savas, O. Yilmaz, F. Akcay, M. Karakok, *Ann. Clin. Lab. Sci.* **34** (2004) 57–62.
29. D. R. Gough, T. G. Cotter, *Cell Death Dis.* **2** (2011) 213.
30. J. R. Stone, S. Yang, *Antioxid. Redox Signaling* **8** (2006) 243–270.
31. E. Niki, *Free Radical Biol. Med.* **66** (2014) 3–12.
32. M. A. Livrea, L. Tesoriere, A. Bongiorno, A. M. Pintaudi, M. Ciaccio, A. Riccio, *Free Radical Biol. Med.* **18** (1995) 401–409.
33. S. Balasaheb Nims, D. Pal, *RSC Adv*, **5** (2015) 27986–28006.
34. H. Goker, S. Ozden, *J Mol Struct.* 1197 (2019) 183-195.
35. M. Weber, H. Bartsch, T. Erker, *Monatsh. Chem.* **133** (2002) 653.
36. J. Dudash, Y. Zhang, J. B. Moore, R. Look, Y. Liang, M. P. Beavers, B. R. Conway, P. J. Rybczynski, K. T. Demarest, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15** (2005) 4790.
37. L. Dymińska, A. Gagor, Z. Talik, J. Lorenc, J. Hanuza, *Vib. Spectrosc.* **57** (2011) 229–241.
38. D. V. Dekhane, D.V. S. S. Pawar, S. V. Gupta, M. S. Shingare, S. N. Thore, *Chin. Chem. Lett.* **21** (2010) 519–523.
39. G. Mladenova, E. Lee-Ruff, *Tetrahedron Lett.* **48** (2007) 2787–2789.
40. K. V. Bukhryakov, A. V. Kurkin, M. A. Yurovskaya, *Chem. Heterocycl. Compd.* **47** (2011) 533.
41. Yu. M. Yutilov, L. I. Shcherbina, A. F. Efremenko, *Khim. Geterotsikl. Soedin., Chem. Heterocycl. Comp.,* **25** (1989) 529–535.
42. R. Vinodkumara, M. A. Charia, P. K. Dubey, *J. Heterocycl. Chem.,* **44** (2007) 1537.
43. L. W. Hertel, J. S. Kroin, J. W. Misner, J. M. Tustin, *J. Org. Chem.* **53** (1988) 2406.
44. R. L. Clark, A. A. Pessolano, T. Y. Shen, D. P. Jacobus, H. Jones, V. J. Lotti, L. M. Flataker, *J. Med. Chem.* **21** (1978) 965.
45. G. Y. Leshner, R. P. Brundage, C. J. Opalka, D. F. Page, *Chem. Abstr.* **96** (1982) 85551.
46. L. Kueźński, A. Mrozikiewicz, K. Poreba, *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **34** (1982) 229.
47. K. V. Bukhryakov, A. V. Kurkin, M. A. Yurovskaya, *Chem. Heterocycl. Compd.* **47** (2011) 533.
48. A. K. Rustgi, *Genes Dev.* **21**(20) (2007) 2525–2538.

49. F. Chan, C. Sun, M. Perumal, Q.D. Nguyen, V. Bavetsias, E. McDonald, V. Martins, N.E. Wilsher, F.I. Raynaud, M. Valenti, S. Eccles, R. te Poele, P. Workman, E.O. Aboagye, S. Linardopoulos, *Mol. Cancer Ther.* **6** (2007) 3147–3157.
50. J. Paris, M. Philippe, *Dev. Biol.* **140** (1990) 221–224.
51. R. Giet, C. Petretti, C. Prigen, *Trends Cell Biol.* **15** (2005) 241–250.
52. Y. M. Thu, A. Richmond, *Cytokine Growth Factor Rev.* **21** (2010) 213–226.
53. T. Wang, M. A. Block, S. Cowen, A. M. Davies, E. Devereaux, L. Gingipalli, J. Johannes, N. A. Larsen, Q. Su, J. A. Tucker, i dr., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22** (2012) 2063–2069.
54. M. O. Püsküllü, C. Karaaslan, F. Bakar, H. Göker, *Chem. Heterocycl. Compd.* **51** (2015) 723–733.
55. J. Li, S. Xie, S. Ahmed, F. Wang, Y. Gu, C. Zhang, X. Chai, Y. Wu, J. Cai, G. Cheng, *Front Pharmacol.* **8** (2017) 364.
56. I Sujatha, R. Reddy, L. Eppakayala J. *Adv. Drug Research* **2**(2) (2012) 17–24.
57. C. M. Galmarini, J. R. Mackey, C. Dumontet, *Leukemia* **15** (2001) 875–890.
58. A. Hartwich, N. Zdzienicka, D. Schols, G. Andrei, R. Snoeck, I. E. Głowacka, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **39** (2020) 542–591.
59. X. Li, B. Huang, Z. Zhou, P. Gao, C. Pannecouque, D. Daelemans, E. De Clercq, P. Zhan, X. Liu, *Chem. Biol. Drug Des.* **88** (2016) 241–253.
60. I. Fang, C. Yang, *Exp. Eye Res.* **130** (2015) 38–50.
61. U. Grädler, T. Fuchß, W. Ulrich, R. Boer, A. Strub, C. Hesslinger, C. Anézo, K. Diederichs, A. Zaliani, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21** (2011) 4228–4232.
62. W. Li, L. Wang, W. Huang, M. Skibba, Q. Fang, L. Xie, T. Wei, Z. Feng, G. Liang, *Vascul. Pharmacol.* **72** (2015) 153–162.
63. L. C. M. Ying, M. Woodward, S. Colagiuri, *Diabetes Res. Clin. Pract.* **116** (2016) 149–158.
64. S. C. Lee, H. T. Kim, C. H. Park, D. Y. Lee, H. J. Chang, S. Park, J. M. Cho, S. Ro, Y. G. Suh, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22** (2012) 4221–4224.
65. P. Ulrich, A. Cerami, *Recent Prog. Horm. Res.* **56** (2000) 1–21.
66. R. Singh, A. Barden, T. Mori, L. Beilin, 2001. *Diabetologia* **44** (2001) 129–146.
67. M. Taha, K. A.A. Alkadi, N. H. Ismail, S. Imran, A. Adam, S. M. Kashif, S. Adnan, A. Shah, W. Jamil, S. Sidiqqi, K. M. Khan *Arabian J. Chem.* **12**(8) (2019) 3118–3128.
68. P. Lavanya, M. Suresh, Y. Kotaiah, N. Harikrishna, C. V. Rao, *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **4**(4) (2011) 69.

69. F. Borges, F. Roleira, N. Milhazes, L. Santana, E. Uriarte, *Curr. Med. Chem.* **12**(8) (2005) 887-916.
70. N. Perin, M. Cindrić, P. Vervaeke, S. Liekens, T. Mašek, K. Starčević, M. Hranjec, *Med. Chem.* **17** (2021) 13-20.
71. V. Lyssenko, M. Laakso. *Diabetes care* **36** (2013) 120-126.
72. P. Vicini, A. Geronikaki, M. Incerti, B. Busonera, G. Poni, C.A. Cabras, P.L. Colla, *Bioorg. Med. Chem.* **11** (2003) 4785–4789.
73. M. Peppia, J. Uribarri, H. Vlassara, *Clin. Diabetes* **21** (2003) 186-187.
74. A. Goldin, J. A. Beckman, A. M. Schmidt, M. A. Creager, *Circulation* **114** (2006) 597-605.
75. F. Giacco, M. Brownlee, *Circ. Res.* **107** (2010) 1058-1070.
76. B. N. Ames, M.K. Shigenaga, N. Y. Ann, *Acad. Sci.* **663** (1992) 85–89.
77. M. Taha, N. H. Ismail, S. Imran, H. Rashwan, W. Jamil, S. Ali, S. M. Kashif, F. Rahim, U. Salar, K. M. Khan, *Bioorg. Chem.* **65** (2016) 48-56.
78. I. Boček, K. Starčević, I. Novak Jovanović, R. Vianello, M. Hranjec, *J. Mol. Liq.* **342** (2021) 117527-117540.
79. J. R. Cannon, J. T. Greenamyre, *Toxicol. Sci.* **124** (2011) 225–250.
80. H. Braak, E. Ghebremedhin, U. Rub, H. Bratzke, K. Del Tredici, *Cell Tissue Res.* **318** (2004) 121–134.
81. M. C. Daga, M. Taddeia, G. Varchib, *Tetrahedron Lett.* **42** (2001) 5191–5194.
82. S. Kamila, H. Ankati, K. Mendoza, E.R. Biehl, *Org. Chem. J.* **5** (2011) 127–134.
83. B. Lončar, N. Perin, M. Mioč, I. Boček, L. Grgić, M. Kralj, S. Tomić, M. Radić Stojković, M. Hranjec, *Eur. J. Med. Chem.* **217** (5) (2021) 113342.
84. M. Cindrić, I. Sović, M. Mioč, L. Hok, I. Boček, P. Roškarić, K. Butković, I. Martin-Kleiner, K. Starčević, R. Vianello, M. Kralj, M. Hranjec, *Antioxidants* **8** (2019) 477, 22.
85. M. Blois, *Nature*, **181** (1958) 1199–1200.
86. K. R. Kirtikar, B.D. Basu, *Indian medicinal plants* (2006) 993–994.
87. E.S. Contreras-Guzman, F.C. Strong, *Journal of AOAC (USA)*, **65** (1982) 1215–1222.
88. S. B. Kedare, R. P. Singh, *J. Food Sci. Technol.* **48** (2011) 412–422.
89. V. Katalinic, D. Modun, I. Music, M. Boban, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **140** (2005) 47–52.
90. I. F. F. Benzie, J. J. Strain, *Anal. Biochem.* **239** (1996) 70-76.
91. R. Amorati, L. Valgimigli, *Free Rad. Res.* **49** (2015) 633-649.
92. A. Karadag, B.Ozcelik, S. Saner, *Food Anal. Met.* **2** (2009) 41-60.

93. M. Tireli, K. Starčević, T. Martinović, S. Kraljević Pavelić, G. Karminski-Zamola, M. Hranjec, *Mol. Divers.* **21** (2017) 201–210.
94. I. Boček, M. Hranjec, R. Vianello, *J. Mol. Liq.* **355** (2022) 118982, 12.
95. N. Perin, D. Babić, P. Kassal, A. Čikoš, M. Hranjec, R. Vianello, *Chemosensors* **10** (2022) 21, 15.
96. M. Hranjec, E. Horak, D. Babić, S. Plavljanin, Z. Srdović, I. Murković Steinberg, R. Vianello, N. Perin, *New J. Chem.* **41** (2017) 358-371.
97. A. P. Demchenko, *Anal. Bioanal. Chem.* **395** (2009) 1195–1196.

8. Sažetak

Novi hidroksi supstituirani akrilonitrili imidazo[4,5-*b*]piridina kao potencijalni antioksidansi i pH senzori

U ovom radu opisana je sinteza novih akrilonitrilnih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina, te je provedeno i ispitivanje antioksidativne aktivnosti ovih spojeva te njihovih spektroskopskih svojstava kao potencijalnih pH senzora. Sinteza novih akrilonitrilnih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina **25-48** provedena je klasičnim reakcijama organske kemije i reakcijama potpomognutim mikrovalovima u nekoliko sintetskih koraka. Reakcijama nekatalizirane aminacije početnih reaktanata, 2-klor-3-nitropiridina **1** i 5-brom-2-klor-3-nitropiridina **2** pod djelovanjem mikrovalnog zračenja, priređeni su različito supstituirani amini **5-8**. Redukcijom spojeva **5-8** sa $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ priređeni su diamino supstituirani derivati **10-14** koji reakcijama termičke ciklokondenzacije daju glavne prekursore, 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridine **15-20**. U posljednjem koraku sinteze, kondenzacijom odabranih aromatskih benzaldehida **21-24** i 2-cijanometilimidazo[4,5-*b*]piridina **15-20**, uz dodatak apsolutnog etanola i piperidina, priređeni su akrilonitrilni derivati **25-48**. Strukture svih novosintetiziranih spojeva potvrđene su ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom, dok su strukture **25-28** okarakterizirane i masenom spektrometrijom.

Ispitivanje antioksidativne aktivnosti novosintetiziranih akrilonitrilnih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina **25-48** provedeno je primjenom DPPH, ABTS i FRAP metode. Nekoliko ispitanih spojeva pokazalo je jako izraženu i poboljšanu antioksidativnu aktivnost u sve tri korištene metode u odnosu na standardni antioksidans BHT.

Spektroskopska karakterizacija UV/Vis spektroskopijom u nekoliko organskih otapala različite polarnosti te u puferima različitih pH vrijednosti provedena je za spojeve **25**, **26**, **27**, **28** i **32**. Iz dobivenih rezultat može se utvrditi da se spektroskopske karakteristike mijenjaju u odnosu na korištena otapala i pufere različitih pH vrijednosti. Na taj je način potvrđena moguća primjena ovakvog tipa spojeva kao pH senzora u otopinama.

Ključne riječi: aminacija, imidazo[4,5-*b*]piridin, akrilonitrili, antioksidativna aktivnost, DPPH metoda, FRAP metoda, ABTS metoda, UV/Vis spektroskopija, pH senzori

9. Summary

New hydroxy substituted acrylonitrile imidazo[4,5-*b*]pyridines as potential antioxidants and pH sensors

In this paper, the synthesis of new acrylonitrile derivatives of imidazo[4,5-*b*]pyridines was described, also the antioxidant activity of these compounds and their spectroscopic properties as potential pH sensors was investigated. The synthesis of new acrylonitrile derivatives of imidazo[4,5-*b*]pyridine **25-48** was performed by classical reactions of organic chemistry and microwave-assisted reactions in several synthetic steps. By uncatalyzed amination reactions of the initial reactants, 2-chloro-3-nitropyridine **1** and 5-bromo-2-chloro-3-nitropyridine **2** under the action of microwave radiation, various substituted amines **5-8** were prepared. By reduction of compounds **5-8** with $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, diamino substituted derivatives **10-14** were prepared, which then gave the main precursors 2-cyanomethylimidazo[4,5-*b*]pyridines **15-20** in thermal cyclocondensation reactions. In the last step of the synthesis, in condensation reaction of selected aromatic benzaldehydes **21-24** and 2-cyanomethylimidazo[4,5-*b*]pyridine **15-20**, with the addition of absolute ethanol and piperidine, acrylonitrile derivatives **25-48** were prepared. The structures of all newly synthesized compounds were confirmed by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy, while structures **25-28** were also characterized by mass spectrometry.

Antioxidant activity determination of newly synthesized acrylonitrile derivatives of imidazo[4,5-*b*]pyridine **25-48** was performed using DPPH, ABTS and FRAP methods. Several of the tested compounds showed very pronounced and improved antioxidant activity in all three methods compared to the standard antioxidant BHT.

Spectroscopic characterization for compounds **25**, **26**, **27**, **28** and **32** was performed by using UV/Vis spectroscopy in several organic solvents of different polarity and in buffers with different pH values. Based on the obtained results it can be determined that the spectroscopic characteristics are changed significantly in dependence to the used solvents and buffers with different pH values. In this way, the possible use of this type of compounds as pH sensors in solutions was confirmed.

Key words: amination, imidazo[4,5-*b*]pyridine, acrylonitriles, antioxidant activity, DPPH method, FRAP method, ABTS method, UV/Vis spectroscopy, pH sensors

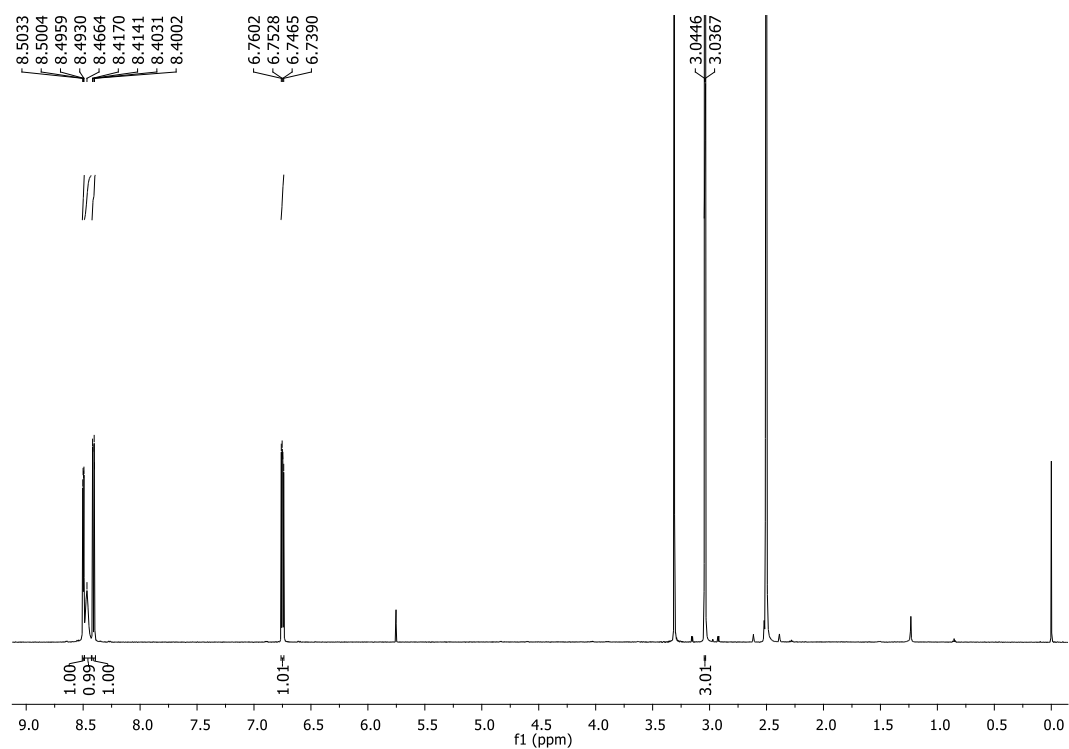
10. Životopis

Mirna Dragić, rođena 30. srpnja 1997. godine u Sisku. U razdoblju od 2004.-2012. godine pohađala je Osnovnu školu u Jasenovcu. Srednjoškolsko zvanje farmaceutskog tehničar, stječe 2016. godine u srednjoj školi Zdravstveno učilište Zagreb. Po završetku srednje škole upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, preddiplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala. Stručnu praksu odradila je na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za procese taloženja. Sudjelovala je na XIV. susretu mladih kemijskih inženjera 2022. godine, s posterskim priopćenjem pod nazivom "Sinteza novih 2,6-disupstituiranih imidazo[4,5-*b*]piridina Suzukijevom reakcijom". Tijekom studija radila je nekoliko studentski poslova gdje je stekla dobre komunikacijske vještine i spremnost na timski rad. Služi se engleskim jezikom u govoru i pismu. Poznaje rad Microsoft office programskog paketa te osnove programa MatLab.

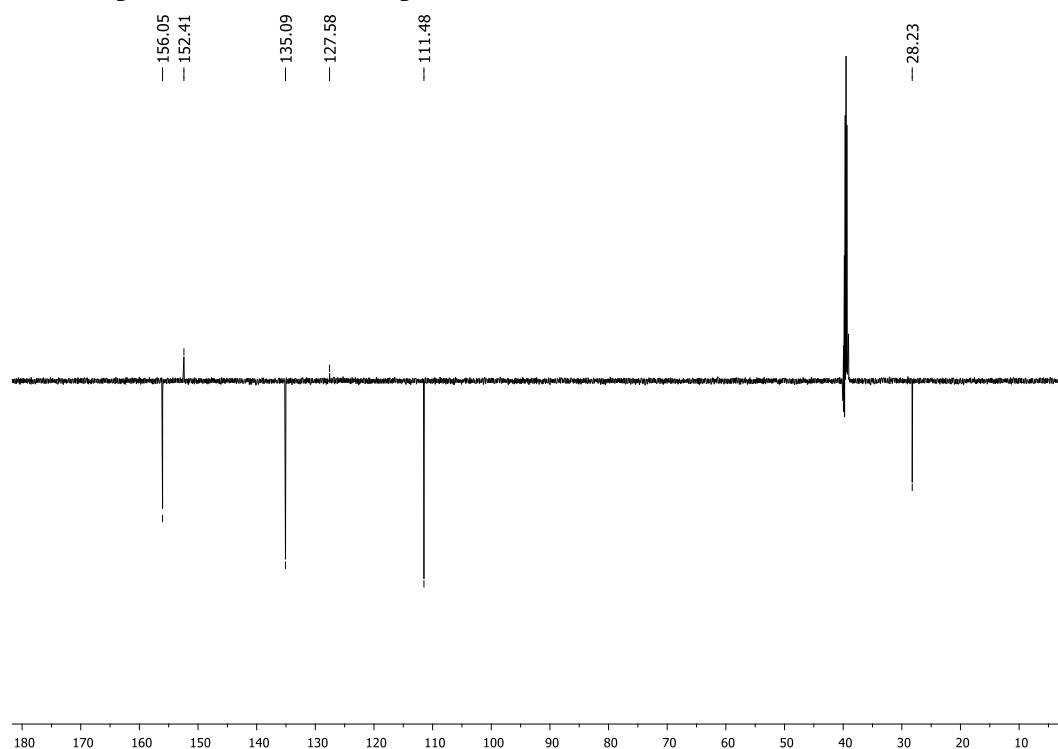
11. Prilozi

Prilog 1.

a) ^1H NMR spektar *N*-metil-3-nitropiridin-2-amina **5**

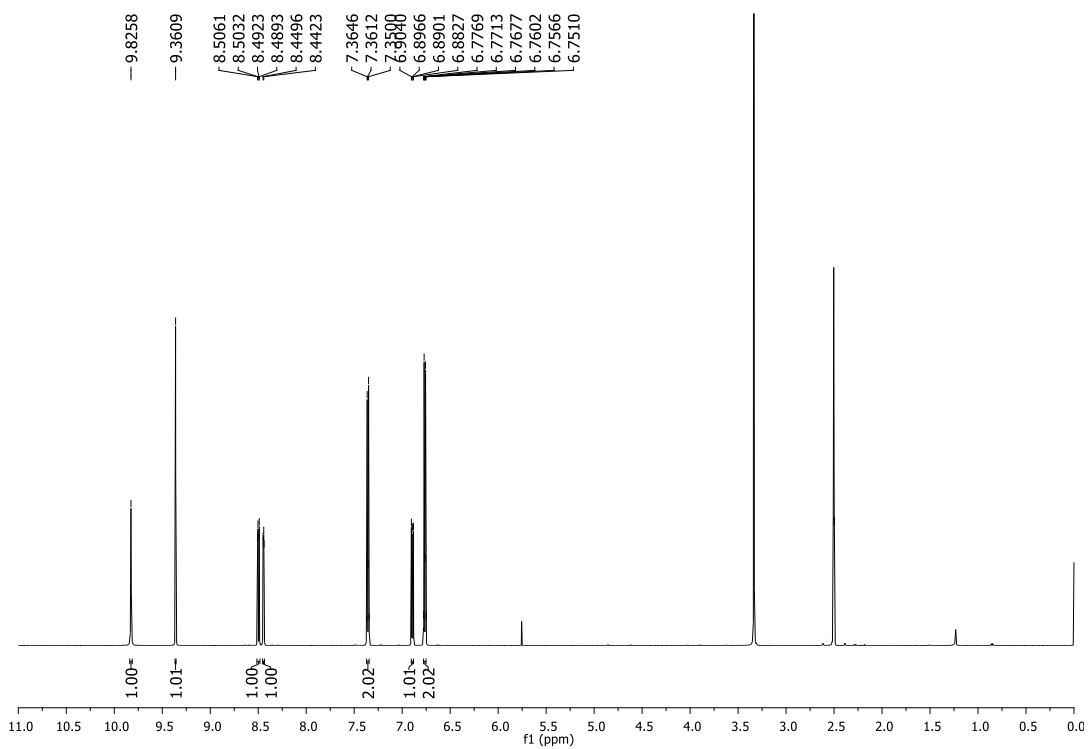


b) ^{13}C NMR spektar *N*-metil-3-nitropiridin-2-amina **5**

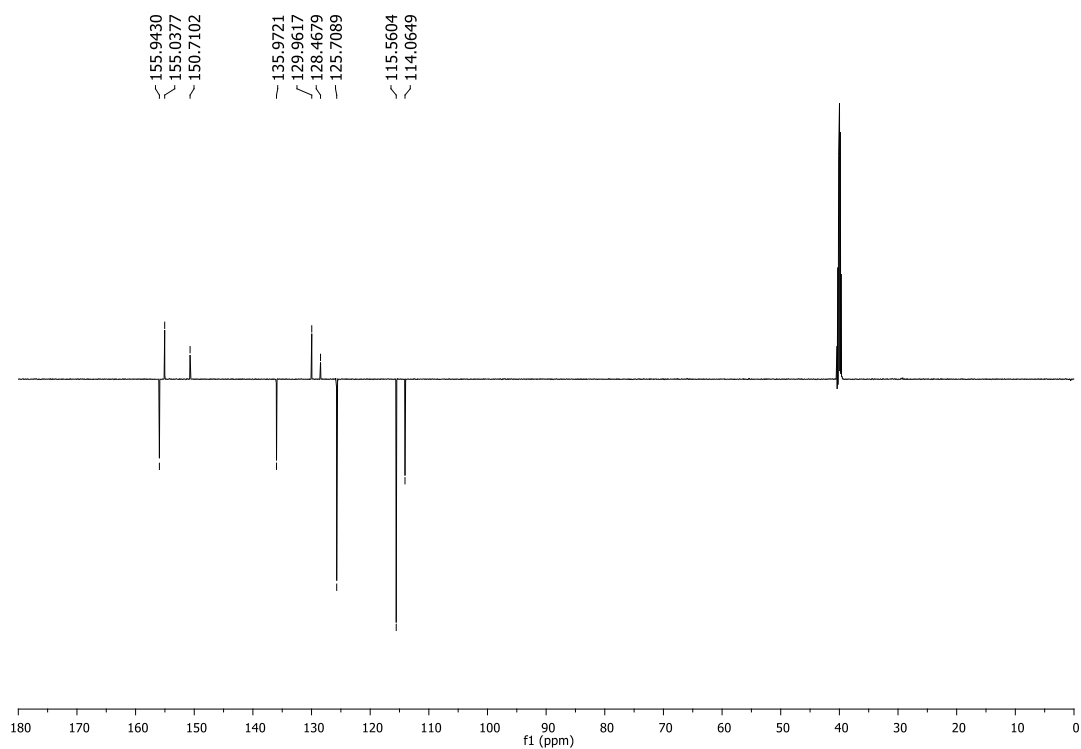


Prilog 2.

a) ^1H NMR spektr 4-((3-nitropridin-2-il)amino)fenola **6**

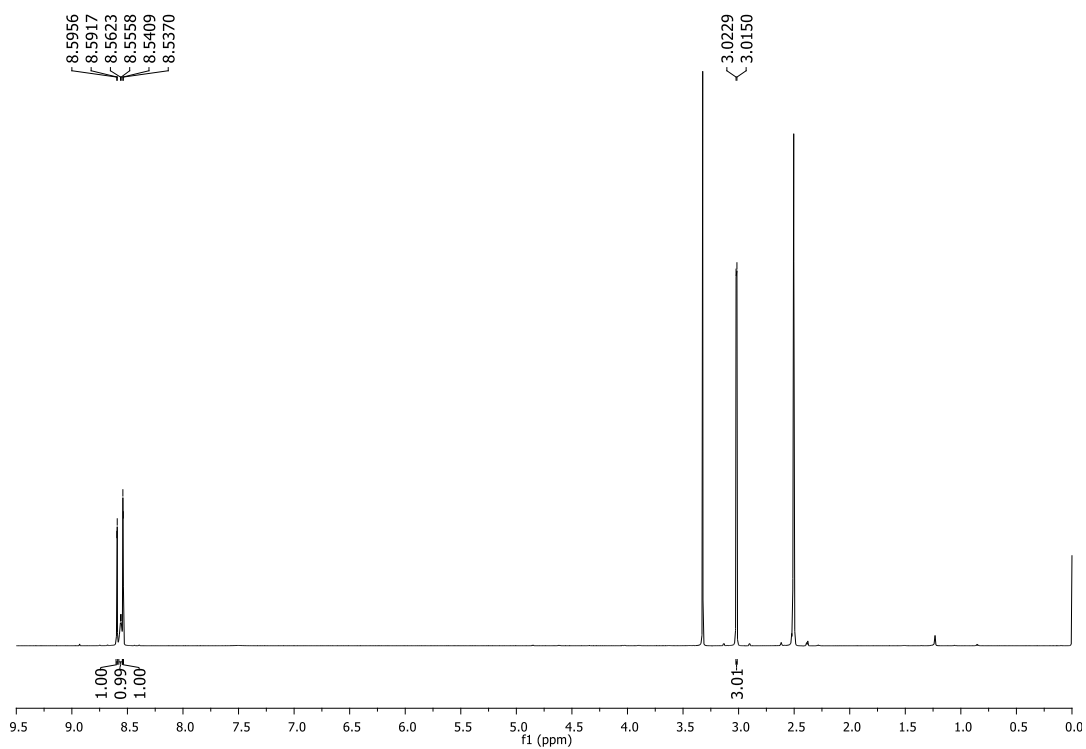


b) ^{13}C NMR spektr 4-((3-nitropridin-2-il)amino)fenola **6**

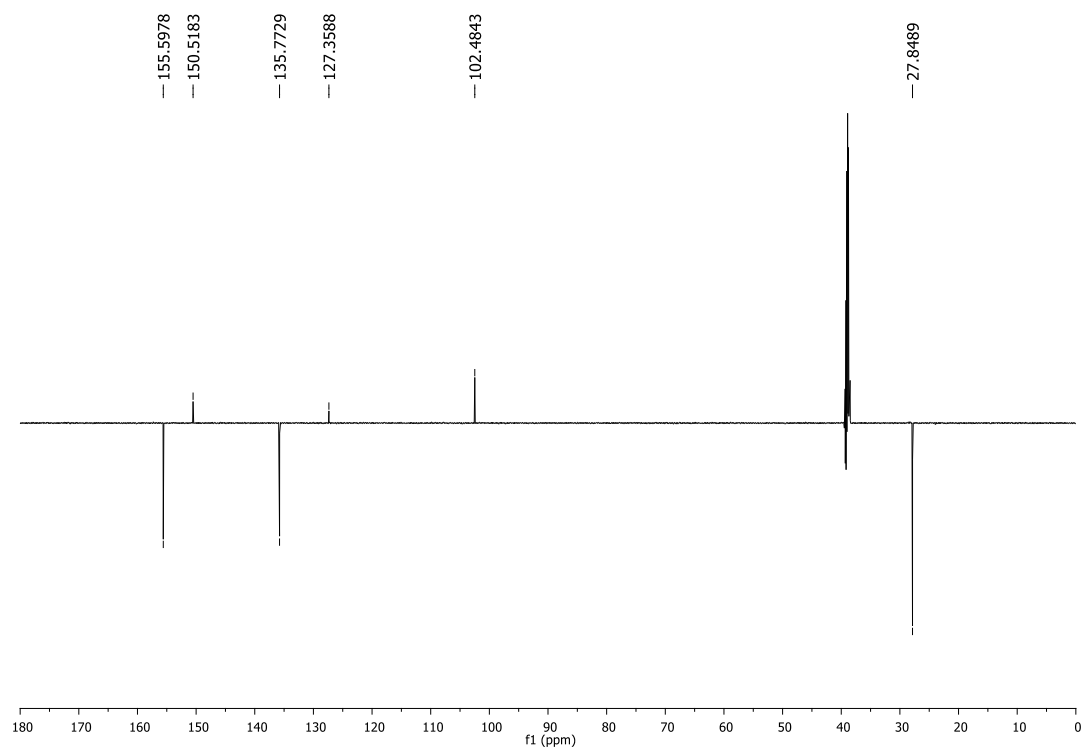


Prilog 3.

a) ^1H NMR spektar 5-brom-*N*-metil-3-nitropiridin-2-amina **7**

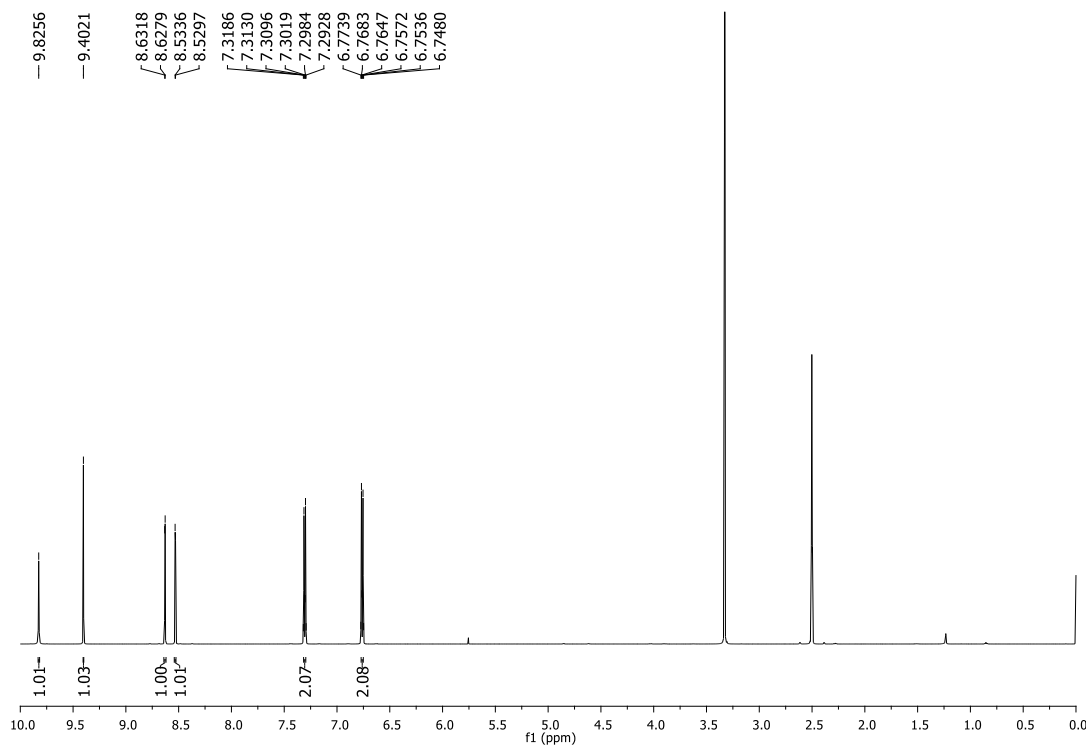


b) ^{13}C NMR spektar 5-brom-*N*-metil-3-nitropiridin-2-amina **7**

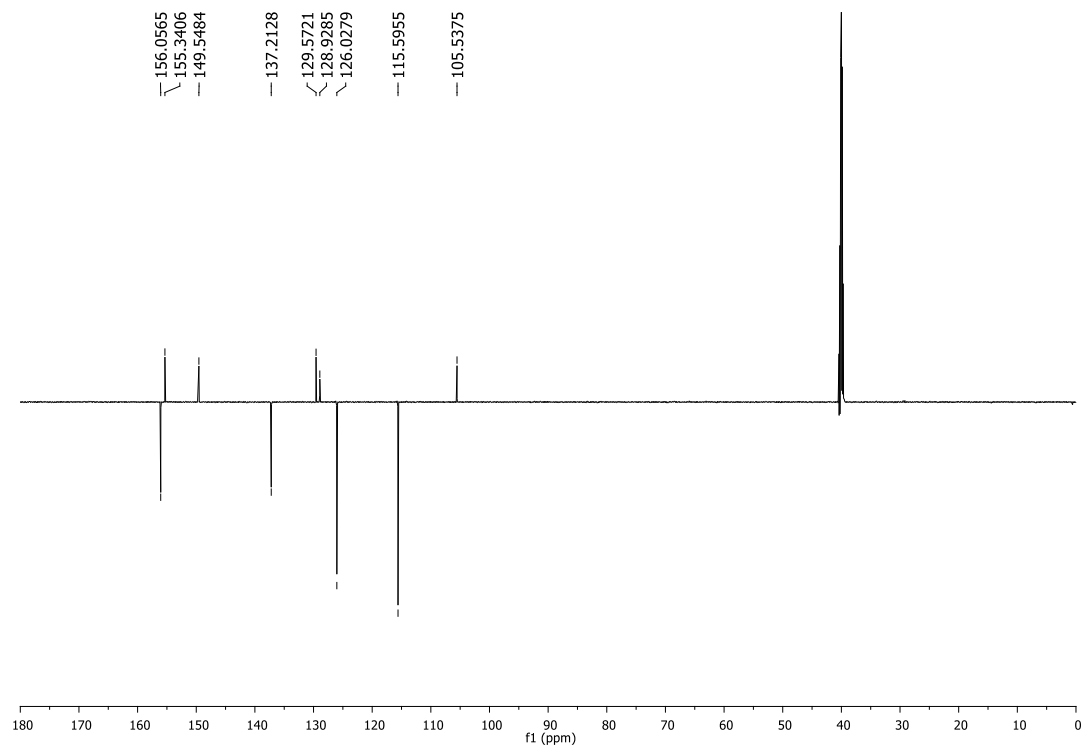


Prilog 4.

a) ^1H NMR spektar 4-((5-brom-3-nitropiridin-2-il)amino)fenola **8**

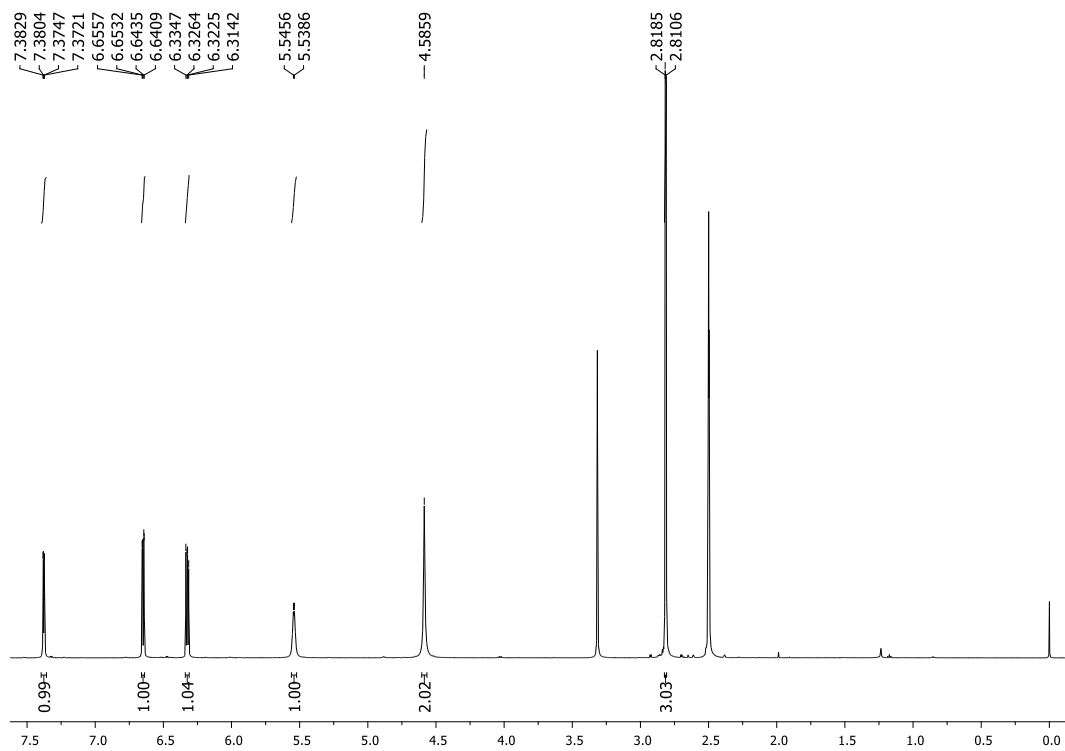


b) ^{13}C NMR spektar 4-((5-brom-3-nitropiridin-2-il)amino)fenola **8**

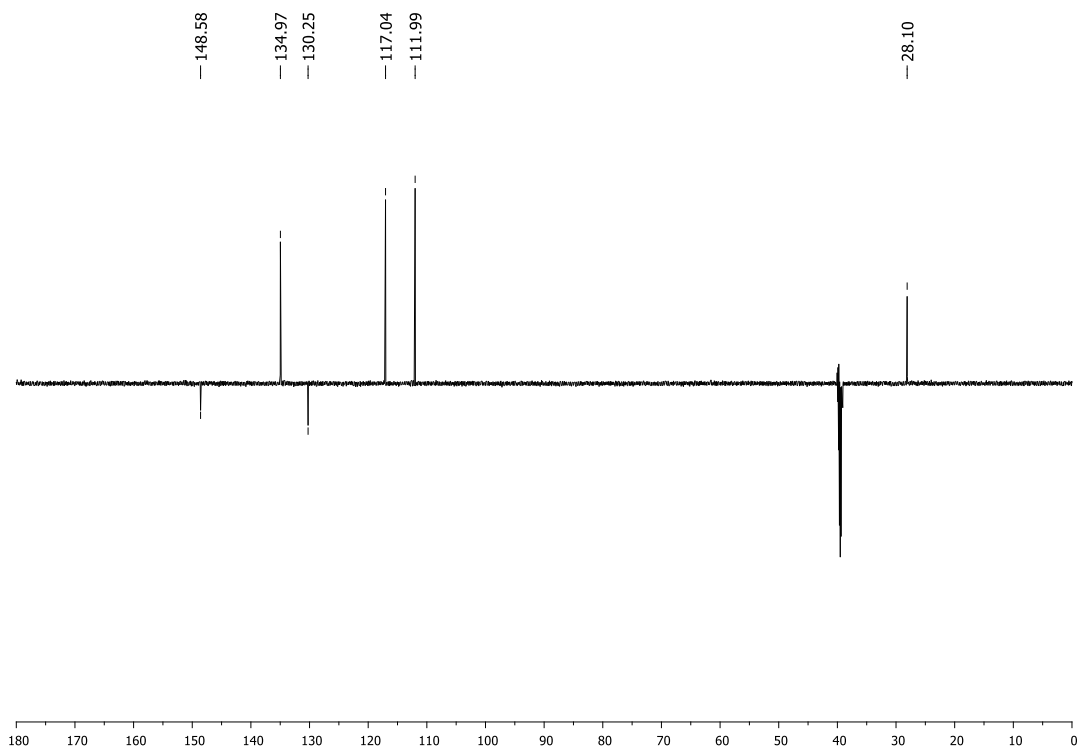


Prilog 5.

a) ^1H NMR spektar N^2 -metilpiridin-2,3-diamina **10**

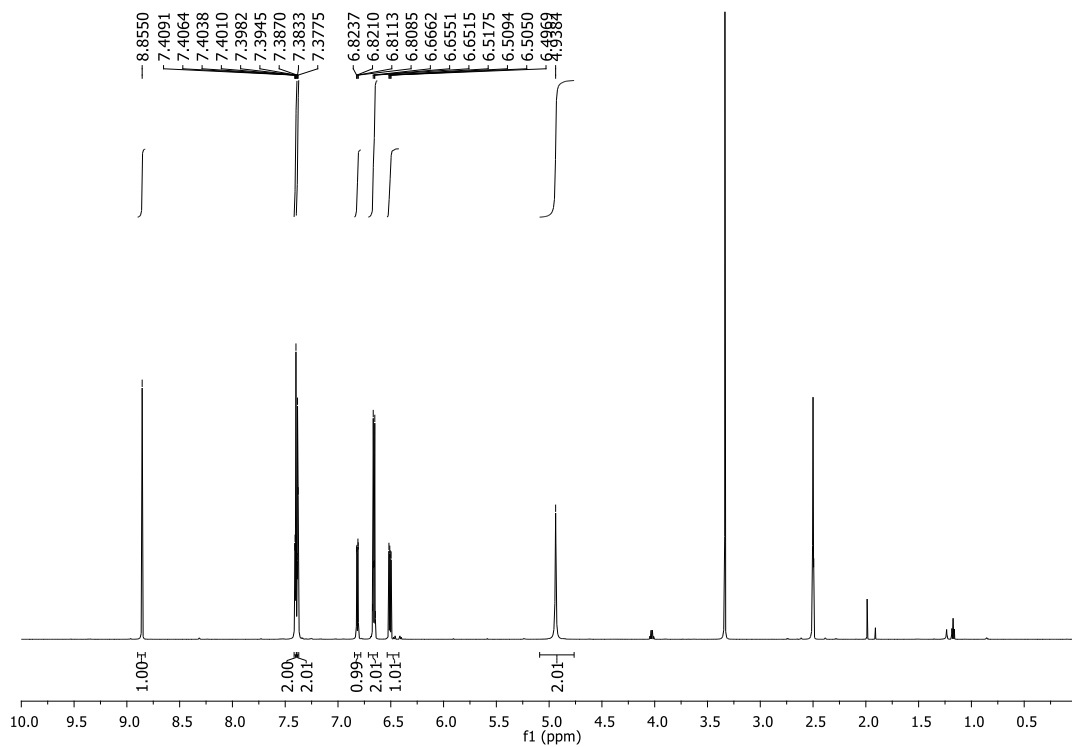


b) ^{13}C NMR spektar N^2 -metilpiridin-2,3-diamina **10**

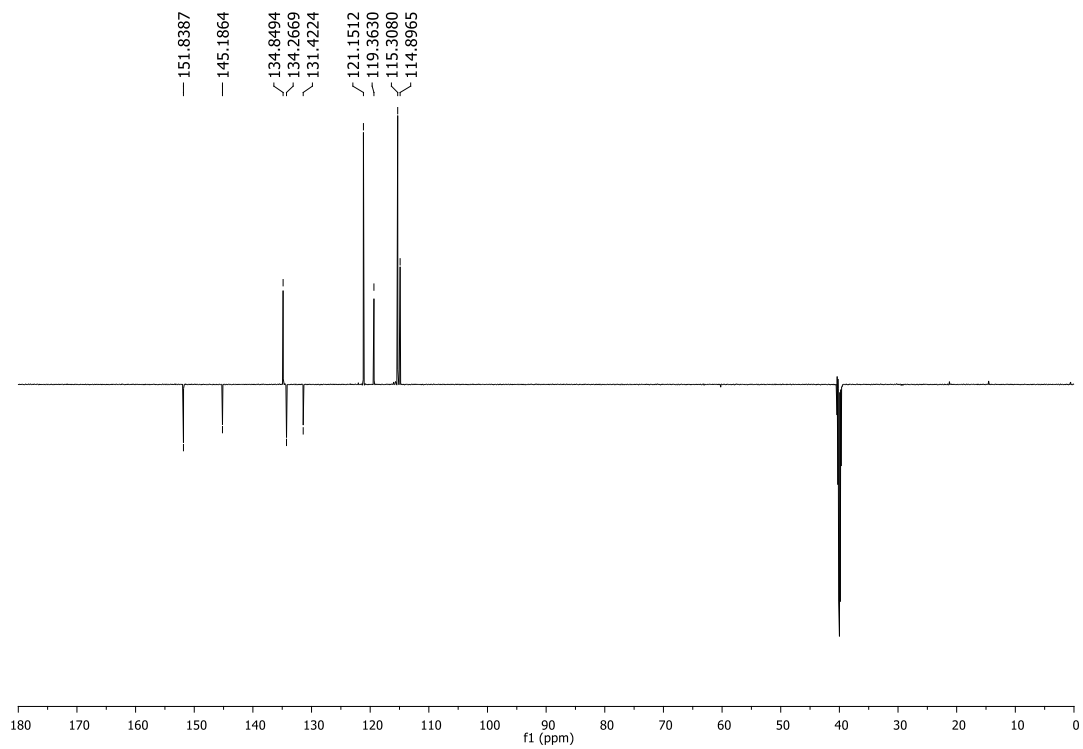


Prilog 6.

a) ^1H NMR spektar 4-((3-aminopiridin-2-il)amino)fenola **11**

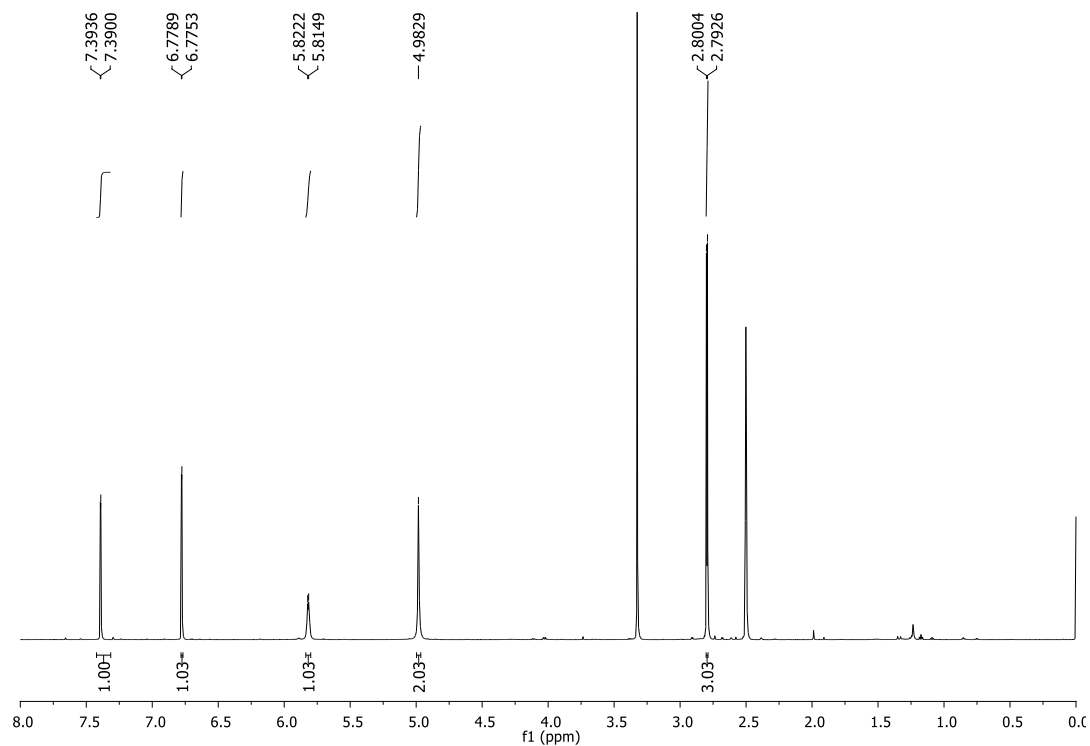


b) ^{13}C NMR spektar 4-((3-aminopiridin-2-il)amino)fenola **11**

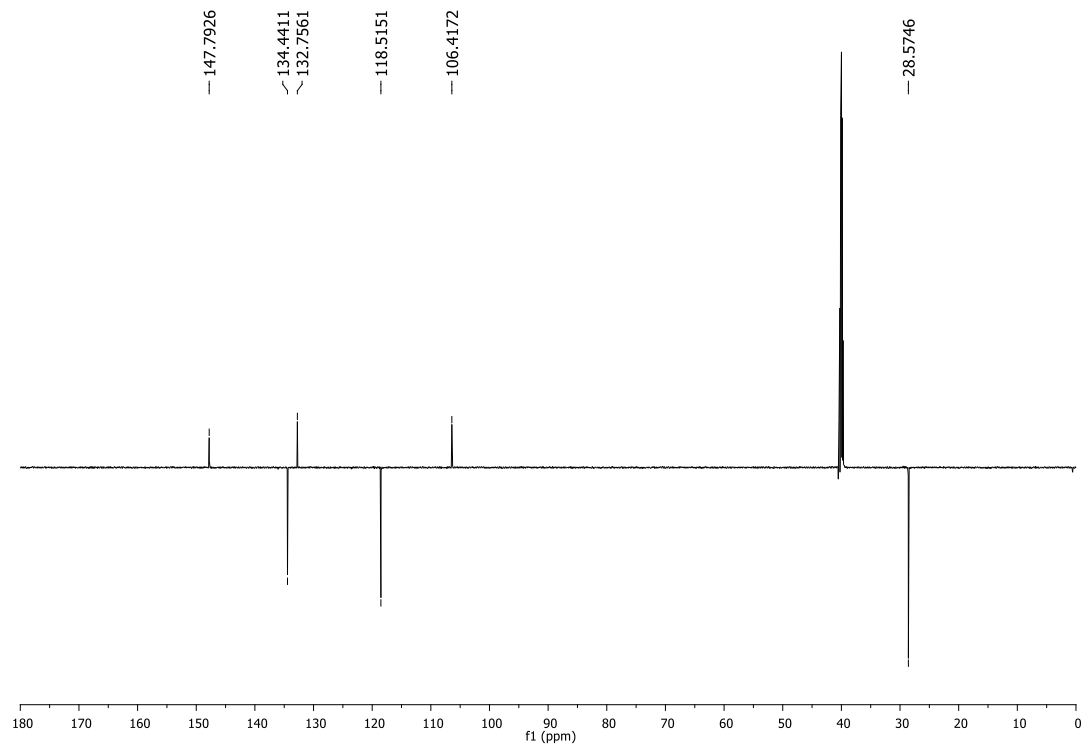


Prilog 7.

a) ^1H NMR spektar 5-brom- N^2 -metilpiridin-2,3-diamina **13**

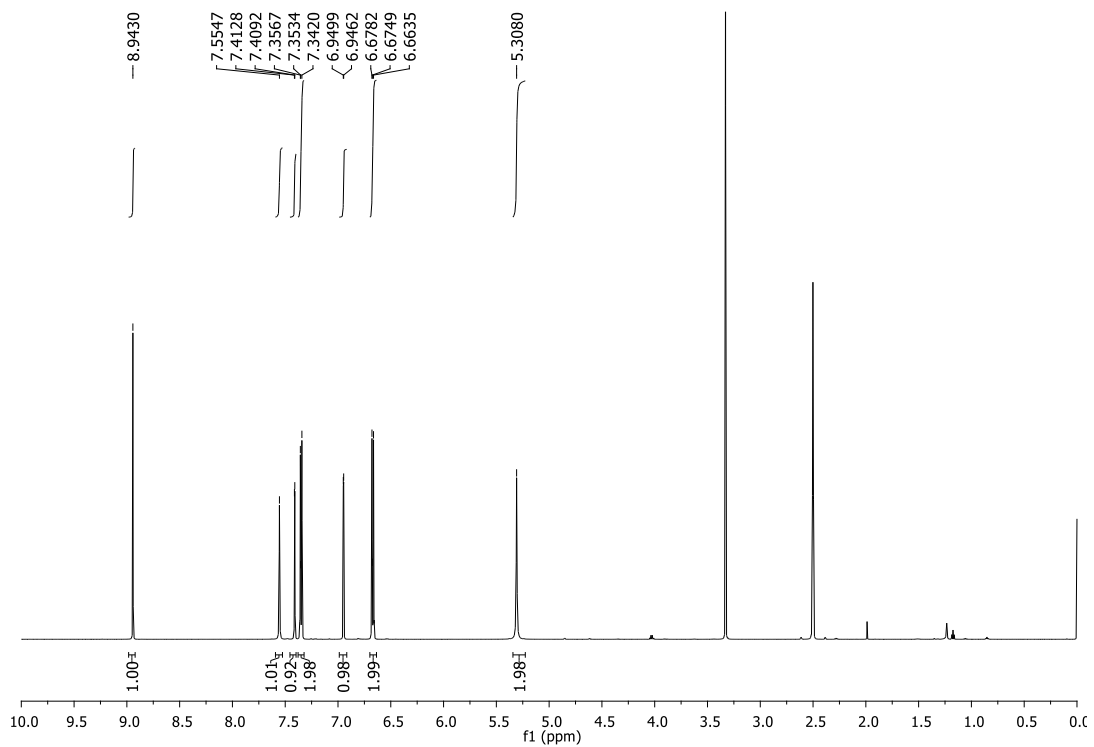


b) ^{13}C NMR spektar 5-brom- N^2 -metilpiridin-2,3-diamina **13**

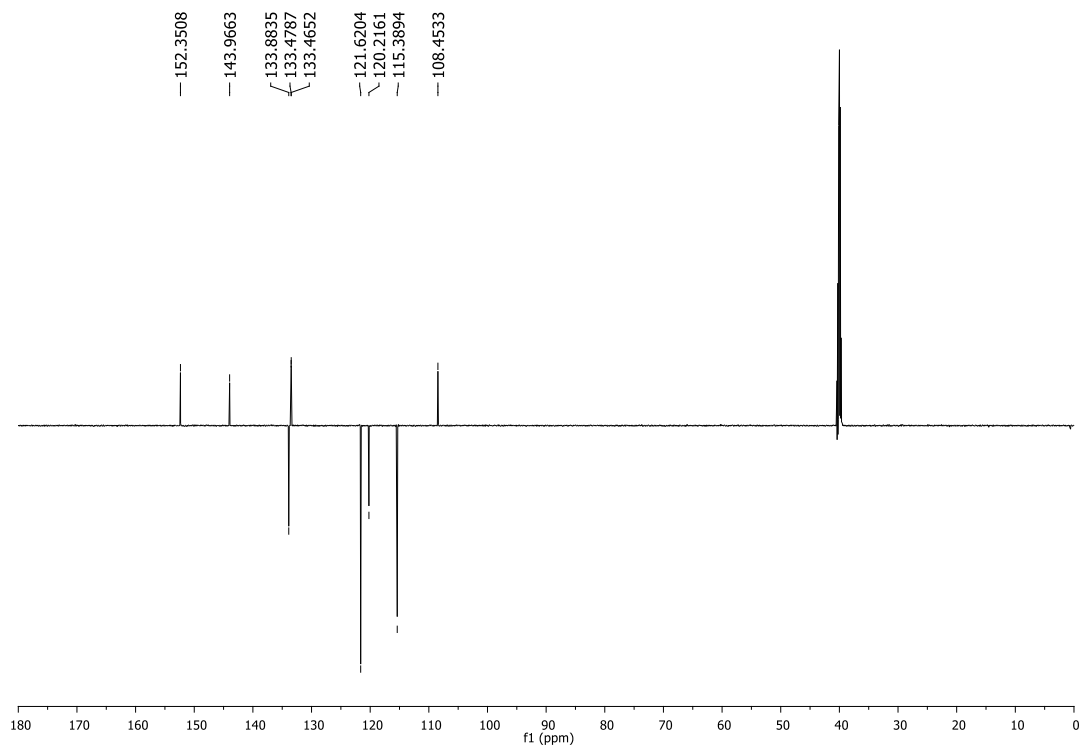


Prilog 8.

a) ^1H NMR spektar 4-((3-amino-5-brompiridin-2-il)amino)fenola **14**

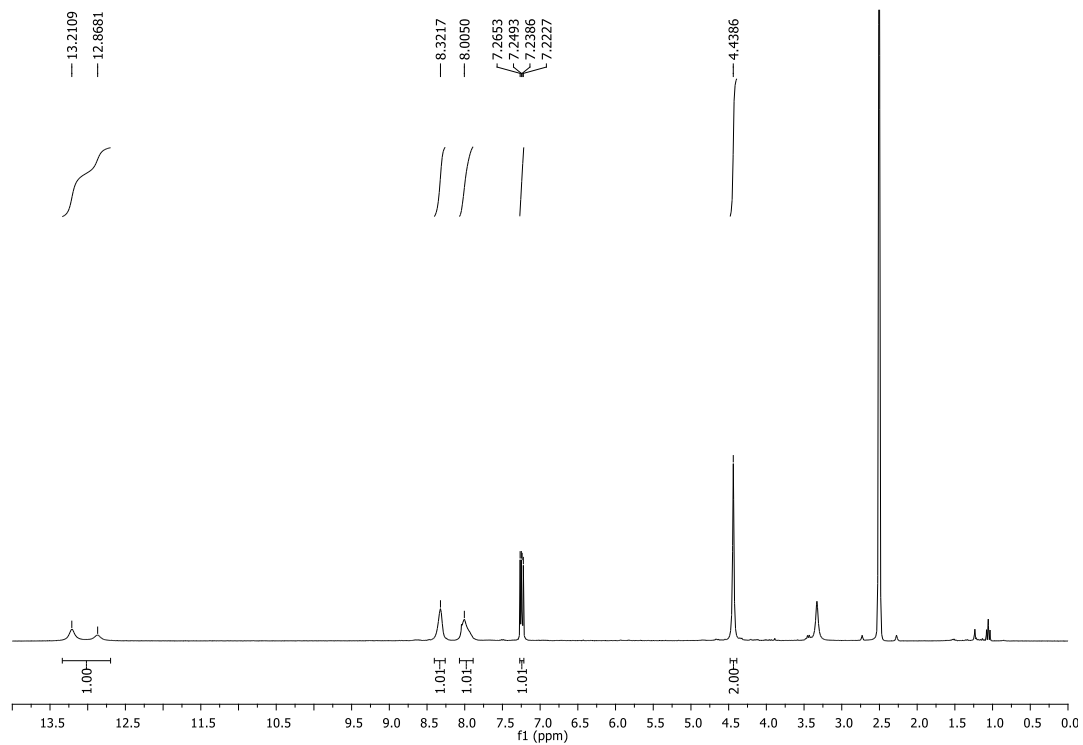


b) ^{13}C NMR spektar 4-((3-amino-5-brompiridin-2-il)amino)fenola **14**

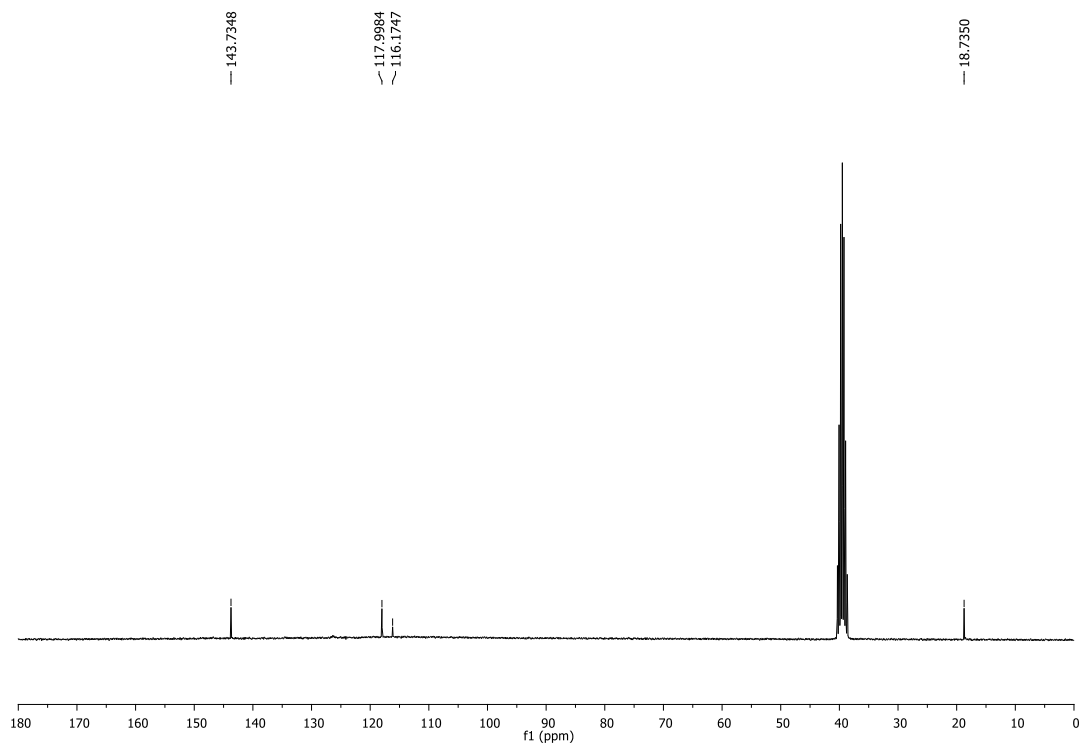


Prilog 9.

a) ^1H NMR spektar 2-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)acetonitrila **15**

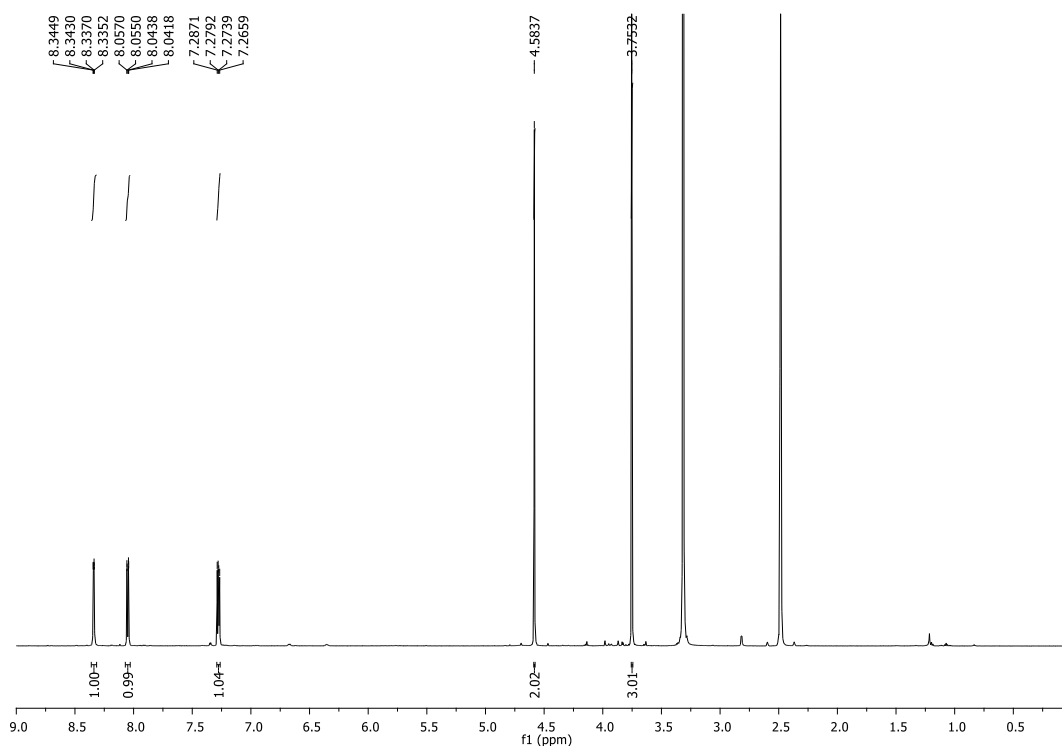


b) ^{13}C NMR spektar 2-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)acetonitrila **15**

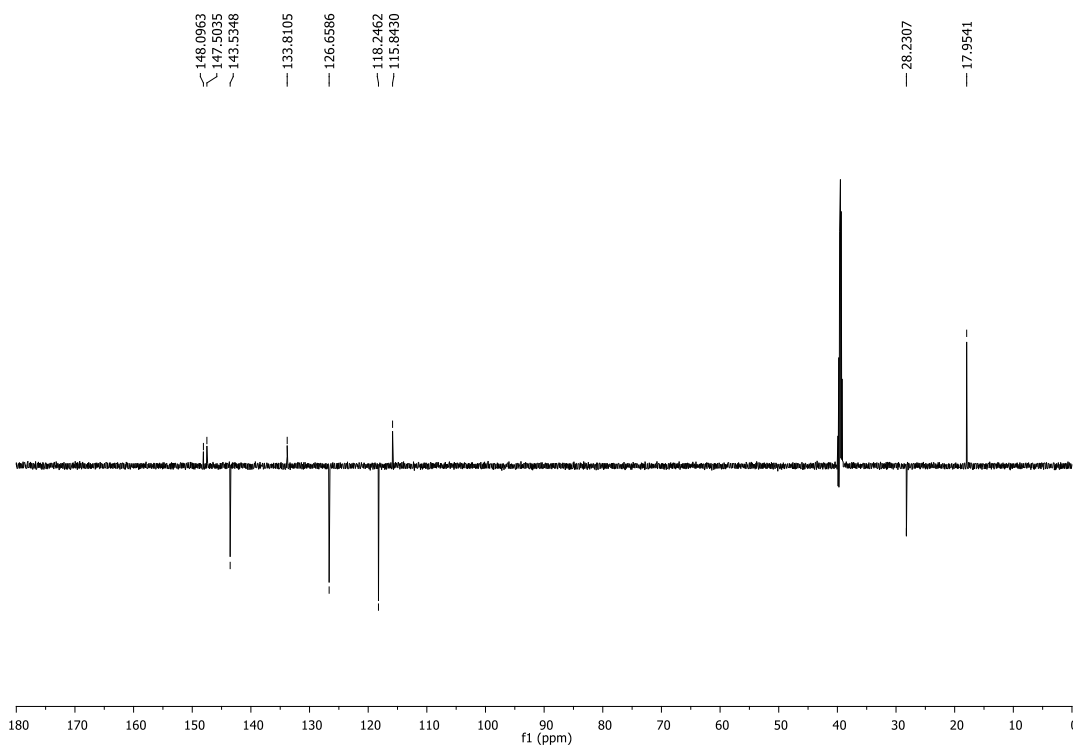


Prilog 10.

a) ^1H NMR spektar 2-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)acetonitrila **16**

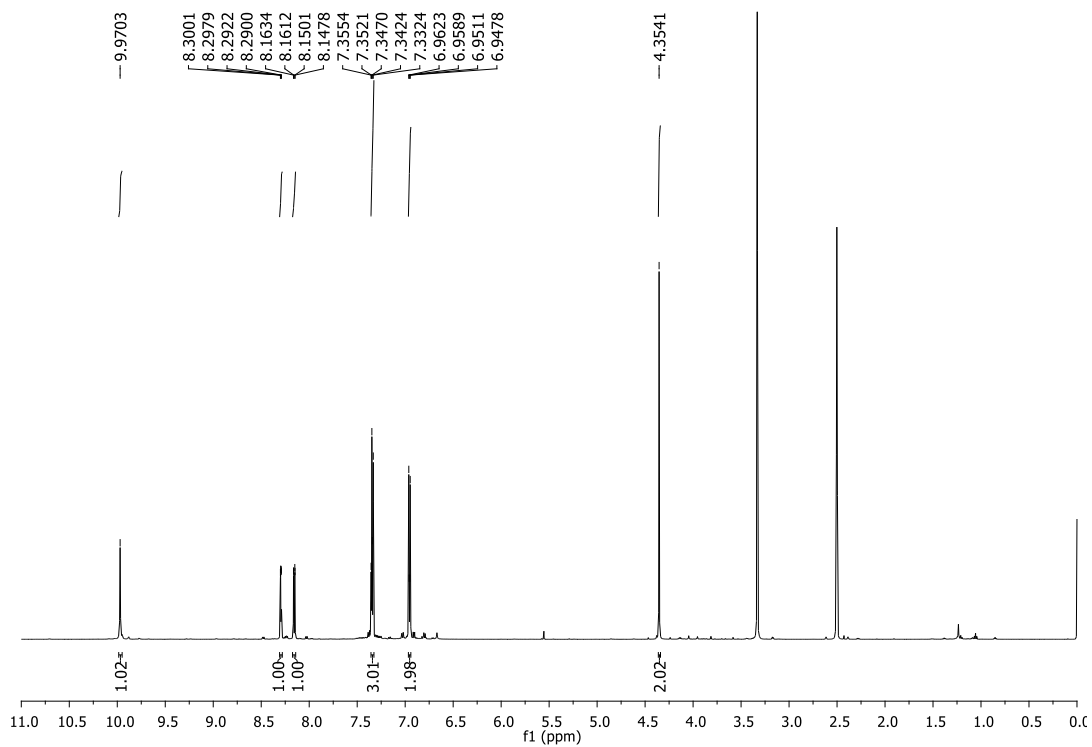


b) ^{13}C NMR spektar 2-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)acetonitrila **16**

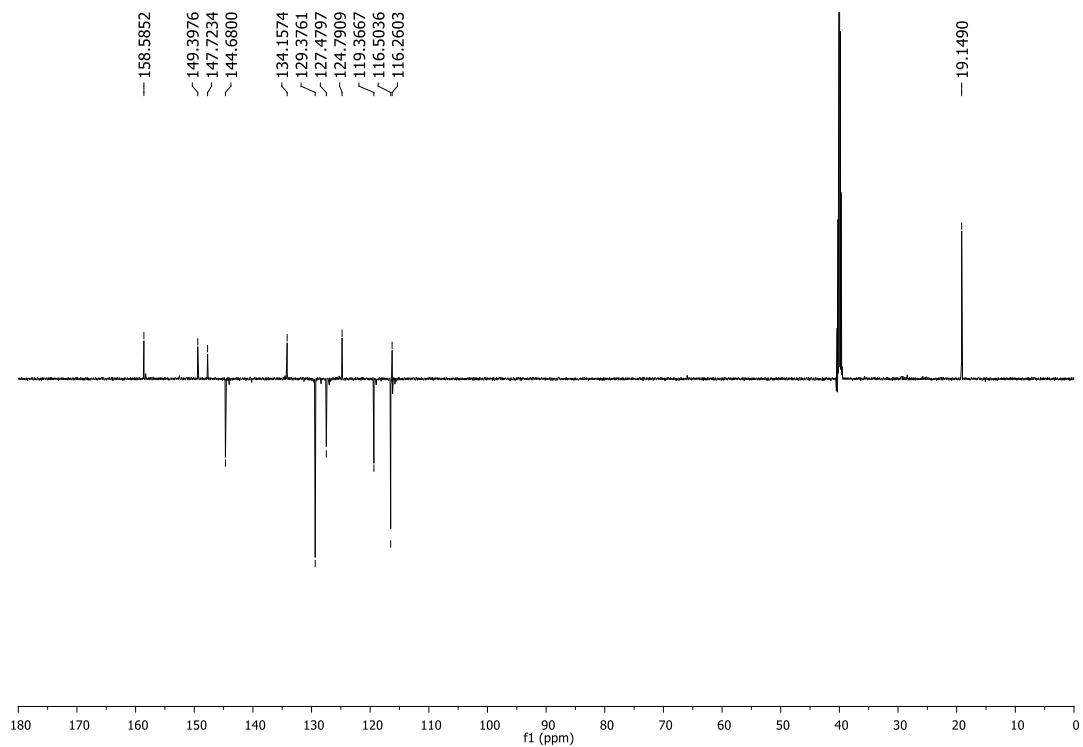


Prilog 11.

a) ^1H NMR spektar 2-(3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)acetonitrila **17**

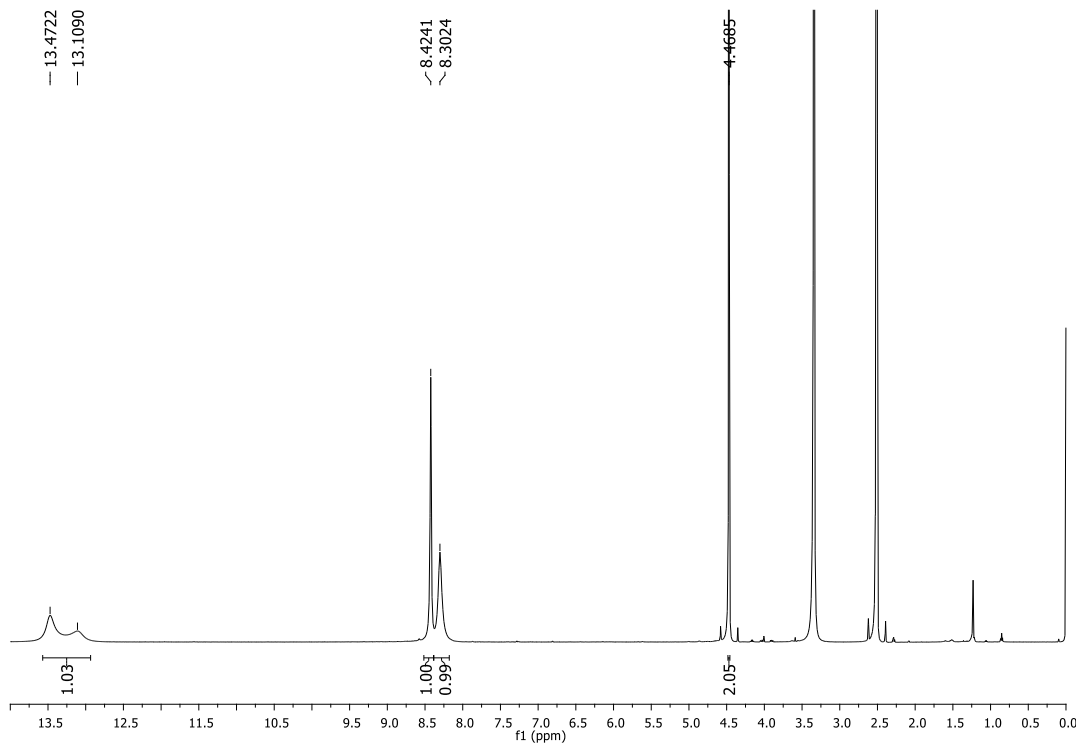


b) ^{13}C NMR spektar 2-(3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)acetonitrila **17**

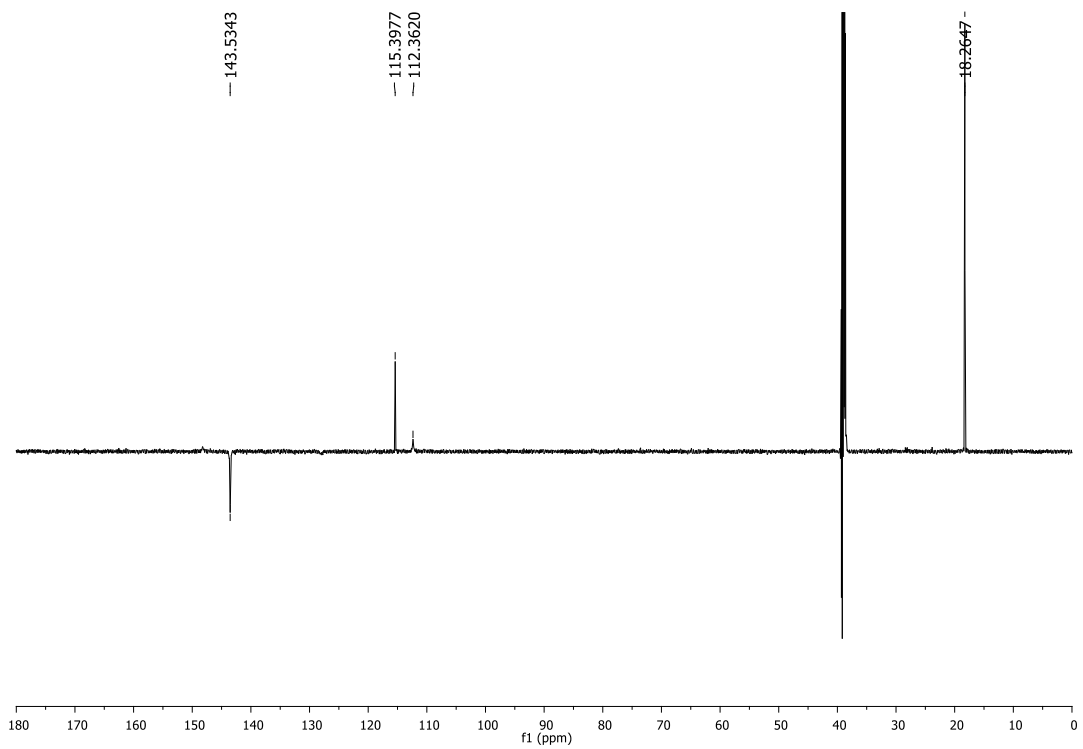


Prilog 12.

a) ^1H NMR spektar 2-(6-brom-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)acetonitrila **18**

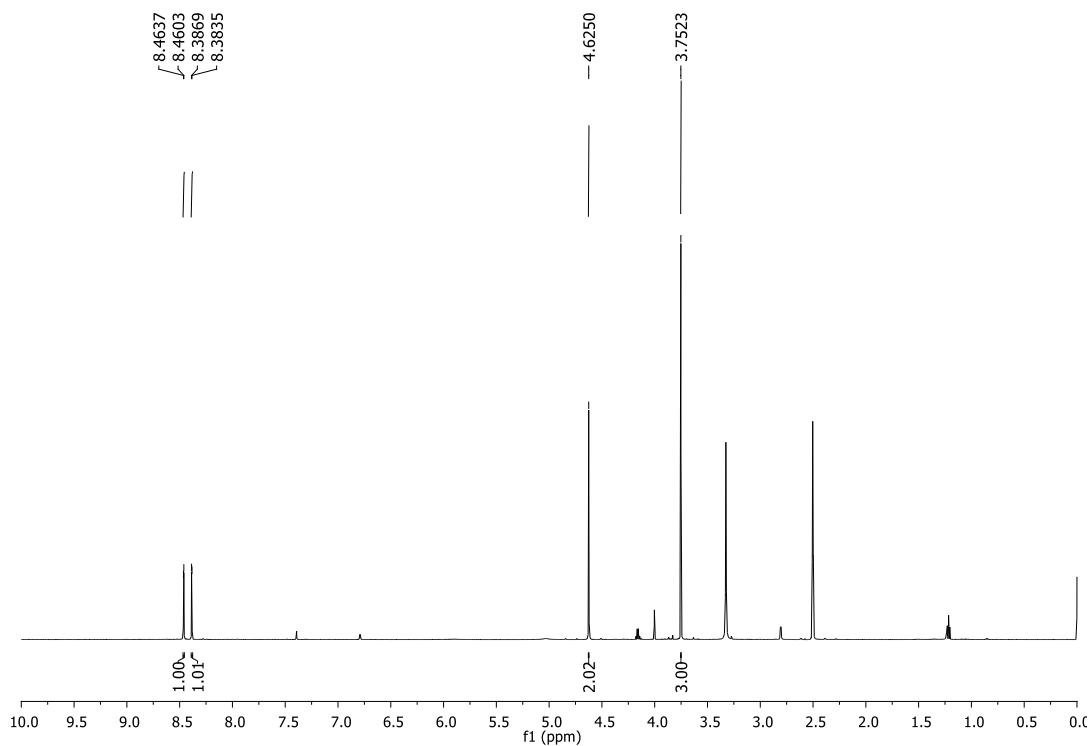


b) ^{13}C NMR spektar 2-(6-brom-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)acetonitrila **18**

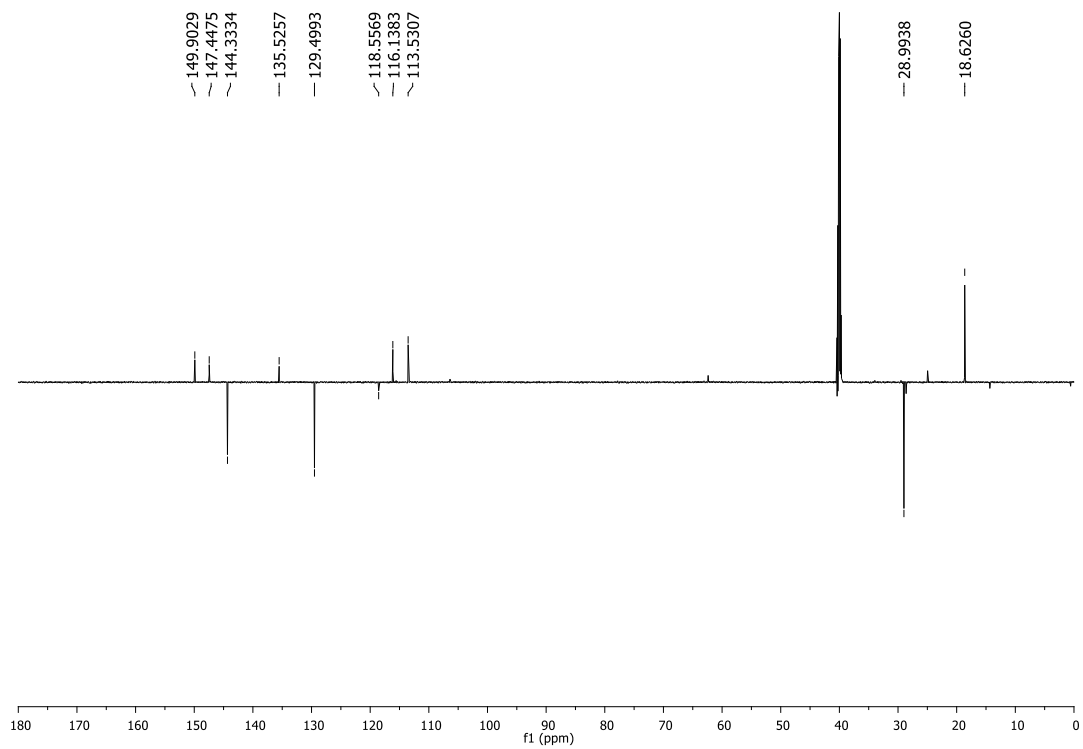


Prilog 13.

a) ^1H NMR spektar 2-(6-brom-3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)acetonitrila **19**

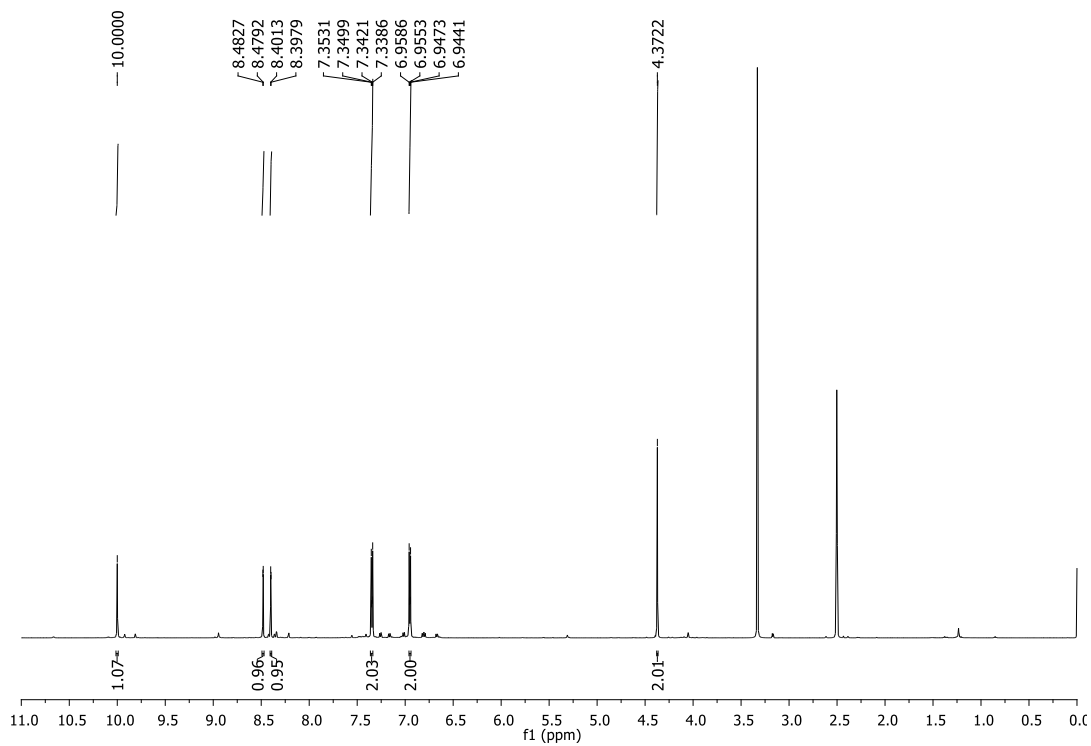


b) ^{13}C NMR spektar 2-(6-brom-3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)acetonitrila **19**



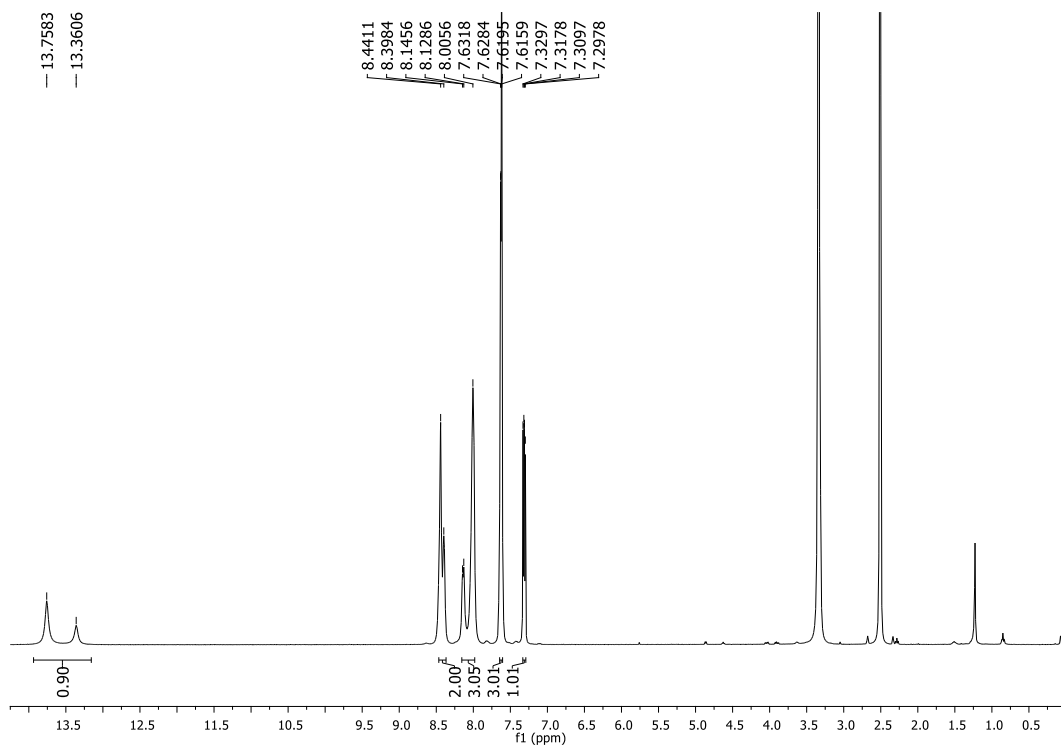
Prilog 14.

^1H NMR spektar 2-(6-brom-3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-ol)acetonitrila **20**

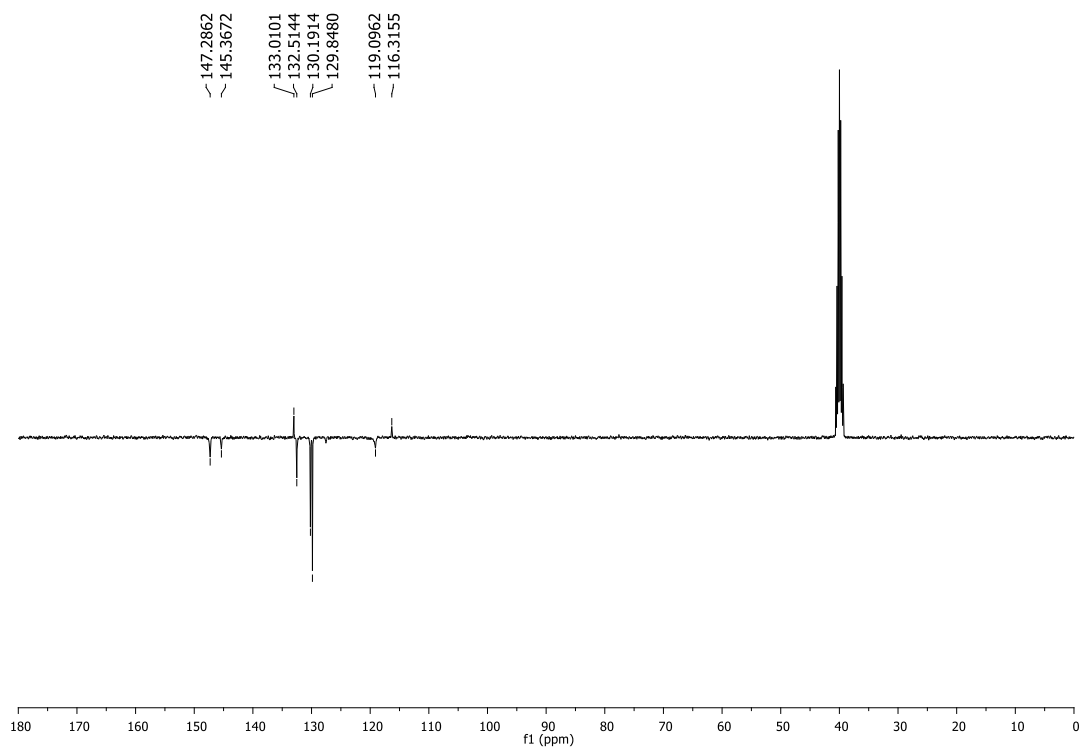


Prilog 15.

a) ^1H NMR spektar (*E*)-2-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-fenilakrilonitrila **25**

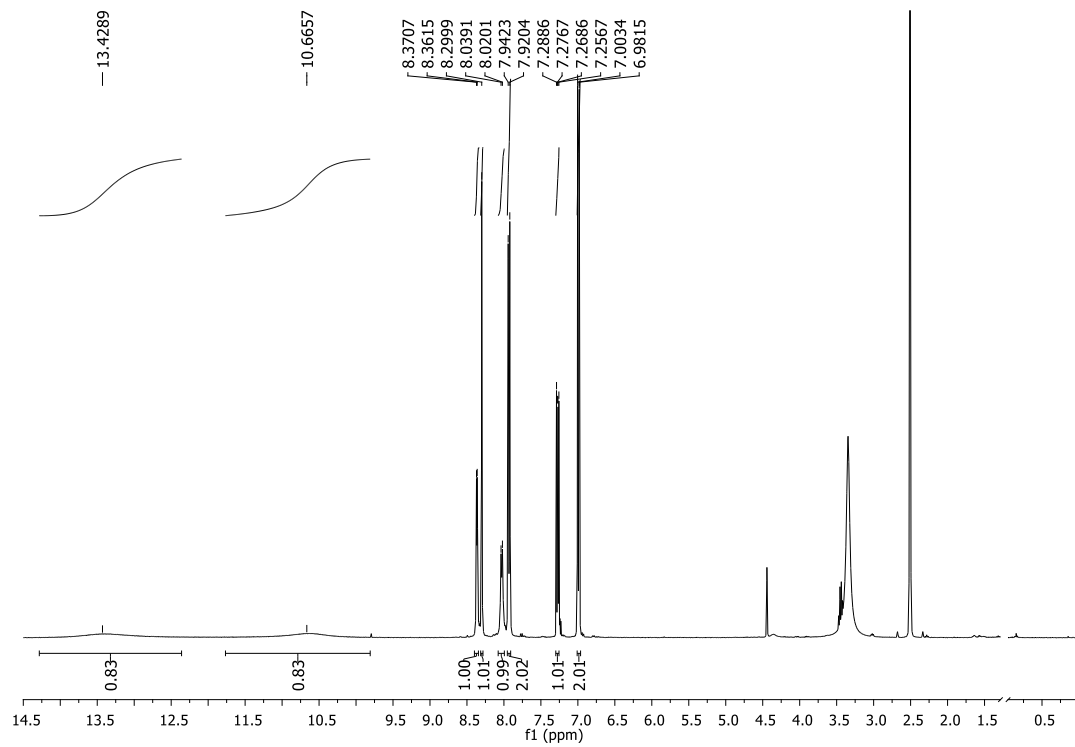


b) ^{13}C NMR spektar (*E*)-2-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-fenilakrilonitrila **25**

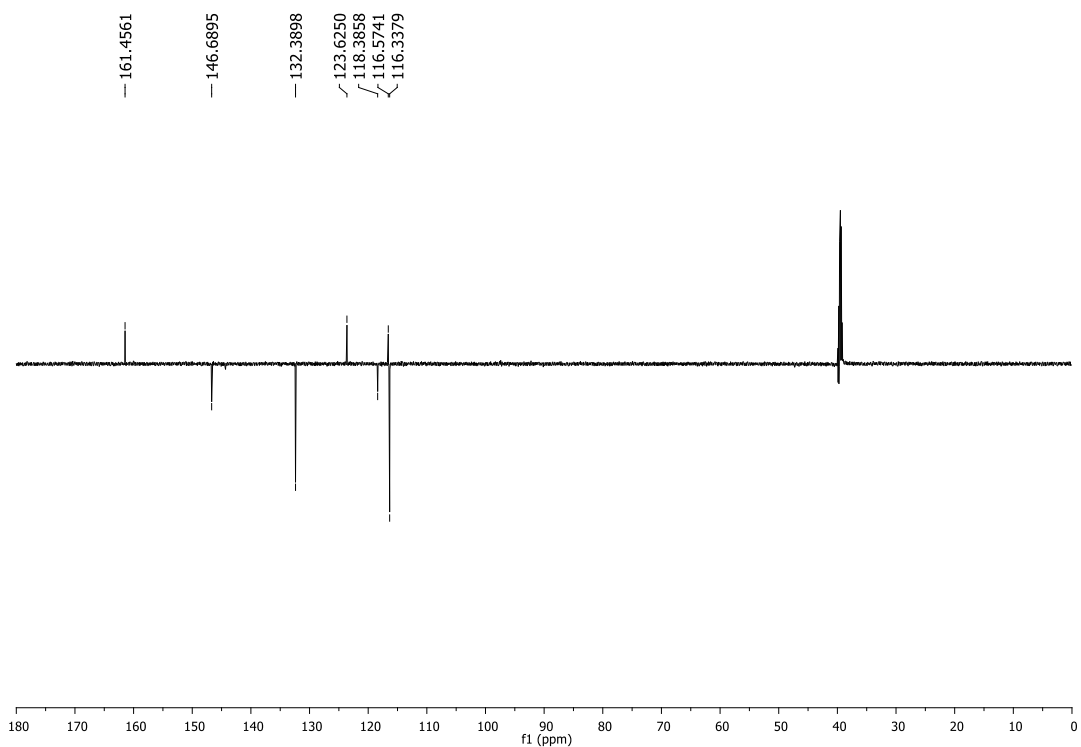


Prilog 16.

a) ^1H NMR spektar (*E*)-2-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(4-hidroksifenil)akrilonitrila **26**

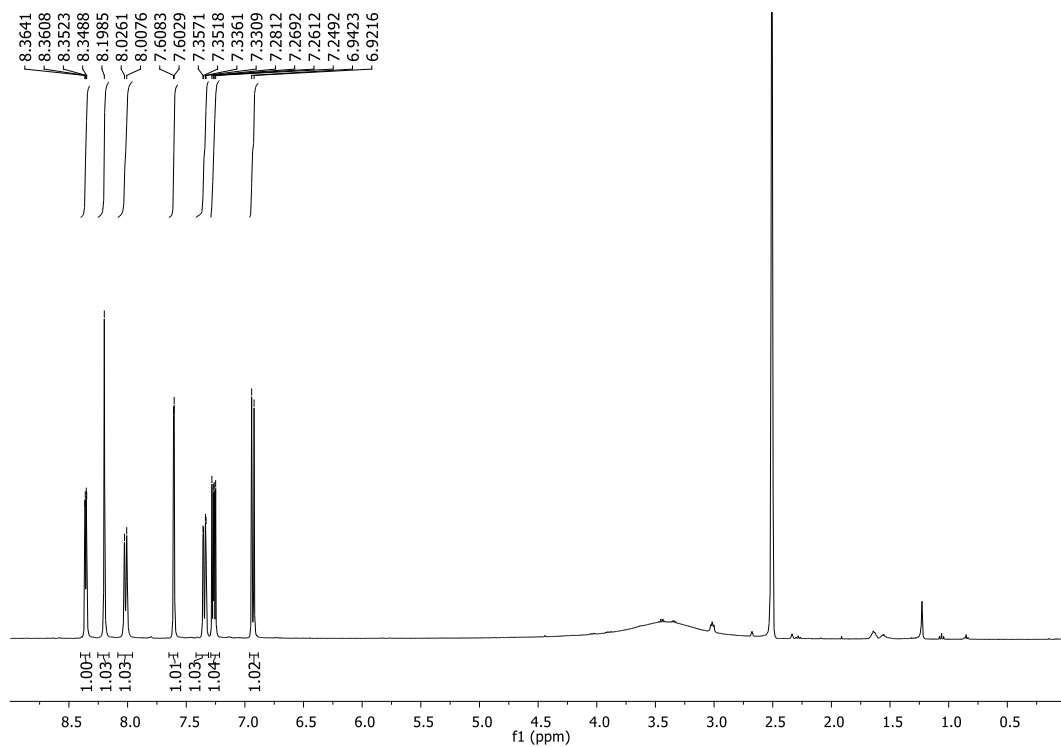


b) ^{13}C NMR spektar (*E*)-2-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(4-hidroksifenil)akrilonitrila **26**

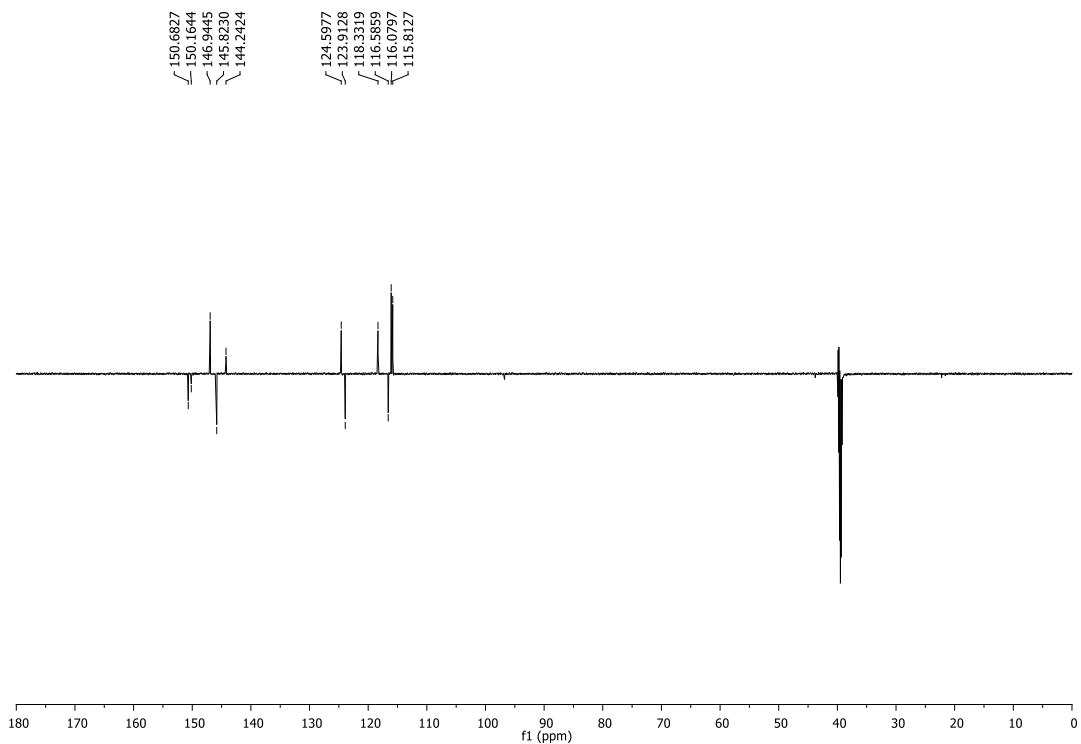


Prilog 17.

a) ^1H NMR spektar (*E*)-2-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4-dihidroksifenil)akrilonitrila **27**

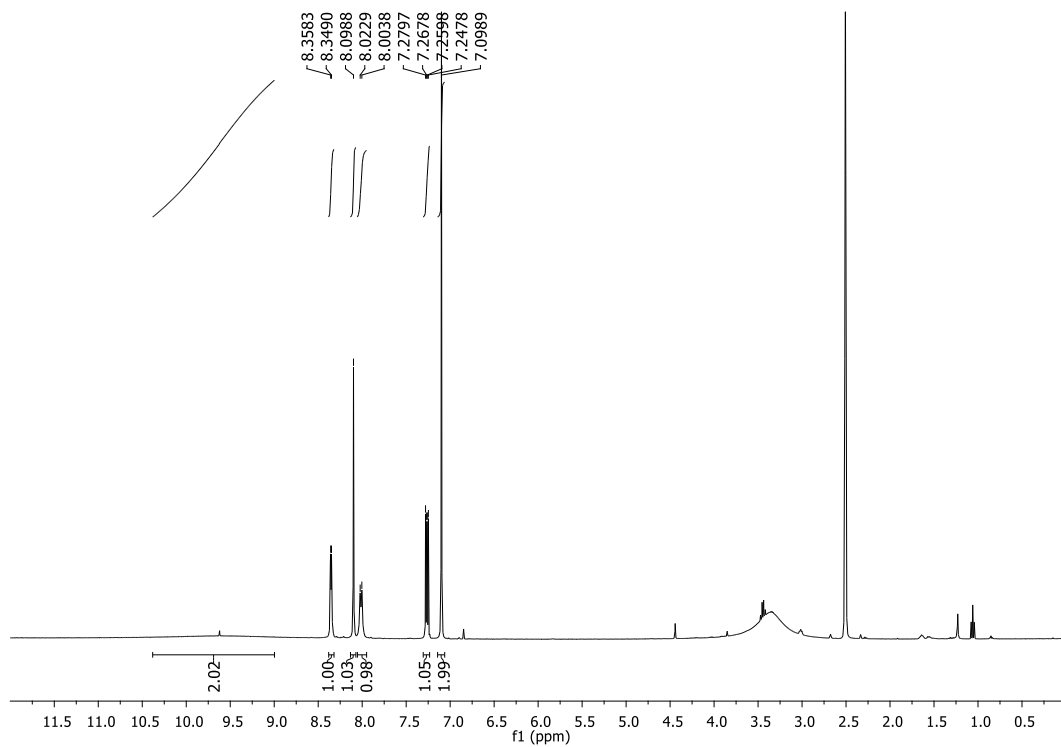


b) ^{13}C NMR spektr (*E*)-2-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4-dihidroksifenil)akrilonitrila
27

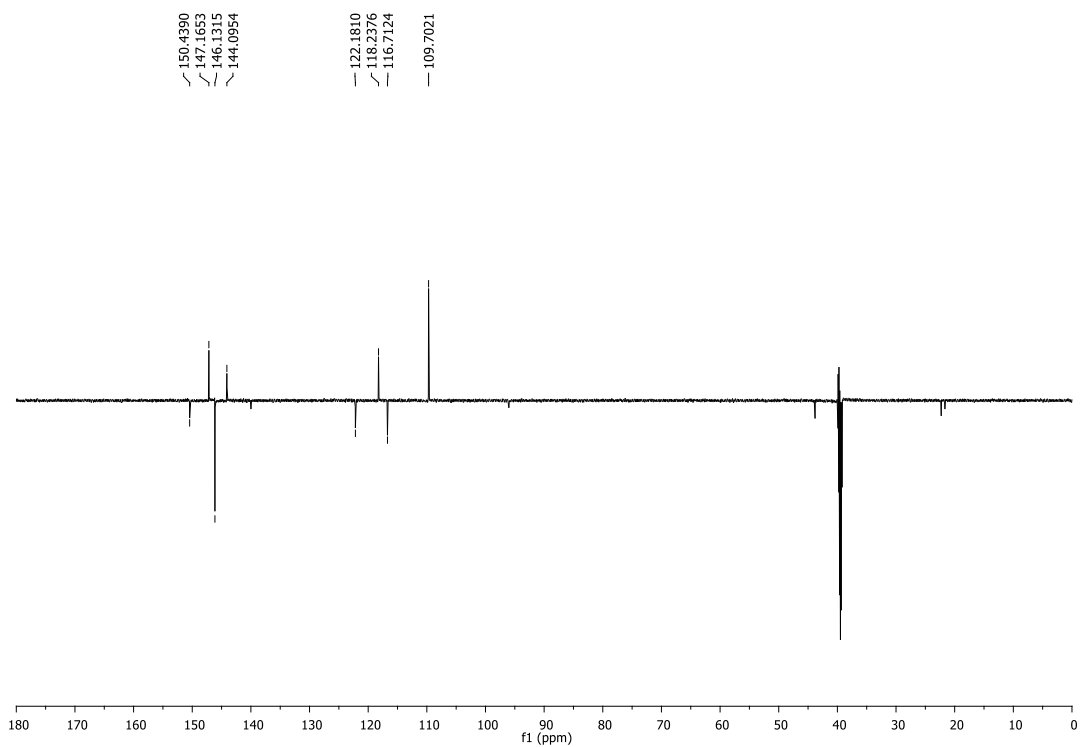


Prilog 18.

a) ^1H NMR spektr (*E*)-2-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4,5-trihidroksifenil)akrilonitril
28

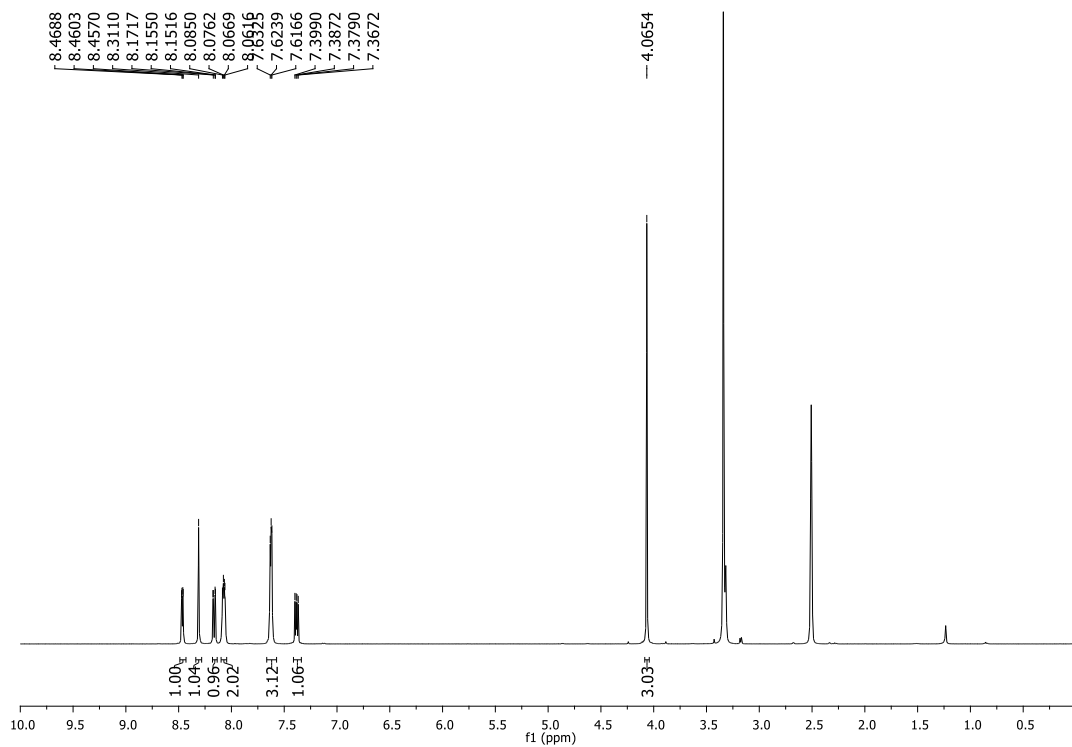


b) ^{13}C NMR spektr (*E*)-2-(3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4,5-trihidroksifenil) akrilonitril **28**

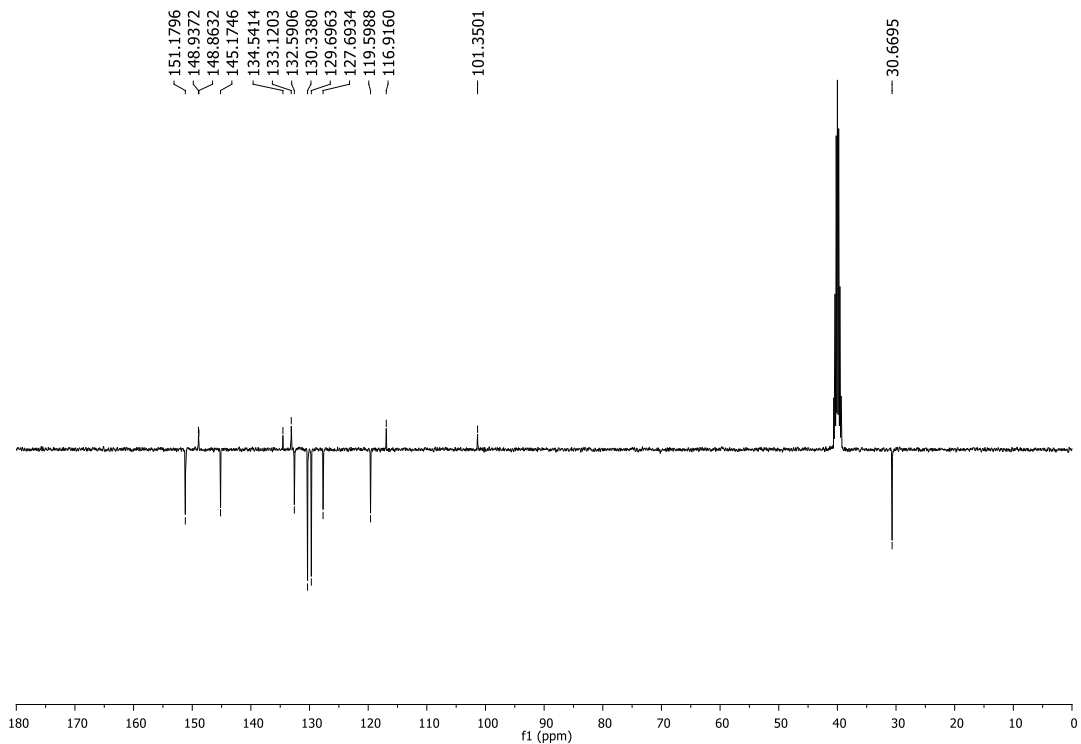


Prilog 19.

a) ^1H NMR spektr (*E*)-2-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-fenilakrilonitrila **29**

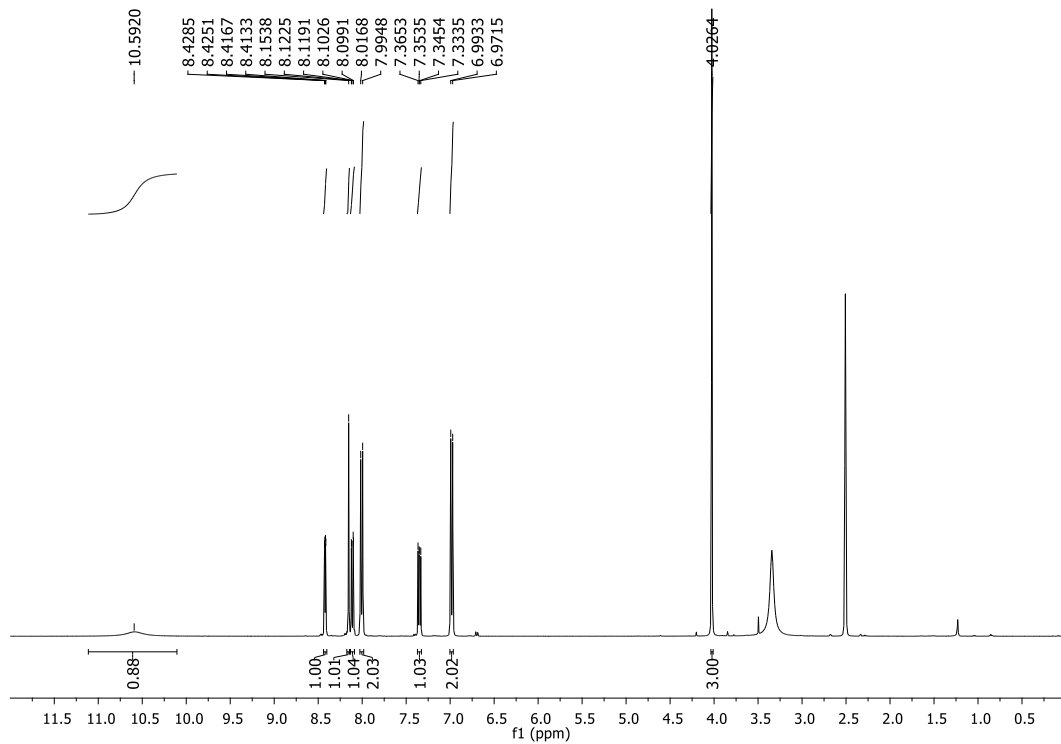


b) ^{13}C NMR spektar (*E*)-2-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-fenilakrilonitrila **29**

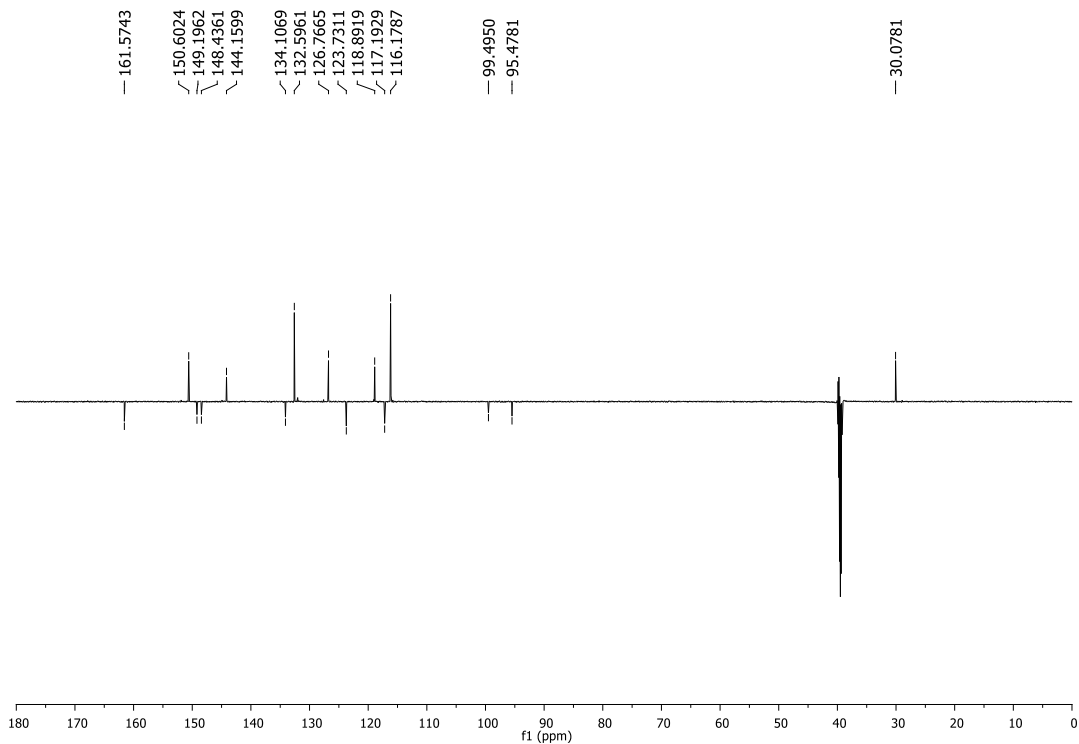


Prilog 20.

a) ^1H NMR spektar (*E*)-3-(4-hidroksifenil)-2-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitrila **30**

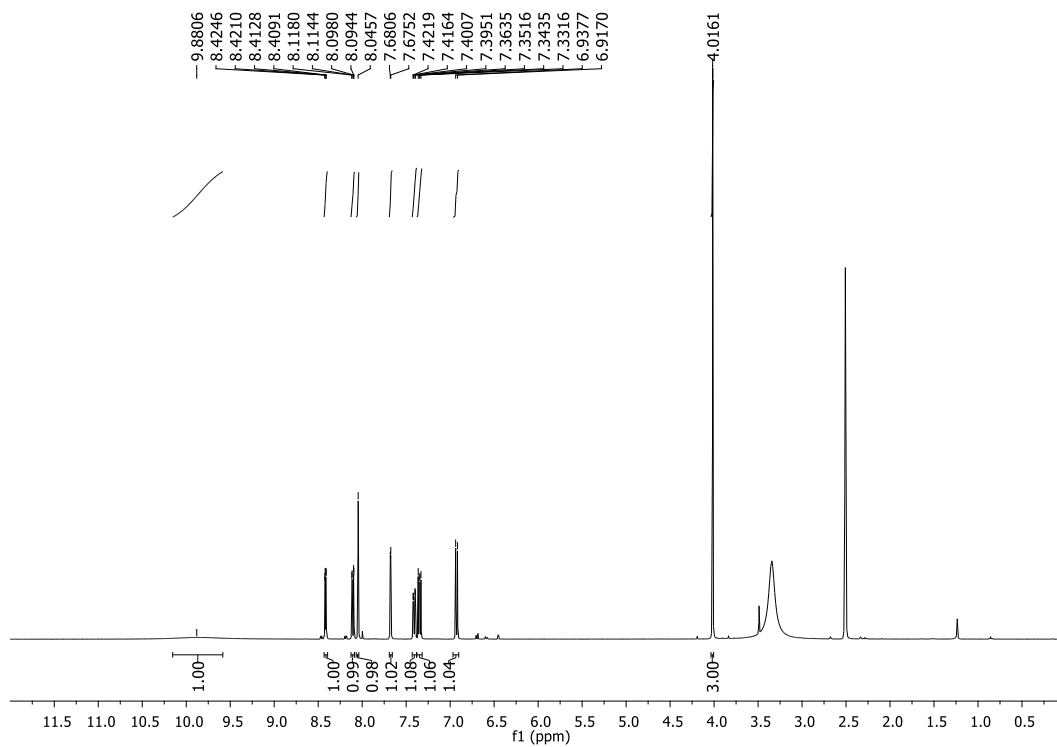


b) ^{13}C NMR spektar (*E*)-3-(4-hidroksifenil)-2-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitrila **30**

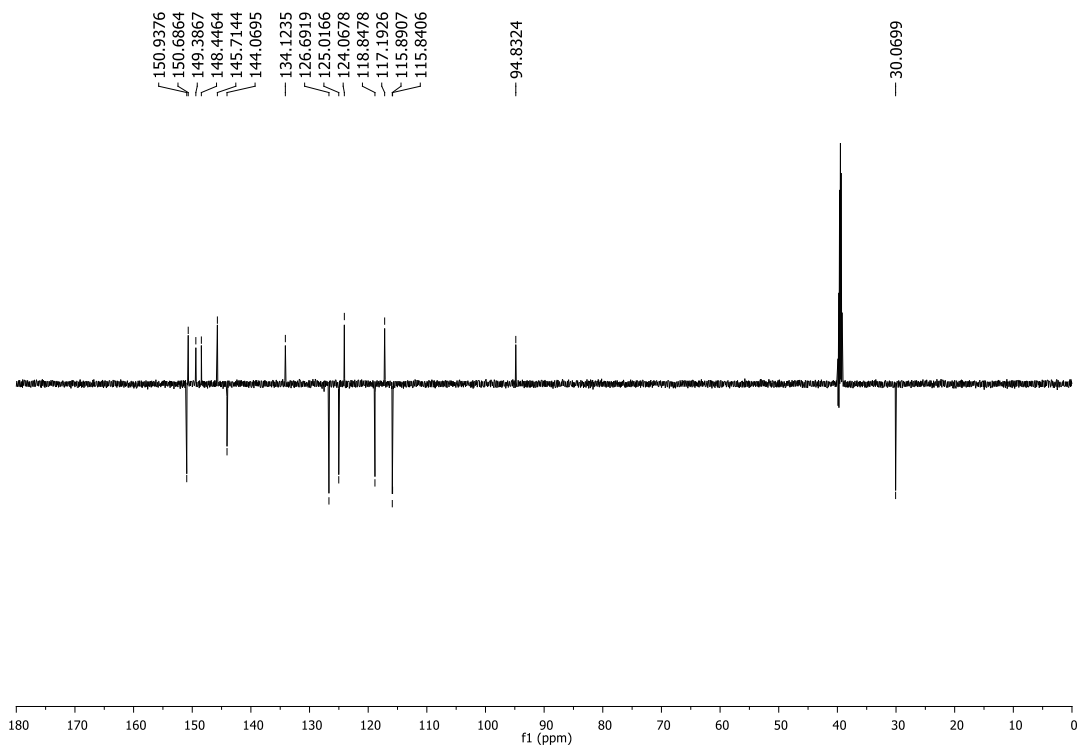


Prilog 21.

a) ^1H NMR spektar (*E*)-3-(3,4-dihidroksifenil)-2-(3-metil-3*H*-imidazo [4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitrila **31**

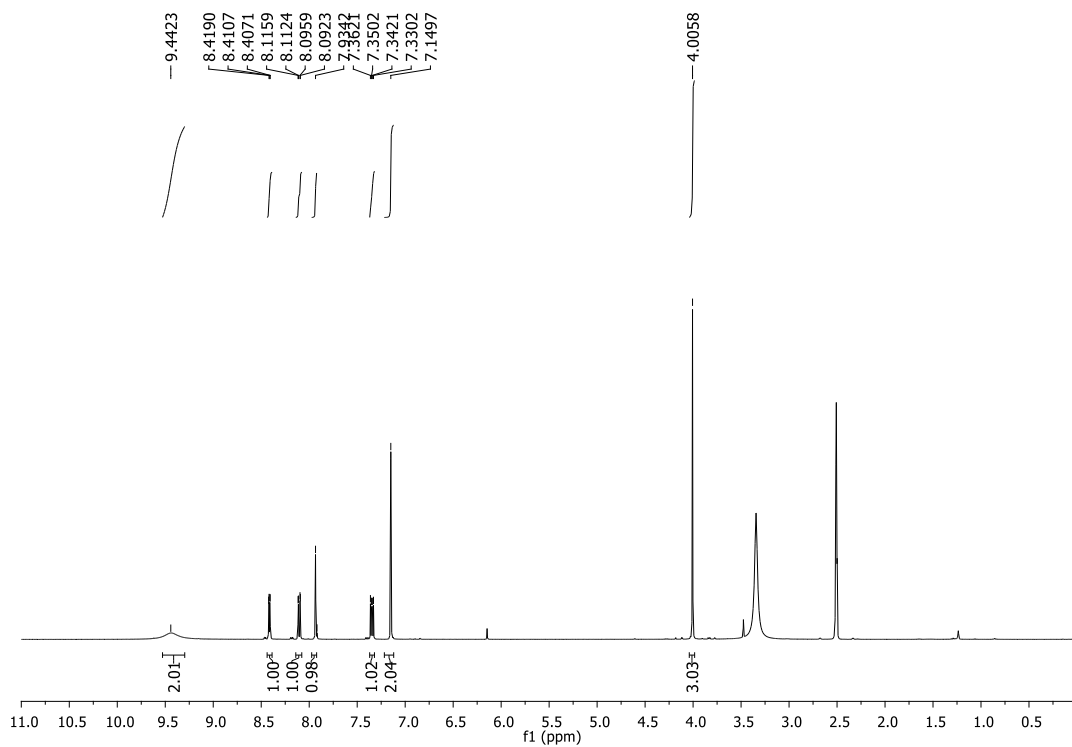


b) ^{13}C NMR spektar (*E*)-3-(3,4-dihidroksifenil)-2-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitrila **31**

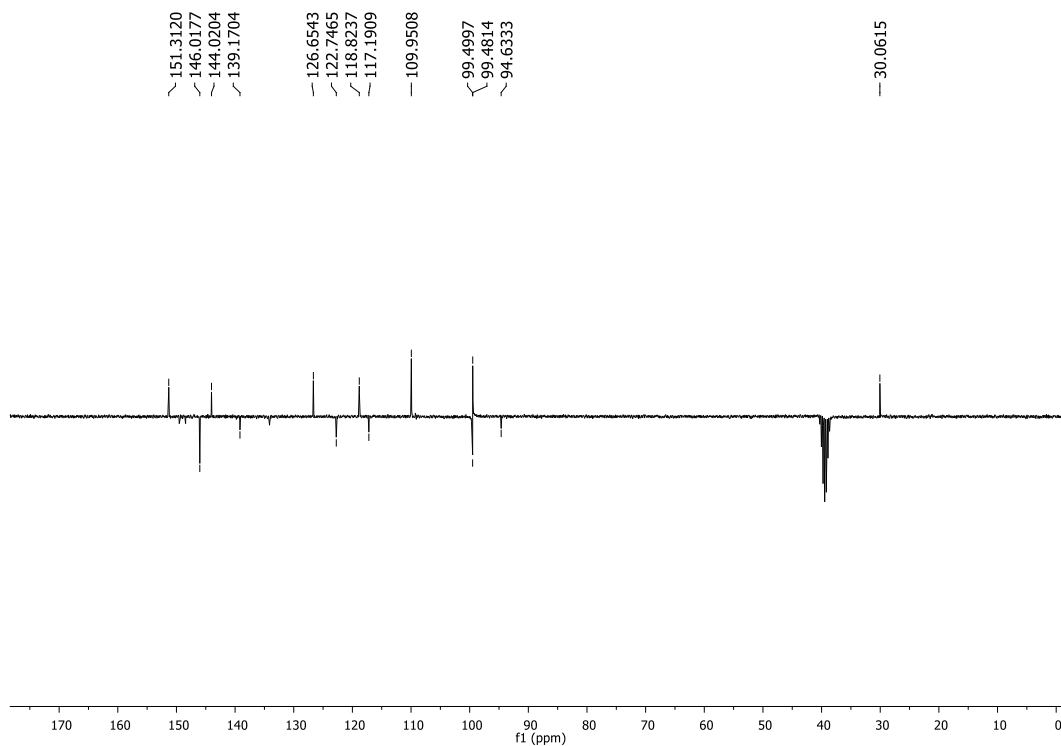


Prilog 22.

a) ^1H NMR spektar (*E*)-3-(3,4,5-trihidroksifenil)-2-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitrila **32**

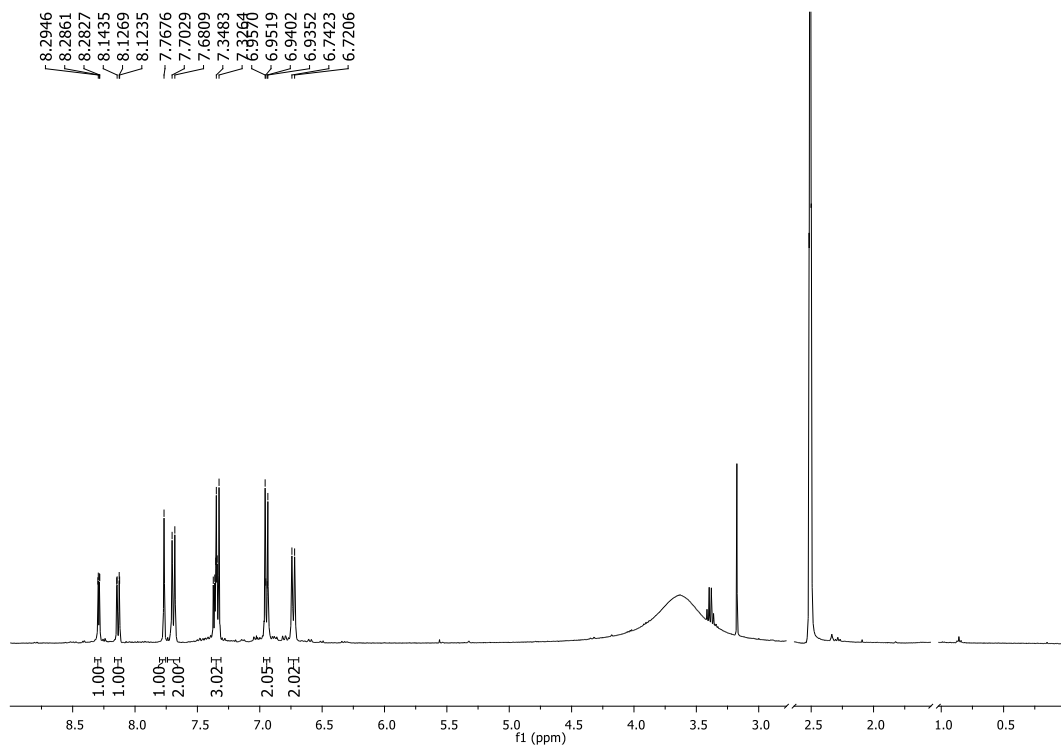


b) ^{13}C NMR spektar (*E*)-3-(3,4,5-trihidroksifenil)-2-(3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitrila **32**

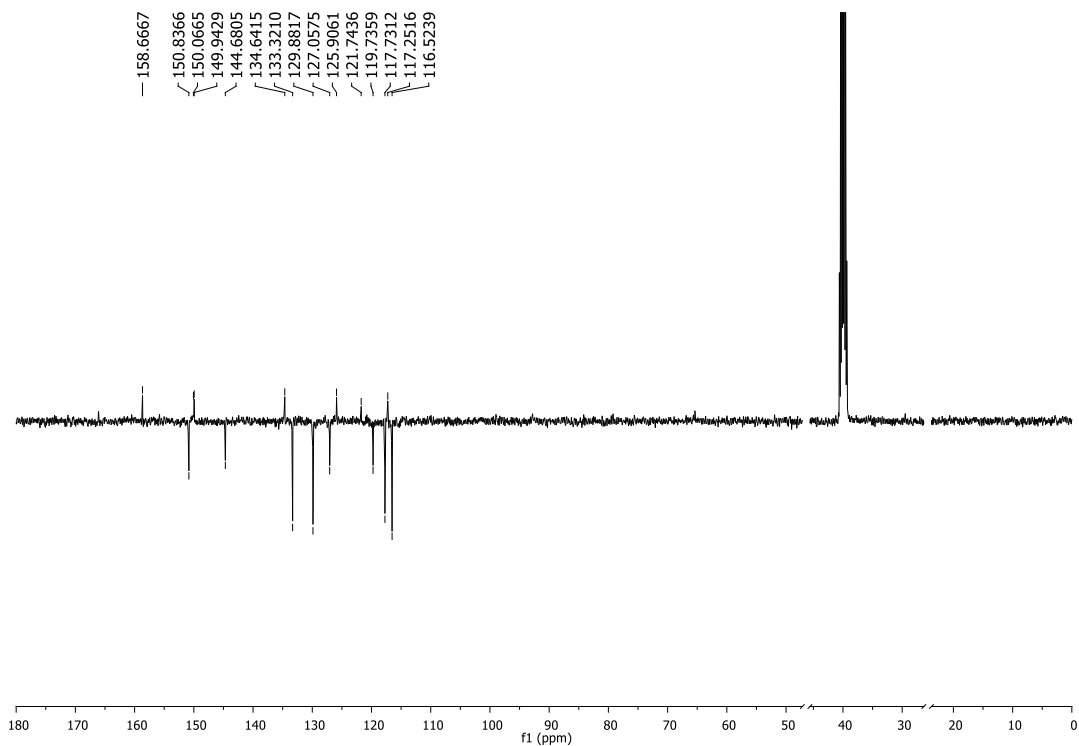


Prilog 23.

a) ^1H NMR spektar (*E*)-3-(4-hidroksifenil)-2-(3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitrila **34**

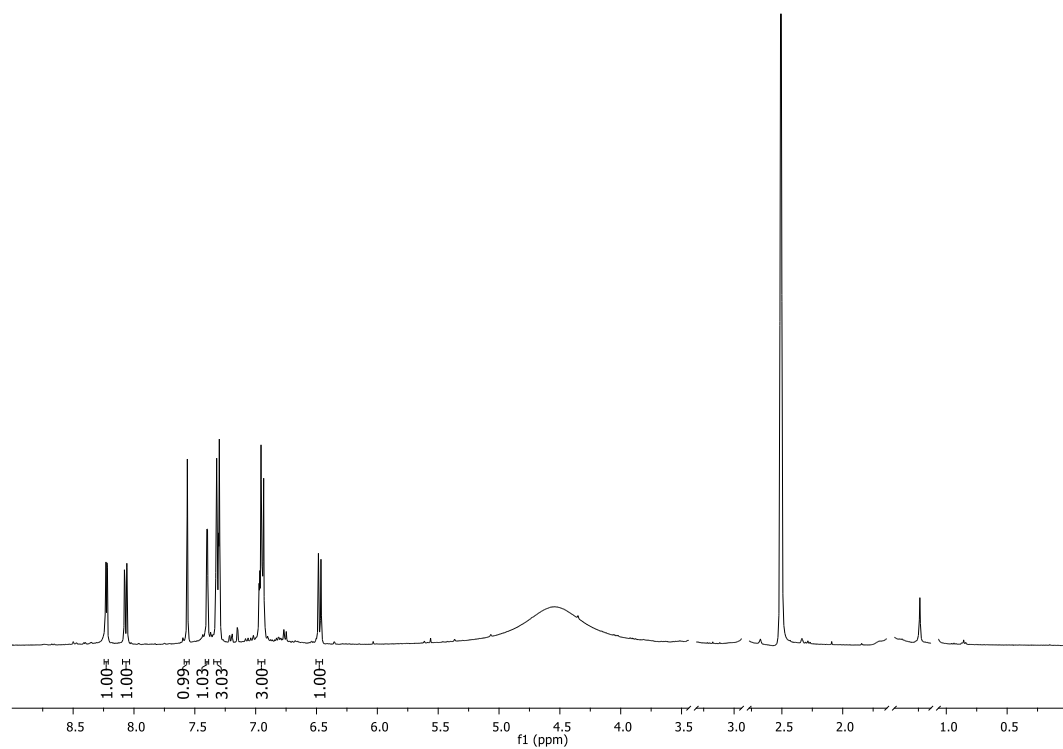


b) ^{13}C NMR spektar (*E*)-3-(4-hidroksifenil)-2-(3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitrila **34**

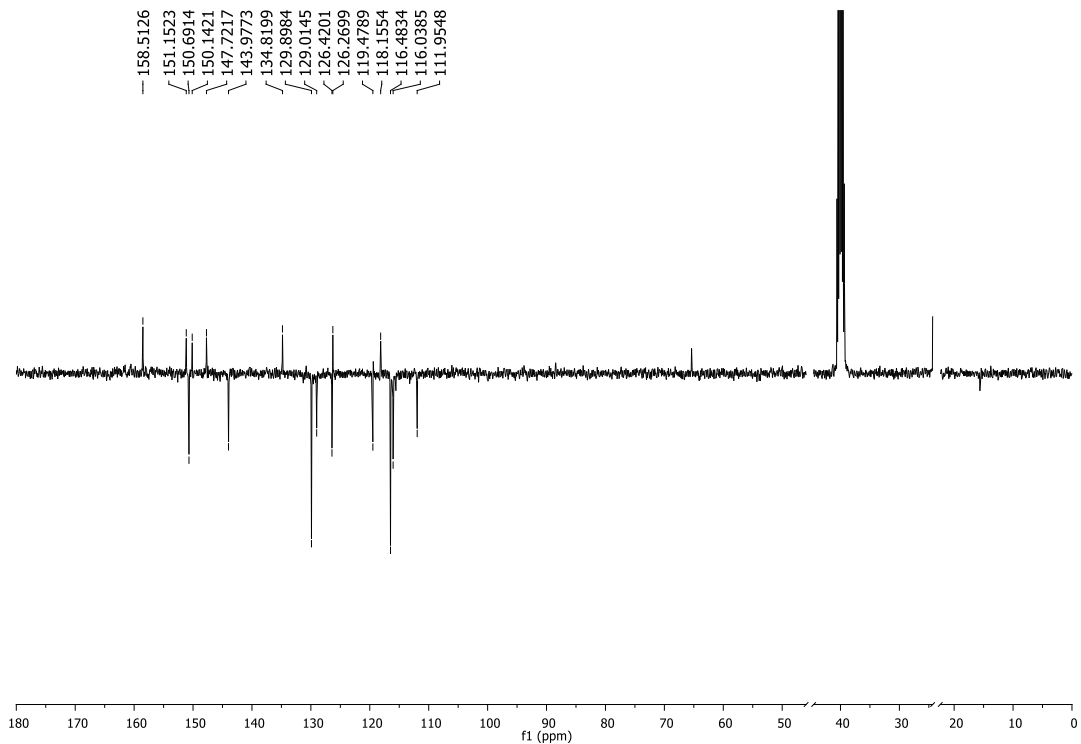


Prilog 24.

a) ^1H NMR spektar (*E*)-3-(3,4-dihidroksifenil)-2-(3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitrila **35**

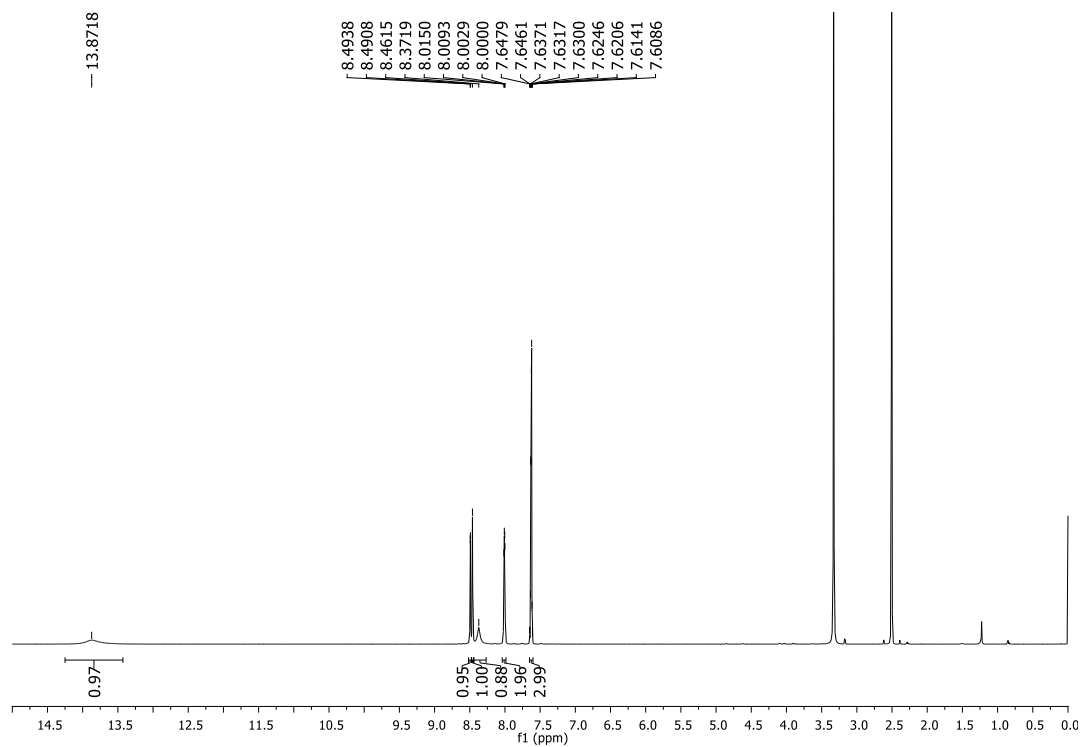


b) ^{13}C NMR spektar (*E*)-3-(3,4-dihidroksifenil)-2-(3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)akrilonitrila **35**

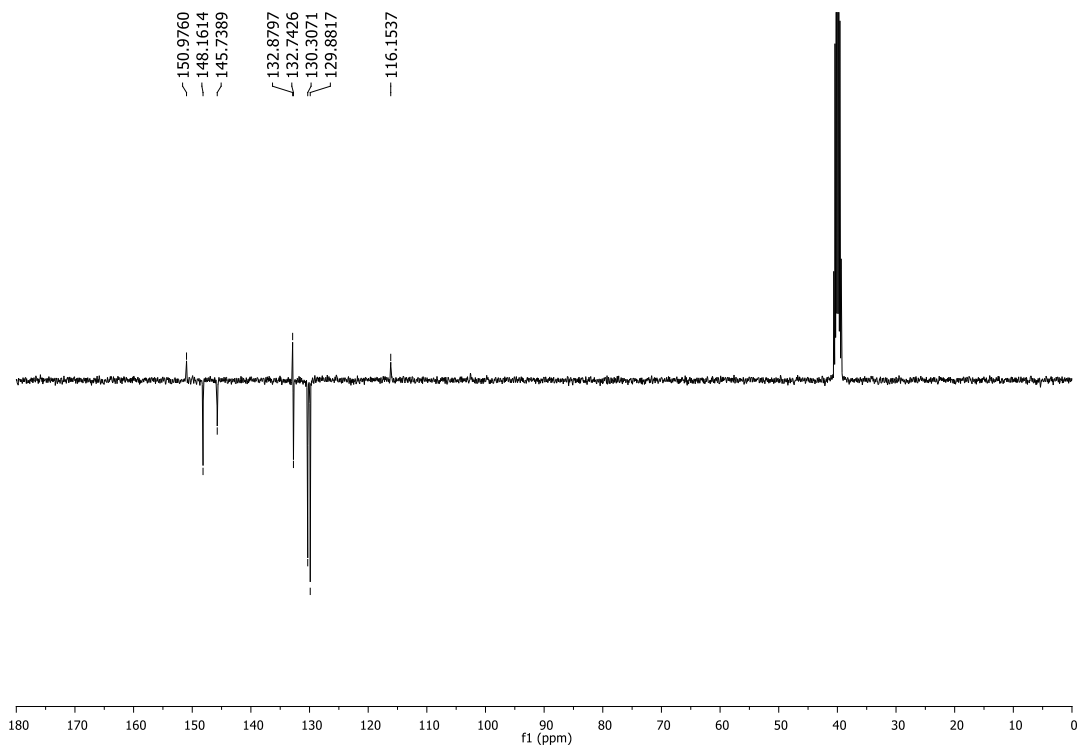


Prilog 25.

a) ^1H NMR spektar (*E*)-2-(6-brom-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-fenilakrilonitrila **37**

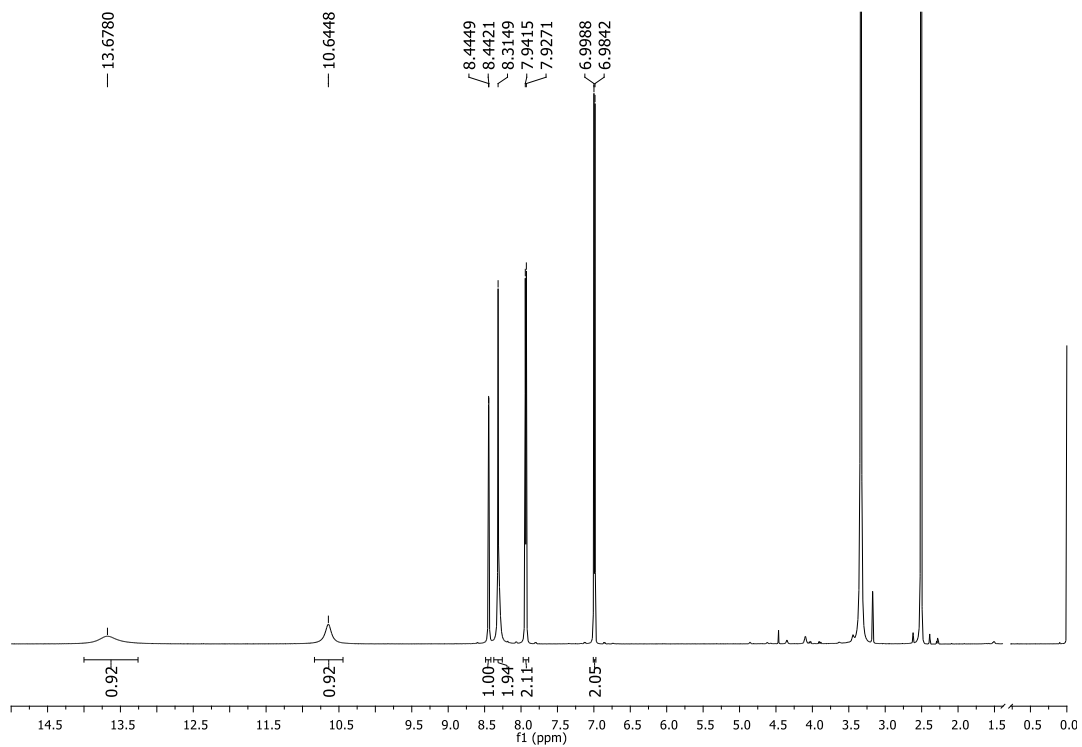


b) ^{13}C NMR spektar (*E*)-2-(6-brom-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-fenilakrilonitrila **37**

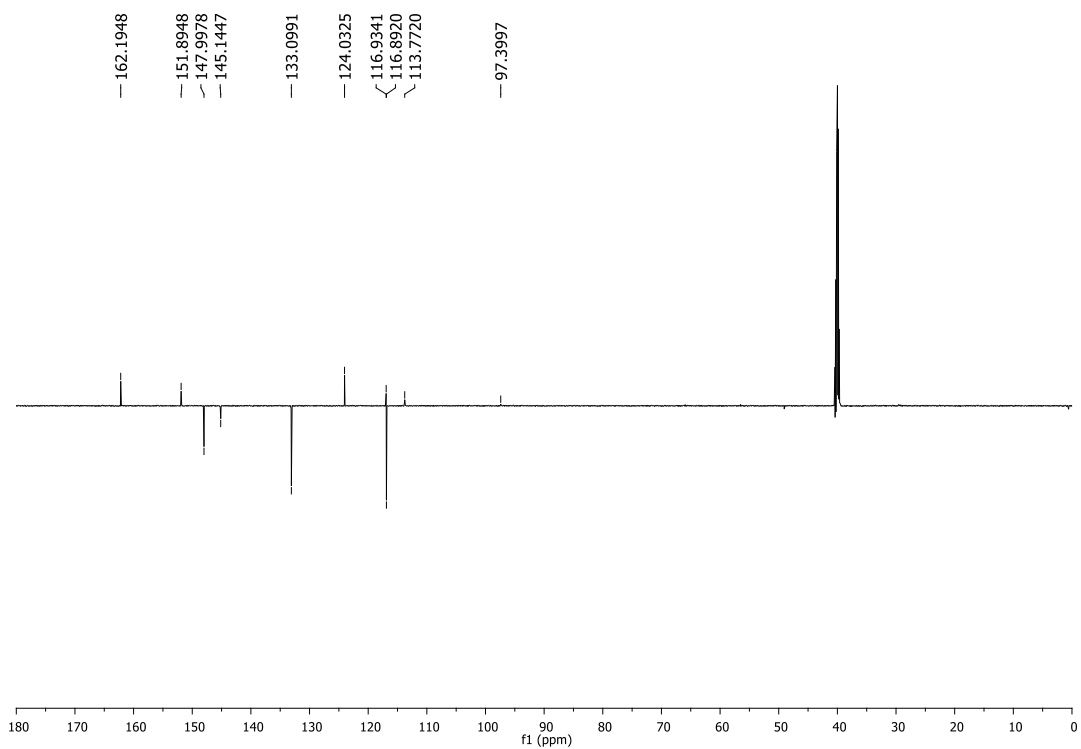


Prilog 26.

a) ^1H NMR spektar (*E*)-2-(6-brom-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(4-hidroksifenil)akrilonitrila **38**

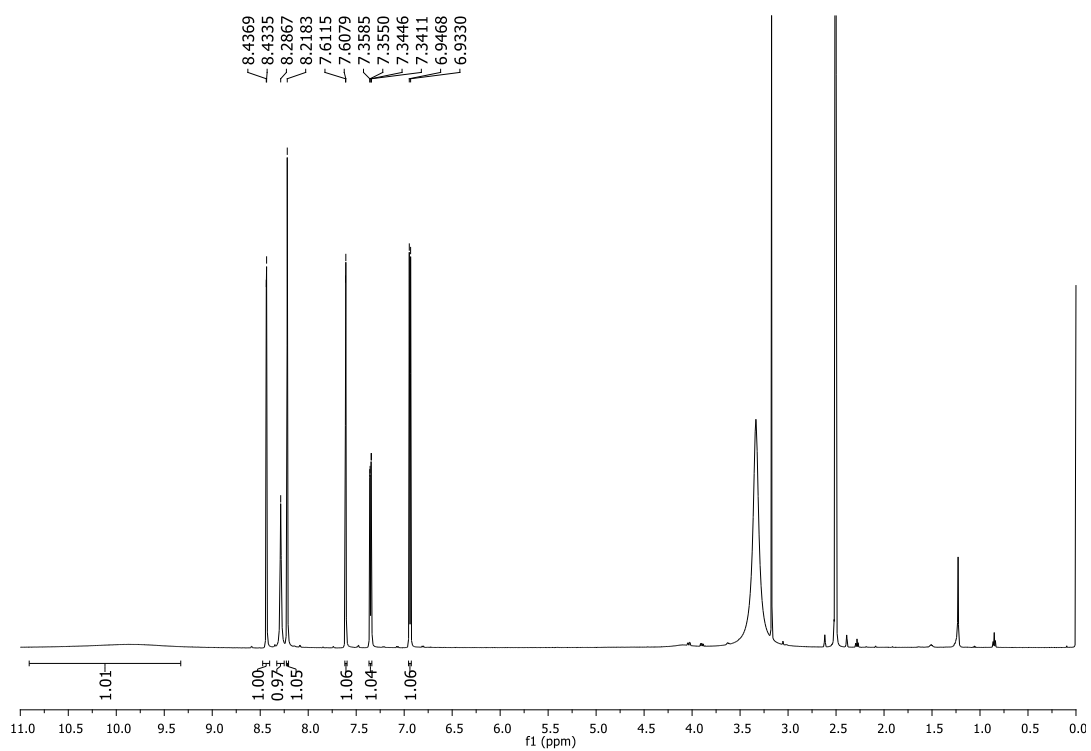


b) ^{13}C NMR spektar (*E*)-2-(6-brom-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(4-hidroksifenil) akrilonitrila **38**

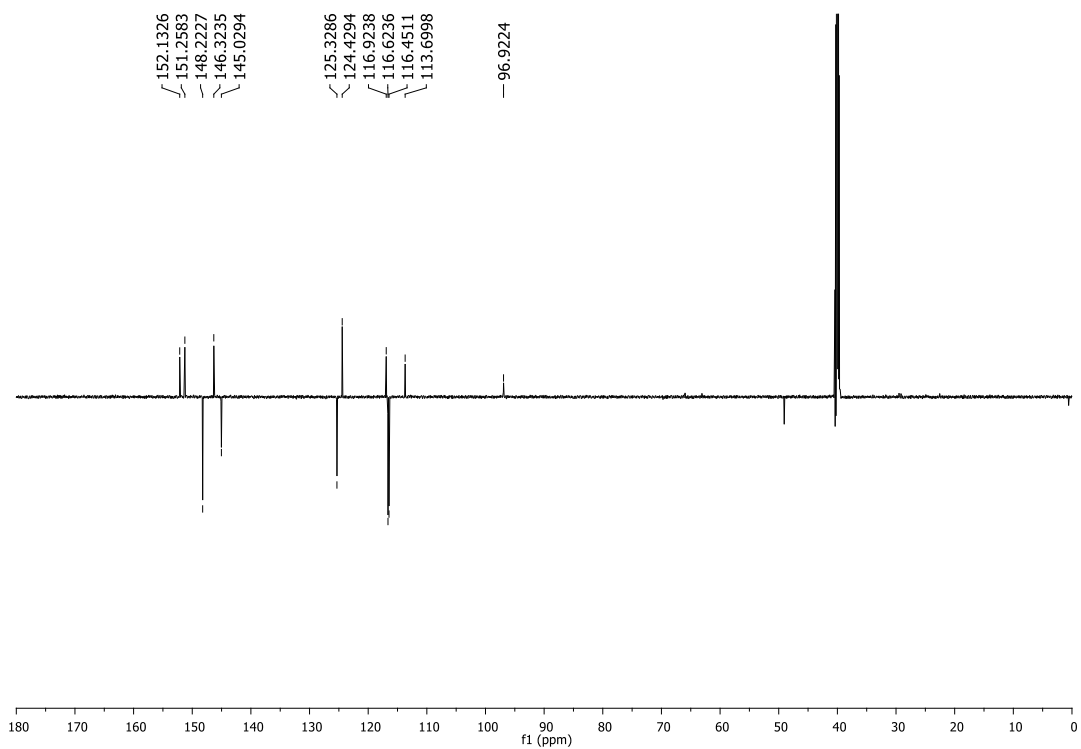


Prilog 27.

a) ^1H NMR spektar (*E*)-2-(6-brom-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4-dihidroksifenil) akrilonitrila **39**

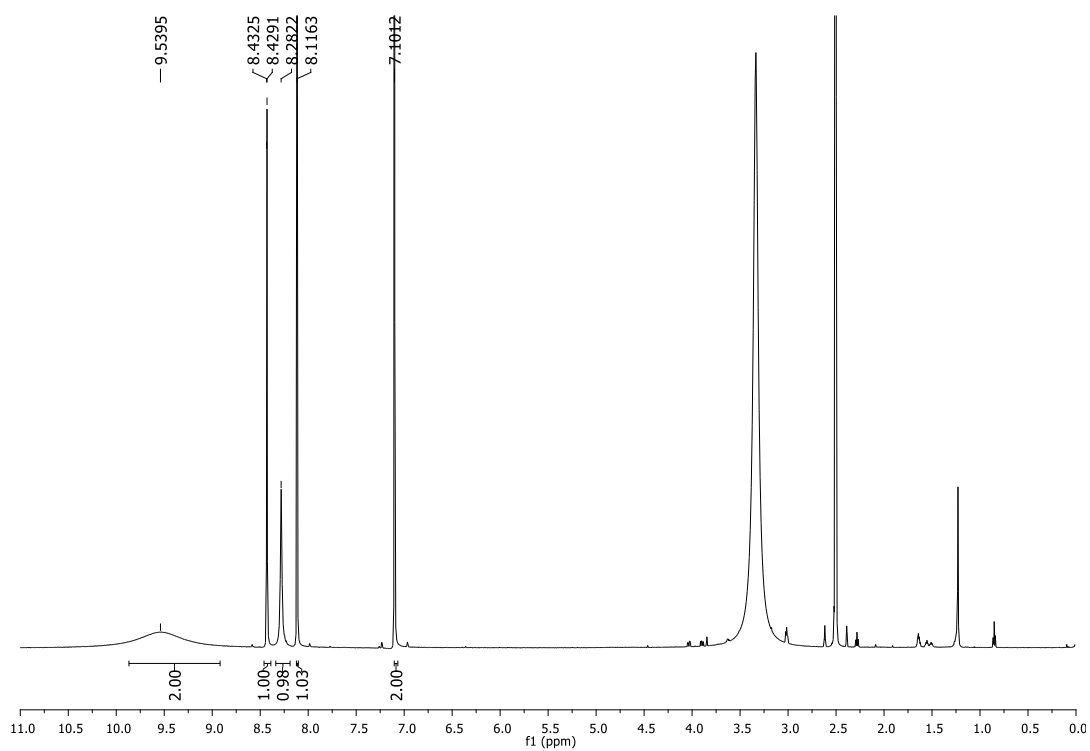


b) ^{13}C NMR spektr (*E*)-2-(6-brom-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4-dihidroksifenil) akrilonitrila **39**

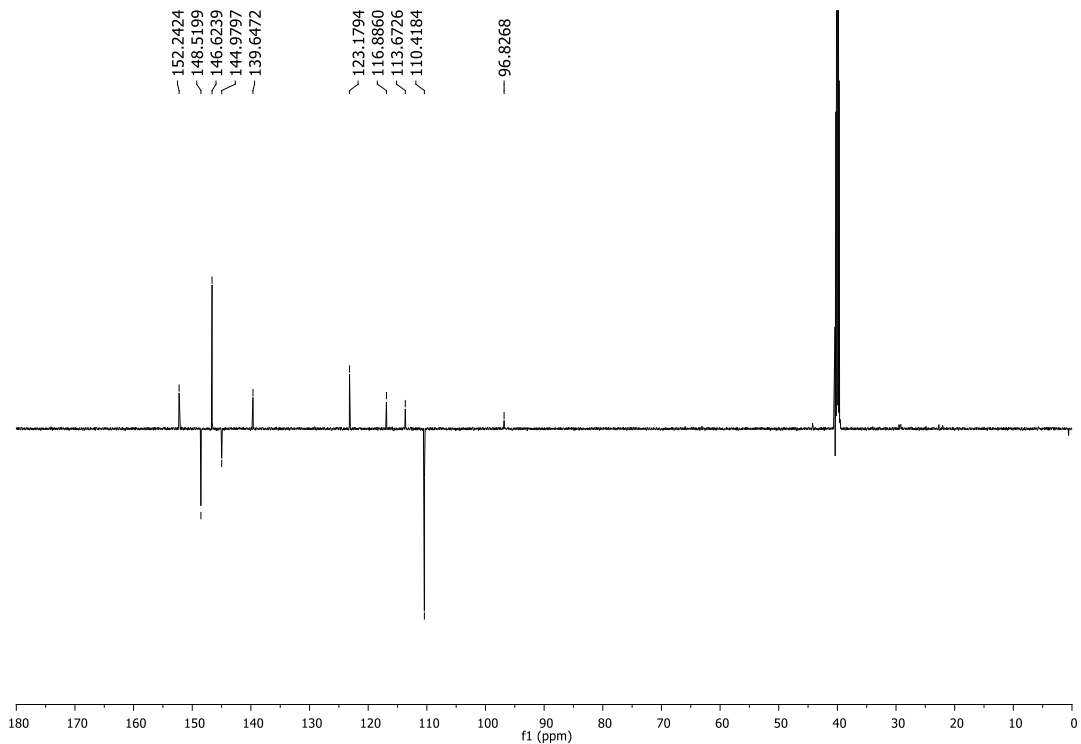


Prilog 28.

a) ^1H NMR spektr (*E*)-2-(6-brom-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4,5-trihidroksifenil) akrilonitrila **40**

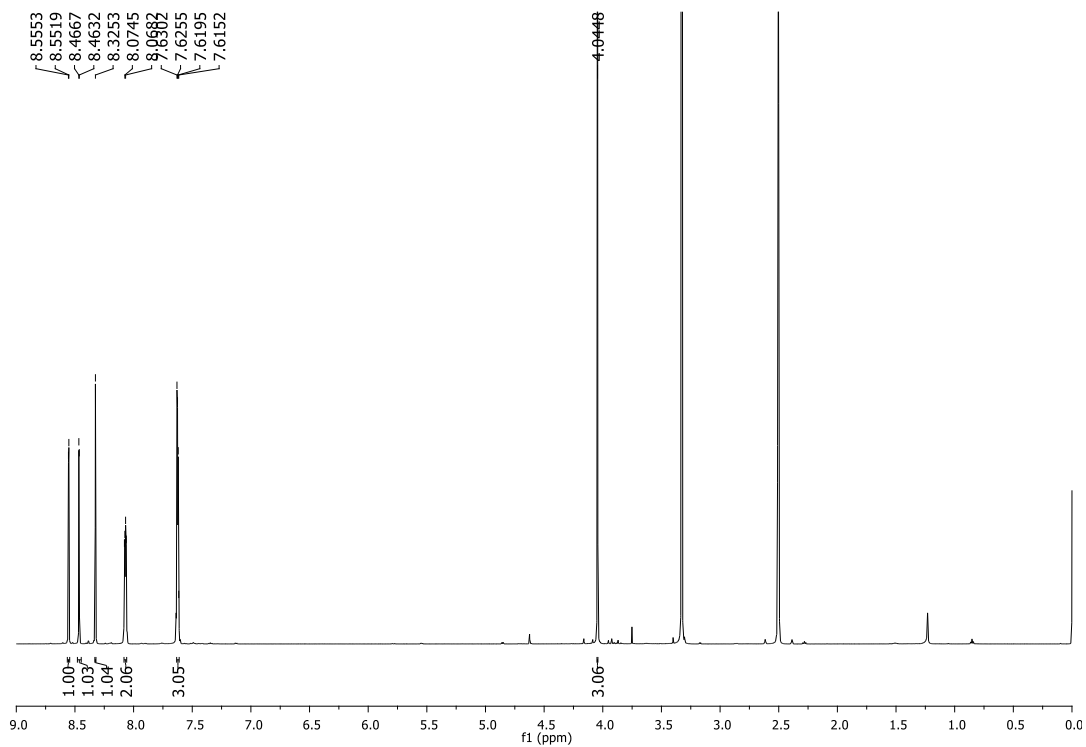


b) ^{13}C NMR spektar (*E*)-2-(6-brom-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4,5-trihidroksifenil) akrilonitrila **40**

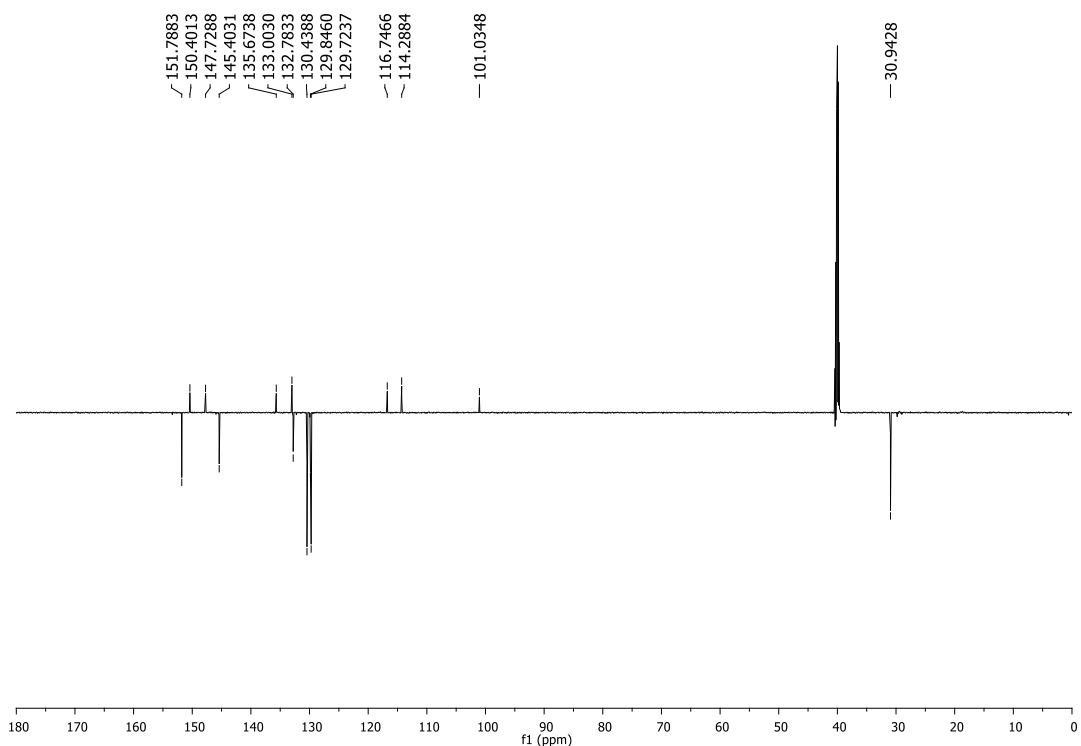


Prilog 29.

a) ^1H NMR spektar (*E*)-2-(6-brom-3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-fenilakrilonitrila **41**

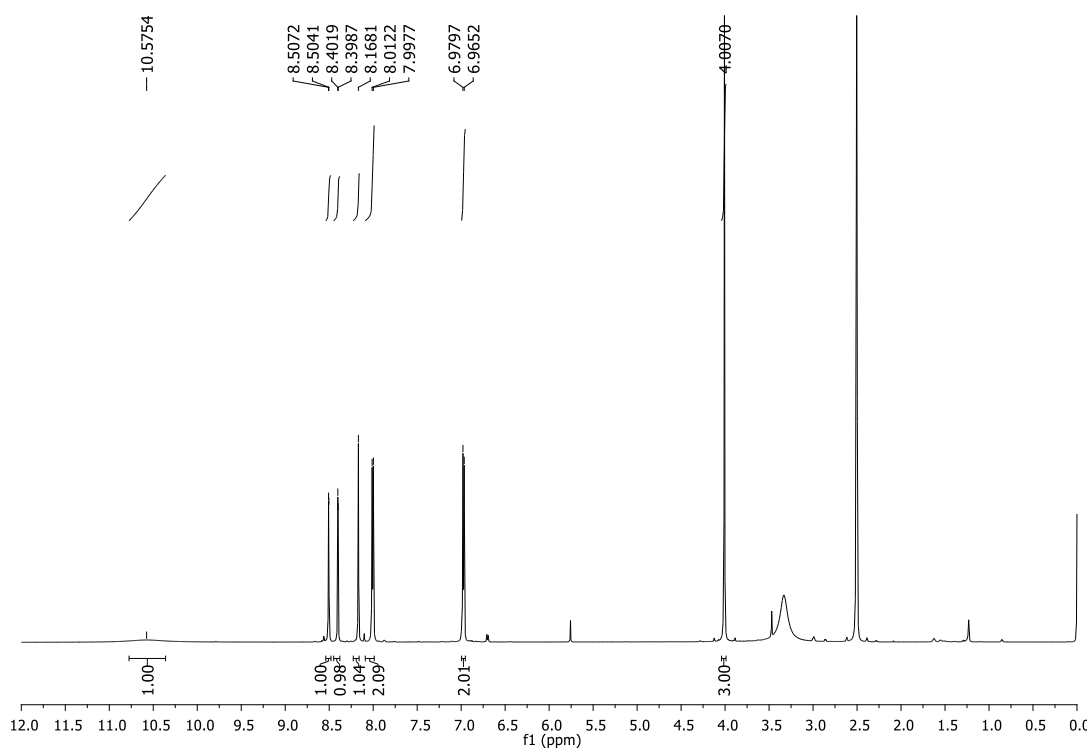


b) ^{13}C NMR spektar (*E*)-2-(6-brom-3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-fenilakrilonitrila **41**

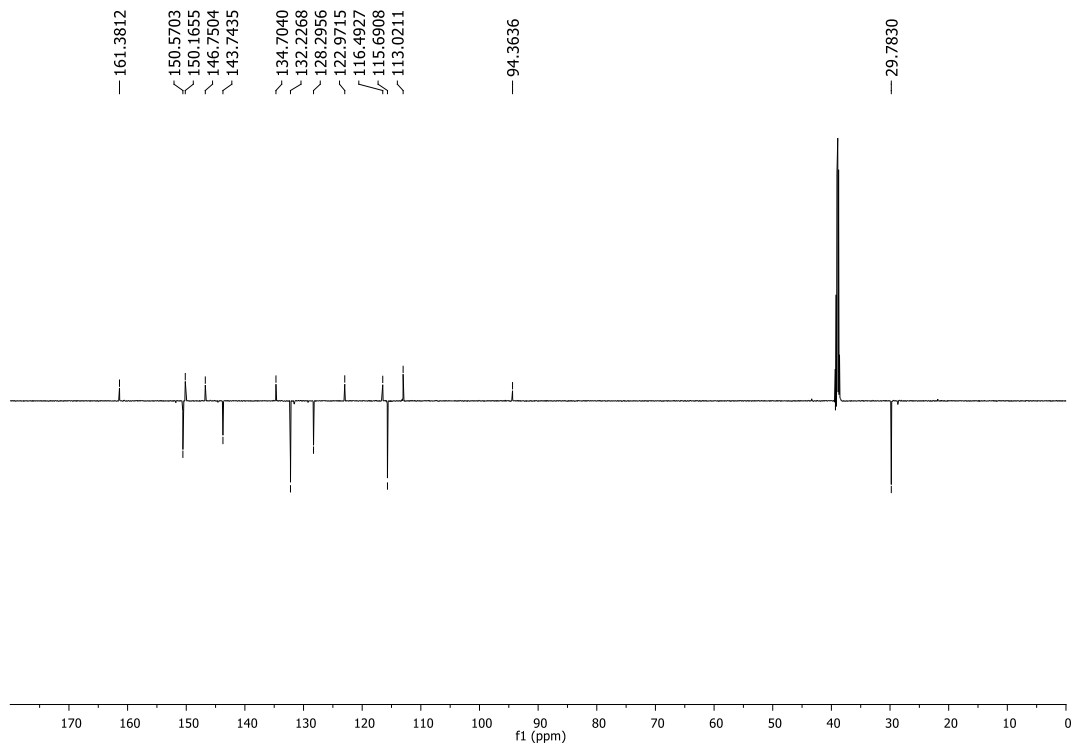


Prilog 30.

a) ^1H NMR spektar (*E*)-2-(6-brom-3-metil-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(4-hidroksifenil)akrilonitrila **42**

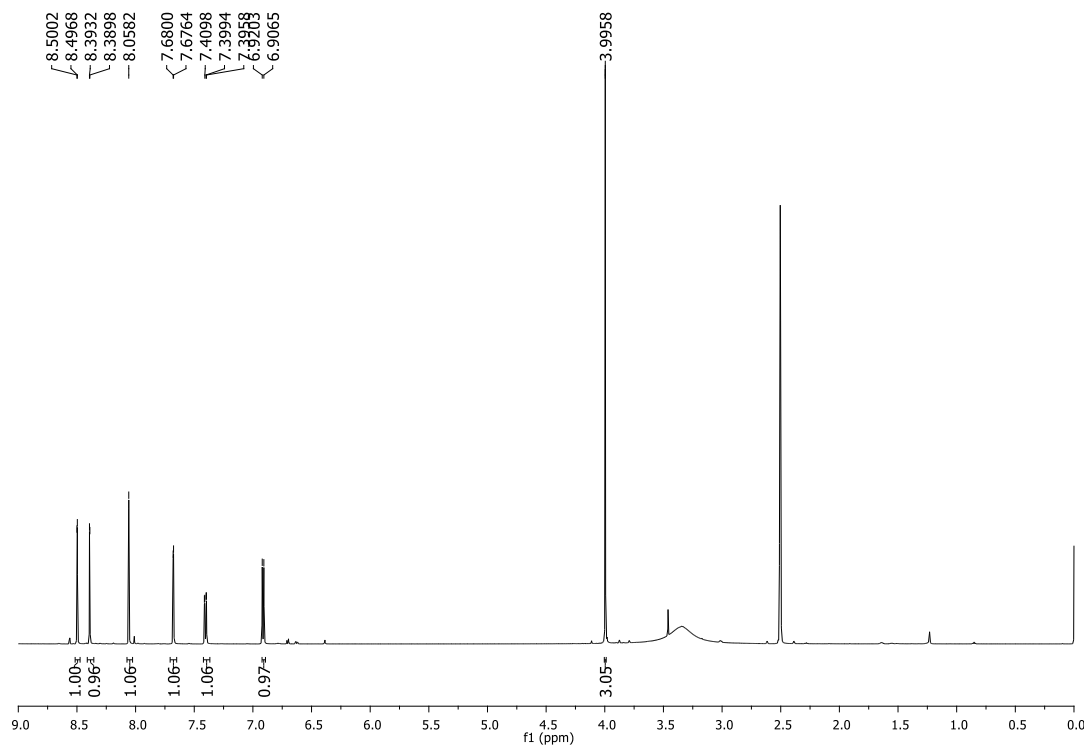


b) ^{13}C NMR spektr (*E*)-2-(6-brom-3-metill-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(4-hidroksifenil)akrilonitrila **42**

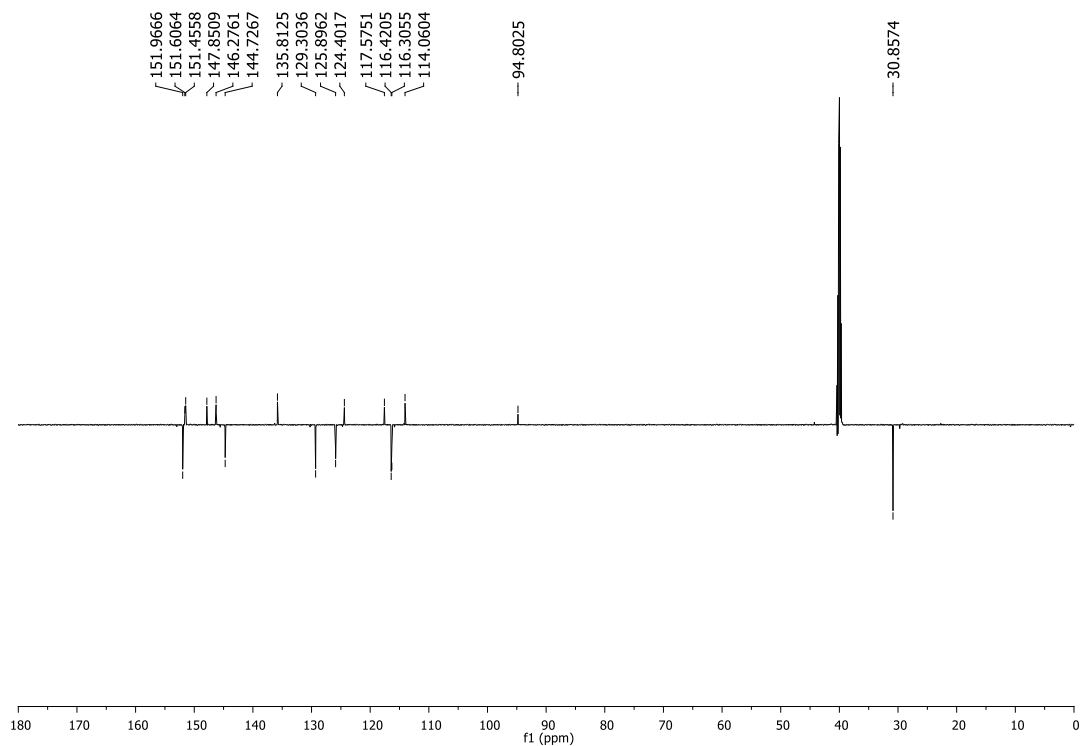


Prilog 31.

a) ^1H NMR spektr (*E*)-2-(6-brom-3-metill-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4-dihidroksifenil)akrilonitrila **43**

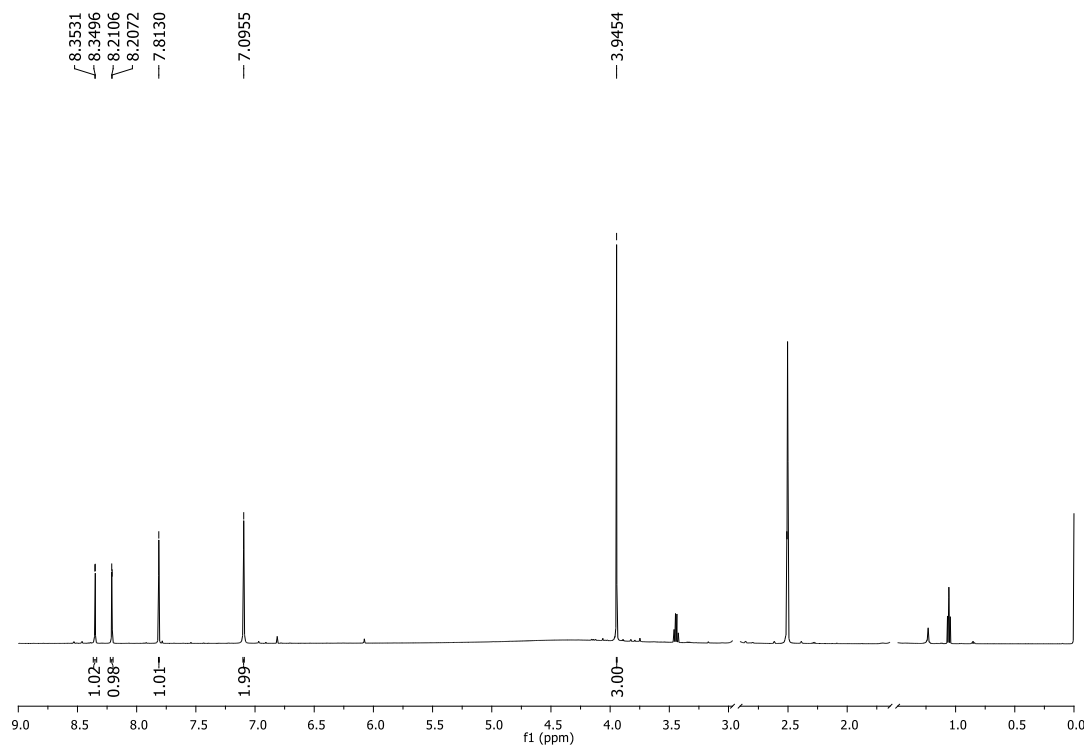


b) ^{13}C NMR spektr (*E*)-2-(6-brom-3-metill-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4-dihidroksifenil)akrilonitrila **43**

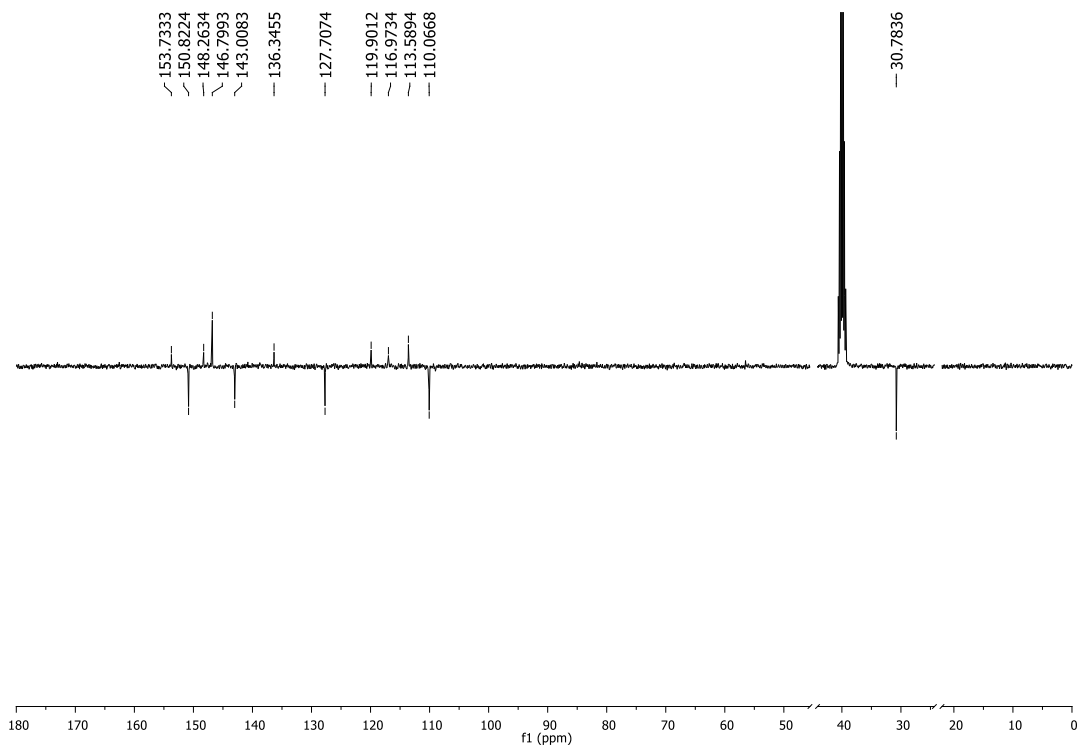


Prilog 32.

a) ^1H NMR spektr (*E*)-2-(6-brom-3-metill-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4,5-trihidroksifenil)akrilonitrila **44**

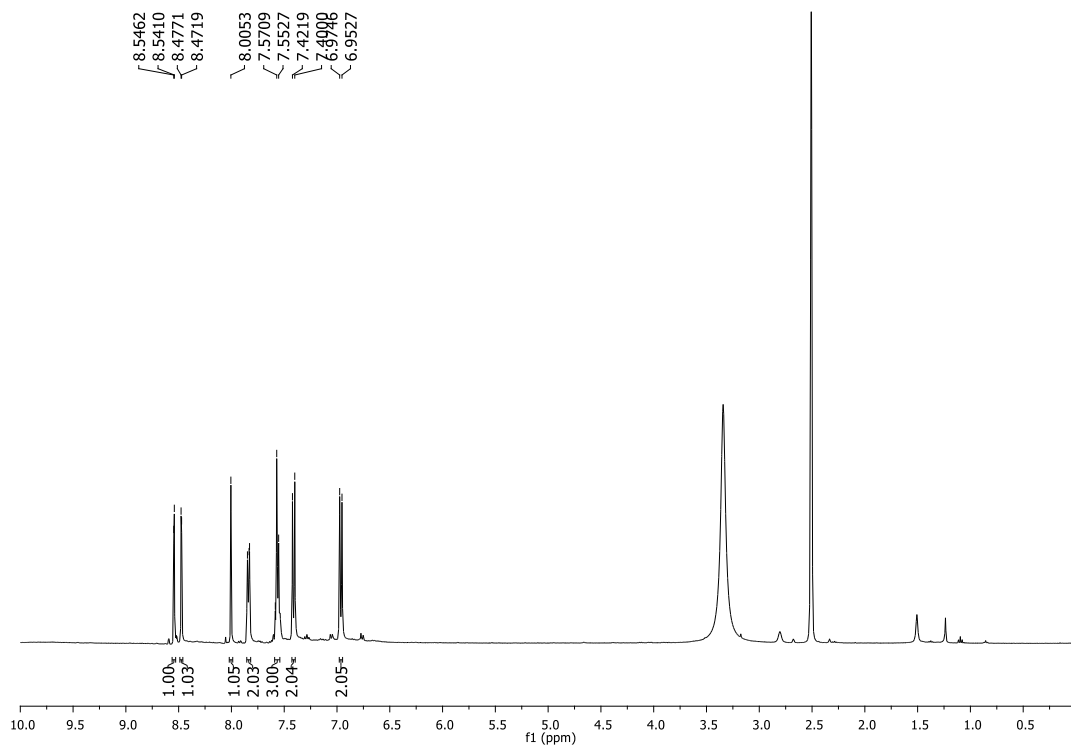


b) ^{13}C NMR spektar (*E*)-2-(6-brom-3-metill-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4,5-trihidroksifenil)akrilonitrila **44**

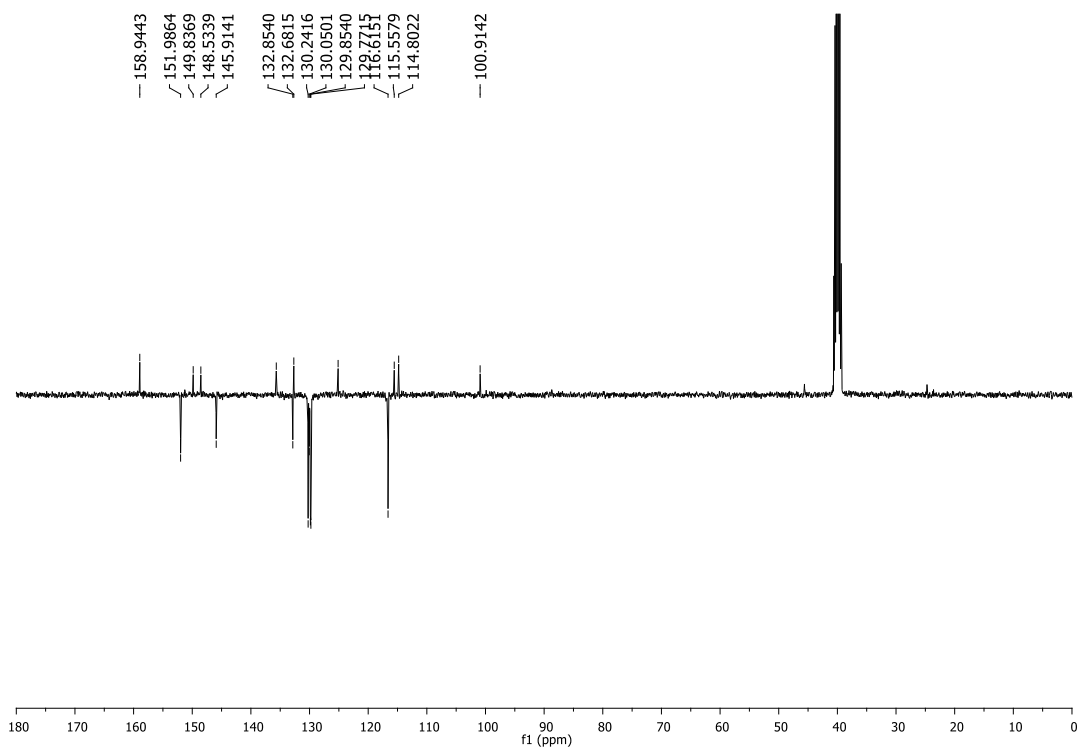


Prilog 33.

a) ^1H NMR spektar (*E*)-2-(6-brom-3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-fenilakrilonitrila **45**

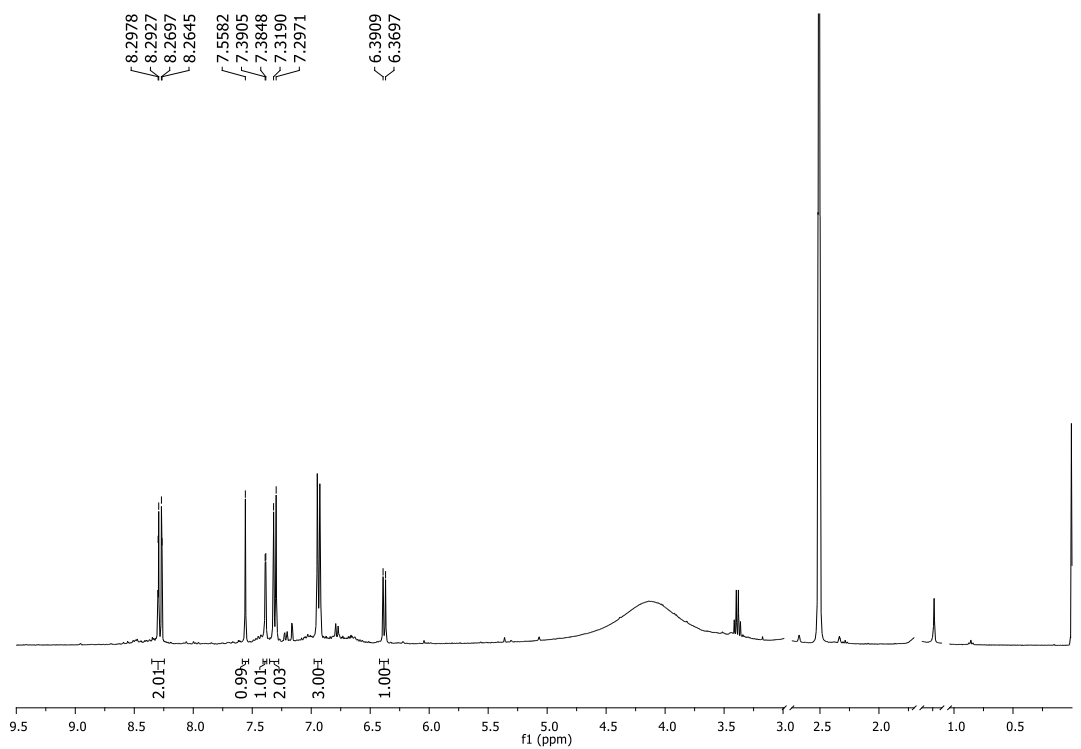


b) ^{13}C NMR spektr (*E*)-2-(6-brom-3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-fenilakrilonitrila **45**

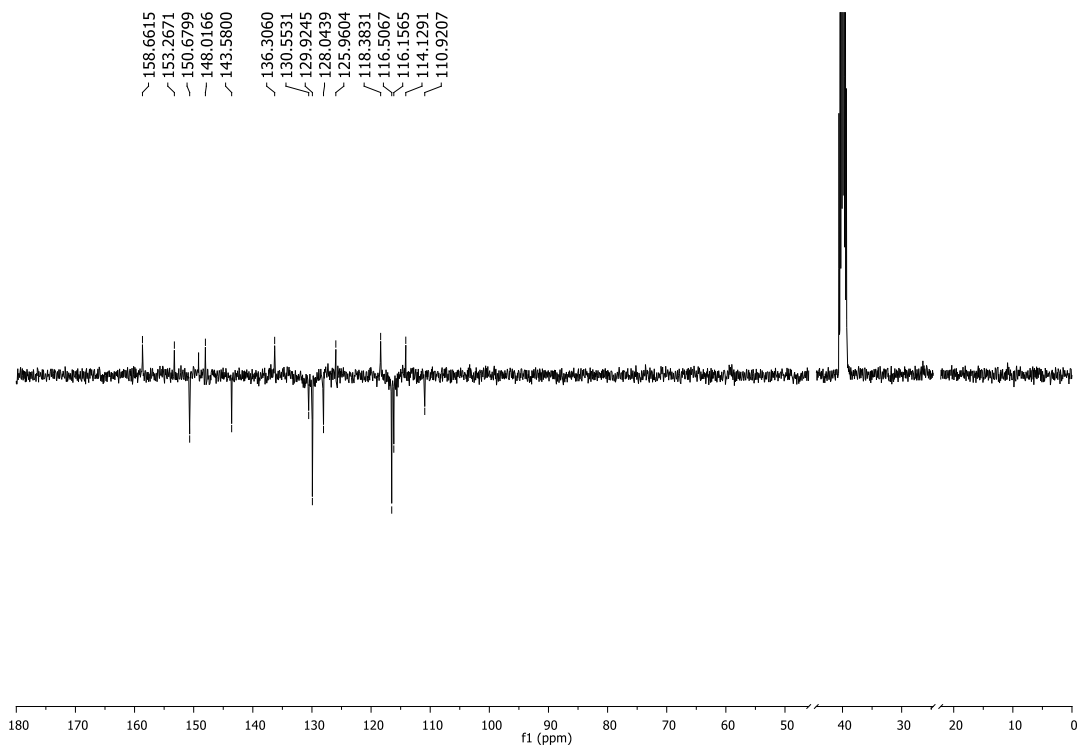


Prilog 34.

a) ^1H NMR spektr (*E*)-2-(6-brom-3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(4-hidroksifenil)akrilonitrila **46**

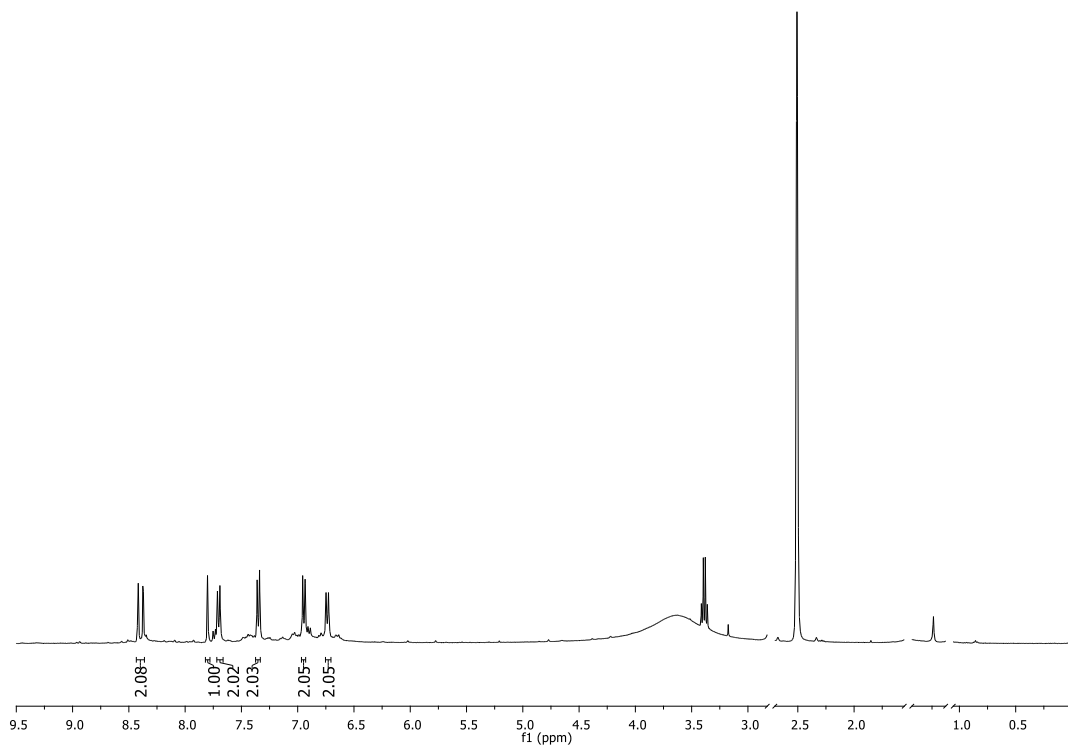


b) ^{13}C NMR spektr (*E*)-2-(6-brom-3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(4-hidroksifenil)akrilonitrila **46**

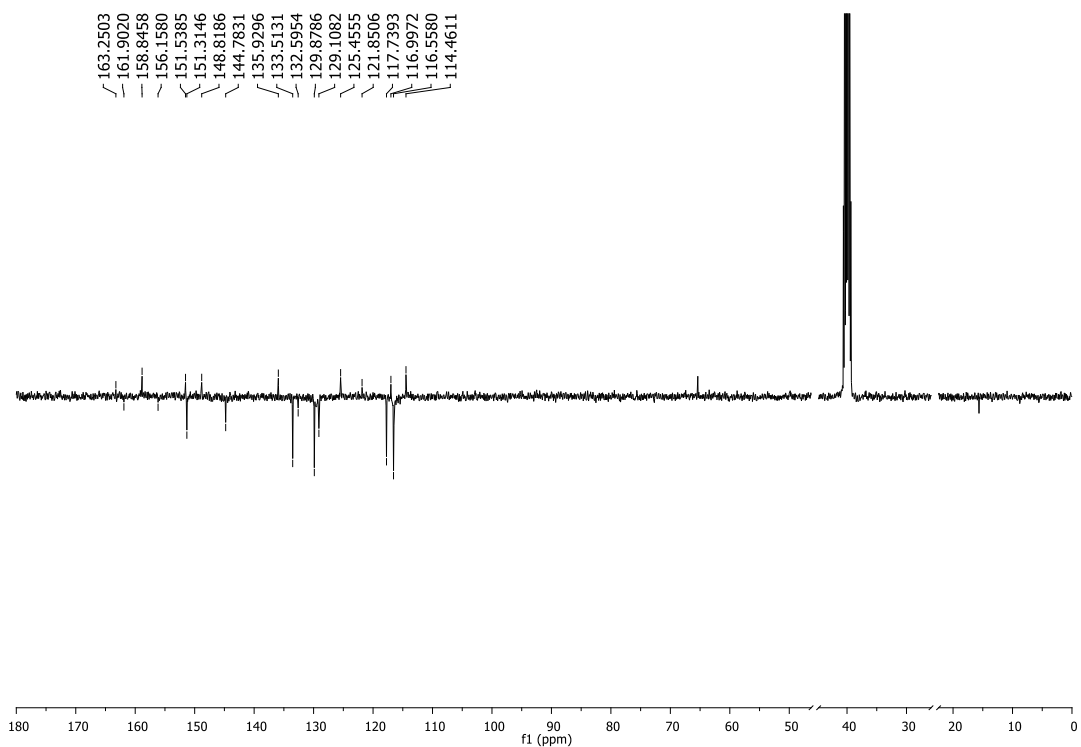


Prilog 35.

a) ^1H NMR spektr (*E*)-2-(6-brom-3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4-dihidroksifenil)akrilonitrila **47**

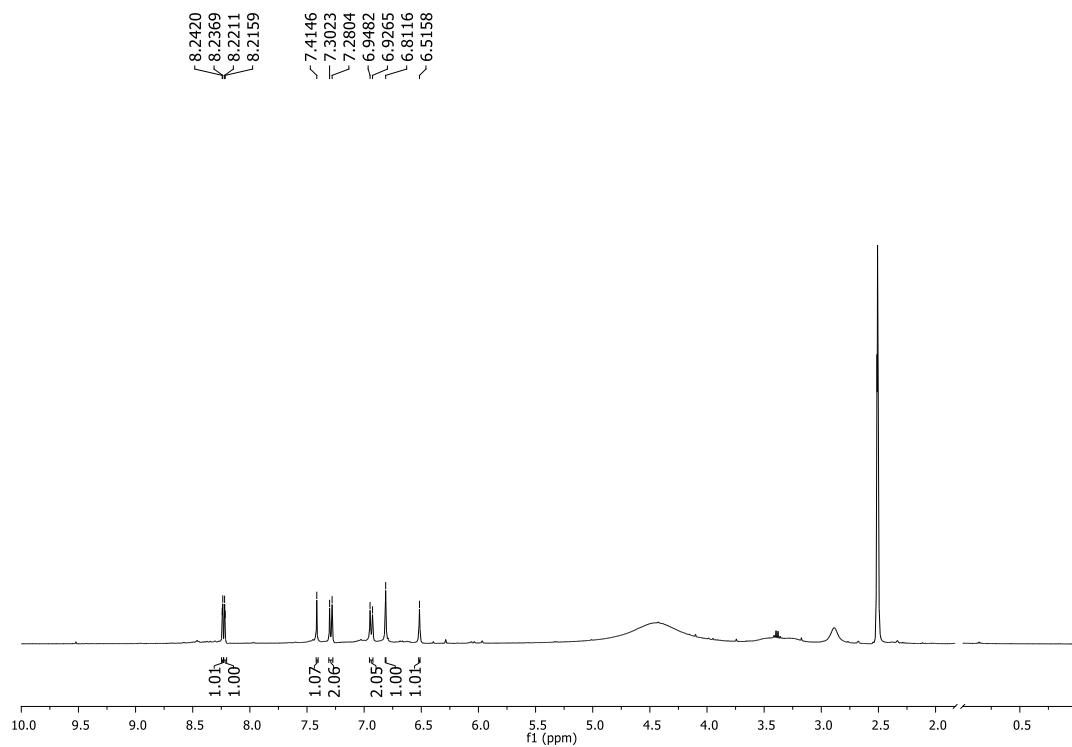


b) ^{13}C NMR spektar (*E*)-2-(6-brom-3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4-dihidroksifenil)akrilonitrila **47**



Prilog 36.

a) ^1H NMR spektar (*E*)-2-(6-brom-3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4,5-trihidroksifenil)akrilonitrila **48**



b) ^{13}C NMR spektr (*E*)-2-(6-brom-3-(4-hidroksifenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-il)-3-(3,4,5-trihidroksifenil)akrilonitrila **48**

