

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

**Patricia Debogović i Marija Kos**

**SINTEZA, STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA I  
ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST NOVIH AMIDNIH  
DERIVATA *N*-SUPSTITUIRANIH BENZIMIDAZOLA**

Zagreb, srpanj 2020.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za organsku kemiju  
Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije pod  
mentorstvom prof. dr. sc. Marijane Hranjec i  
neposrednim voditeljstvom Anje Beč, mag. appl. chem.,  
u sklopu projekata Hrvatske nacionalne zaklade 4379  
*Istraživanje antioksidativnog djelovanja benzazolskog  
skeleta u dizajnu novih antitumorskih agensa* i predan je  
na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj  
godini 2019./2020.



## **POPIS KRATICA I SIMBOLA:**

3D-QSAR – trodimenzionalni kvantitativni odnos strukture i aktivnosti

CAT– katalaza

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

ELMP – lipidna peroksidacija membrane eritrocita izazvana vodikovim peroksidom

G6PD – glukoza-6-fosfat dehidrogenaza

GSH – glutation peroksidaza

L· – lipidni radikal

LDL – lipoproteini niske gustoće

LOX – lipoksigenaza

LP – lipidna peroksidacija

MIC – minimalna inhibitorna koncentracija

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NOS1 – inducibilna sintaza dušićnog oksida 1

NOS2 – inducibilna sintaza dušićnog oksida 2

NOS3 – inducibilna sintaza dušićnog oksida 3

O<sub>2</sub><sup>-·</sup> – superoksidni anion radikal

OH· – hidroksilni radikal

OH<sub>2</sub><sup>·</sup> – hidroperoksidni radikal

PCA – analiza glavnih komponenata

RNA – ribonukleinska kiselina

RNS – reaktivne dušikove vrste

RO· – alkoksilni radikal

ROO· – peroksidni radikal

ROS – reaktivne kisikove vrste

SAR – odnos strukture i aktivnosti

SOD – superoksid dismutaza

TRX – tioredoksin peroksidaza

# SADRŽAJ

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>2. OPĆI DIO</b> .....  | <b>3</b>  |
| 2.1. Amidna veza.....   | 4         |
| 2.1.1. Stvaranje amidne veze: metode i strategija.....  | 4         |
| 2.1.2. Aktivacija karboksilnih kiselina s acilnim kloridima.....  | 8         |
| 2.1.2.1. Nedostaci acilnih klorida.....   | 11        |
| 2.1.3. Aktivacija acilnim azidima.....  | 11        |
| 2.1.4. Aktivacija acilnim imidazolima.....  | 12        |
| 2.1.5. Aktivacija anhidridima.....  | 12        |
| 2.1.5.1. Simetrični anhidridi.....  | 13        |
| 2.1.5.2. Mješoviti anhidridi.....   | 13        |
| 2.2. Antioksidansi.....   | 14        |
| 2.2.1. Podjela antioksidansa.....   | 15        |
| 2.2.2. Primjeri antioksidansa.....  | 16        |
| 2.2.3. Mehanizam djelovanja antioksidansa.....  | 22        |
| 2.3. Reaktivne kisikove vrste.....  | 22        |
| 2.4. Biološki učinci reaktivnih kisikovih vrsta.....  | 24        |
| 2.4.1. Lipidna peroksidacija.....   | 24        |
| 2.4.2. 4-hidroksinonenal.....   | 26        |
| 2.4.3. Malondialdehid.....  | 27        |
| 2.4.4. Antioksidativna obrana protiv lipidne peroksidacije.....   | 29        |
| 2.5. Sinteza i biološka aktivnost derivata benzimidazola i benzotiazola.....  | 29        |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....   | <b>55</b> |
| 3.1. Opće napomene.....   | 56        |
| 3.2. Sinteza <i>N</i> -supstituiranih derivata 2-aminobenzimidazola <b>13-15</b> i 2-amino-5-cijanobenzimidazola <b>16-18</b> .....                       | 57        |
| 3.2.1. Opći postupak pripreme <i>N</i> -izobutil-2-nitroanilina <b>3</b> i <i>N</i> -supstituiranih derivata 3-nitrobenzonnitrila <b>4-6</b> .....        | 58        |
| 3.2.2. Opći postupak pripreme <i>N</i> -izobutil-1,2-fenilendiamina <b>7</b> i <i>N</i> -supstituiranih derivata 3-aminobenzonnitrila <b>8-10</b> .....   | 59        |
| 3.2.3. Priprava 2-amino-1-metilbenzimidazola <b>13</b> .....  | 60        |
| 3.2.4. Priprava 2-amino-1-izobutilbenzimidazola <b>14</b> .....   | 61        |
| 3.2.5. Opći postupak pripreme 2-amino-1-fenilbenzimidazola <b>15</b> i <i>N</i> -supstituiranih derivata 2-amino-5-cijanobenzimidazola <b>16-18</b> ..... | 61        |
| 3.3. Sinteza <i>N</i> -supstituiranih derivata benzamida i metoksi supstituiranih benzamida.....  | 63        |
| 3.3.1. Opći postupak pripreme metoksi supstituiranih benzoil-klorida <b>22-24</b> .....   | 64        |
| 3.3.2. Opći postupak pripreme <i>N</i> -supstituiranih derivata benzamida i metoksi supstituiranih benzamida <b>27-54</b> .....                           | 64        |
| <b>4. RASPRAVA I REZULTATI</b> .....  | <b>75</b> |
| 4.1. Cilj rada.....   | 76        |
| 4.2. Sinteza ciljanih spojeva.....  | 77        |
| 4.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti.....  | 90        |
| 4.3.1. DPPH metoda.....   | 90        |
| 4.3.2. FRAP metoda.....   | 91        |

|                            |            |
|----------------------------|------------|
| <b>5. ZAKLJUČCI.....</b>   | <b>95</b>  |
| <b>6. ZAHVALE.....</b>     | <b>98</b>  |
| <b>7. LITERATURA.....</b>  | <b>100</b> |
| <b>8. SAŽETAK.....</b>     | <b>107</b> |
| <b>9. SUMMARY.....</b>     | <b>109</b> |
| <b>10. ŽIVOTOPISI.....</b> | <b>111</b> |
| <b>11. PRILOZI.....</b>    | <b>113</b> |

# **1. UVOD**

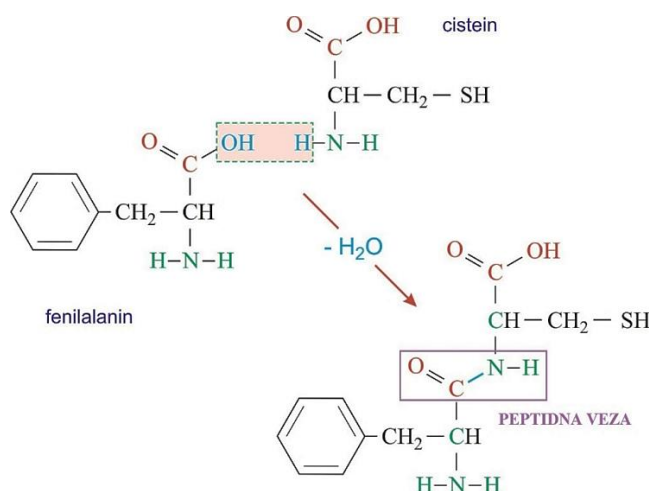
Amidna funkcionalna skupina jedna je od temeljnih strukturnih podjedinica prirodnih i sintetskih organskih spojeva. U ljudskom organizmu dolazi u strukturi proteina kao amidna veza koja povezuje aminokiseline pri čemu proteini imaju važnu ulogu u biološkim procesima poput enzimske katalize, prijenosa i pohrane tvari hemoglobinom, imunosne zaštite antitijelima i sl. Prema tome, amidi imaju ključnu ulogu u organskoj i medicinskoj kemiji kao i u razvoju farmaceutika. Brojni tržišno dostupni farmaceutici posjeduju upravo amidnu skupinu u svojoj strukturi – gotovo 25% svih farmaceutika<sup>1</sup> i 2/3 svih potencijalnih biološki aktivnih organskih spojeva<sup>2</sup>. Osim amidne veze, vrlo važna strukturna jedinica u medicinskoj kemiji je i benzimidazolna jezgra. Derivati benzimidazola strukturni su izosteri prirodnih nukleotida što im omogućava laku interakciju s važnim biomolekulama kao što su DNA ili RNA. Pripadaju visokostabilnim heterocikličkim aromatskim spojevima čiji derivati posjeduju različite biološke aktivnosti. Utvrđeno je da derivati benzimidazola imaju antitumorsku, antivirusnu, antimikrobnu, antifungalnu, antipiretsku, antialergijsku i antioksidativnu aktivnost. Antioksidativna aktivnost esencijalna je ne samo za ljude, već i za biljke i životinje jer štiti stanice od različitih oštećenja uzrokovanih slobodnim radikalima. Posljedica stvaranja prekomjerne količine slobodnih radikala jest oksidacijski stres koji bi mogao biti važan faktor u različitim patološkim stanjima. Brojna istraživanja pokazala su da antioksidansi imaju značajnu ulogu u tretiranju i prevenciji različitih bolesti pa se velika pažnja posvećuje otkrivanju novih molekula s antioksidativnim svojstvima. Osim farmakološke uporabe, amidi i derivati benzimidazola široko se upotrebljavaju i u drugim granama znanosti. Zahvaljujući njihovim dobrim svojstvima, služe za izradu materijala poput najlona, a omogućena je i njihova napredna primjena u distribuciji lijekova te izradi supstanci za zacjeljivanje rana.<sup>3</sup>

## **2. OPĆI DIO**



## 2.1. Amidna veza

Peptidna ili amidna veza je kovalentna kemijska veza koja povezuje aminokiseline te na taj način nastaju peptidi i proteini. Označava se kao funkcionalna skupina sastavljena od četiri atoma: C(=O)NH. Amidna je veza kruta, planarna te sklona stvaranju vodikovih veza. U peptidnim lancima  $\alpha$ -karboksilna skupina jedne aminokiseline se veže na  $\alpha$ -amino skupinu druge aminokiseline peptidnom vezom uz gubitak jedne molekule vode.<sup>4</sup> Stvaranje peptidne veze između dva segmenta aminokiselina jedna je od najvažnijih reakcija u organskoj kemiji i biokemiji (Slika 1.).<sup>5</sup>



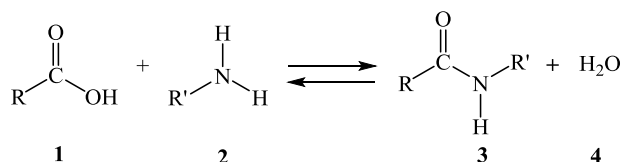
Slika 1. Sinteza dipeptida povezanog peptidnom vezom<sup>5</sup>

U današnje vrijeme razvijen je velik broj metoda za sintezu amida s ciljem povećanja selektivnosti, ekonomičnosti, dobivanja što manjeg broja štetnih nusprodukata i većeg iskorištenja što je izrazito bitno za sve razvijeniju farmaceutsku industriju.<sup>6</sup>

### 2.1.1. Stvaranje amidne veze: metode i strategije

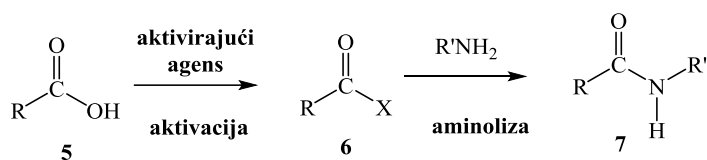
Razvijene su različite metode stvaranja amidne veze gdje se kao polazni reaktanti koriste alkoholi, aldehidi, nitrili i arilni halogenidi. Najdirektnija metoda stvaranja amidne veze je reakcija kondenzacije karboksilne kiseline ili njezinih derivata s aminom.

Amidna veza stvara se između karbonilnog ugljikovog atoma jedne molekule i dušikovog atoma amino skupine druge molekule pri čemu su kisikov atom (vezan na karbonilni ugljik) i vodik (vezan na dušik) u *trans* položaju.<sup>7</sup> Sinteza amidne veze odvija se uz izlazak jedne molekule vode što čini ovu reakciju ekološki prihvatljivom (Shema 1.).



**Shema 1.** Nastanak amidne veze

Reakcijom karboksilne kiseline s aminom stvaraju se kiselo-bazni uvjeti pri čemu se formira stabilna sol. Budući da je termodinamička ravnoteža na strani hidrolize, direktnu kondenzaciju soli moguće je ostvariti samo na povišenoj temperaturi (160-180 °C) što nepovoljno djeluje na druge funkcionalne skupine.<sup>8</sup> Taj je problem djelomično riješen aktivacijom karboksilne kiseline odgovarajućim aktivirajućim agensom pri čemu dolazi do zamjene hidroksilne skupine dobro odlazećom skupinom X prije same aminolize (Shema 2). Enzimski kataliza također je ispitivana kao alternativna metoda sinteze amida.<sup>9,10</sup>

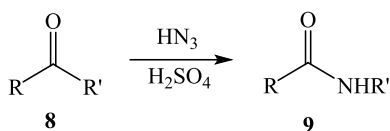


**Shema 2.** Aktivacija karboksilne kiseline i aminoliza

Direktno stvaranje amidne veze zahtjeva mnogo energije i daje male vrijednosti iskorištenja. Prema tome, izravnu kondenzaciju karboksilne kiseline s aminom teško je postići bez prisustva katalizatora ili reagensa za kondenzaciju. Iako je rezultirajuća amidna veza termodinamički stabilna, potrebna je velika energija aktivacije karboksilne kiseline. Aktivacija karboksilne kiseline provodi se prevođenjem kiseline u acil-halogenide, acil-azide, acilimidazole, anhidride, estere i druge spojeve s dobrim odlazećim skupinama. Više je načina kondenzacije derivata karboksilne kiseline s aminom: formiranje intermedijernog acilirajućeg sredstva koji se potom izolira i podvrgne reakciji s aminom.

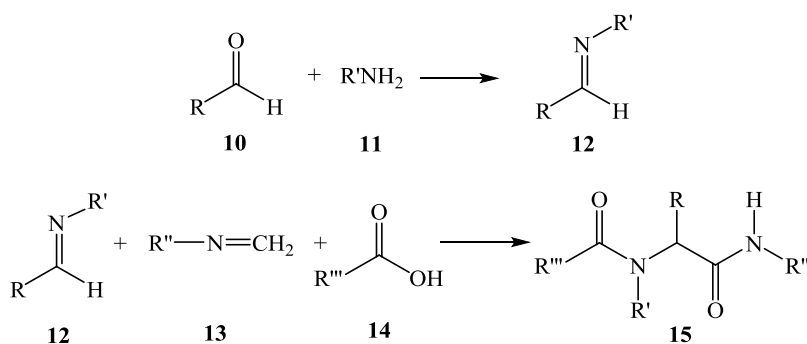
Drugi način jest da se reaktivni acilirajući agens formira iz kiseline u zasebnim koracima te potom odmah tretira s aminom, dok je treći način generiranje acilirajućeg sredstva *in situ* iz kiseline u prisutnosti amina dodavanjem reagensa za kondenzaciju. Da bi se aktivirala karboksilna kiselina, potrebno je odabrati odgovarajući reagens za kondenzaciju. Izbor može biti problematičan jer se, na primjer u medicinskoj kemiji, amidi često priređuju koristeći širok raspon supstrata s promjenjivom reaktivnošću (anilini, sekundarni amini, veliki supstrati i sl.) pa reagens za kondenzaciju mora pokrivati široko područje reaktivnosti.<sup>11</sup>

Za sintezu amidne veze danas je poznat veliki broj različitih sintetskih metoda. Osim iz karboksilnih kiselina, amidna veza može se dobiti i kiselo kataliziranom reakcijom azida s elektrofilnim karbonilnim spojevima poput ketona uz istiskivanje dušika. Navedena reakcija dobivanja amida naziva se Schmidtova reakcija (Shema 3.).<sup>12</sup>



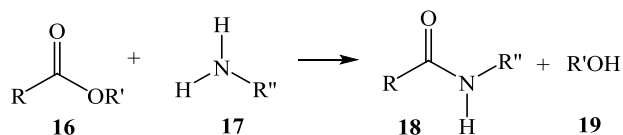
**Shema 3.** Schmidtova reakcija dobivanja amida

Ugijeva četverokomponentna kondenzacija aldehida, amina, karboksilne kiseline i izocijanida omogućava brzo dobivanje  $\alpha$ -aminoacil amidnih derivata. Dobiveni produkti imaju važnu primjenu u farmaceutskoj industriji (Shema 4.).<sup>13</sup>



**Shema 4.** Ugijeva reakcija dobivanja amida

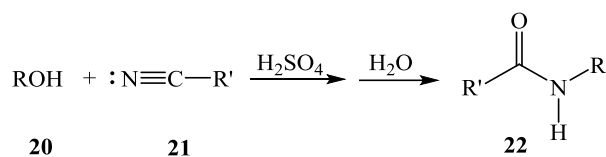
Amidna se veza može dobiti iz estera uz katalizator, nukleofilnom adicijom i potom eliminacijom. Ovaj se način često primjenjuje u industriji. Reakcijom nastaje ekvivalent alkohola što negativno utječe na efikasnost ukupne reakcije (Shema 5.).<sup>14</sup>



**Shema 5.** Sinteza amida iz estera karboksilne kiseline

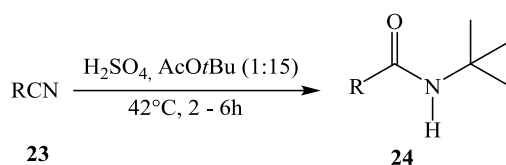
Jedan od načina sinteze amida je i Ritterova reakcija alkohola ili alkena s nitrilom ili cijanovodikom (Shema 6.).

Reakcija obuhvaća formiranje karbokationa pod utjecajem jake sumporne kiseline, vezanje nitrila preko slobodnog elektronskog para na dušiku te naposljetku nastanak amidne veze uz dodatak vode.<sup>15</sup>



**Shema 6.** Ritterova reakcija

Modificirana Ritterova reakcija je efikasna metoda za konverziju alifatskih i aromatskih nitrila u odgovarajuće *N-tert*-butilne amide (Shema 7.).<sup>16</sup>



**Shema 7.** Modificirana Ritterova reakcija

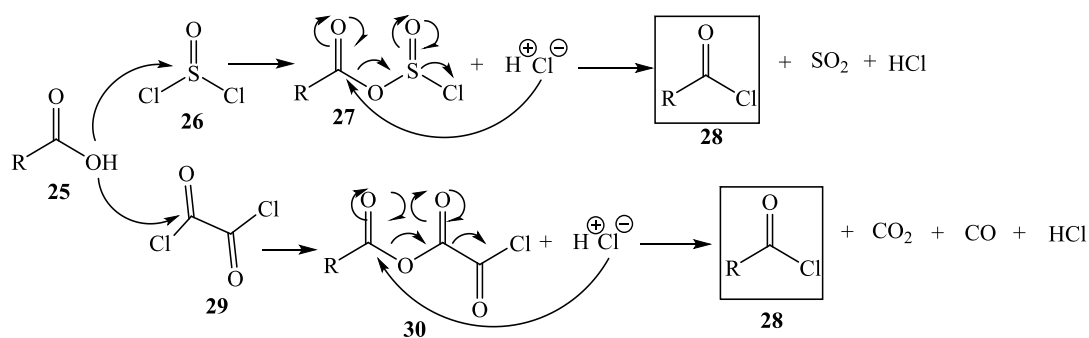
Stvaranjem amidne veze mogu se javiti određeni nedostaci kao što su nisko iskorištenje, racemizacija, raspadanje i otežano pročišćavanje produkata i sl. Kako bi se spriječili navedeni neželjeni efekti, primjenjuju se blagi reagensi za kondenzaciju i metode koje omogućavaju postizanje visokih iskorištenja i suzbijanje racemizacije susjednih kiralnih centara. Primjer jednog takvog slučaja u kojem se javljaju komplikacije je pri sintezi proteina pri čemu može doći do epimerizacije, obično putem oksazolinskog intermedijera nastalog racemizacijom. Stoga, kada se odabiru reagensi za kondenzaciju potrebno je provesti nekoliko testova koji su razvijeni u svrhu procjene opsega epimerizacije (Tablica 1.).<sup>17</sup>

**Tablica 1.** Epimerizacijski testovi za procjenu reagensa za kondenzaciju kod sinteze aminokiselina

| Autor                   | Kiselina              | Amin      | Metoda analize            |
|-------------------------|-----------------------|-----------|---------------------------|
| Young <sup>18</sup>     | Z-Leu-OH              | H-Gly-OEt | Optička rotacija          |
| Weinstein <sup>19</sup> | Ac-Phe-OH             | H-Ala-OMe | NMR                       |
| Bodansky <sup>20</sup>  | Ac- <i>iso</i> Leu-OH | H-Gly-OMe | Kiralni HPLC              |
| Anteunis <sup>21</sup>  | Z-Gly-Phe-OH          | H-Val-OMe | HPLC ili NMR              |
| Anderson <sup>22</sup>  | Z-Gly-Phe-OH          | H-Gly-OEt | Frakcijska kristalizacija |
| Izumiya <sup>23</sup>   | Z-Gly-Ala-OH          | H-Leu-OBz | Hidrogeniranje uz HPLC    |

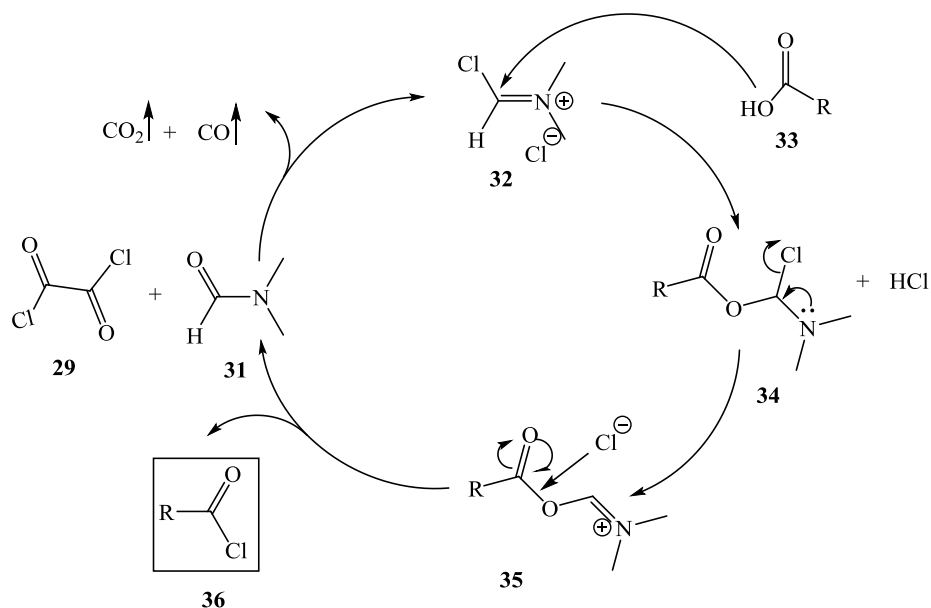
### 2.1.2. Aktivacija karboksilnih kiselina s acilnim kloridima

Sintezu prvog dipeptida (Gly-Gly) 1901. godine proveo je Fisher primjenom acilnih klorida kao reagensa za kondenzaciju.<sup>24</sup> Komercijalno je dostupan velik broj acilnih klorida putem kojih se omogućuje laka aktivacija kiselina. Reagensi koji se danas najčešće koriste za pripremu acilnih klorida iz odgovarajućih kiselina su tionil-klorid (SOCl<sub>2</sub>)<sup>25</sup>, oksalil-klorid (COCl<sub>2</sub>)<sup>26,27</sup>, fosforov triklorid (PCl<sub>3</sub>)<sup>28</sup>, fosforoksi-klorid (POCl<sub>3</sub>)<sup>29</sup>, fosforov pentaklorid (PCl<sub>5</sub>)<sup>30</sup>. PCl<sub>5</sub> se uglavnom koristi za aromatske kiseline koje imaju elektron-odvlačće supstituente jer ne reagiraju dobro s SOCl<sub>2</sub>. Upotreba (COCl)<sub>2</sub> u sintezi kiselinskog klorida rezultira s 2 molekule plina od kojih je jedna CO što predstavlja sigurnosnu i kemijsku opasnost.



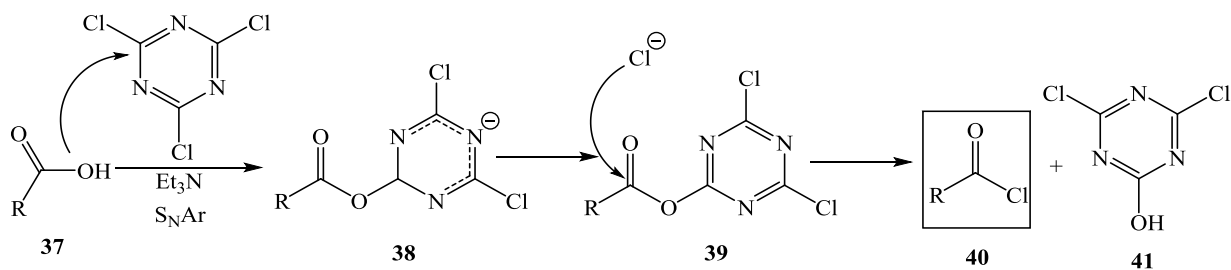
**Shema 8.** Mehanizam nastanka acil-klorida pomoću tionil-klorida i/ili oksalil-klorida

Navedene reakcije su potpomognute dodatkom jedne kapi *N,N*-dimetilformamida (DMF) čiji je katalitički ciklus prikazan na Shemi 9.



**Shema 9.** Aktivacija uz DMF, katalitički ciklus

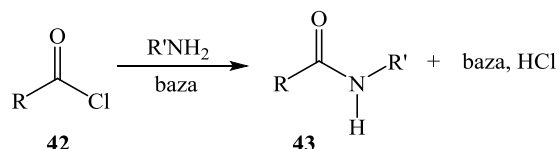
Nedostatak uporabe reagensa za kloriranje je razvijanje plinovitog HCl-a ili pak osjetljivost na kisele uvjete. Neki supstrati, primjerice amini zaštićeni Boc skupinom, osjetljivi su na kisele uvjete pa zahtijevaju bazične uvjete. Na primjer, cijanurin-klorid u prisutnosti trietilamina daje acilni klorid.<sup>31</sup> Prisutnost ove organske baze omogućava zadržavanje bazičnih uvjeta tijekom reakcije. Mehanizam uključuje aromatsku nukleofilnu supstituciju kojom nastaje aktivirani ester i kloridni anion. Zatim slijedi nukleofilni napad kloridnog aniona na ester što rezultira nastankom acilnog klorida (Shema 10.). Zahvaljujući brojnim prednostima cijanurin-klorid je pogodan aktivirajući agens za stvaranje velikog broja amida.



**Shema 10.** Stvaranje acilnog klorida upotrebom cijanurin-klorida

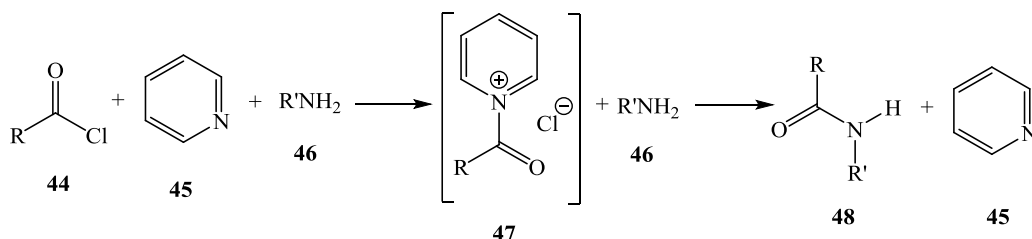
Neutralni uvjeti su također pogodni za reakciju stvaranja acilnih klorida iz karboksilnih kiselina. Primjerice, djelovanjem trifenilfosfina (TPP-a) i tetraklorugljika (CCl<sub>4</sub>) pri niskoj temperaturi iz karboksilne kiseline nastaje acil-klorid.

Amidna veza nastaje reakcijom kondenzacije nastalog acilnog klorida s odgovarajućim aminom (Shema 11).



**Shema 11.** Sinteza amida

Dodatak baze služi za neutralizaciju nastalog HCl-a i sprječavanje konverzije amina u nereaktivnu sol. Reakcija se provodi u inertnom suhom otapalu u prisutnosti ne-nukleofilnog tercijarnog amina, primjerice trietilamina (NEt<sub>3</sub>).<sup>32</sup> Acilni kloridi su dovoljno otporni u navednim uvjetima tako da mogu reagirati s aminima uz djelovanje baze NaOH, što nam tumači Schotten-Baumannova kondenzacija.<sup>33</sup> Reakcije se mogu ubrzati primjenom katalizatora piridina (Shema 12.) ili *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP). U nekim slučajevima piridin se koristi i kao otapalo.<sup>34</sup>

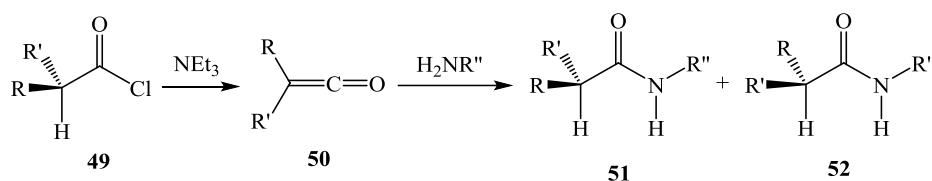


**Shema 12.** Katalitička uloga piridina

Cink se kao metalni katalizator također može koristiti za ubrzavanje reakcije kondenzacije na sobnoj temperaturi. Metoda je primjenjiva na alkile, arile, heterocikle, ugljikohidrate i aminokiseline pri čemu se dobivaju visoka iskorištenja.<sup>35</sup>

### 2.1.2.1. Nedostatci acilnih klorida

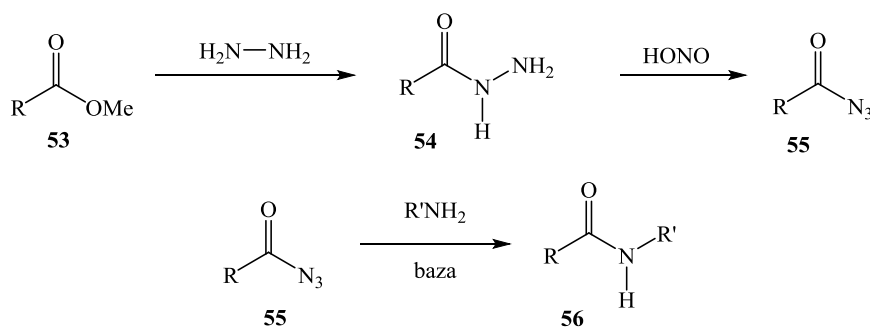
Unatoč svim prednostima, acilni kloridi imaju ograničenu uporabu u povezivanju peptida zbog mogućnosti hidrolize, racemizacije, odcjepljenja zaštitnih skupina i popratnih neželjenih reakcija. Tendencija racemizaciji acilnih klorida u bazičnim uvjetima može se prikazati standardnom sintezom ketena (Shema 13.).<sup>36</sup> Keteni nastaju reakcijom acilnog klorida koji sadrži  $\alpha$ -proton s trietilaminom ( $\text{NEt}_3$ ). Reakcija može dalje ići s nukleofilom poput amina što naposljetku vodi do nastanka racemične smjese produkta.



**Shema 13.** Potencijalna racemizacija prikazana preko stvaranja ketena

### 2.1.3. Aktivacija acilnim azidima

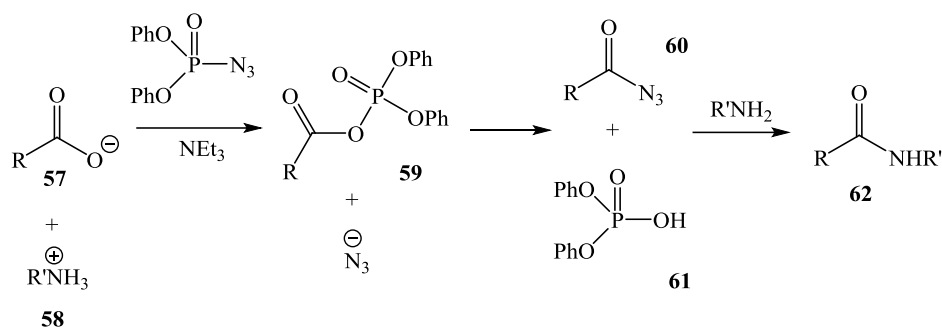
Povezivanje peptida putem acilnih azida<sup>37</sup> jedna je od prvih razvijenih metoda koju je proveo Curtius.<sup>38</sup> Priprema acilnih azida kreće iz odgovarajućih metilnih estera u dva sintetska koraka: u prvom dolazi do zamjene metoksi skupine s hidrazinom, a potom slijedi reakcija nitiranja pri čemu nastaje konačni acilni azid (Shema 14.).



**Shema 14.** Dvostupanjska sinteza amida preko stvaranja acilnih azida

Navedena metoda sinteze amida je učinkovita uz mogućnost izbjegavanja racemizacije. No, s druge strane može doći do Curtiusovog pregrađivanja koje vodi do nastanka neželjenog izocijanata.<sup>39</sup> Uspješniji proces razvijen je uporabom difenilfosfonskog azida (DPPA) (Shema 15.).<sup>40</sup>

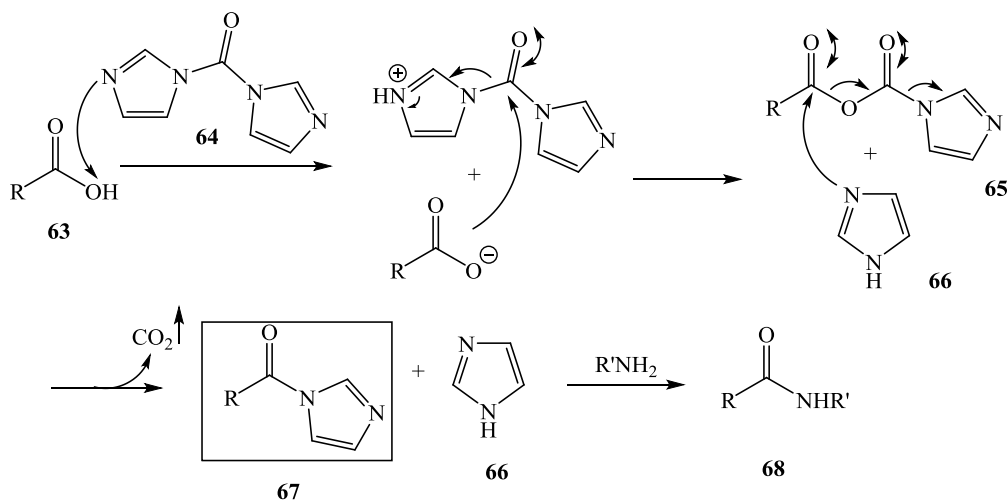




**Shema 15.** Priprava amida primjenom DPPA

### 2.1.4. Aktivacija acilnim imidazolima

Karbonil-diimidazol (CDI)<sup>41</sup> učinkovit je reagens u aktivaciji acilnim imidazolima koji omogućuje stvaranje amida. Nastali acil-karboksi imidazol i imidazol lako međusobno reagiraju dajući aktivne vrste poput acilnih imidazola (Shema 16.). Prilikom provođenja reakcije dodatak baze nije potreban i reakcija je kompatibilna sa kloridnim solima amina.<sup>42,43</sup> Prema tome, reagens CDI učestalo se koristi u kemiji peptida<sup>44</sup>, a njegova primjena može se proširiti i na dobivanje estera i tioestera.



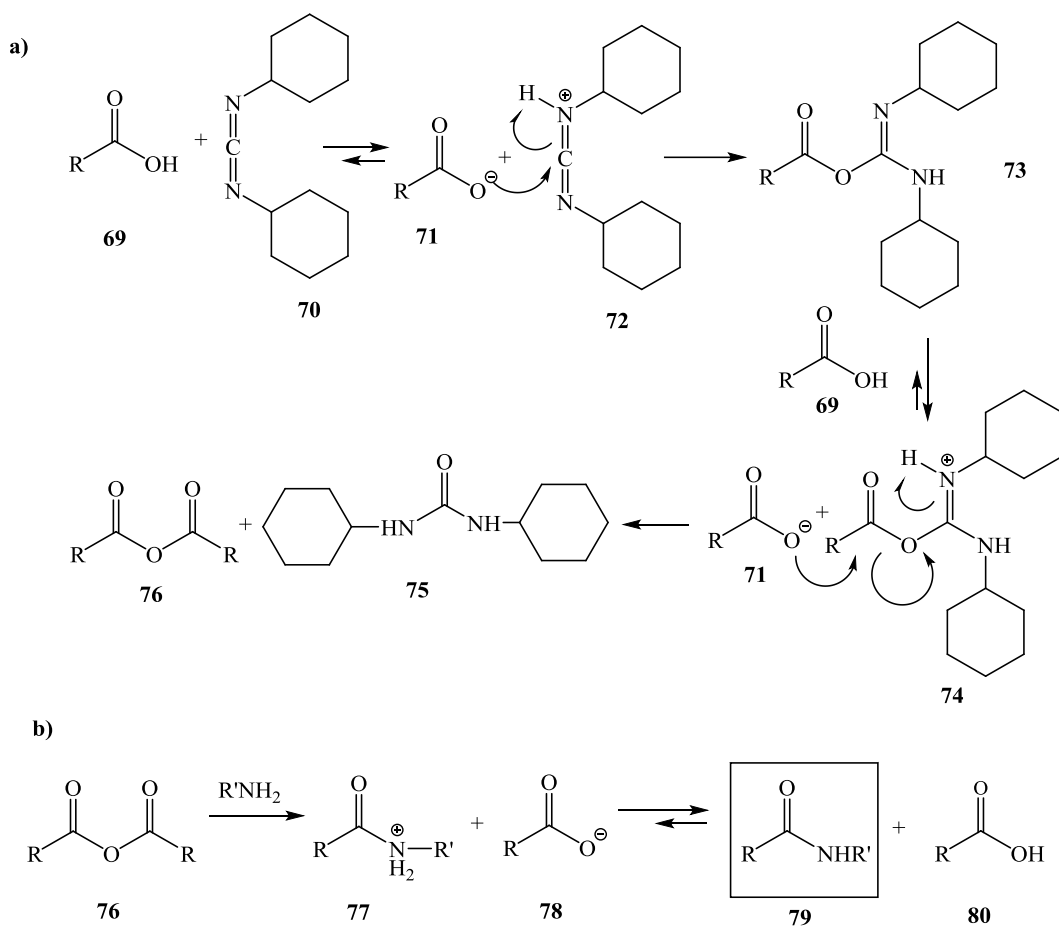
**Shema 16.** Priprava amida primjenom CDI

### 2.1.5. Aktivacija anhidridima

Anhidridi su reaktivne vrste koje lako reagiraju s velikim brojem nukleofila poput amina, alkohola i tiola. Ova strategija aktivacije obuhvaća uporabu različitih anhidrida – od jednostavnijih simetričnih do složenijih, mješovitih anhidrida. Komercijalna dostupnost anhidrida je prilično ograničena pa se stoga željeni anhidridi moraju najprije pripremiti.

### 2.1.5.1. Simetrični anhidridi

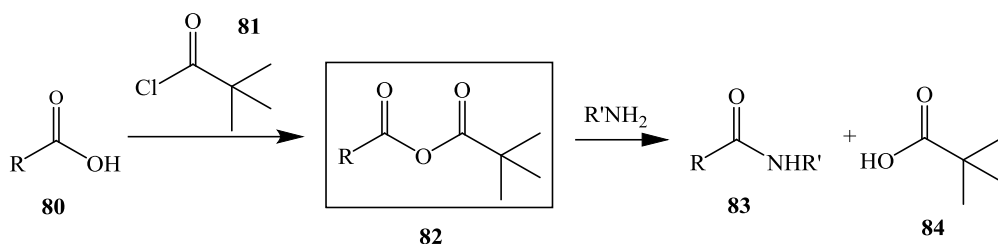
Simetrični anhidridi nastaju zagrijavanjem odgovarajuće karboksilne kiseline ili, u blažim uvjetima, reakcijom dviju molekula kiselina u prisustvu dicikloheksilkarbodiimida (DCC).<sup>45</sup> Pokretačka sila reakcije je stvaranje nusprodukta uree. U idućem stupnju, nastali anhidrid reagira s odgovarajućim aminom dajući željeni amid (Shema 17.). Ova učinkovita metoda dobivanja amida kompatibilna je s formiranjem peptida.<sup>46</sup> Glavni nedostatak ove sinteze je taj da samo polovica kiseline učinkovito daje amide, dok je druga polovica kiseliniski otpad.



Shema 17. Sinteza a) anhidrida i b) amida

### 2.1.5.2. Mješoviti anhidridi

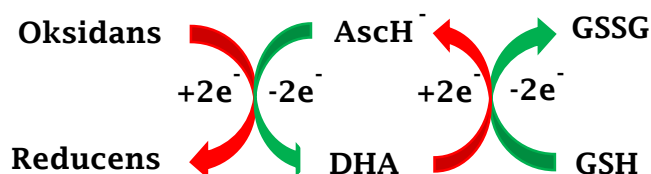
Kako bi se riješio problem kiselinskog otpada, razvijene su metode s mješovitim anhidridima. Tehniku mješovitih anhidrida prvi je proveo Vaughan<sup>47</sup>, a bila je to prva opća metoda dostupna za sintezu peptida. Mješoviti pivalični anhidridi<sup>48</sup> jedni su od mogućih reagensa za dobivanje amida (Shema 18.). Selektivnost aminolize rezultat je steričkog ometanja *tert*-butilne skupine.



**Shema 18.** Dvostupanjska sinteza amida putem pivaličnog anhidrida

## 2.2. Antioksidansi

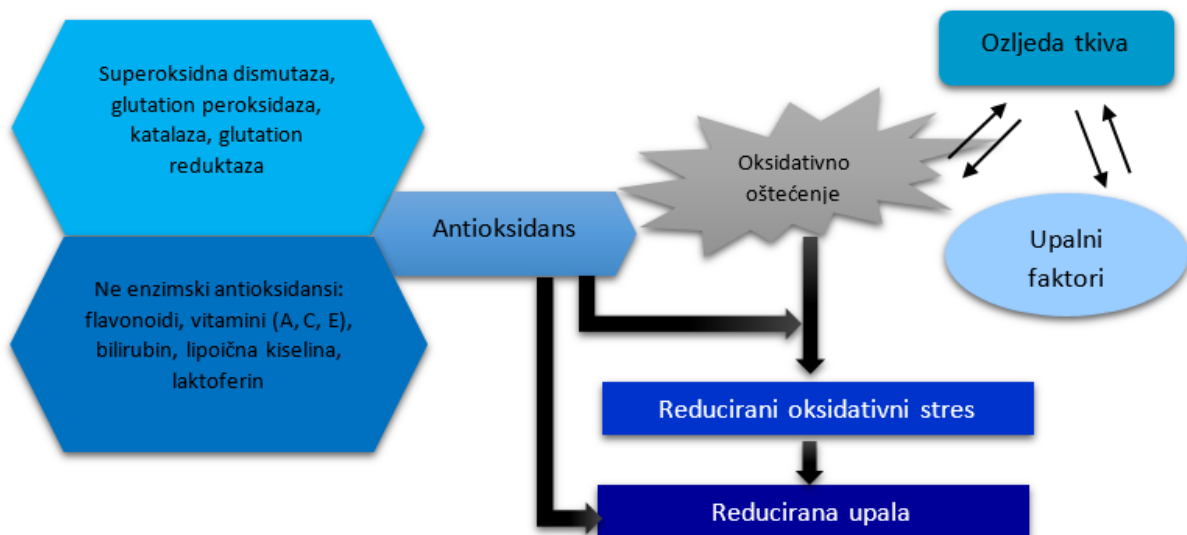
Gledajući kroz povijest, istraživanja vezana uz antioksidanse krajem 19. i početkom 20. stoljeća bila su posvećena njihovoj upotrebi u industriji, kao što je industrija gume (proces vulkanizacije)<sup>49</sup>, polimerizaciji goriva te sprečavanju polimerizacije nezasićenih masti.<sup>50</sup> Sama riječ „antioksidans“ originalno se je u prošlosti odnosila na kemikaliju koja sprečava konzumaciju kisika<sup>51</sup> i usporava degradaciju tvari jer nisu bili poznati mehanizmi oksidacije te antioksidativni efekt. U vidu antioksidansa, prekretnica u evoluciji znanja je otkriće Alberta Szent-Györgyia tridesetih godina, koji je otkrio vitamin C (Slika 2.).<sup>49</sup> Vitamin C ubrzo je povezo s biološkom oksidacijom te je glavna svojstva objavio u časopisu *The Biochemical Journal*<sup>52</sup> i tako postavio osnove njegove kemije i biokemije.



**Slika 2.** Prikaz ciklusa vitamina C koji je objavio 1928. Szent-Györgyi<sup>49</sup>

Danas se pod pojmom antioksidansa podrazumijevaju molekule, ioni ili stabilni radikali koji mogu usporiti ili inhibirati oksidaciju drugih molekula.<sup>53</sup> Oksidacija je kemijska reakcija prijenosa elektrona s neke supstance na oksidacijski agens. Oksidansi, koji su često redukcijski agensi, ulaze u interakciju sa slobodnim radikalima te ih stabiliziraju, što je važno jer slobodni radikali mogu lančanim reakcijama uzrokovati oštećenja stanica. Takva oštećenja mogu pak voditi do nastanka različitih tumora.<sup>54</sup> U ljudsko se tijelo procesom disanja konstantno unosi kisik kako bi stanice mogle stvarati energiju, a posljedica te aktivnosti je proizvodnja visoko reaktivnih molekula tzv. slobodnih radikala.

Slobodni radikali su bilo koje kemijske vrste s jednim ili više ne isparenih elektrona te kao takvi mogu nezavisno postojati. Reaktivne vrste obuhvaćaju reaktivne kisikove vrste (ROS) i reaktivne dušikove vrste (RNS) te su one u niskim koncentracijama neophodne u mnogim biokemijskim procesima, uključujući apoptozu<sup>55</sup>, staničnu diferencijaciju, imunost<sup>56</sup> te u obrani organizma protiv patogena<sup>57</sup>. S druge strane, visoke koncentracije reaktivnih vrsta uzrokovat će neravnotežu između oksidansa i antioksidansa te dolazi do oksidativnog stresa koji može utjecati na brojna patološka stanja. Upravo zbog toga u današnje se vrijeme istraživanja sve više fokusiraju na otkrivanje novih molekula s antioksidativnim sposobnostima koje bi se primijenile u sprečavanju bolesti poput raka, infarkta, arterioskleroze, reumatoidnog artritisa, dijabetesa i neurodegeneracije, odnosno kao potencijalni lijekovi.<sup>58</sup>



**Slika 3.** Pregled djelovanja antioksidansa<sup>59</sup>

### 2.2.1. Podjela antioksidansa

Antioksidansi se mogu klasificirati na više načina, a osnovna je podjela na temelju aktivnosti<sup>60</sup>:

#### a) Enzimski antioksidansi

- Superoksidne dismutaze – enzimi u čijoj se strukturi nalazi atom metala, a kataliziraju pretvorbu dva superoksidna radikala u kisik i vodikov peroksid koji je manje toksičan od superoksida

- Katalaze – enzimi peroksisoma koji razgrađuju vodikov peroksid na vodu i kisik
- Glutation peroksidaze – razgrađuju vodikov peroksid

b) Ne-enzimski antioksidansi<sup>54</sup>

- Primarni ili prirodni antioksidansi – reagiraju s lipidnim radikalima i prevode ih u stabilnije produkte, najvažniji izvori su začini i biljke
- Sekundarni ili sintetski antioksidansi – fenolni spojevi koji hvataju slobodne radikale i tako zaustavljaju lančane reakcije

Nadalje, primarni antioksidansi uključuju:

1. Mineralne antioksidanse – kofaktori enzimskih antioksidansa, a njihov nedostatak utječe na metabolizam mnogih makromolekula, primjerice ugljikohidrata. U ovu skupinu spadaju selen, bakar, željezo, cink i magnezij.
2. Antioksidativni vitamini – bitni su za većinu metaboličkih funkcija, a uključuju vitamine A, C i E.
3. Fitokemikalije – fenolni spojevi koji obuhvaćaju: flavonoide, katehine, karotenoide te terpene.

U sekundarne antioksidanse spadaju:

1. Butilirani hidroksianisol (BHA)
2. Butilirani hidroksitoluen (BHT)
3. Propil-galat (PG) i metalni kelirajući agens (EDTA)
4. *Tert*-butilni hidrokinon (TBHQ)
5. Nordihidroguaretična kiselina (NDGA)

### **2.2.2. Primjeri antioksidansa**

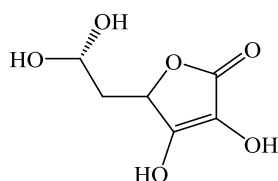
ANTIOKSIDANSI IZ HRANE:

#### ***Vitamin C***

Vitamin C ili askorbinska kiselina (Slika 4.) smatra se najvažnijim u vodi topljivim antioksidansom, a nalazi se u ekstracelularnim tekućinama.

Ima sposobnost neutralizacije ROS-a u vodenoj fazi prije nego što se inicira lipidna peroksidacija te ga možemo smatrati prvom linijom obrane organizma. Tijelo ga ne može pohraniti, stoga je važan regularan unos putem hrane.

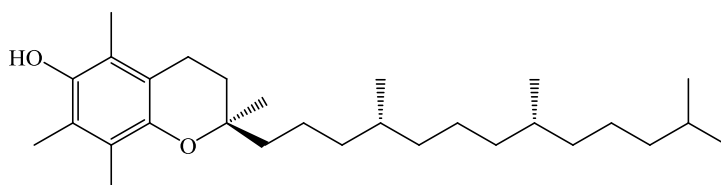
Glavni izvori su voće i povrće, od kojih se ističu citrusno voće, zelena paprika, brokula, zeleno lisnato povrće, jagode, kupus i krumpir.<sup>61</sup> Po strukturi je ketolakton s dvije ionizirajuće hidroksilne skupine, a pri fiziološkom pH dominantni oblik mu je askorbat monoanion ( $\text{AscH}^-$ ) koji je odličan redukcijski agens. Njegovom oksidacijom nastat će askorbat radikal anion ( $\text{Asc}^{\cdot-}$ ) i dehidroaskorbinska kiselina (DHA). Čista askorbinska kiselina je kristalni bijeli prah, dok je njezina vodena otopina bezbojna.



**Slika 4.** Struktura vitamina C

### ***Vitamin E***

Vitamin E jest ime za skup od osam tokoferola i tokotrienola topivih u masti. Razlika između tokoferola i tokotrienola je u zasićenosti bočnog izoprenoidnog lanca vezanog na kromanolni prsten. U strukturi tokoferola koji se javljaju u prirodi nalaze se tri asimetrična ugljikova atoma R konfiguracije, dok je za tokotrienole specifično da su sve dvostruke veze u bočnom lancu *trans* konfiguracije.<sup>62</sup> Čisti vitamin E je bezbojna uljna tekućina, sklona oksidaciji u prisustvu kisika, svjetla te nekih metalnih iona. Mogu se pohranjivati u tijelu s masti u jetri i drugim tkivima, a najviše proučavani je  $\alpha$ -tokoferol (Slika 5.). Zadaća mu je zaštita membrane od oksidacije reakcijom s lipidnim radikalima koji nastaju u lančanoj reakciji lipidne peroksidacije.

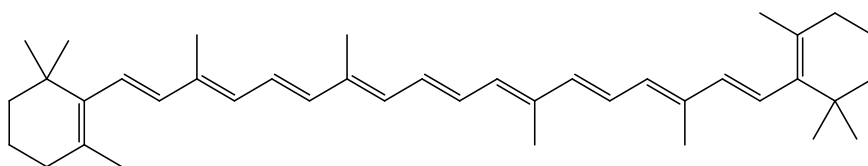


**Slika 5.** Struktura  $\alpha$ -tokoferola

Istraživanja su pokazala da ima važnu ulogu kod srčanih bolesti poput arterioskleroze<sup>63</sup> te vjerojatno pomaže pri sprečavanju stvaranja srčanih ugrušaka koji mogu voditi do srčanog udara ili tromboembolije.<sup>64</sup> Nekoliko je istraživanja pokazalo da dodatno uzimanje vitamina E može smanjiti rizik od degeneracije žute pjege i pojave očne mrežnice. Glavni izvori su cjelovite žitarice, visoko kvalitetna povrtna ulja, sjemenke te orašasti plodovi.

### ***Beta-karoten***

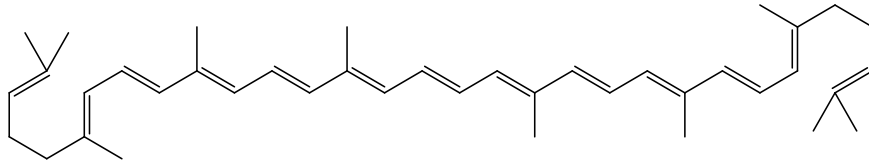
Beta-karoten (Slika 6.) najviše je proučavani od više od 600 otkrivenih različitih karotenoida. Štiti tamno zeleno, narančasto i žuto voće i povrće od oštećenja uzrokovanih solarnom radijacijom te se vjeruje da ima sličnu ulogu i u tijelu. Važan je u zaštiti mastima bogatih tkiva, a istraživanja pokazuju da bi mogao djelovati sinergistički s vitaminom E.<sup>49</sup> Bogati izvori beta-karotena su mrkva, brokula, rajčica, kelj, bundeva, breskva, kupus, batat i marelica.<sup>65</sup> U strukturi ima dvije retinilne skupine, a u tankom crijevu enzim beta-karoten dioksidaza cijepa ga na retinal koji je oblik vitamina A. Sastoji se izoprenskih jedinica, a dugi lanac konjugiranih dvostrukih veza daje mu specifičnu boju. Vrlo je nestabilan te se na zraku može spontano oksidirati.



**Slika 6.** Struktura beta-karotena

### ***Likopen***

Likopen (Slika 7.) je prirodni pigment topiv u mastima, koji sintetiziraju biljke i mikroorganizmi. Spada također u karotenoide, ima izoprensku strukturu te je podložan *cis-trans* izomerizaciji. U *trans* konfiguraciji molekula je u potpunosti izdužena te je planarne konfiguracije.<sup>66</sup> Najvažniji izvori su crveno voće i povrće kao što su rajčice, marelice, breskve, lubenice, ružičasti grejpfrut. Smatra se da može zbog svojih antioksidativnih sposobnosti, djelujući kao hvatač slobodnih radikala, spriječiti pojavu tumora i aterogeneze zaštitom važnih biomolekula poput lipida, lipoproteina niske gustoće (LDL), proteina te DNA.<sup>67</sup>



**Slika 7.** Struktura likopena

Zbog velikog broja konjugiranih dvostrukih veza pokazuje veću sposobnost gašenja singletnog kisika u odnosu na  $\beta$ -karoten i  $\alpha$ -tokoferol.<sup>68</sup> Također, zbog prisutnosti nezasićenih dvostrukih veza podložan je oksidativnoj degradaciji ili izomerizaciji pod utjecajem kisika, svjetla, topline ili nekih drugih vanjskih utjecaja.

### ***Selen***

Selen jest mineral za kojeg se pretpostavlja da pomaže stanicama u borbi protiv oštećenja uzrokovanih reaktivnim kisikovim vrstama te tako štiti stanicu od nastanka raka. U tijelu se nalazi ukomponiran u različite proteine tzv. selenoproteine. Primjer je enzim glutation peroksidaza koja uklanja vodikov peroksid i lipidne hidroperokside na račun reduciranog glutationa, što će eliminirati toksične molekule. Nalazi se i u sastavu tioredoksin reduktaze koja je važna za sintezu DNA, regulaciju transkripcije gena te rasta.<sup>69</sup> Izvori selena su riba, crveno meso, piletina, jaja, češnjak, školjke, a najveća je količina pronađena u brazilskom orahu. U većim količinama može uzrokovati trovanje pa treba paziti da se ne unese prekomjerno.

U Tablici 2. prikazani su još neki antioksidativni spojevi prisutni u različitim začinima i biljkama.



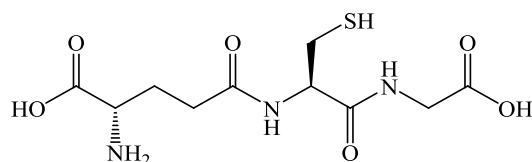
**Tablica 2.** Antioksidativni spojevi u začinima i biljkama.\*<sup>70</sup>

| <b>Začin</b>            | <b>Antioksidativni spojevi</b>  |
|-------------------------|---|
| <i>Klinčić</i>          | Fenolne kiseline (galična kiselina), flavonol glukozidaza, fenolna hlapiva ulja (eugenol, acetileugenol), tanini  |
| <i>Đumbir</i>           | Shogaol, gingerol   |
| <i>Muškatni oraščić</i> | Miristfenon, fenolna hlapiva ulja, fenolna kiselina (kofeinska kiselina), flavanoli (katehin)   |
| <i>Mažuran</i>          | Beta-karoten, beta-sitosterol, kofeinska kiselina, karvakol, eugenol, hidrokinon, linalil-acetat, mircen, ružmarinska kiselina, terpinen-4-ol   |
| <i>Origano</i>          | Kofeinska kiselina, <i>p</i> -kumarinska kiselina, ružmarinska kiselina, derivati kafeila, karvakol, flavonoidi   |
| <i>Crvena paprika</i>   | Beta-karoten, beta-sitosterol, kofeinska kiselina, kampesterol, kamfen, kapascin, kapsantin, klorogenična kiselina, eugenol, gama-terpinen, hesperidin, miristinska kiselina              |
| <i>Ružmarin</i>         | Karnosol, 12- <i>o</i> -metilkarnosoik, rozmanol, kofeinska kiselina, ružmarinska kiselina, derivati kafeila, fenolni diterpeni (karnosoična kiselina), karnosol, epirosmanol, flavonoidi |
| <i>Kadulja</i>          | Rozmanol, epirosmanol, fenolne kiseline (ružmarinska kiselina), fenolni diterpeni (karnoična kiselina), flavonoidi  |
| <i>Sezam</i>            | Sezaminol, $\alpha$ -tokoferol, sezamol   |
| <i>Kurkuma</i>          | Kurkumin, 4-hidroksicinamolmetan  |
| <i>Timijan</i>          | Fenolne kiseline (galična, kofeinska i ružmarinska kiselina), timol, fenolni diterpeni, flavonoidi  |

\*iz različitih izvora

**ENDOGENI ANTIOKSIDANSI:*****Glutation***

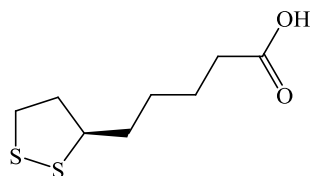
Glutation (GSH) (Slika 8.) je u vodi topljiv antioksidans sintetiziran u tijelu iz aminokiselina glicina, glutaminske kiseline i cisteina. U strukturi ima tiolnu skupinu, a u tijelu se nalazi u redoks ravnoteži između reduciranog oblika (GSH) i oksidiranog oblika – glutacion disulfida (GSSG). U stanicama ga sintetiziraju  $\gamma$ -glutamilcistein sintaza i glutacion sintaza.<sup>71</sup> Zadaća mu je neutralizacija ROS-a, primjerice lipidnih peroksida. Nalazi se u gotovo svim stanicama tijela, a najveća koncentracija nađena je u jetri. Osim toga, nalazi se i u biljkama gdje također ima važnu obrambenu ulogu vezanu uz različite vanjske utjecaje. Može se unijeti u organizam i putem hrane, a izvori su šparoge, tikvice, špinat, krumpir, avokado, brokula i jagode.



**Slika 8.** Struktura glutationa

### ***Lipoična kiselina***

Lipoična kiselina (LA) izolirana je iz goveđe jetre 1951. i prvotno je smatrana vitaminom. Nalazi se u svakoj stanici tijela te u svojoj strukturi sadrži dvije tiolne (sumporne) skupine koje mogu biti oksidirane ili reducirane. Zajedno sa svojim reduciranim oblikom, dihidrolipoičnom kiselinom, ima sposobnost keliranja teških metala te neutralizacije slobodnih radikala u lipidnim i vodenim medijima (amfifilna svojstva) pa se tako još nazivaju univerzalnim antioksidansom.<sup>72</sup> U svojoj strukturi LA ima jedno kiralno središte te se endogeno sintetizira samo kao R-izomer (Slika 9.). Egzogenom LA bogata je hrana životinjskog podrijetla, dok su glavni biljni izvori grašak, brokula, rajčica, rižine mekinje i špinat. Kovalentno se veže za određene proteine te služi kao prostetička skupina mitohondrijskog multienzimskog kompleksa važnog za metabolizam aminokiselina i energije.

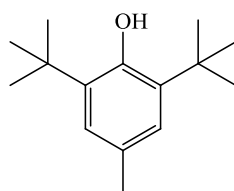


**Slika 9.** Struktura (R)- $\alpha$ -lipoične kiseline

## SINTETIČKI ANTIOKSIDANSI

### ***Butilirani hidroksitoluen***

Nakon što je otkriveno da su slobodni radikali uzročnici staničnih oštećenja, osim prirodnih antioksidansa sintetizirano je i mnoštvo novih molekula koje bi služile kao potencijalni antioksidansi, a primjer je i butilirani hidroksitoluen (BHT) (Slika 10.). Koristi se u različitim područjima kao što su hrana, plastika, guma, biomedicina te uljna i naftna industrija<sup>73</sup> u ulozi supstrata ili kao aditiv. U strukturi ima fenolni prsten, a zbog dobrih svojstava napravljen je i velik broj njegovih derivata.



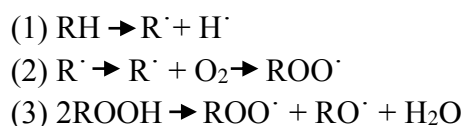
**Slika 10.** Struktura butiliranog hidroksitoluena

### 2.2.3. Mehanizam djelovanja antioksidansa

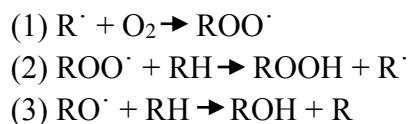
Dva su glavna principa na kojima se temelji djelovanje antioksidansa. Prvi jest mehanizam cijepanja lanca u kojem primarni antioksidans donira elektrone prisutnim slobodnim radikalima, dok drugi uključuje uklanjanje inicijatora ROS i RNS gašenjem katalizatora lančane reakcije.

#### Lančana reakcija slobodnih radikala:

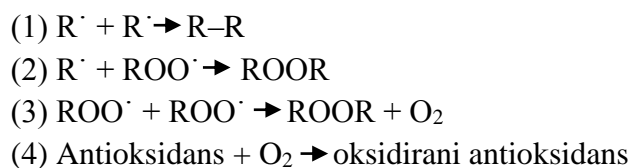
##### i. Inicijacija



##### ii. Propagacija



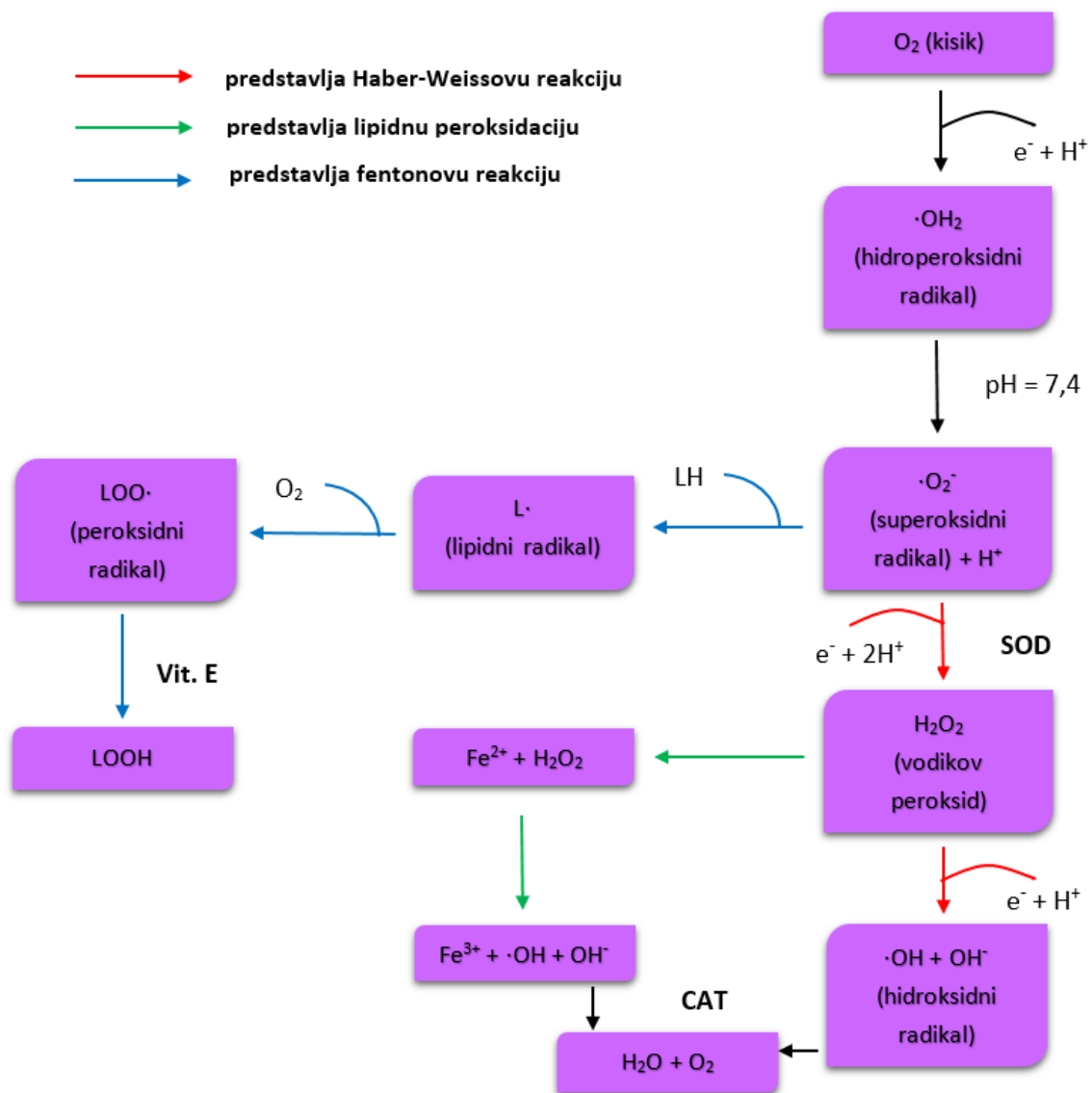
##### iii. Terminacija



### 2.3. Reaktivne kisikove vrste

Da bi razumjeli sam mehanizam djelovanja antioksidansa, bitno je nešto reći o već spomenutim reaktivnim vrstama. Reaktivne kisikove vrste (ROS) jest izraz koji obuhvaća sve visoko reaktivne molekule, uključujući i slobodne radikale, koje u svojoj strukturi sadržavaju kisik. U ROS tako spadaju: hidroksilni radikal ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), superoksidni anion radikal ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), peroksidni radikal ( $\text{ROO}^{\cdot}$ ), alkoksilni radikal ( $\text{RO}^{\cdot}$ ), singletni kisik ( $^1\text{O}_2$ ), ozon ( $\text{O}_3$ ) i hipoklorična kiselina ( $\text{HClO}$ ) (Slika 11).

Osim ROS-a, postoje i reaktivne dušikove vrste (RNS) koje su obitelj antimikrobnih molekula izvedenih iz dušičnog oksida (NO), a u organizmu nastaju enzimskom aktivnošću inducibilne sintaze dušičnog oksida 2 (NOS2) te imaju važnu ulogu u obrani organizma protiv patogena. NOS2 se eksprimira prvenstveno u makrofazima nakon indukcije citokinima i mikrobnim produktima, naročito gama-interferonom i lipopolisaharidima.<sup>74</sup> Osim NOS2, NO može nastati i pomoću drugih izoforma sintaze dušičnog oksida iz L-arginina, a to su NOS1 i NOS3.<sup>58</sup>



**Slika 11.** Generiranje ROS-a različitim reakcijama<sup>77</sup>  
 SOD-superoksidna dismutaza, CAT-katalaza

S druge strane, ROS se može generirati u organizmu na više načina. Većina oksidansa u stanicama nastaju kao posljedica normalnog aerobnog metabolizma: oko 90% kisika kojeg koristi stanica je konzumiran od strane mitohondrijskog transportnog sustava elektrona. Drugi izvor su fagociti (bijele krvne stanice), oksidansi nastaju kao dio mehanizma kojim se ubijaju bakterije i virusi dok su nepoznati proteini (antigeni) denaturirani. Naposljetku, treći je izvor ksenobiotički metabolizam, primjerice detoksifikacija toksičnih supstanci.<sup>75</sup> Stoga, ROS ima centralnu ulogu u intracelularnim putevima provođenja signala za različite patofiziološke stanične odgovore te patofiziologiju različitih bolesti poput sindroma akutnog respiratornog distresa, starenja, Alzheimerera, arterioskleroze, raka, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, upale, upalne bolesti zglobova, neuroloških bolesti, pretilosti, Parkinsonove bolesti, plućne fibroze, reumatoidnog artritisa i vaskularnih bolesti.<sup>76</sup>

Uz navedeno, na nastanak reaktivnih vrsta također mogu utjecati i jača tjelovježba koja ubrzava stanični metabolizam, izloženost toksinima poput dima cigarete, zagađenja, pesticida, insekticida, UV svjetlo i ionizacijska radijacija. Posljedica prekomjerne sinteze ROS-a ili smanjene obrane antioksidansima je oksidacijski stres.

## 2.4. Biološki učinci reaktivnih kisikovih vrsta

Reaktivne kisikove vrste reagiraju s velikim brojem biomolekula (proteini, lipidi, ugljikohidrati i nukleinske kiseline) te mogu ireverzibilno uništiti ili izmijeniti njihove funkcije nakon interakcije s njima. Slobodni radikali mogu međudjelovati s drugim molekulama na sljedeće načine<sup>77</sup>:

Elektron donori/elektron akceptori:  $\text{OH}\cdot + \text{RS}^-$ ,  $\text{OH}^- + \text{RS}\cdot$

Uklanjanje vodika:  $\text{CCl}_3\cdot + \text{RH}$ ,  $\text{CCl}_3 + \text{R}\cdot$

Adicijske reakcije:  $\text{CCl}_3\cdot + \text{CH}_2=\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_2(\text{CCl}_3)\text{-CH}_2$

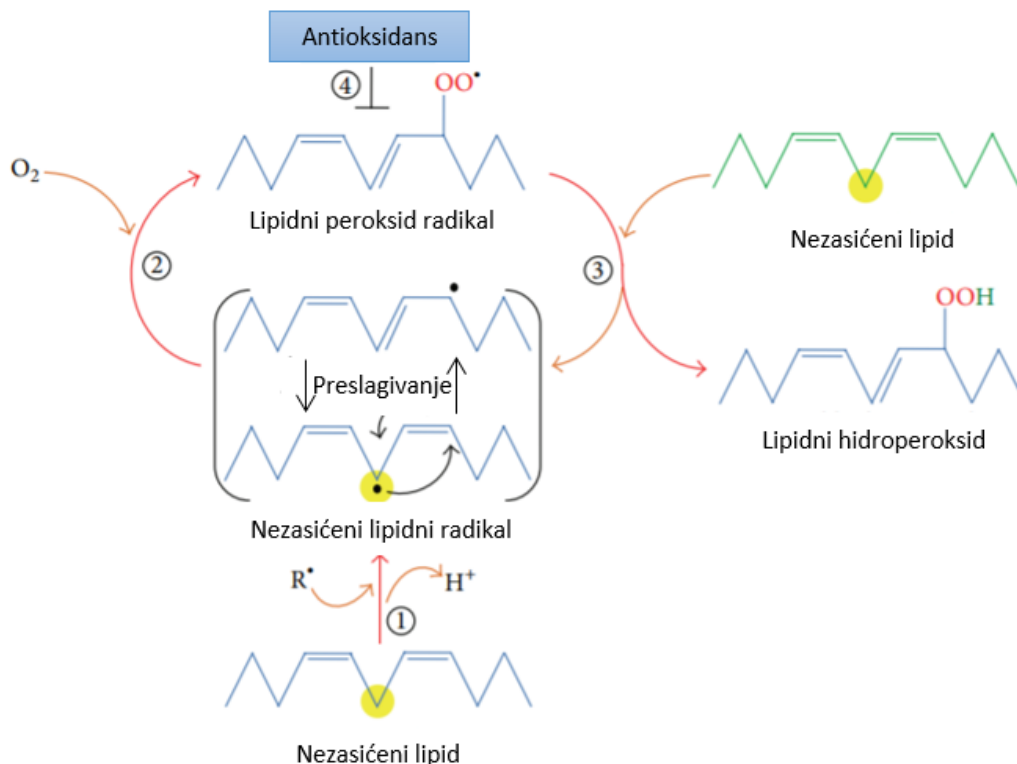
Samouništenje:  $\text{CCl}_3\cdot + \text{CCl}_3\cdot$ ,  $\text{C}_2\text{Cl}_6$

Disproporcioniranje:  $\text{CH}_3\text{CH}_2\cdot + \text{CH}_3\text{CH}_2\cdot$ ,  $\text{CH}_2=\text{CH}_2 + \text{CH}_3\text{-CH}_3$

### 2.4.1. Lipidna peroksidacija

Jedan od efekata oksidativnog stresa uzrokovanog reaktivnim vrstama je lipidna peroksidacija. Lipidna peroksidacija (Slika 12.) inicirana je napadom bilo koje reaktivne kemijske vrste koja može ukloniti vodik s masne kiseline ili masnog acilnog bočnog lanca, no pretežito su to hidroksidni i hidroperoksidni radikali.

Što je veći broj dvostrukih veza u bočnom lancu to će biti lakše uklanjanje vodikovog atoma. Polinezasićene masne kiseline su upravo zbog toga posebno osjetljive na oksidativnu degradaciju uzrokovanu reakcijama slobodnih radikala u stanicama što rezultira nastankom visoko reaktivnih aldehida. Česte mete su glikolipidi, fosfolipidi i kolesterol. Osim reaktivnim vrstama, lipidi mogu biti oksidirani enzimima kao što su lipoksigenaze, ciklooksigenaze i citokrom P450.<sup>78</sup> S obzirom na to da vodikov atom ima jedan elektron, njegovim uklanjanjem ostaje ne-sparen elektron na ugljikovom atomu na koji je taj vodik bio vezan. Takav nastali lipidni radikal može imati nekoliko sudbina, a najvjerojatnija u aerobnim stanicama je molekularno pregrađivanje nakon kojeg dolazi do reakcije s  $O_2$  te nastaje peroksidni radikal. Peroksidni se radikali mogu kombinirati jedan s drugim ili pak mogu napasti membranske proteine. Također mogu i ukloniti vodik sa susjednih bočnih lanaca masnih kiselina i tako pokrenuti propagaciju odnosno lančanu reakciju lipidne peroksidacije. Trajanje propagacije ovisi o brojnim faktorima kao što su omjer lipida i proteina, kompozicija masnih kiselina, koncentracija kisika i prisustvo antioksidansa.<sup>79</sup>



**Slika 12.** Proces lipidne peroksidacije; 1-inicijacija, 2, 3-propagacija, 4-terminacija<sup>78</sup>

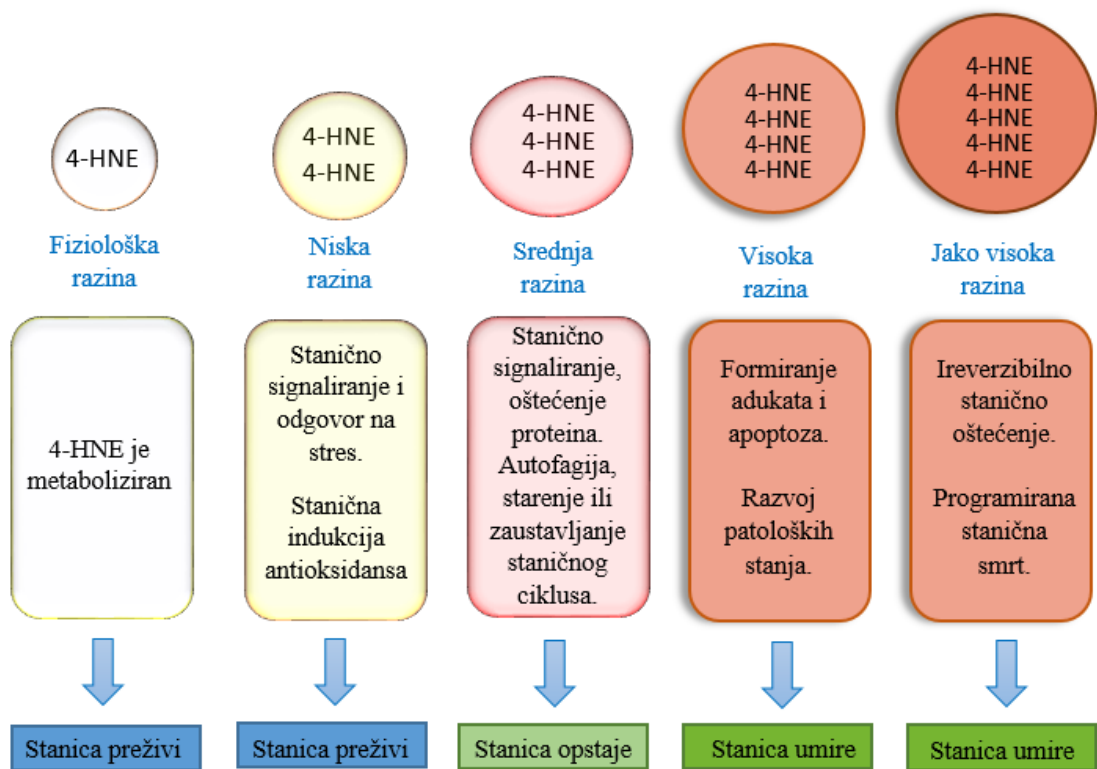
U lipidnoj peroksidaciji mogu sudjelovati i ioni prijelaznih metala. Kada su željezni, bakrov ili određeni kelati tih iona dodani liposomima, lipoproteinima ili izoliranim biološkim membranama, dolazi do peroksidacije. Oksidirani oblici tih metalnih iona ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) mogu također ubrzati peroksidaciju ako je prisutan redukcijski agens. Ponekad kao redukcijski agens mogu poslužiti i same membrane odnosno tiolne skupine membranskih proteina. Do peroksidacije dolazi reakcijom metalnih iona s  $\text{H}_2\text{O}_2$  iz kojeg će se zatim generirati hidroksilni radikali. Još jedan od načina nastanka lipidnih peroksida je kombinacija polinezasićenih masnih kiselina ili njihovih bočnih lanaca s visoko reaktivnim singletnim kisikom koji nastaje kada molekula kisika apsorbira energiju te će doći do preslaganja elektrona. Reakcija nije inicijacijska jer peroksidi nastaju direktno, bez prethodne apstrakcije vodika koja bi pokrenula lančanu reakciju.

Opseg lipidne peroksidacije može se odrediti mjerenjem količine nezasićenih masnih kiselina, količine primarnih oksidacijskih produkta ili količine sekundarnih oksidacijskih produkta.

Neke od metoda za detekciju i mjerenje biološke lipidne peroksidacije su analiza masnih kiselina HPLC ili GLC uređajem, upotreba kisikove elektrode kojom se mjeri potrošnja kisika od strane ugljikovih radikala tokom reakcija peroksidne dekompozicije, metoda oslobađanja joda (lipidni peroksidi oksidiraju  $\text{I}^-$  u  $\text{I}_2$  titracijom s tiosulfatom), pomoću glutation peroksidaze, ciklooksigenaze, GC-MS spektrometrijom, mjerenjem emisije svjetla, fluorescencije, ugljikovodičnih plinova, TBA (tiobarbiturna kiselina) testom te konjugacijom diena.<sup>34</sup>

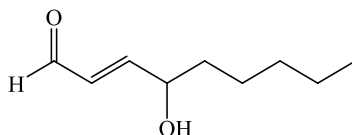
#### **2.4.2. 4-hidroksinonenal**

4-hidroksinonenal (4-HNE) većinski je citotoksičan produkt lipidne peroksidacije, a može se naći u različitim tkivima i kod normalnih, fizioloških uvjeta<sup>80</sup> te ima jedinstveno svojstvo da ostane stabilan (ne metabolizira se) vezujući se za makromolekule poput proteina. Može se detektirati upotrebom monoklonalnih antitijela. Danas je poznato da je 4-HNE važan u signalnim putevima za zaustavljanje staničnog ciklusa, diferencijaciju, regulaciju ekspresije gena (p-53 i c-fos) i apoptozu pa je tako prisutan kod mnogih bolesti kao što su rak, autoimune i neurodegenerativne bolesti.<sup>81</sup>



**Slika 13.** 4-HNE promovira stanično preživljavanje ili inducira staničnu smrt.<sup>78</sup>

Po strukturi (Slika 14.) je  $\beta$ -nezasićeni elektrofilni spoj koji nastaje dekompozicijom arahidonske kiseline i većih polinezasićenih masnih kiselina enzimskim ili ne-enzimskim putem. Jako je reaktivan zbog postojanja triju funkcionalnih grupa: (i) C=C dvostruka veza koja može biti meta za Michaelovu adiciju na tiol, redukciju ili epoksidaciju, (ii) karbonilna grupa koja može dati acetal/tioacetal ili biti meta za formiranje Schiffove baze, oksidaciju ili redukciju, (iii) hidroksila grupa koja se može oksidirati u keton.<sup>82</sup>

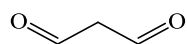


**Slika 14.** Struktura 4-hidroksinonenala

### 2.4.3. Malondialdehid

Malondialdehid (MDA) (Slika 15.) jest najviše proučavani produkt lipidne peroksidacije. Pretpostavlja se da je on najmutageniji produkt lipidne peroksidacije dok je prethodno spomenuti 4-HNA najtoksičniji.<sup>83</sup>





**Slika 15.** Struktura malondialdehida

MDA je bio široko korišten kao pogodan biomarker lipidne peroksidacije omega-3 i omega-6 masnih kiselina zbog lake reakcije s tiobarbiturnom kiselinom (TBA).<sup>84</sup> Test se temelji na reakciji TBA i MDA pri čemu nastaje intenzivno obojen fluorescentni crveni adukt, no s obzirom na to da je test nespecifičan to je izazvalo kontroverzije te su danas razvijene druge metode za kvantificiranje MDA u *in vivo* uzorcima, kao što je plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS/MS). MDA je jedan od najpopularnijih i najpouzdanijih markera za određivanje oksidativnog stresa u kliničkim situacijama zahvaljujući njegovoj visokoj reaktivnosti<sup>85</sup> pa molekula je vrlo bitna u biomedicinskoj istraživačkoj zajednici.

MDA je konačan produkt koji se generira dekompozicijom arahidonske kiseline i većih polinezasićenih masnih kiselina, enzimatskim ili ne-enzimatskim procesima. U enzimskim procesima nastaje tijekom biosinteze tromboksana A<sub>2</sub> koji je biološki aktivan metabolit arahidonske kiseline.

Uz pomoć tromboksan A<sub>2</sub> sintaze i prostaglandin endoperoksida ili prostaglandina H<sub>2</sub>, koji se prethodno generira djelovanjem ciklooksigenaze na arahidonsku kiselinu, dobiva se naposljetku MDA.<sup>86</sup>

Kod ne-enzimskog procesa najprije dolazi do ciklizacije peroksidnog radikala s *cis*-dvostrukom vezom, intramolekulskom radikalskom adicijom na dvostruku vezu te nastaje novi radikal. Nastali intermedijarni radikal može opet ciklizirati i formirati biciklički endoperoksid, strukturno sličan prostaglandinima, i podlegnuti cijepanju iz čega nastaje MDA. Drugi put je iz arahidonske kiseline te kisikovih radikala što će dati također bicikličke endoperoksidge iz kojih nastaje MDA. Nakon formiranja MDA će se enzimski metabolizirati ili reagirati sa staničnim i tkivnim proteinima ili DNA te formirati adukte koji rezultiraju biomolekularnim oštećenjem.<sup>72</sup> Metabolizam vjerojatno uključuje oksidaciju MDA mitohondrijskom aldehyd dehidrogenazom nakon koje slijedi dekarboksilacija i nastanak acetaldehida, a njega dalje oksidira aldehyd dehidrogenaza u acetat pa sve do CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O.<sup>87</sup> S druge strane, citoplazmatski MDA metabolizira fosfoglukoza izomeraza u metilglioksal kojeg dalje metaboliziraju enzimi u D-laktat. Dio MDA izluči se u urin u obliku različitih enamina. U slučaju da ne dođe do metabolizma, MDA može reagirati, a reaktivnost mu je ovisna o pH, niska je pri fiziološkim uvjetima dok se smanjenjem pH povećava.

Elektrofilnog je karaktera zbog čega dobro reagira s nukleofilima, kao što su bazični aminokiselinski ostaci (npr. lizin, histidin, arginin) i može postojati u obliku enolatnog iona. Reakcijom sa slobodnim aminokiselinama ili proteinima nastaju adukti Schiffove baze.<sup>87</sup> MDA adukti su biološki važni jer sudjeluju u reakcijama koje promoviraju intramolekulsko ili intermolekulsko protein/DNA unakrsno povezivanje (eng. *crosslinking*), što može uzrokovati promjene bioloških svojstava biomolekula te izazvati bolesti.<sup>88</sup> Pretpostavlja se da MDA može reagirati i s nekoliko nukleozida što uzrokuje oštećenja i mutacije DNA te bi moglo značajno doprinosti nastanku raka i drugih genetskih bolesti.

#### **2.4.4. Antioksidativna obrana protiv lipidne peroksidacije**

Prva linija obrane protiv superoksidnih aniona jest enzim superoksidna dismutaza (SOD), a zadaća joj je kataliza disproporcioniranja superoksidnih aniona na vodikov peroksid i molekularni kisik. SOD ima dvije izoforme: Zn/Cu SOD u citoplazmi te Mn SOD u mitohondrijima. Kako nastali vodikov peroksid i dalje predstavlja prijetnju za stanicu potrebna je i njegova dekompozicija, a nju vrši enzim katalaza na dva načina. Prvi način je da se ponaša kao katalizator te nastaju voda i kisik, a drugi je da se ponaša kao peroksidaza.<sup>89</sup>

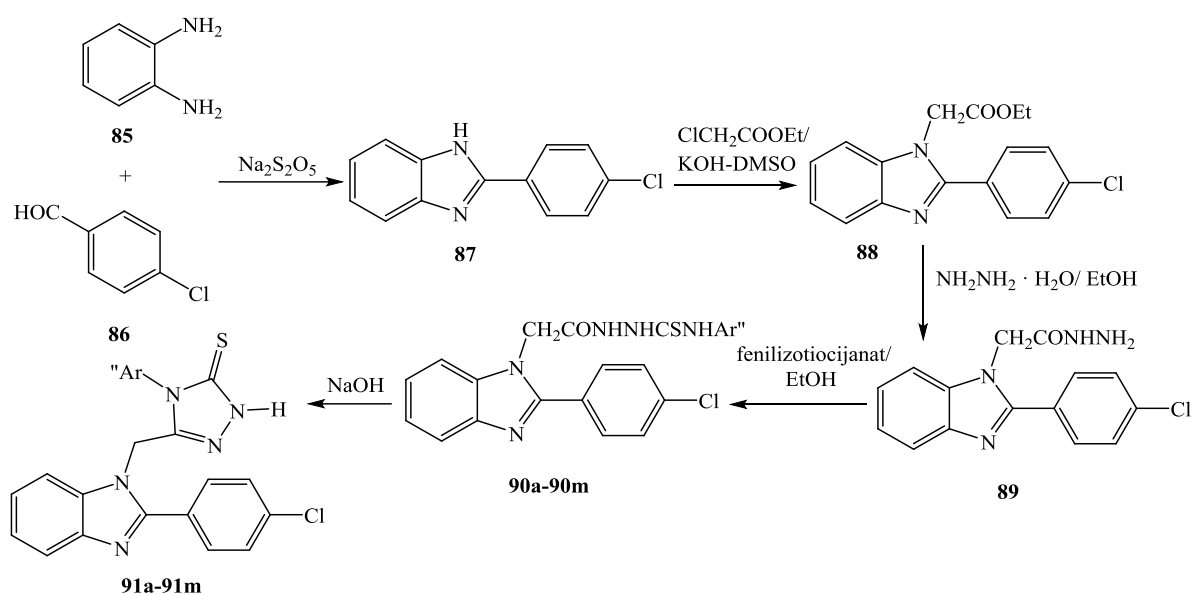
Katalaza je jedan od najefikasnijih enzima te je prisutna u svim prokariotima i eukariotima, a uglavnom se nalazi u peroksisomima stanica sisavaca.

Osim katalaze, vodikov peroksid mogu razgraditi i grupa enzima koje se nazivaju peroksidaze, a najvažnije su glutation peroksidaze (GSH) i tioredoksin peroksidaze (TRX).<sup>79</sup> Osim enzimskih, od lipidne peroksidacije mogu štiti i neenzimski antioksidansi, a tu se ističe već ranije spomenuti glutation, te vitamini E i C.

### **2.5. Sinteza i biološka aktivnost derivata benzimidazola i benzotiazola**

G. Ayhan-Kilcigil i suradnici sintetizirali su te istraživali antioksidativna svojstva novih derivata benzimidazola koji sadrže tiosemikarbazidni i triazolni supstituent na položaju N1 benzimidazolnog prstena. Poznato je da derivati benzimidazola i triazola pokazuju niz različitih bioloških učinaka. Za derivate triazola je karakteristično da posjeduju protuupalno<sup>90</sup>, antimikrobno<sup>91,92</sup>, antivirusno<sup>93</sup> i antioksidativno<sup>94,95</sup> djelovanje. Prema tome, očekuje se da sintetizirani spojevi, koji u svojoj strukturi sadrže benzimidazolnu i triazolnu jezgru i njihove otvorenolančane analoge tiosemikarbazide, posjeduju snažnija antioksidativna svojstva. U tu svrhu, sintetizirani su odgovarajući tiosemikarbazidi i 5-(2-(*p*-klorfenilbenzimidazol-1-il metil)-4-supstituirani fenil-2,4-dihidro-[1,2,4]-triazol-3-tioni (Shema 19.).

2-(*p*-klorfenil)-1*H*-benzimidazol **87** priređen je oksidacijskom kondenzacijom *o*-fenilendiamina, *p*-klorbenzaldehida i natrijevim metabisulfitom.<sup>96</sup> Reakcijom 2-(*p*-klor)fenil-1*H*-benzimidazola sa etil kloracetatom u KOH/DMSO nastaje *N*-alkilirani produkt, etilni ester(2-(*p*-klorfenil)-benzimidazol-1-il)-octene kiseline **88**.<sup>97</sup> Hidrazin-hidrat i dobiveni etilni ester u etanolu su zatim podvrgnuti zagrijavanju na temperaturi refluksa u trajanju od 4 h pri čemu je nastao željeni hidrazid, (2-(*p*-klorfenil)-benzimidazol-1-il)-hidrazid octene kiseline **89** u iskorištenju od 94%.<sup>98</sup> Tiosemikarbazidi **90a-90m** su dobiveni zagrijavanjem nastalog hidrazida octene kiseline s arilnim izotiocijanatom u apsolutnom etanolu u trajanju od 30 min.<sup>99</sup> U konačnici, ciklizacijom nastalih tiosemikarbazida sa NaOH<sup>100</sup> dobivaju se 5-(2-(*p*-klorfenil)benzimidazol-1-il metil)-4-supstituiran fenil-2,4-dihidro-[1,2,4]-triazol-3-tioni (**91a-91m**) (Shema 19.). Strukture dobivenih produkata potvrđene su IR i <sup>1</sup>H NMR spektroskopijom te masenom spektrometrijom.



**Shema 19.** Sintetski put dobivanja spojeva **90a-90m** i **91a-91m**

Svi sintetizirani spojevi podvrgnuti su *in vitro* ispitivanju kao potencijalni inhibitori lipidne peroksidacije ovisne o NADPH-u u mikrosomima jetre štakora. Lipidna peroksidacija određuje se spektrofotometrijski putem stvaranja reaktivne supstance 2-tiobarbiturine kiseline (TBARS). Količine TBARS-a izražene su u obliku nmol malondialdehida (MDA)/mg proteina. Tiosemikarbazidi **90a-90m** imaju jače inhibicijsko djelovanje na LP u usporedbi s njihovim triazolnim analogima **91a-91m** (Tablica 3.).

**Tablica 3.** *In vitro* učinci sintetiziranih produkata na razinu LP-a u jetri<sup>a</sup>

| Spoj <sup>b</sup>     | Ar''         | LP (nmol MDA /<br>mg) protein | Inhibicija % |
|-----------------------|--------------|-------------------------------|--------------|
| Kontrola <sup>c</sup> |              | 18,48 ± 2,32                  | 0            |
| 90a                   | fenil        | 9,51 ± 2,33                   | 70           |
| 90b                   | 4-tolil      | 3,64 ± 0,27                   | 80           |
| 90c                   | 3-tolil      | 3,36 ± 0,88                   | 82           |
| 90d                   | 2-tolil      | 8,75 ± 0,10                   | 53           |
| 90e                   | 4-fluorfenil | 8,01 ± 1,05                   | 57           |
| 90g                   | 2-fluorfenil | 5,34 ± 0,81                   | 71           |
| 90h                   | 4-klorfenil  | 8,01 ± 3,62                   | 57           |
| 90i                   | 3-klorfenil  | 3,30 ± 0,49                   | 82           |
| 90j                   | 2-klorfenil  | 4,60 ± 1,73                   | 75           |
| 90k                   | 4-bromfenil  | 4,26 ± 1,53                   | 77           |
| 90l                   | 3-bromfenil  | 2,96 ± 0,16                   | 84           |
| 90m                   | 2-bromfenil  | 4,66 ± 0,48                   | 75           |
| 91a                   | fenil        | 9,10 ± 0,64                   | 51           |
| 91b                   | 4-tolil      | 12,77 ± 5,04                  | 31           |
| 91c                   | 3-tolil      | 10,34 ± 0,13                  | 44           |
| 91d                   | 2-tolil      | 7,22 ± 0,56                   | 61           |
| 91e                   | 4-fluorfenil | 8,35 ± 0,72                   | 55           |
| 91f                   | 3-fluorfenil | -                             | -            |
| 91g                   | 2-fluorfenil | 10,97 ± 4,26                  | 41           |
| 91h                   | 4-klorfenil  | 12,27 ± 0,01                  | 34           |
| 91i                   | 3-klorfenil  | 6,93 ± 2,57                   | 62           |
| 91j                   | 2-klorfenil  | 4,15 ± 0,88                   | 78           |
| 91k                   | 4-bromfenil  | 6,84 ± 0,77                   | 63           |
| 91l                   | 3-bromfenil  | 5,11 ± 0                      | 72           |
| 91m                   | 2-bromfenil  | 3,01 ± 0,24                   | 84           |
| BHT                   |              | 5,68 ± 0,22                   | 65           |

<sup>a</sup> Svaka vrijednost predstavlja srednju vrijednost ± S.D. 2–4 neovisna eksperimenta. <sup>b</sup> Koncentracija u inkubacijskom mediju (10<sup>-3</sup> M). <sup>c</sup> Samo dimetilsulfoksid, kontrola spojeva – Nije testirano

Svi sintetizirani tiosemikarbazidi uzrokuju više od 50%-tne inhibicije LP-a pri koncentraciji od 10<sup>-3</sup> M. Također, neki tiosemikarbazidi poput **90a-90c**, **90g**, **90i-90m** koji u svojoj strukturi sadrže Ar'' supstituente: fenil, *p*-tolil, *m*-tolil, *o*-fluoro, *m*- i *o*-kloro i *p*-, *m*- i *o*-bromo fenil, pokazuju veću aktivnost u odnosu na butilirani hidroksitoluen (BHT) koji se koristi kao pozitivna kontrola.

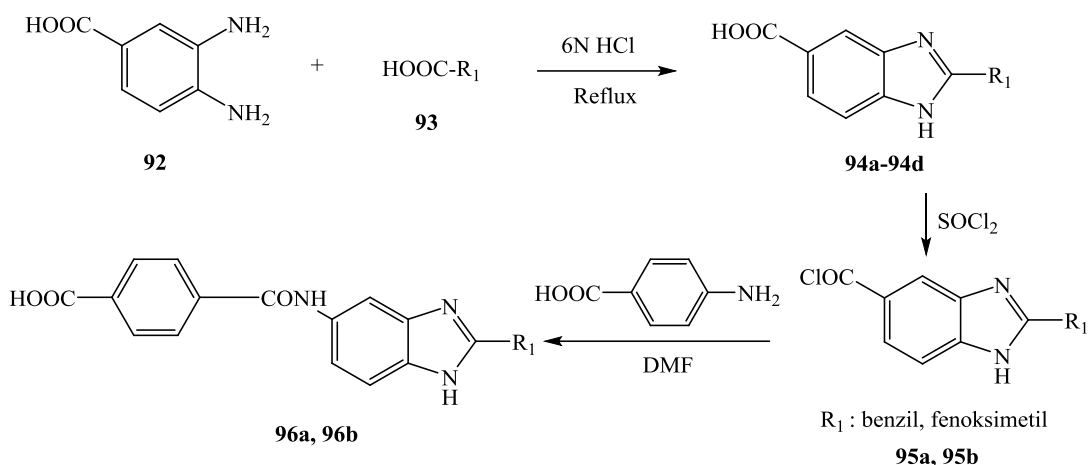
U triazolnoj seriji spojeva, najaktivniji su derivati **91j**, **91i** i **91m** koji uzrokuju inhibiciju LP-a od 72 do 84%. Navedeni spojevi imaju jači inhibicijski učinak od BHT (65% inhibicije).

Sintetizirani spojevi podvrgnuti su i na testiranje učinkovitog deaktiviranja superoksidnog anionskog radikala i DPPH slobodnog radikala. Sposobnost spojeva za deaktivacijom superoksidnog anionskog radikala određuje se spektrofotometrijski na temelju inhibicije redukcije citokroma c.<sup>101</sup> Na temelju dobivenih rezultata, nijedan od produkata pri koncentracijama od  $10^{-3}$  i  $10^{-4}$  M nije pokazao značajnu sposobnost deaktiviranja superoksidnog radikala.

DPPH metoda je opisana kao jednostavna, brza i prikladna metoda za probir mnogih uzoraka za deaktivacijom radikala.<sup>102</sup> Rezultati istraživanja pokazali su da svi sintetizirani produkti stupaju u interakciju sa DPPH-om. Time je omogućeno učinkovito uklanjanje DPPH radikala što se vizualno može pratiti promjenom boje.

Svi testirani tiosemikarbazidi (**90a-90m**) daju vrlo visoke vrijednosti za interakciju sa DPPH-om (85–96%), dok svi ispitani triazoli (**91a-91m**) pokazuju nešto slabiju interakciju sa DPPH-om (73–89%) kod koncentracije  $10^{-3}$  M i (43–80%) kod koncentracije  $10^{-4}$  M. Općenito, navedena interakcija izražava reducirajuću aktivnost ispitivanih spojeva i ukazuje na njihovu mogućnost deaktivacije slobodnih radikala. Ukupni rezultati provedenog istraživanja ukazuju da *in vitro*, novosintetizirani derivati benzimidazola posjeduju snažna antioksidativna svojstva.

Melatonin ima važnu ulogu u niz fizioloških procesa. U posljednjem desetljeću pokazalo se da melatonin i srodni spojevi djeluju na slobodne radikale i lipidnu peroksidaciju.<sup>103,104</sup> Istraživana je potencijalna uloga melatonina kao antioksidansa za deaktivacijom i detoksikacijom ROS-a, posebno visokocitotoksičnog hidroksilnog radikala.<sup>14</sup> Prema tome, spojevi analogni melatoninu mogu se koristiti u antioksidativne svrhe, bilo kao lijekovi ili dodaci prehrani. Iako spojevi u kojima je karboksilna skupina vezana za prstenasti sustav nisu detaljno istraživani, prethodna ispitivanja dala su značajne rezultate njihove antioksidativne aktivnosti.<sup>105</sup> Zahvaljujući sličnosti indolog i benzimidazolnog prstena, postoji mogućnost zamjene indola melatonina benzimidazolnim prstenom čime se dobije slično, vrlo učinkovito antioksidativno djelovanje. Stoga su H. Gurer-Orhan i suradnici sintetizirali (osim **94d**<sup>106</sup>) i okarakterizirali šest novih benzimidazolnih analoga melatonina (Shema 20.).

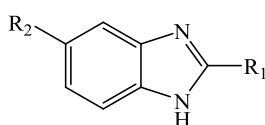


**Shema 20.** Sinteza spojeva **94a-94d** i **96a, 96b**

Takoder, provedena su i *in vitro* ispitavanja dobivenih produkata na antioksidativni sustav humanih eritrocita.

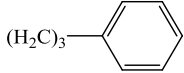
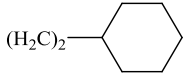
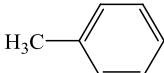
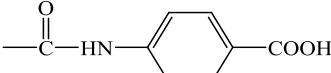
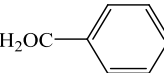
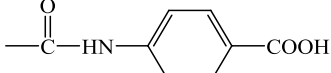
Antioksidativna djelotvornost ovakvih spojeva procijenjena je njihovim inhibicijskim učinkom na lipidnu peroksidaciju membrane eritrocita izazvane vodikovim peroksidom (EMLP) i na različite antioksidativne enzime eritrocita poput superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G6PD). Sinteza spojeva **94a-94d** prikazana je na Shemi 20. 3,4-diaminobenzojeva kiselina **92** u reakciji s odgovarajućom kiselinom (fenil-maslačna kiselina za **94a**, tioglikolna kiselina za **94b**, β-alanin za **94c** i 2-cikloheksilpropionska kiselina za **94d**) u 6N HCl-u<sup>107</sup> nakon 3h zagrijavanja na temperaturi refleksa za **94a**, 6 h za **94b**, 24 h za **94c** i 8 h za **94d** daje željene produkte. Spojevi **96a** i **96b** priređeni su reakcijom 2-benzil-1*H*-benzimidazol-5-karboksilne kiseline (za **96a**) i 2-fenoksimetil-1*H*-benzimidazol-5-karboksilne kiseline (za **96b**) s SOCl<sub>2</sub> te potom reakcijom s *p*-aminobenzojevom kiselinom u DMF-u. Strukture dobivenih produkata potvrđene su <sup>1</sup>H NMR spektroskopijom te masenom spektrometrijom.

Spojevi **94a-94d** imaju –COOH skupinu na C5 položaju aromatskog prstena, dok spojevi **96a** i **96b** imaju karboksamidni supstituent. Nekoliko aromatskih i alifatskih skupina odabrane su kao supstituenti R<sub>1</sub> kako bi se usporedio njihov utjecaj na antioksidativnu učinkovitost (Tablica 4.) te kako bi se proučavao utjecaj strukture na biološku aktivnost (SAR analiza).



**Slika 16.** Struktura različito supstituiranog benzimidazola

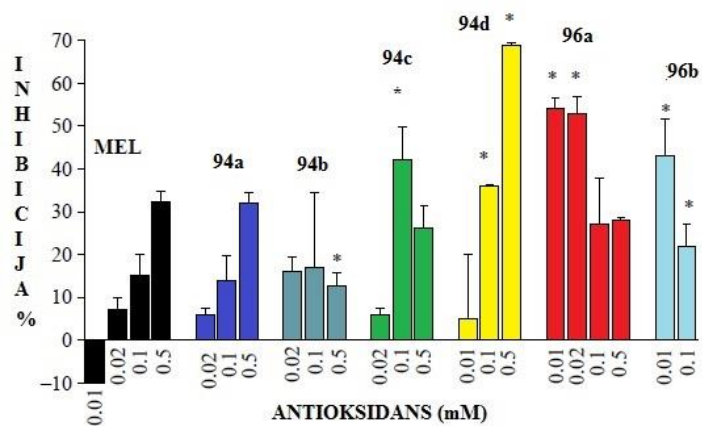
**Tablica 4.** Derivati benzimidazola s odgovarajućim supstituentima i njihova iskorištenja

| Spoj | R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub>   | Iskorištenje % |
|------|---|--|----------------|
| 94a  |  | -COOH  | 20             |
| 94b  | CH <sub>2</sub> SH  | -COOH  | 29             |
| 94c  | (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> - NH <sub>2</sub>                                 | -COOH  | 16             |
| 94d  |  | -COOH  | 20             |
| 96a  |  |  | 43             |
| 96b  |  |  | 14             |

Jednostavan i relevantan test za procjenu antioksidativnog/prooksidativnog potencijala lijekova i/ili kandidata za lijekove je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-izazvana lipidna peroksidacija membrane eritrocita (EMLP).<sup>108</sup> Utvrđeno je da neki derivati benzimidazola imaju bolja antioksidativna svojstva u usporedbi s melatoninom, koji se ovdje koristi kao referentni antioksidans. Spoj **94a** pokazuje antioksidativni učinak vrlo sličan melatoninu.

Spoj **94b**, koji sadrži bočni tiolni lanac, ima manji inhibicijski učinak na EMLP-izazvan vodikovim peroksidom u usporedbi s melatoninom, a učinak se ne mijenja s povećanjem koncentracije spoja. Bočni lanac spoja **94b** (-CH<sub>2</sub>SH) nije toliko velik kao dugački bočni lanac melatonina, pa su tako bočni lanci ovih dvaju spojeva sterički neekvivalentni što rezultira manjom antioksidacijskom aktivnosti spoja **94b** u usporedbi s melatoninom. Općenito je utvrđeno da je -SH skupina ključna za antioksidativnu aktivnost. Antioksidativni učinci spojeva **94c**, **96a** i **96b** također su neovisni o koncentraciji; antioksidativni efekt se smanjuje pri višim koncentracijama.

Spoj **94d** ima najveći inhibički učinak na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-izazvani EMLP pri koncentraciji od 0,5 mM (Slika 17.). Nepolaran bočni lanac u strukturi derivata benzimidazola **94d** omogućava spoju da lako stupi u interakciju s nepolarnim komponentama eritrocitnih membrana poput fosfolipida.



\*p<0,05, u usporedbi sa vrijednostima za odgovarajuće koncentracije melatonina

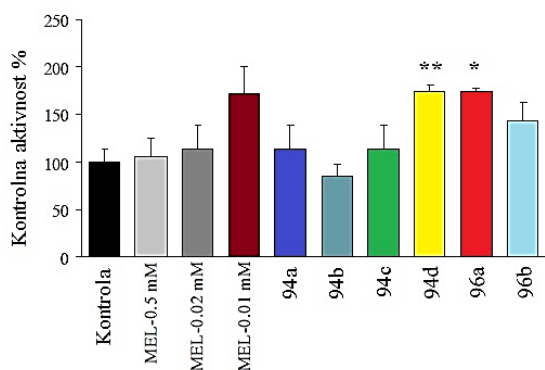
**Slika 17.** Inhibitorni učinak benzimidazola na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-izazvanu peroksidaciju u membranama eritrocita

Osim utjecaja na EMLP, ispitivana je i potencijalna interakcija derivata benzimidazola s antioksidativnim enzimima eritrocita.

U tu svrhu, SOD, CAT i G6PD izabrani su kao važne komponente antioksidativnog obrambenog sustava. SOD katalizira dismutaciju superoksidnog anionskog radikala na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Degradaciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pri nižim, fiziološkim koncentracijama katalizira enzim glutation-peroksidaza, dok pri većim koncentracijama djeluje enzim CAT. Osim toga, peroksidaza i CAT katalitički uklanjaju i lipidne hidroperokside iz stanice smanjujući tako stvaranje OH<sup>•</sup> radikala.

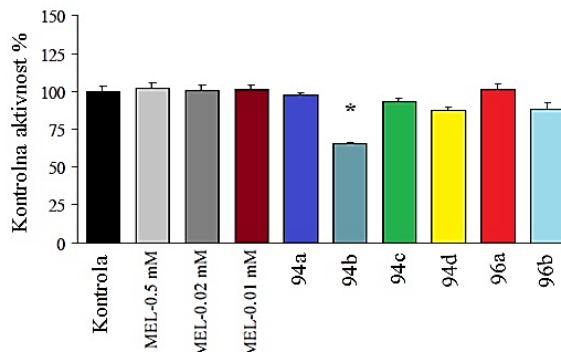
Spojevi **94d** i **96a** aktiviraju SOD u humanim eritrocitima *in vitro* što može poboljšati sposobnost antioksidativne obrane stanica (Slika 18). Jedini spoj koji je uzrokovao inhibiciju enzima CAT *in vitro* je **94b** (Slika 19.). On inhibira CAT usprkos prisutnoj nukleofilnoj tiolnoj skupini koja može uzrokovati smanjenje aktivnosti enzima.





\*p<0,05, u odnosu na kontrolnu vrijednost

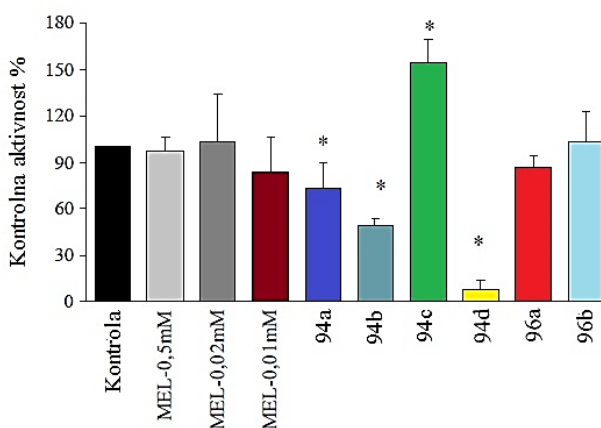
**Slika 18.** *In vitro* učinak melatonina i derivata benzimidazola na aktivnost SOD-a u humanim eritrocitima



\*p<0,05, u odnosu na kontrolnu vrijednost

**Slika 19.** *In vitro* učinak melatonina i derivata benzimidazola na aktivnost CAT u humanim eritrocitima

Iako se G6PD ne navodi kao antioksidativni enzim, neophodan je za obranu od oksidativnog stresa. Rezultati istraživanja pokazali su da spoj **94c** uzrokuje pojačanu aktivaciju G6PD-a, što upućuje na prilagodbu na oksidativni stres tamo gdje je potrebno više NADPH koji se troši tijekom redukcije peroksida i drugih reaktivnih vrsta. S druge strane, spojevi **94a**, **94b** i **94d** inhibiraju aktivnost G6PD-a u eritrocitima *in vitro* što može biti posljedica redoks-osjetljive inaktivacije G6PD-a (Slika 20.).

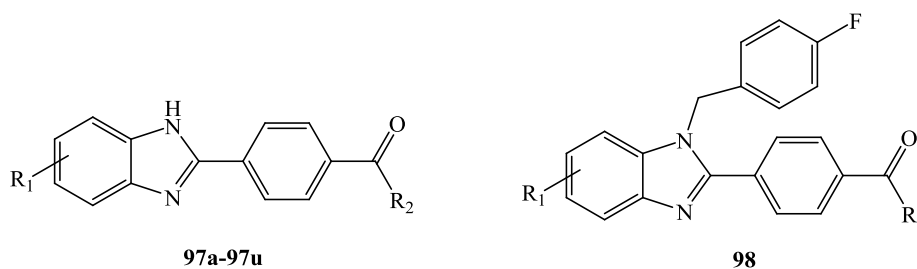


\*p<0,05, u odnosu na kontrolnu vrijednost

**Slika 20.** *In vitro* učinak melatonina i derivata benzimidazola na aktivnost G6PD u humanim eritrocitima

U konačnici, sintetizirani derivati benzimidazola pokazali su vrlo dobru antioksidativnu aktivnost *in vitro* na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-izazvan EMLP-sustav. Provedeno je istraživanje također dalo i informacije o interakciji antioksidativnih enzima sa sintetiziranim spojevima.

Skupina znanstvenika predvođena C. Kušom ispitala je antioksidativna svojstva i sposobnost deaktivacije slobodnih radikala sintetiziranih 2-[4-(supstituiran piperazin-/piperidin-1-ilkarbonil)fenil]-1*H*-benzimidazolnih derivata. Zahvaljujući brojim biološkim učincima benzimidazolnih derivata, znanstvenici su u ovom istraživanju proučavali postoji li povezanost između antimikrobnih i antioksidativnih svojstava. Također, provedena su i ispitivanja antifungalnog djelovanja priređenih spojeva. Sintetiziranim spojevima, 4-(1*H*-benzimidazol-2-il)benzamidima **97a-97u** i 5-klor-1-(*p*-fluorbenzil)-2-{4-[(4-metil-1-piperazin-1-il)karbonil]fenil}-1*H*-benzimidazolu **98**, ranije je potvrđena antimikrobna aktivnost (Slika 21.).<sup>109</sup>



**Slika 21.** Sintetizirani spojevi **97a-97u** i **98**

Inhibicijski učinci spojeva **97a-97u** i **98** na lipidnu peroksidaciju ovisnu o NADPH-u određeni su mjerenjem stvaranja reaktivne supstance 2-tiobarbiturne kiseline (TBARS) upotrebom mikrosoma jetre štakora (Tablica 5.).

Rezultati prethodnih istraživanja pokazali su da spoj **97i** ima najbolje antifungalno djelovanje protiv *Candida albicans*, dok su **97c**, **97d**, **97h**, **97i** i **98** dobri antifungicidi protiv *C. krusei*. Istraživanjem antioksidativnih svojstva spojeva **97b**, **97d**, **97i** i **98** otkriveno je da oni značajno inhibiraju lipidnu peroksidaciju (LP). Spoj **98**, koji jedini ima *p*-fluorbenzilni susptituent i analog je nesuptituiranog **97c**, pokazao je najbolju antifungalnu aktivnost protiv svih vrsta *Candida* te ima najveću vrijednost inhibicije LP-a (83%).

**Tablica 5.** *In vitro* učinci sintetiziranih spojeva na razinu LP-a u jetri<sup>a</sup>

| Spoj <sup>b</sup>     | R <sub>2</sub>                  | R <sub>1</sub>       | LP razina<br>[nmol mg <sup>-1</sup><br>min <sup>-1</sup> ] | % kontrole |
|-----------------------|---------------------------------|----------------------|--|------------|
| 97a                   | <i>N</i> -metilpiperazin        | 5(6)-H               | 12,02 ± 1,32   | 74         |
| 97b                   | <i>N</i> -metilpiperazin        | 5(6)-CH <sub>3</sub> | 13,43 ± 0,72   | 83         |
| 97c                   | <i>N</i> -metilpiperazin        | 5(6)-Cl              | 7,04 ± 0,83  | 43         |
| 97d                   | <i>N</i> -metilpiperazin        | 5(6)-NO <sub>2</sub> | 7,60 ± 0,44  | 47         |
| 97e                   | <i>N</i> -metilpiperazin        | 5,6-diklor           | 12,96 ± 1,65   | 78         |
| 97f                   | <i>p</i> -fluorfenilpiperazin   | 5(6)-H               | 10,71 ± 1,52   | 66         |
| 97g                   | <i>p</i> -fluorfenilpiperazin   | 5(6)-CH <sub>3</sub> | 10,61 ± 1,53   | 65         |
| 97h                   | <i>p</i> -fluorfenilpiperazin   | 5(6)-Cl              | 10,61 ± 1,79   | 65         |
| 97i                   | <i>p</i> -fluorfenilpiperazin   | 5(6)-NO <sub>2</sub> | 7,25 ± 1,79  | 45         |
| 97j                   | <i>p</i> -fluorfenilpiperazin   | 5,6-diklor           | 11,18 ± 0,07   | 69         |
| 97k                   | <i>o</i> -metoksifenilpiperazin | 5(6)-H               | 11,65 ± 0,20   | 72         |
| 97l                   | <i>o</i> -metoksifenilpiperazin | 5(6)-CH <sub>3</sub> | 10,24 ± 0,93   | 63         |
| 97m                   | <i>o</i> -metoksifenilpiperazin | 5(6)-Cl              | 11,46 ± 0,01   | 71         |
| 97n                   | <i>o</i> -metoksifenilpiperazin | 5(6)-NO <sub>2</sub> | 11,45 ± 0,04   | 69         |
| 97o                   | <i>o</i> -metoksifenilpiperazin | 5,6-diklor           | 8,17 ± 0,13  | 50         |
| 97p                   | piperidin                       | 5(6)-H               | 14,28 ± 1,25   | 88         |
| 97r                   | piperidin                       | 5(6)-CH <sub>3</sub> | 17,65 ± 0,40   | 109        |
| 97s                   | piperidin                       | 5(6)-Cl              | 12,87 ± 2,13   | 79         |
| 97t                   | piperidin                       | 5(6)-NO <sub>2</sub> | 10,14 ± 0,47   | 62         |
| 97u                   | piperidin                       | 5,6-diklor           | 17,19 ± 0,21   | 106        |
| 98                    | <i>N</i> -metilpiperazin        | 5-Cl                 | 2,73 ± 0,48  | 17         |
| Kontrola <sup>c</sup> |                                 |                      | 16,25 ± 1,45   | 100        |
| BHT                   |                                 |                      | 5,68 ± 0,22  | 35         |

<sup>a</sup> Svaka vrijednost predstavlja srednju vrijednost ± S.D. 2–4 neovisna eksperimenta. <sup>b</sup> Koncentracija u inkubacijskom mediju (10<sup>-3</sup> M). <sup>c</sup> Samo dimetilsulfoksid, kontrola spojeva i BHT

Gotovo svi 5-nitro-supstituirani spojevi **97d**, **97i** i **97n** pokazali su dobru antimikrobnu aktivnost. Derivati piperidina nisu učinkoviti u djelovanju ni protiv gljivica niti bakterija. Piperidinom supstituirani spojevi **97r** (109%) i **97u** (106%) povećavaju LP, dok drugi produkti, poput **97p** (12%), **97s** (21%) i **97t** (38%), pokazuju slabu inhibiciju LP-a pri koncentraciji od 10<sup>-3</sup> M. Spojevi **97c**, **97d**, **97i** i **97o** pokazuju dobro antifungalno djelovanje i antioksidativne učinke na LP u jetri. Dobivene su vrlo visoke vrijednosti inhibicije LP-a za prethodno navedene spojeve, a kreću se u rasponu od 50 do 57% što je blisko dobivenoj vrijednosti za BHT - 65%.

Prema tome, supstitucijom benzimidazolnog prstena na položaju N1 poboljšava se antimikrobna, antifungalna i antioksidativna učinkovitost takvih spojeva što objašnjava postojeću korelaciju između *N*-supstitucije i biološke aktivnosti. Deaktivacija superoksidnog anionskog radikala priređenim spojevima određena je primjenom sustava ksantin/ksantin-oksida (Tablica 6.).

**Tablica 6.** Učinkovitost spojeva **97a-97u** i **98** na deaktivaciju superoksidnog radikala<sup>a</sup>

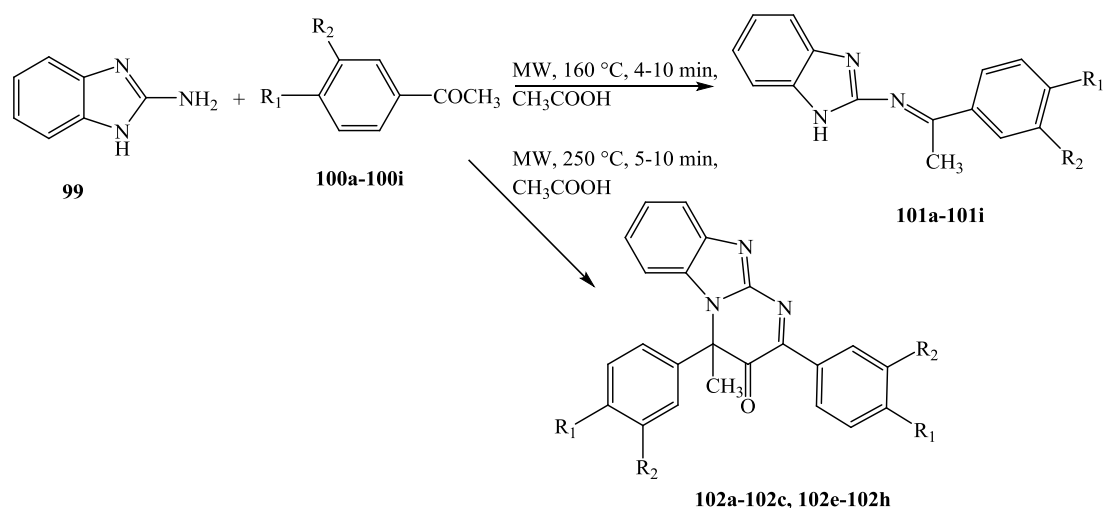
| Spoj      | Deaktivacija superoksidnog anionskog radikala (%) |          |          |          |          | IC <sub>50</sub> [mM] |
|-----------|---|----------|----------|----------|----------|-----------------------|
|           | 0,0625 mM   | 0,125 mM | 0,25 mM  | 0,5 mM   | 1 mM     |                       |
| 97a       | BU  | BU       | BU       | 5 ± 0,3  | 6 ± 0,7  |                       |
| 97b       | BU  | BU       | BU       | BU       | BU       |                       |
| 97c       | BU  | BU       | 8 ± 2,1  | 14 ± 0,7 | 25 ± 1,4 |                       |
| 97d       | 22 ± 2,4  | 32 ± 3,5 | 52 ± 4,2 | 65 ± 4,2 | 88 ± 2,1 | 0,282                 |
| 97e       | 22 ± 2,1  | 48 ± 1,4 | 62 ± 0,7 | 63 ± 2,8 | 93 ± 3,5 | 0,242                 |
| 97f       | BU  | BU       | BU       | BU       | P        |                       |
| 97g       | BU  | BU       | BU       | P        | P        |                       |
| 97h       | BU  | BU       | BU       | BU       | 19 ± 1,4 |                       |
| 97i       | P   | P        | P        | P        | P        |                       |
| 97j       | BU  | BU       | BU       | BU       | BU       |                       |
| 97k       | BU  | BU       | BU       | BU       | BU       |                       |
| 97l       | BU  | BU       | BU       | BU       | P        |                       |
| 97m       | BU  | BU       | BU       | BU       | P        |                       |
| 97n       | BU  | BU       | BU       | BU       | BU       |                       |
| 97o       | BU  | BU       | BU       | BU       | BU       |                       |
| 97p       | BU  | BU       | BU       | BU       | 10 ± 0,7 |                       |
| 97r       | BU  | BU       | BU       | BU       | 11 ± 1,4 |                       |
| 97s       | 29 ± 2,4  | 60 ± 2,8 | 71 ± 1,4 | 69 ± 2,1 | 70 ± 0,7 | 0,176                 |
| 97t       | BU  | BU       | BU       | BU       | BU       |                       |
| 97u       | BU  | BU       | BU       | P        | P        |                       |
| 98        | -   | -        | -        | -        | -        |                       |
| Vitamin E | 33 ± 1,4  | 79 ± 2,1 | 82 ± 3,5 | 85 ± 2,8 | 90 ± 3,5 | 0,126                 |

<sup>a</sup> Svaka vrijednost predstavlja srednju vrijednost ± S.D. 2–4 neovisna eksperimenta. BU- bez učinka, P- pro-oksida

Deaktivacija ovakvog radikala najaktivnijim spojevima **97d**, **97e** i **97s** ovisi o njihovoj koncentraciji. Istraživanjem je dobiveno da navedeni spojevi imaju sličan inhibicijski učinak na formiranje superoksidnog anionskog radikala - 88%, 93%, i 70% pri koncentraciji od 1 mM što je slično vrijednosti dobivenoj za vitamin E (90% pri 1 mM), a koji je korišten kao pozitivna kontrola. Spojevi **97a**, **97c**, **97h**, **97p** i **97r** pokazuju vrlo ograničene inhibicijske učinke na stvaranje superoksidnog aniona - 6 do 25% pri 1 mM.

Nadalje, spojevi **97b**, **97j**, **97k**, **97n**, **97o** i **97t** ne pokazuju nikakve učinke na stvaranje superoksidnog aniona, dok **97f**, **97g**, **97i**, **97l**, **97m** i **97u** djeluju kao pro-oksidansi pri 1mM. Svi ispitani spojevi ne ostvaruju interakcije sa stabilnim DPPH slobodnim radikalom.

U današnje je vrijeme povećan interes za kombiniranjem dviju farmakofornih skupina na istom skeletu koji vodi do stvaranja novih hibridnih molekula. Tako nastali hibridni lijekovi kombiniraju dvije biološki aktivne komponente u jednu molekulu s ciljem stvaranja novog kemijskog entiteta povećane biološke aktivnosti u odnosu na njihove pojedinačne komponente.<sup>110,111</sup> Prema tome, pirimido[1,2-*a*]benzimidazoli, koji sadrže dvije biološki aktivne heterociklične jezgre, od velikog su farmakološkog značaja budući da njihovi derivati posjeduju različite biološke aktivnosti.<sup>112-114</sup> U posljednje se vrijeme znatna pozornost posvećuje njihovim sintezama i ispitivanju biološke aktivnosti.<sup>115,116</sup> Uzimajući u obzir biološku aktivnost derivata benzimidazola i pirimido-benzimidazola prema prethodno navedenim konstatacijama, C. G. Neochoritis i suradnici proveli su "one-pot" sintezu novih Schiff-ovih baza benzimidazola **101a-101i** i 3-oksopirimido[1,2-*a*]benzimidazola **102a-102c** i **102e-102h** iz 2-aminobenzimidazola **99** (Shema 21.). Provedena su i preliminarna ispitivanja produkata kao inhibitora lipoksigenaze (LOX) i lipidne peroksidacije (LP) potkrijepljena procjenom citotoksičnosti na fibroblaste ljudskih pluća.



**Shema 21.** "One-pot" sinteze spojeva **101a-101i**, **102a-102c** i **102e-102h**

Sve su reakcije provedene u ekološki prihvatljivim uvjetima ("zelena kemija") primjenom mikrovalnog zračenja bez otapala. Sinteze su provedene reakcijom 2-aminobenzimidazola **99** s derivatom acetofenona **100** u prisutnosti octene kiseline i potpomognute su mikrovalnim zračenjem. Pri temperaturi od 160°C dobivene su samo Schiffove baze **101a-101h**, osim 1-naftilnog derivata **101i** koji je nastao pri temperaturi 250 °C.

Povećanjem temperature na 250 °C sintetizirani su pirimido derivati **100a-100f** (Tablica 7.). Također, pri 250 °C djelomično su sintetizirani 4-metoksi-supstituirani spoj **102d** i naftilni derivat **102i**. Razlog nepotpunog stvaranja **102d** je smanjena nukleofilnost NH skupine što čini napad na slabo elektrofilan 4-metoksiacetofenonski karbonilni ugljik zabranjenim, pa uvijek nastaje samo Schiff-ova baza **101d**. Nenastajanje **102i** može se pripisati stereokemijskim razlozima. Dobiveni su produkti pročišćeni kolonskom kromatografijom, a njihove su strukture potvrđene IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektroskopijom (1D i 2D) te masenom spektrometrijom.

**Tablica 7.** Prikaz supstituenata, optimiziranih reakcijskih uvjeta i vrijednosti iskorištenja spojeva

| Spoj        | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>   | Vrijeme (min) | Temp (°C) | Produkti    | Iskorištenje (%) |
|-------------|------------------|------------------|---------------|-----------|-------------|------------------|
| <b>100a</b> | H                | H                | 5             | 160       | <b>101a</b> | 92               |
| <b>100b</b> | CH <sub>3</sub>  | H                | 4             | 160       | <b>101b</b> | 91               |
| <b>100c</b> | H                | CH <sub>3</sub>  | 4             | 160       | <b>101c</b> | 90               |
| <b>100d</b> | OCH <sub>3</sub> | H                | 10            | 160       | <b>101d</b> | 89               |
| <b>100e</b> | H                | OCH <sub>3</sub> | 4             | 160       | <b>101e</b> | 90               |
| <b>100f</b> | Cl               | H                | 5             | 160       | <b>101f</b> | 93               |
| <b>100g</b> | Br               | H                | 4             | 160       | <b>101g</b> | 85               |
| <b>100h</b> | H                | Br               | 4             | 160       | <b>101h</b> | 89               |
| <b>100i</b> | 1-naftil         | 1-naftil         | 10            | 250       | <b>101i</b> | 92               |
| <b>100a</b> | H                | H                | 5             | 250       | <b>102a</b> | 81               |
| <b>100b</b> | CH <sub>3</sub>  | H                | 7             | 250       | <b>102b</b> | 72               |
| <b>100c</b> | H                | CH <sub>3</sub>  | 10            | 250       | <b>102c</b> | 86               |
| <b>100e</b> | H                | OCH <sub>3</sub> | 10            | 250       | <b>102e</b> | 70               |
| <b>100f</b> | Cl               | H                | 5             | 250       | <b>102f</b> | 92               |
| <b>100g</b> | Br               | H                | 5             | 200       | <b>102g</b> | 93               |
| <b>100h</b> | H                | Br               | 5             | 200       | <b>102h</b> | 88               |

Dobivenim su spojevima **101a-101i** i **102a-102c** i **102e-102h** ispitana antioksidativna svojstva i sposobnost inhibicije lipoksigenaze (LOX-a) *in vitro*. U tu svrhu, primijenjene su dvije različite metode za određivanje antioksidativne aktivnosti ovih spojeva:

a) interakcija s već ranije spomenutim, stabilnim DPPH slobodnim radikalom i b) interakcija s vodotopivim azo spojem 2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihidrokloridom (AAPH). Azo spojevi stvaraju slobodne radikale spontanom termičkom degradacijom, pa su korisni za nastajanje slobodnih radikala *in vitro*.<sup>117</sup>

AAPH se koristi kao čisti i kontrolirani izvor termički proizvedenih alkilperoksilnih slobodnih radikala. Dobiveni su rezultati uspoređeni s poznatim antioksidansima, nordihidroguairetnom kiselinom (NDGA), butiliranim hidroksilnim toluenom (BHT) i 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilnom kiselinom (troloks). Interakcija ispitivanih spojeva sa stabilnim DPPH slobodnim radikalnom ukazuje na njihovu sposobnost deaktivacije radikala i doniranja elektrona u sustav bez željeza. Rezultati istraživanja pokazali su da svi spojevi **101** i **102** pokazuju slabu interakciju sa DPPH-om pri koncentraciji 0,05 mM u odnosu na BHT i NDGA (Tablica 8.).

**Tablica 8.** Interakcija s DPPH-om (%); *In vitro* inhibicija LP-a (AAPH, %); *In vitro* inhibicija lipoksigenaze (LOX, %)

| Spoj    | DPPH % 0.05 mM |        | AAPH % inhibicija |        | LOX % inhibicija |        |
|---------|----------------|--------|-------------------|--------|------------------|--------|
|         | 20 min         | 60 min | 0,01 mM           | 0,1 mM | 0,01 mM          | 0,1 mM |
| 101a    | 0,3            | 5      | 18                | 67     | BA <sup>a</sup>  | BA     |
| 101b    | BA             | 8      | 47                | 84     | BA               | BA     |
| 101c    | BA             | BA     | 63                | 77     | BA               | 8      |
| 101d    | 4              | 3      | 12                | 68     | 22               | 65     |
| 101e    | BA             | BA     | 69                | 100    | BA               | 42     |
| 101f    | 3              | 4      | nt                | 26     | 62               | 85     |
| 101g    | BA             | 4      | 22                | 50     | BA               | 18     |
| 101h    | BA             | 6      | 65                | 97     | BA               | BA     |
| 101i    | 5              | 7      | 26                | 97     | 18               | 98     |
| 102a    | 2              | 1      | 11                | 100    | 49               | 100    |
| 102b    | BA             | BA     | 8                 | 80     | BA               | 40     |
| 102c    | 4              | 5      | 35                | 84     | BA               | 19     |
| 102e    | 3              | 2      | 3                 | 100    | BA               | BA     |
| 102f    | 2              | 2      | 33                | 97     | BA               | BA     |
| 102g    | 3              | 2      | 9                 | 78     | 51               | 61     |
| 102h    | BA             | 3      | 51                | 88     | BA               | 12     |
| NDGA    | 81             | 83     |                   |        | 40               | 84     |
| BHT     | 31             | 60     |                   |        |                  |        |
| Troloks |                |        |                   | 63     |                  |        |

<sup>a</sup> Bez detektirane aktivnosti (BA) pod primijenjenim eksperimentalnim uvjetima. Svaki *in vitro* eksperiment 3 puta ponovljen.

Razlog tomu je manjak oksidiranih komponenta poput onih u BHT-u. Očito je odsustvo vodikovih atoma u fenolnim hidroksilnim skupinama koji bi se mogli donirati za stabiliziranje DPPH radikala.

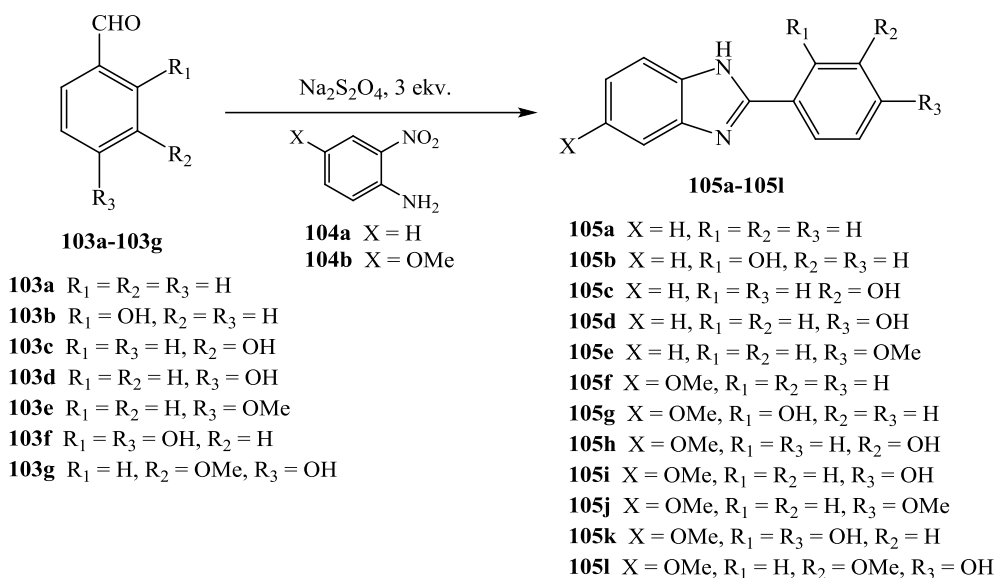
Većina ispitivanih spojeva **101** i **102** učinkovito inhibiraju AAPH-izazvanu lipidnu peroksidaciju (LP) i imaju veću aktivnost u odnosu na referentni spoj troloks. Inhibicijska aktivnost derivata ovisna je o koncentraciji. U seriji testiranih Schiff-ovih baza najbolju inhibiciju LP-a pokazuju **101e**, **101h** i **101i**, dok nisku aktivnost pokazuje **101f**. Za pirimido-benzimidazolne derivate **102** pri koncentraciji od 0,1 mM, najbolju inhibiciju LP-a pokazuju **102a** (100%), **102e** (100%) i **102f** (97%) (Tablica 8.).

Lipoksigenaze (LOX) imaju važnu ulogu u membranskoj lipidnoj peroksidaciji stvaranjem hidroperoksida u lipidnom dvosloju.<sup>118,119</sup> Inhibitori LOX-a dobri su agensi za liječenje upalnih i alergijskih bolesti te za liječenje određenih vrsta raka i kardiovaskularnih bolesti.<sup>120,121</sup> Većina LOX inhibitora su antioksidansi ili "čistači" slobodnih radikala.<sup>122</sup> Prema dobivenim rezultatima, najbolji inhibitor LOX-a među Schiff-ovim bazama je naftil-supstituiran spoj **101i**, zatim **101f** i **101d**, dok su spojevi **102a** i **102g** najaktivniji među 3-oksopirimido[1,2-*a*]benzimidazolnom skupinom spojeva (Tablica 8.). Među izomerima **102g** i **102h**, *p*-analog pokazuje veću inhibiciju LOX-a. Spojevi **101i** i **102a** mogu se upotrijebiti kao osnovne molekule za dizajniranje novih spojeva s izvrsnim inhibicijskim djelovanjem protiv LOX-a i LP-a.

Citotoksičnost Schiffovih baza **101d**, **101g** i **101i**, kao i pirimido-benzimidazola **102c**, **102e** i **102f** određena je primjenom MTT testa na fibroplaste ljudskih pluća. Na temelju ispitivanja održivosti stanica, Schiff-ove baze, **101i** i **101g**, potencijalni su kandidati za medicinsku upotrebu s obzirom na njihovu inhibicijsku djelotvornost protiv LOX-a ili AAPH-a. Spoj **101d** pokazao se citotoksičnim i ne preporučuje se za primjenu u medicinske svrhe. S druge strane, pirimido-benzimidazolni spoj **102e** potencijalni je kandidat za medicinsku upotrebu, dok se **102c** i **102f** mogu upotrijebiti kao inhibitori pri nižim koncentracijama od spoja **102e**.

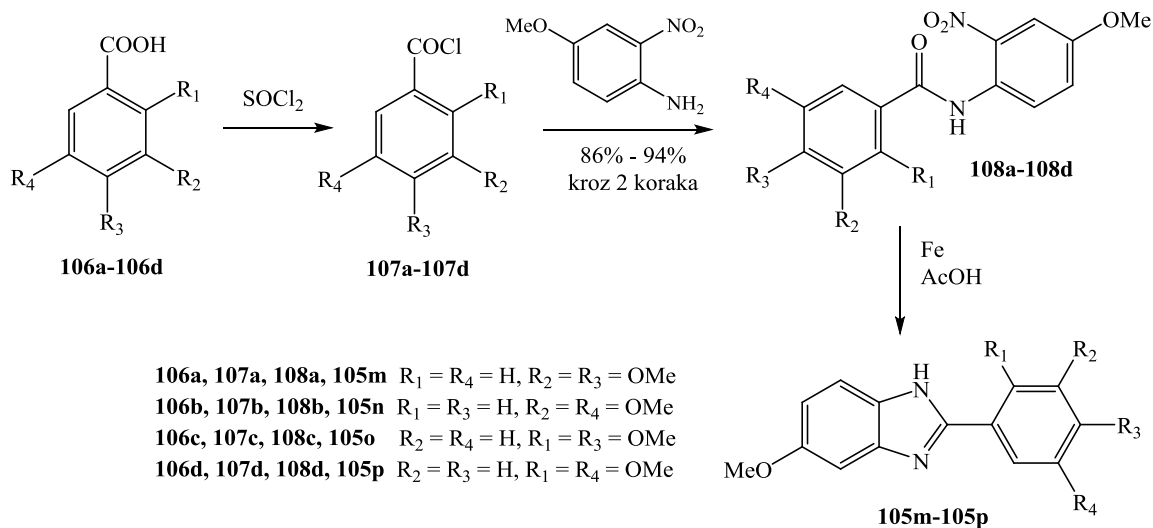
Potaknut nizom dobrih bioloških aktivnosti različito supstituiranih benzimidazola, B. Zhou istraživao je sa svojim timom znanstvenika sintezu, antioksidativnu te antimikrobnu aktivnost novopriređenih derivata 2-arilbenzimidazola. Supstituirani 2-arilbenzimidazoli **105a-105l** (Shema 22.) sintetizirani su iz različito supstituiranih benzaldehida i *o*-nitroanilina (ili 4-metoksi-2-nitroanilina) u prisutnosti Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Yangovom metodom.<sup>123</sup>





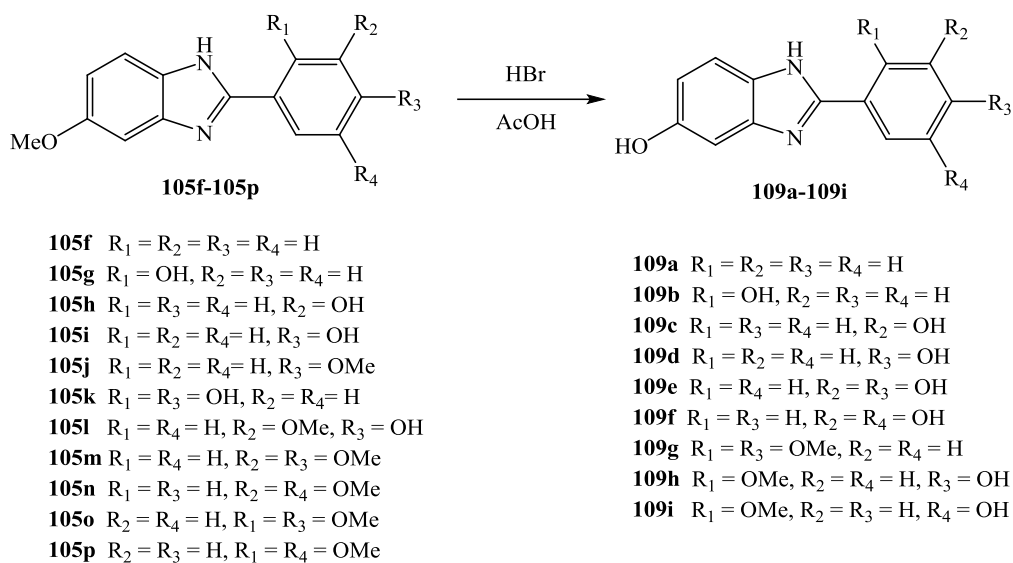
**Shema 22.** Sinteza spojeva **105a-105i**

Nadalje, na Shemi 23. prikazana je sinteza supstituiranih benzoil-klorida iz odgovarajućih kiselina, a zatim su uz pomoć 4-metoksi-2-nitroanilina dobiveni određeni *N*-(4-metoksi-2-nitrofenil)benzamidi **108a-108d**. Redukcijom benzamida sa željeznim prahom i potom ciklizacijom sintetizirani su 2-arilbenzimidazoli **105m-105p**.



**Shema 23.** Sinteza spojeva **105m-105p**

Naposljetku su demetiliranjem spojeva **105f-105p**, u prisustvu bromovodične kiseline, pripremljeni 5-hidroksi-2-fenilbenzimidazoli **109a-109i** (Shema 24.).



**Shema 24.** Sinteza spojeva **109a-109i**

Priređenim spojevima **105a-105p** i **109a-109i** najprije su ispitana antioksidativna svojstva; mogućnost deaktiviranja hidroksidnog radikala, superoksidnog anion radikala i DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala te sposobnost redukcije. *In vitro* ispitivanja su provedena pri različitim koncentracijama u odnosu na TBHQ.

Najveću deaktivacijsku aktivnost na radikal OH· pokazali su spojevi **105g**, **109b**, **109d**, **109e**, i **109h**, pri čemu je spoj **109h** (EC<sub>50</sub> = 46 ± 4 μM) pokazao aktivnost veću od TBHQ (EC<sub>50</sub> = 65 ± 2 μM). Ostali su spojevi pokazali slabu aktivnost (EC<sub>50</sub> > 200 μM). Najveću sposobnost deaktivacije radikala O<sub>2</sub><sup>·-</sup> imali su spojevi **105b**, **105g**, **105k** i **109b** (EC<sub>50</sub> = 122 ± 17, 87 ± 13, 189 ± 15, i 169 ± 11 μM i to veću od standarda TBHQ (EC<sub>50</sub> > 200 μM), što je ukazalo na činjenicu da *o*-hidroksifenilna grupa na položaju 2 benzimidazolnog prstena ima najveći utjecaj na sposobnost deaktivacije O<sub>2</sub><sup>·-</sup>. DPPH metoda jest brza i pouzdana metoda određivanja sposobnosti deaktivacije slobodnih radikala. Obećavajuću aktivnost pokazali su derivati **109a-109i**, što upućuje na to da je antioksidativna aktivnost ovisna o hidroksilnoj skupini u položaju 5 benzimidazolnog prstena pa je i tim spojevima određena redukcijaska sposobnost FRAP metodom koja se bazira na svojstvu komponente da reducira feritni tripiridilni triazinski kompleks (TPTZ) u Fe<sup>2+</sup>. Svi spojevi osim spoja **109h** imali su slična ili bolja redukcijaska svojstva u odnosu na TBHQ.

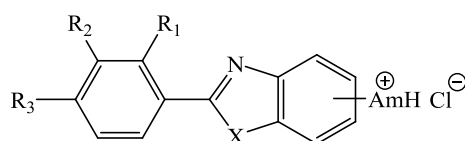
Zbog najbolje deaktivacije OH<sup>·</sup>, spoj **109h** korišten je za smanjenje oksidativnog stresa prethodno induciranog u stanicama A549 te su rezultati pokazali da pokazuje dobru antioksidativnu aktivnost u staničnom sustavu. Nadalje su spojevi **105a-105p** i **109a-109i** testirani *in vitro* na antimikrobnu aktivnost na gram-negativne (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) i gram-pozitivne (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus albus*) bakterije. Kao standard za usporedbu korišten je antibiotik ciprofloksacin. Prema *E. coli* bakteriji spojevi su pokazali umjerenu do dobru aktivnost, dok na *P. aeruginosa* nisu pokazali značajnu aktivnost. Što se tiče gram-pozitivnih bakterija, na *S. aureus* su najbolju aktivnost pokazali spojevi **109a-109d**, što pokazuje da hidroksilna skupina u položaju 5 benzimidazolnog prstena vjerojatno pozitivno utječe na antimikrobnu aktivnost. Zanimljivo je da su spojevi **105h**, **105m**, **109b**, **109c** i **109f** pokazali selektivnost i maksimalnu aktivnost na *B. cereus*, dok na *S. albus* nijedan spoj nije pokazao značajnu aktivnost. Na kraju je ispitana i citotoksičnost spojevana stanice miša (NIH/3T3) te nijedna od sintetiziranih derivata nije pokazao toksičnost nakon 48 h pri koncentraciji od 200 μM, stoga je utvrđeno da bi molekule mogle u budućnosti poslužiti kao glavni predvodni spojevi za razvoj novih antioksidansa i/ili antimikrobnih agensa.

L. Racané i suradnici sintetizirali su i istraživali antioksidativna svojstva novih amidino supstituiranih derivata benzimidazola i benzotiazola. Do sada su od svih benzazolnih amidino supstituiranih derivata oni s cikličkim amidinskim supstituentom (2-imidazolilna skupina) pokazali najznačajniju antiproliferativnu aktivnost *in vitro* s IC<sub>50</sub> vrijednostima u submikromolarnom području inhibitornih koncentracija.<sup>124</sup> S druge strane, aciklički benzimidazoli i benzotiazoli pokazali su da se selektivno vežu u mali utor DNA (eng. *DNA groove binders*).

Reakcijom kondenzacije iz odgovarajućih aldehida i amidino supstituiranih 2-aminotiofenola u ledenoj octenoj kiselini te zatim dodatkom klorovodične kiseline priređeni su ciljani kationski 6-amidino-2-arilbenzotiazolni spojevi **110a-110h** koji su izolirani kao hidrokloridne soli. Amidino i 2-imidazolnil supstituirani benzimidazolni derivati **111a-111h** dobiveni su iz prethodno pripremljenih 4-amidino/4-(2-imidazolnil)-1,2-fenilenediamin hidroklorida i odgovarajućih benzaldehida u apsolutnom etanolu te uz oksidacijski agens *p*-benzokinon. Spojevi su također dobiveni u obliku hidrokloridnih soli. Strukture svih dobivenih derivata potvrđene su <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektroskopijom i masenom spektrometrijom.

Potom je određena antioksidativna aktivnost priređenih spojeva pri čemu su korištene DPPH metoda, ABTS metoda kojom se mjeri sposobnost deaktivacije radikala uz pomoć radikal kationa 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sumporne kiseline (ABTS) te FRAP metoda. Procjena je napravljena *in vitro* spektrometrijskim metodama.<sup>125</sup> Kao standard za usporedbu korišten je 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol (BTH). Strukture spojeva i dobiveni rezultati za DPPH i ABTS metodu prikazani su u Tablici 9.

**Tablica 9.** IC<sub>50</sub> vrijednosti sintetiziranih 2-arilbenzimidazola i benzotiazola za DPPH i ABTS metodu\*



| Spoj | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>   | X  | Am              | DPPH IC <sub>50</sub> μM | ABTS IC <sub>50</sub> μM    |
|------|----------------|----------------|------------------|----|-----------------|--------------------------|-----------------------------|
| 110a | OH             | H              | H                | S  | ne supstituiran | >100                     | >100                        |
| 110b | OH             | H              | OH               | S  | ne supstituiran | >100                     | 13,34 ± 0,8 <sup>(b)</sup>  |
| 110c | OH             | H              | OCH <sub>3</sub> | S  | ne supstituiran | nema aktivnosti          | >100                        |
| 110d | OH             | OH             | OH               | S  | ne supstituiran | 23,89 ± 4,7              | 7,64 ± 1,5 <sup>(b)</sup>   |
| 110e | OH             | H              | H                | S  | 2-imidazolinil  | nema aktivnosti          | >100                        |
| 110f | OH             | H              | OH               | S  | 2-imidazolinil  | >100                     | 9,83 ± 0,9 <sup>(b)</sup>   |
| 110g | OH             | H              | OCH <sub>3</sub> | S  | 2-imidazolinil  | nema aktivnosti          | >100                        |
| 110h | OH             | OH             | OH               | S  | 2-imidazolinil  | 34,76 ± 7,0              | 9,33 ± 0,7 <sup>(b)</sup>   |
| 111a | OH             | H              | H                | NH | ne supstituiran | nema aktivnosti          | Ne                          |
| 111b | OH             | H              | OH               | NH | ne supstituiran | >100                     | 10,74 ± 0,5 <sup>(b)</sup>  |
| 111c | OH             | H              | OCH <sub>3</sub> | NH | ne supstituiran | >100                     | 53,59 ± 11,4 <sup>(b)</sup> |
| 111d | OH             | OH             | OH               | NH | ne supstituiran | 23,57 ± 2,7              | 6,84 ± 2,4 <sup>(b)</sup>   |
| 111e | OH             | H              | H                | NH | 2-imidazolinil  | >100                     | >100                        |
| 111f | OH             | H              | OH               | NH | 2-imidazolinil  | nema aktivnosti          | 6,21 ± 0,4 <sup>(b)</sup>   |
| 111g | OH             | H              | OCH <sub>3</sub> | NH | 2-imidazolinil  | >100                     | 35,69 ± 1,3 <sup>(b)</sup>  |
| 111h | OH             | OH             | OH               | NH | 2-imidazolinil  | 92,92 ± 7,4              | 32,04 ± 3,7 <sup>(a)</sup>  |
| BTH  | OH             |                |                  |    | H               | 25,00 ± 4,2              | 28,00 ± 2,3 <sup>(a)</sup>  |

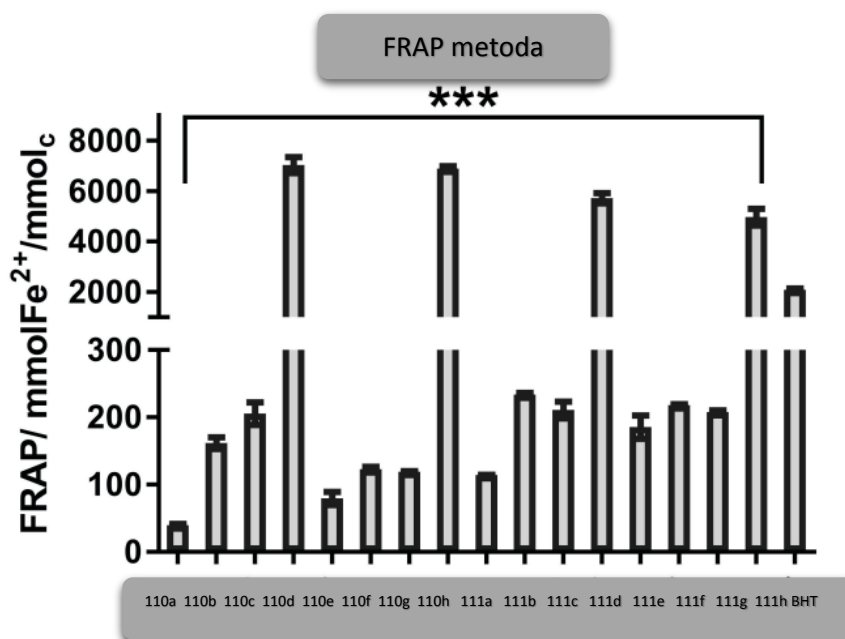
\* vrijednosti su izražene kao ± standardna devijacija

<sup>a,b</sup> vrijednosti s različitim eksponentom u istom stupcu su značajno različite (P < 0,05) na t-testu (spoj u odnosu na BHT)

Derivati benzotiazola **110d** i **110h** i derivati benzimidazola **111d** i **111h** pokazali su dobru sposobnost deaktivacije DPPH, što je pokazalo da se povećanjem hidroksilnih skupina na fenilnom prstenu poboljšava sposobnost deaktivacije DPPH radikala. Također spojevi **110d** i **111d** koji imaju nesupstituiranu amidinsku skupinu pokazali su izraženiju aktivnost u odnosu na spojeve **110h** i **111h** s 2-imidazolinilnom skupinom.

Sposobnost čistog spoja da smanji obojenje reagirajući direktno s  $ABTS^{++}$  je mjera njihovog antioksidativnog kapaciteta. Uz to,  $ABTS^{++}$  radikali su puno stabilniji od DPPH radikala te bi se mogli koristiti za procjenu hidrofilnih i lipofilnih spojeva.<sup>126</sup> I kod ove je metode različit broj hidroksilnih skupina vezanih na fenilni presten jako utjecao na antioksidativnu aktivnost pa su tako najaktivniji bili derivati s tri hidroksilne skupine **110d**, **110h**, **111d** i **111h**. Derivati **110b**, **110f**, **111b** i **111f** s dvije hidroksilne skupine također su pokazali dobru aktivnost u odnosu na BHT, što je vidljivo iz rezultata prikazanih u Tablici 9.

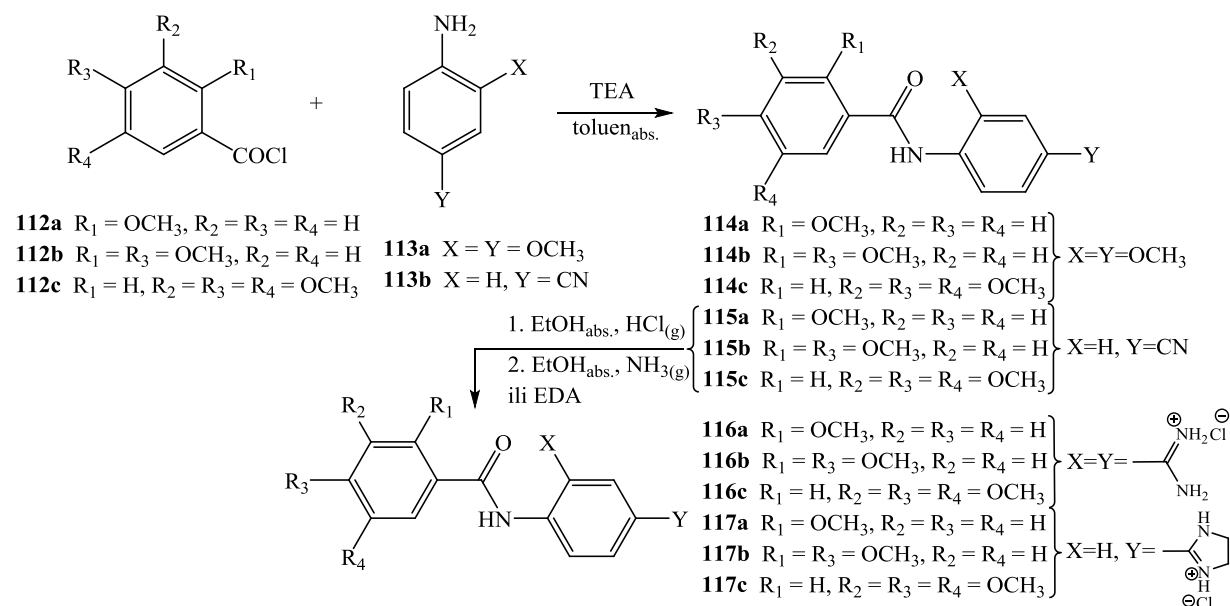
Naposljetku je određena redukcijska sposobnost FRAP metodom, praćenjem promjene u apsorbanciji pri 593 nm. Značajnu su aktivnost pokazali samo spojevi **110d**, **110h**, **111d** i **111h** stoga je opet glavni utjecaj imao broj hidroksilnih skupina (Slika 22.). Redukcijska sposobnost navedenih komponenta bila je veća od referentne komponente (BHT), a iznosila je:  $7032,8 \pm 310,8$ ,  $6884,7 \pm 109,5$ ,  $5719,9 \pm 202,7$  i  $4969,0 \pm 336,4$  mmol  $Fe^{2+}$ /mmol.



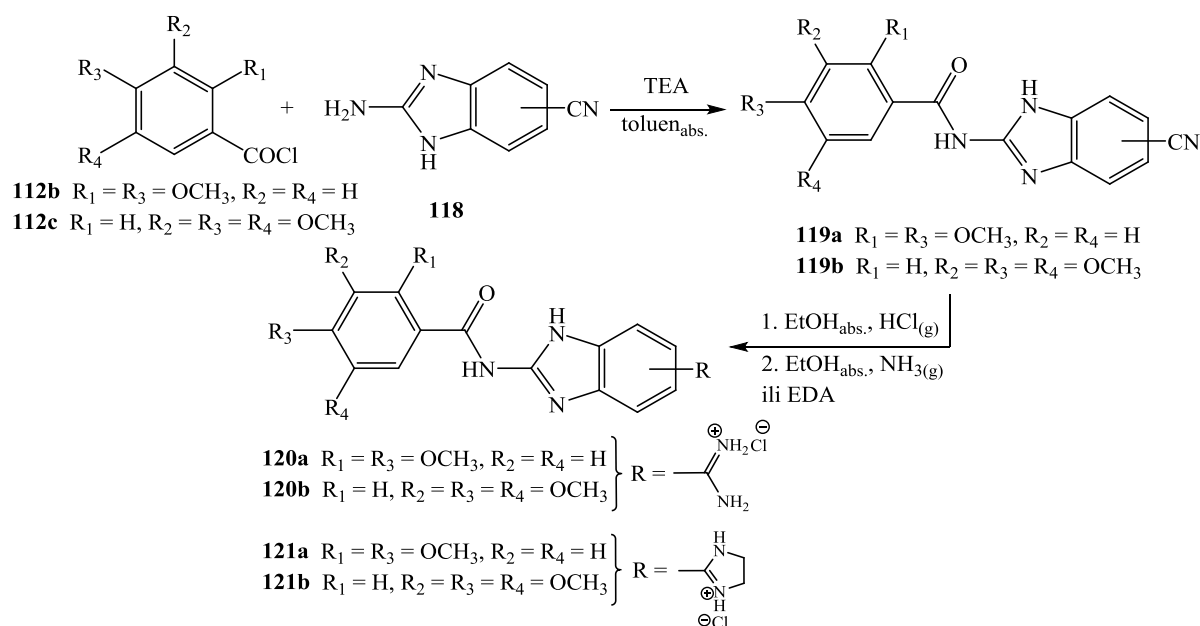
**Slika 22.** Svojstvo redukcije testiranih spojeva **110a-110h** i **111a-111h** FRAP metodom ( $P < 0,01$  za sve komponente u odnosu na BHT)

Naša istraživačka skupina predvođena M. Cindrić te u suradnji s drugim znanstvenicima sintetizirala je i ispitala antioksidativnu i antiproliferativnu aktivnost novih metoksi i amidino supstituiranih benzamida i benzimidazola, potaknuti obećavajućim rezultatima sličnih derivata.

Kondenzacijom benzoil-klorida **112a-112c** i odgovarajućih 4-supstituiranih anilina **113a-113b** u apsolutnom toluenu uz trietilamin, priređeni su monometoksi, dimetoksi i trimetoksi supstituirani benzamidi **114-115** (Shema 25.) te 2-benzimidazolil supstituirani benzamidi **119a-119b** (Shema 26.). Osim toga, cijano supstituirani benzamidi dalje su prevedeni Pinnerovom reakcijom u amidino (**116, 120**) i 2-imidazolinil (**117, 121**) supstituirane benzamide.<sup>127</sup> Svi amidino supstituirani derivati pripremljeni su u obliku hidrokloridnih soli, radi postizanja bolje topljivosti.

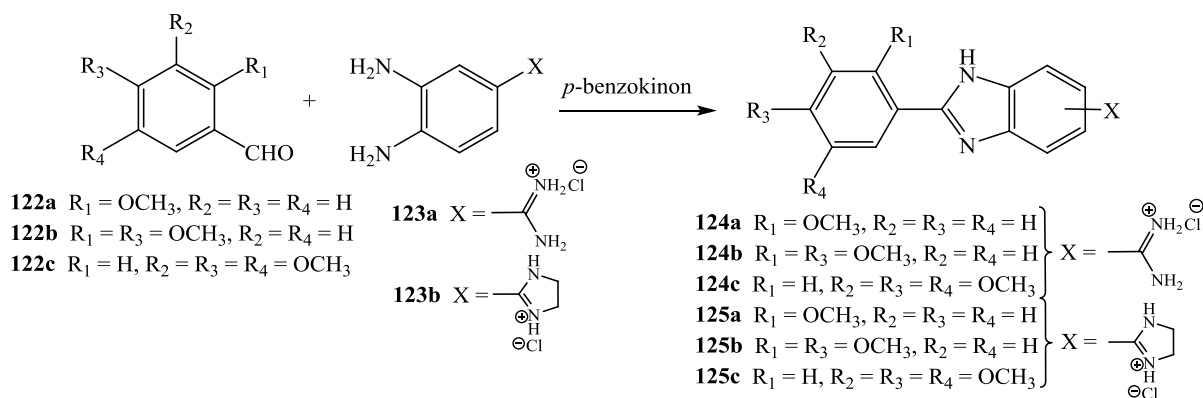


**Shema 25. Sinteza spojeva 114-117**



**Shema 26. Sinteza spojeva 119-121**

Na Shemi 27. prikazana je sinteza amidino **124a-124c** i 2-imidazolinil **125a-125c** supstituiranih benzimidazola dobivenih kondenzacijom odgovarajućih benzaldehida **122a-122c** i 4-amidino/4-(2-imidazolinil)-1,2-fenilendiamin hidroklorida **123a-123b**, uz *p*-benzokinon kao oksidacijski reagens te apsolutni etanol kao otapalo.<sup>128,129</sup> Strukture svih spojeva potvrđene su <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektroskopijom.

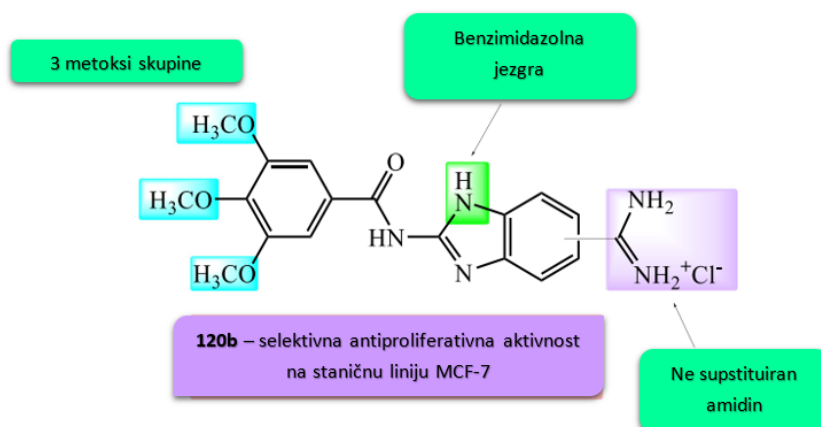


**Shema 27.** Sinteza spojeva **124-125**

Nakon sinteze, određena je antioksidativna aktivnost dobivenih spojeva *in vitro* spektrometrijskim metodama. DPPH metoda pokazala je da su najaktivniji 2-supstituirani benzimidazoli **124-125**, dok su benzamidni derivati **114-117** i **120-121** pokazali malu ili nikakvu aktivnost. Iz odnosa strukture i aktivnosti (SAR) može se zaključiti da je umetanje amidne veze između dva aromatska prstena inhibiralo sposobnost deaktivacije radikala, a različit broj metoksi grupa na fenilnoj jezgri također je utjecao na antioksidativnu aktivnost pa je tako najaktivniji bio spoj **125c** s tri metoksi skupine. Kao standard za usporedbu korištena je L-askorbinska kiselina. Provedena je i procjena redukcijske sposobnosti spojeva FRAP metodom u odnosu na BHT. Najbolje su rezultate pokazali spojevi s dvije i tri metoksi skupine, uz iznimku spoja **114a** s jednom metoksi skupinom. Zaključno, najbolju antioksidativnu aktivnost u obje metode pokazali su spojevi s imidazolinilnom amidinskom skupinom na položaju 5 benzimidazolnog prstena vezanog direktno na fenilnu jezgru.

Uz antioksidativnu aktivnost, priređeni su spojeve testirani i na antiproliferativnu aktivnost na tri vrste tumorskih staničnih linija: HCT 116 (rak debelog crijeva), H 460 (rak pluća) i MCF-7 (rak dojke). Za usporedbu korišten je antitumorski lijek etoposid. Spojevi **116a-116c** pokazali su selektivnu aktivnost na staničnu liniju MFC-7, pri čemu je aktivnost bila bolja povećanjem broja metoksi skupina. Općenito aktivnost je bila bolja kod spojeva s 2-imidazolinilnim supstituentom **117a-117c** te oni nisu bili selektivni.

Zamjenom fenilnog prstena s benzimidazolnom jezgrom vezanom na benzamidnu jedinicu značajno je povećana aktivnost na MCF-7 stanice te je tako najbolju antiproliferativnu aktivnost pokazao spoj **120b** ( $IC_{50} = 9 \pm 7 \mu M$ ) čija je struktura prikazana na Slici 23. Također, SAR je pokazao da se isključenjem amidne veze u strukturi spojeva **124-125** antiproliferativna aktivnost smanjuje.



**Slika 23.** SAR antiproliferativne aktivnosti

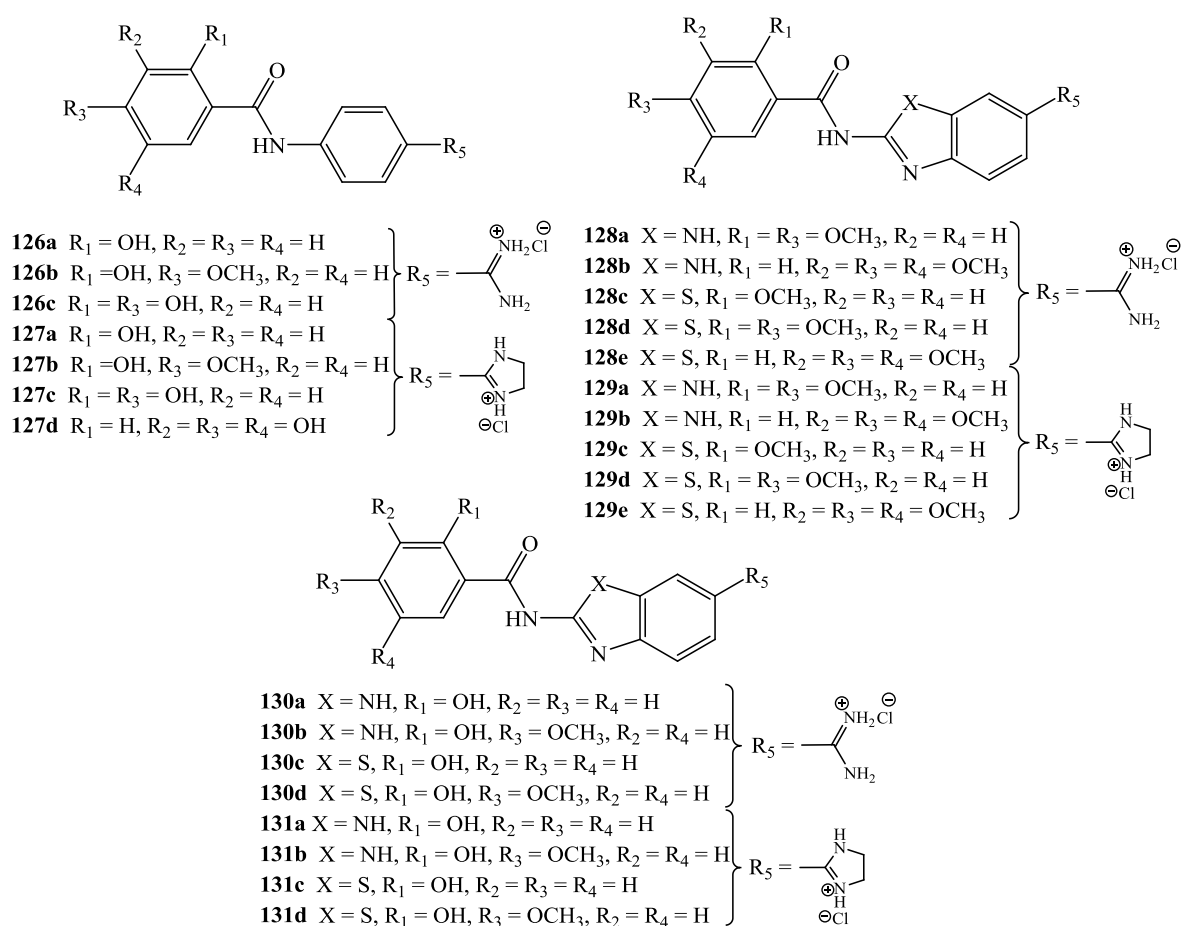
Poznato je da je lipofilnost nužna za prolazak spoja kroz staničnu membranu, a može se iskazati particijskim koeficijentom  $\log P$  koji predstavlja omjer 1-oktanola i vode. Za priređene spojeve izračunate su vrijednosti  $\text{clog}P$  vrijednosti te je na temelju rezultata zaključeno da je vrijednost ovisna o broju metoksi skupina tako da se ona smanjuje povećanjem broja skupina. Veće  $\text{clog}P$  vrijednosti imaju spojevi s 2-imidazolinilnim supstituentom (1,87-2,39) u usporedbi sa spojevima s amidinskom skupinom (1,36-1,88), što znači da su više lipofilni. Uklanjanjem amidne veze iz strukture  $\text{clog}P$  vrijednost se isto je povećala. Iznimka je spoj **120b** koji je pokazao najbolju antiproliferativnu aktivnost bez obzira na malu vrijednost  $\text{clog}P$ .

Iz rezultata je vidljivo da su manje citotoksični spojevi oni koji su pokazali najveću antioksidativnu aktivnost te oni ne inhibiraju proliferaciju staničnih linija raka. Poznato je da su ROS usko povezani s promicanjem nastanka i širenje tumora te bi se terapijski antioksidansi mogli koristiti za prevenciju nastanka raka.

U našoj je istraživačkoj skupini, predvođenoj I. Savić, nadalje dizajnirano i sintetizirano 25 novih amidino supstituiranih benzamida koji se razlikuju u heteroaromatskoj jezgri vezanoj na benzamidnu jedinicu te imaju različit broj metoksi i hidroksi skupina.



Spojevi su supstituirani s amidinskim ili 2-imidazolinilnim skupinama, a priređeni su kiselim Pinnerovom reakcijom iz odgovarajućih cijano supstituiranih prekursora. Kako bi se osigurala bolja topljivost, svi amidino derivati sintetizirani su u obliku hidrokloridnih soli. Njihove strukture prikazane su na Slici 24.



**Slika 24.** Strukture priređenih spojeva **126-131**

Kako bi se predvidjela antioksidativna aktivnost novih derivata, razvijen je 3D-QSAR model. Za generiranje 3D-QSAR modela korišten je Volsurf +<sup>130,131</sup> pristup, a glavna prednost Volsurf+ pristupa je upotreba molekularnih deskriptora koji su neovisni o molekularnom poravnanju te imaju jasno kemijsko ili fizikalno značenje. Modeli su napravljeni uz pomoć biblioteke eksperimentalnih podataka o antioksidativnoj aktivnosti<sup>132-134</sup> objavljenih strukturno sličnih spojeva te je provedena analiza glavnih komponenata (PCA). Eksperimentalno je antioksidativna aktivnost određena najprije DPPH metodom koja je pokazala da svi testirani spojevi imaju bolju ili sličnu aktivnost kao i L-askorbinska kiselina (standard), a rezultati su prikazani u Tablici 10.

Također, rezultati su pokazali da spojevi s amidinskom jedinicom imaju bolju aktivnost u usporedbi sa spojevima s imidazolilnom jezgrom na istom položaju, a uz to su hidroksilne skupine i u ovom slučaju imale važnu ulogu u poboljšanju aktivnosti spojeva. Ukupno, najbolju je aktivnost imao spoj **126c** i to 50 % bolju u odnosu na L-askorbinsku kiselinu. Sljedeće je proveden test mjerenja sposobnosti deaktivacije superoksidnog radikal aniona u kojem su svi spojevi pokazali nižu aktivnost od standarda, a najaktivniji je i tu bio spoj **126c**. Dobiveni podaci zatim su uspoređeni s predviđenim podacima pomoću dva 3D-QSAR modela te je došlo do podudaranja rezultata uz pogrešku unutar standardne devijacije. Iznimka je 7 spojeva za koje je predviđena manja antioksidativna aktivnost od eksperimentalno određene.

**Tablica 10.** Antioksidativna i antiproliferativna aktivnost novo priređenih spojeva **126-131**

| SPOJ             | DPPH ( $\mu\text{M}$ ) | Superoksidni test ( $\mu\text{M}$ ) | IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ), MTT test na HeLa |
|------------------|------------------------|-------------------------------------|--|
| 126a             | 59 ± 4                 | 137 ± 4                             | >200   |
| 126b             | 66 ± 5                 | 158 ± 8                             | >200   |
| 126c             | 39 ± 3                 | 123 ± 4                             | 172,9 ± 15,44  |
| 127a             | 89 ± 6                 | 170 ± 8                             | >200   |
| 127b             | 70 ± 6                 | 156 ± 7                             | >200   |
| 127c             | 51 ± 6                 | 138 ± 5                             | 195,1 ± 6,99   |
| 127d             | 42 ± 5                 | 133 ± 7                             | 78,0 ± 2,22  |
| 128a             | 59 ± 6                 | 142 ± 8                             | 129,2 ± 5,61   |
| 128b             | 52 ± 3                 | 145 ± 4                             | 175,6 ± 1,28   |
| 128c             | 66 ± 7                 | 149 ± 7                             | 20,1 ± 5,71  |
| 128d             | 73 ± 4                 | 171 ± 7                             | >200   |
| 128e             | 57 ± 2                 | 151 ± 6                             | 32,8 ± 0,21  |
| 129a             | 71 ± 5                 | 163 ± 7                             | 40,9 ± 7,57  |
| 129b             | 85 ± 4                 | 180 ± 9                             | 117,4 ± 10,90  |
| 129c             | 82 ± 4                 | 169 ± 5                             | 13,6 ± 1,24  |
| 129d             | 94 ± 2                 | 195 ± 9                             | >200   |
| 129e             | 73 ± 4                 | 172 ± 8                             | 55,4 ± 0,54  |
| 130a             | 42 ± 3                 | 135 ± 4                             | 167,2 ± 10,93  |
| 130b             | 38 ± 3                 | 130 ± 5                             | 133,6 ± 12,25  |
| 130c             | 49 ± 4                 | 139 ± 5                             | 192,0 ± 7,99   |
| 130d             | 46 ± 7                 | 141 ± 6                             | 41,4 ± 5,15  |
| 131a             | 56 ± 5                 | 148 ± 6                             | 194,6 ± 7,65   |
| 131b             | 65 ± 6                 | 163 ± 4                             | >200   |
| 131c             | 80 ± 3                 | 166 ± 3                             | 23,0 ± 0,40  |
| 131d             | 58 ± 3                 | 154 ± 5                             | >200   |
| Askorbinska kis. | 79 ± 3                 | 95 ± 2                              | /  |
| cisplatin        | /                      | /                                   | 2,5 ± 0,24   |

Ispitana je i antiproliferativna aktivnost spojeva prema HeLa staničnim linijama raka (Tablica 10.) u odnosu na cisplatin kao standardni antitumorski lijek pri čemu je većina testiranih spojeva pokazala umjerenu do slabu aktivnost pri mikromolarnoj inhibicijskoj koncentraciji. Generalno, benzotiazolni derivati pokazali su bolju aktivnost u odnosu na benzimidazolne analoge uz iznimku spoja **129a**. Najjaču aktivnost imali su spojevi **128c**, **128e**, **129c** i **131c**.

Osim toga, ispitana je i *in vitro* antibakterijska aktivnost sintetiziranih spojeva na gram-pozitivne (*S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *C. sporogenes*) te gram-negativne (*E. coli*, *P. hauseri*, *P. aeruginosa*, *K. pneumonia*) bakterije. Rezultati su iskazani u obliku minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) u odnosu na antibiotik amikacin. Najznačajniju antibakterijsku aktivnost pokazao je 3,4,5-trimetoksi supstituiran derivat benzimidazola **128b** s amidino skupinom (0,37-1,54 µg/mL) bez pokazivanja značajne selektivnosti između gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. Dobre rezultate pokazao je i 3,4,5-trihidroksi supstituiran benzamidni derivat **127d** s 2-imidazolinilnom grupom (0,89-1,77 µg/mL). Zanimljivo je da spojevi koji su pokazali najjaču antiproliferativnu aktivnost (**128c**, **128e**, **129c**, **131c**) nisu uopće pokazali antibakterijsku aktivnost.

Dodatno je ispitana i antifungalna aktivnost na tri soja gljivica; *C. albicans*, *A. brasiliensis* i *S. cerevisiae* u odnosu na antifungalni lijek nistatin te su neki spojevi pokazali bolju antifungalnu aktivnost u usporedbi s antibakterijskom. Poboljšanu aktivnost od standardnog lijeka pokazala je većina spojeva na sojeve *C. albicans* i *S. cerevisiae* pri čemu su najaktivniji bili spojevi **131a** i **127c** s MIC vrijednostima 0,11 i 0,12 µg/ML. U ovom slučaju benzimidazolni derivati pokazali su izraženiju antifungalnu aktivnost u odnosu na benzotiazolne analoge.

Iz ovog istraživanja vidljivo je da ovakvi amidino supstituirani benzimidazolni i benzotiazolni derivati imaju visok biološki potencijal za daljnju optimizaciju i dizajn novih biološki aktivnih molekula.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. Opće napomene

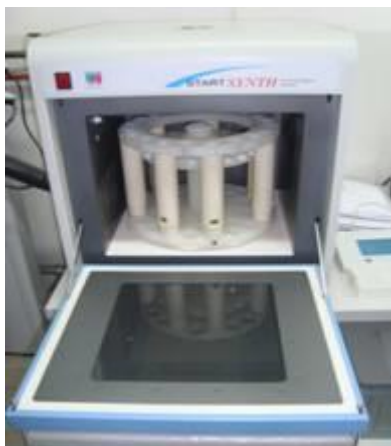
Tališta priređenih spojeva određena su na SMP11 Bibby te KoflerMikroheiztisch aparatu i nisu korigirana.

UV spektri snimljeni su na spektrofotometru VarianCary 50, a korištena je kvarcna kiveta promjera 1 cm i volumena 3 cm<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektri snimljeni su na spektrometrima Bruker AV600 i Bruker AV300. <sup>1</sup>H NMR spektri snimani su pri 300, 400 i 600 MHz, dok su <sup>13</sup>C NMR spektri snimani pri 75, 101 i 151 MHz. Svi NMR spektri snimani su u DMSO-*d*<sub>6</sub> kao otapalu, koristeći tetrametilsilan kao interni standard. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm vrijednostima, a konstante sprege (*J*) u Hz.

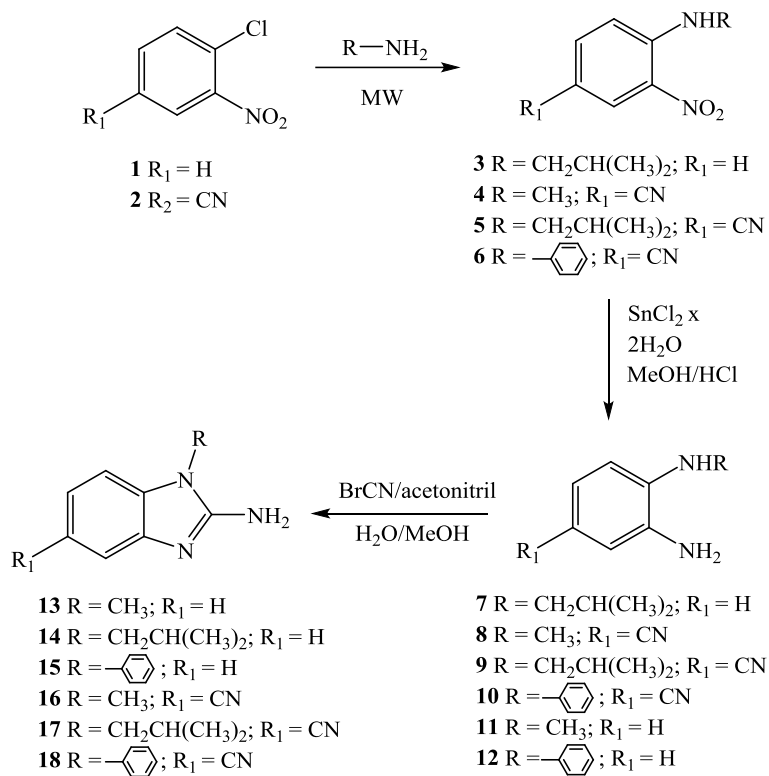
Kromatografska odjeljivanja provedena su na kolonama punjenim silikagelom 0,063-0,2 nm (Kemika, Merck).

Reakcije potpomognute mikrovalnim zračenjem provedene su u Milestone Start Synth mikrovalnom reaktoru (Slika 25.) u kvarcnim posudama (40 bar).



**Slika 25.** Mikrovalni reaktor

### 3.2. Sinteza *N*-supstituiranih derivata 2-aminobenzimidazola 13-15 i 2-amino-5-cijanobenzimidazola 16-18



**Shema 28.** Sinteza *N*-supstituiranih derivata 2-aminobenzimidazola **13-15** i 2-amino-5-cijanobenzimidazola **16-18**

### 3.2.1. Opći postupak pripreve *N*-izobutil-2-nitroanilina **3** i *N*-supstituiranih derivata 3-nitrobenzonitrila **4-6**

Spojevi **3-6** priređeni su sintezom potpomognutom mikrovalovima primjenom MW zračenja snage 800 W i temperature 170 °C. U svaku od kiveta stavi se 0,50 g (3,17 mmol) 1-klor-2-nitrobenzena **1** ili 0,50 g (2,74 mmol) 4-klor-3-nitrobenzonitrila **2**, 10,0 mL acetonitrila te suvišak odgovarajućeg amina. Po završetku mikrovalne sinteze smjesa se pod sniženim tlakom upari na manji volumen, doda se mala količina metanola, nastali talog se profiltrira te ako je potrebno pročisti kolonskom kromatografijom na silikagelu uz CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens.

#### Priprava *N*-izobutil-2-nitroanilina **3**

Spoj **3** priređen je iz 1-klor-2-nitrobenzena **1** (0,50 g, 3,17 mmol) u 10,0 mL acetonitrila i uz suvišak izobutilamina (1,6 mL). Nakon dvosatnog mikrovalnog zračenja nastali produkt se pročisti kolonskom kromatografijom na silikagelu uz CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Dobiveno je 2,35 g (94,1 %) naračastog uljnog produkta.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 8,19 (šs, 1H, NH), 8,07 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 8,6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1,6 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,52 (td, 1H, *J*<sub>1</sub> = 8,4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1,2 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,06 (d, 1H, *J* = 8,5 Hz, H<sub>arom.</sub>), 6,68 (td, 1H, *J*<sub>1</sub> = 8,3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1,1 Hz, H<sub>arom.</sub>), 3,19 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz, CH<sub>2</sub>), 2,01–1,90 (m, 1H, CH), 0,96 (d, 6H, *J* = 6,7 Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 145,9, 137,1, 131,2, 126,7, 115,6, 115,1, 50,0, 27,7, 20,5 (2C).

#### Priprava 4-*N*-metilamino-3-nitrobenzonitrila **4**

Spoj **4** priređen je iz 4-klor-3-nitrobenzonitrila **2** (0,50 g, 2,74 mmol) u 10,0 mL acetonitrila i uz suvišak metilamina (2,6 mL). Nakon dvosatnog mikrovalnog zračenja nastali talog se profiltrira. Dobiveno je 2,51 g (73,8 %) žutog kristaliničnog produkta. T<sub>f</sub> = 174–178 °C.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 8,64 (q, 1H, *J* = 5,5 Hz, NH), 8,49 (d, 1H, *J* = 2,0 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,84 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 9,1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1,6 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,10 (d, 1H, *J* = 9,1 Hz, H<sub>arom.</sub>), 3,00 (d, 3H, *J* = 5,0 Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 148,0, 138,1, 132,2, 131,2, 118,8, 116,1, 96,5, 30,3.

#### Priprava 4-*N*-izobutilamino-3-nitrobenzonitrila **5**

Spoj **5** priređen je iz 4-klor-3-nitrobenzonitrila **2** (0,50 g, 2,74 mmol) u 10,0 mL acetonitrila i uz suvišak izobutilamina (1,9 mL). Nakon dvosatnog mikrovalnog zračenja nastali produkt se

pročisti kolonskom kromatografijom na silikagelu uz CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Dobiveno je 2,20 g (73,3 %) žutog kristaliničnog produkta. T<sub>f</sub> = 99–101 °C.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 8,62 (t, 1H, *J* = 5,5 Hz, NH), 8,51 (d, 1H, *J* = 2,0 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,81 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 9,0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1,8 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,21 (d, 1H, *J* = 9,2 Hz, H<sub>arom.</sub>), 3,27 (t, 2H, *J* = 6,5 Hz, CH<sub>2</sub>), 2,03–1,86 (m, 1H, CH), 0,95 (d, 6H, *J* = 6,7 Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 147,0, 137,5, 131,9, 130,7, 118,2, 115,9, 96,2, 49,5, 27,2, 19,8 (2C).

### Priprava 3-nitro-4-*N*-fenilaminobenzonitrila 6

Spoj 6 priređen je iz 4-klor-3-nitrobenzonitrila 2 (0,50 g, 2,74 mmol) u 10,0 mL acetonitrila i uz suvišak anilina (1,0 mL). Nakon dvosatnog mikrovalnog zračenja nastali talog se profiltrira. Dobiveno je 1,58 g (47,9 %) žutog kristaliničnog produkta. T<sub>f</sub> = 131–135 °C.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 9,90 (s, 1H, NH), 8,59 (d, 1H, *J* = 2,0 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,77 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 9,0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1,9 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,51–7,46 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7,37–7,30 (m, 3H, H<sub>arom.</sub>), 7,09 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz, H<sub>arom.</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 145,6, 138,3, 138,0, 132,9, 132,3, 130,2 (2C), 127,0, 125,9 (2C), 118,4, 117,7, 99,0.

### 3.2.2. Opći postupak pripreve *N*-izobutil-1,2-fenilendiamina 7 i *N*-supstituiranih derivata 3-aminobenzonitrila 8-10

Reakcijska smjesa *N*-izobutil-2-nitroanilina 3 ili *N*-supstituiranih derivata 3-nitrobenzonitrila 4-6 sa SnCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O u smjesi MeOH i HCl<sub>konc</sub> refluksira 30 min. Smjesa se zatim upari do suha, doda se mala količina vode te se zaluži s 20%-tnom otopinom NaOH do pH = 14. Nastali talog se profiltrira i ispire s vrućim etanolom. Ako je potrebno, flitrat se ekstrahira sa etil-acetatom. Organski sloj suši se iznad bezvodnog MgSO<sub>4</sub>, profiltrira i upari do suha.

### Priprava *N*-izobutil-1,2-fenilendiamina 7

Iz 2,35 g (12,11 mmol) *N*-izobutil-2-nitroanilina 3 i 16,40 g (72,69 mmol) SnCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O otopljenog u smjesi 32,0 mL MeOH i 32,0 mL HCl<sub>konc</sub>. dobiveno je 1,10 g (55,2 %) narančastog uljnog produkta.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 6,53 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7,7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1,6 Hz, H<sub>arom.</sub>), 6,47 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7,1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2,0 Hz, H<sub>arom.</sub>), 6,43–6,34 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 4,48 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4,33 (šs, 1H, NH), 2,82 (t, 2H, *J* = 6,0 Hz, CH<sub>2</sub>), 1,93–1,80 (m, 1H, CH), 0,95 (d, 6H, *J* = 6,6 Hz, CH<sub>3</sub>)



### Priprava 3-amino-4-*N*-metilaminobenzonitrila 8

Iz 2,51 g (14,20 mmol) 4-*N*-metilamino-3-nitrobenzonitrila **4** i 26,59 g (117,86 mmol) SnCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O otopljenog u smjesi 38,5 mL MeOH i 38,5 mL HCl<sub>konc.</sub> dobiveno je 1,01 g (48,3 %) svjetlonarančastog praškastog produkta. T<sub>i</sub> = 149–151 °C.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 6,95 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 8,1 Hz, J<sub>2</sub> = 1,9 Hz, H<sub>arom.</sub>), 6,77 (d, 1H, J = 2,0 Hz, H<sub>arom.</sub>), 6,41 (d, 1H, J = 8,2 Hz, H<sub>arom.</sub>), 5,57 (q, 1H, J = 4,7 Hz, NH), 4,89 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 2,77 (d, 3H, J = 4,8 Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 141,6, 135,6, 123,5, 121,6, 114,9, 108,5, 96,9, 29,9.

### Priprava 3-amino-4-*N*-izobutilaminobenzonitrila 9

Iz 2,20 g (10,03 mmol) 4-*N*-izobutilamino-3-nitrobenzonitrila **5** i 18,10 g (80,22 mmol) SnCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O otopljenog u smjesi 26,2 mL MeOH i 26,2 mL HCl<sub>konc.</sub> dobiveno je 1,05 g (55,4 %) bijelog praškastog produkta. T<sub>i</sub> = 158–160 °C.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 6,89 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 8,2 Hz, J<sub>2</sub> = 1,9 Hz, H<sub>arom.</sub>), 6,76 (d, 1H, J = 2,0 Hz, H<sub>arom.</sub>), 6,43 (d, 1H, J = 8,3 Hz, H<sub>arom.</sub>), 5,44 (šs, 1H, NH), 5,03 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 2,91 (t, 2H, J = 6,2 Hz, CH<sub>2</sub>), 1,95–1,80 (m, 1H, CH), 0,94 (d, 6H, J = 6,6 Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 140,5, 135,5, 123,2, 121,6, 115,1, 108,9, 96,6, 51,0, 27,4, 20,9 (2C).

### Priprava 3-amino-4-*N*-fenilaminobenzonitrila 10

Iz 1,58 g (6,61 mmol) 3-nitro-4-*N*-fenilaminobenzonitrila **6** i 12,39 g (54,91 mmol) SnCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O otopljenog u smjesi 18,0 mL MeOH i 18,0 mL HCl<sub>konc.</sub> dobiveno je 1,12 g (80,8 %) svjetložutog praškastog produkta. T<sub>i</sub> = 150–153 °C.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 7,52 (s, 1H, NH), 7,29–7,24 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7,09 (d, 1H, J = 8,2 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,03 (d, 2H, J = 8,5 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,00 (d, 1H, J = 1,9 Hz, H<sub>arom.</sub>), 6,94–6,87 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 5,25 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 142,9, 139,7, 134,7, 129,7 (2C), 121,6, 121,3, 120,6, 118,8 (2C), 117,3, 116,8, 102,5.

### 3.2.3. Priprava 2-amino-1-metilbenzimidazola 13

U okruglu tikvicu stavi se 0,70 g (5,73 mmol) *N*-metil-1,2-fenilendiamina **11**, 20 mL vode, 5 mL acetonitrila te se u obrocima dodaje 0,61 g (5,73 mmol) BrCN-a. Reakcijska smjesa refluksira 2 h na 100 °C. Smjesa se potom zaluži s NH<sub>4</sub>OH do pH = 9 i upari pod sniženim

tlakom na manji volumen. Dobiveno je 0,65 g (76,9 %) smeđeg praškastog produkta.  $T_t = 159\text{--}162\text{ }^\circ\text{C}$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 7,14\text{--}7,09$  (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 6,94 (td, 1H,  $J_1 = 7,5$  Hz,  $J_2 = 1,4$  Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 6,89 (td, 1H,  $J_1 = 7,4$  Hz,  $J_2 = 1,3$  Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 6,40 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 3,49 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 150,7, 131,5, 129,2, 123,9, 123,4, 111,9, 110,6, 29,6$ ; MS (m/z): 148,1 ( $[\text{M}+1]^+$ ).

### 3.2.4. Priprava 2-amino-1-izobutilbenzimidazola 14

U okruglu tikvicu stavi se 1,10 g (6,68 mmol) *N*-izobutil-1,2-fenilendiamina **7**, 20 mL vode, 5 mL acetonitrila te se u obrocima dodaje 0,71 g (6,67 mmol) BrCN-a. Reakcijska smjesa refluksira 2 h na  $100\text{ }^\circ\text{C}$ . Smjesa se potom zaluži s  $\text{NH}_4\text{OH}$  do pH = 9 i upari pod sniženim tlakom na manji volumen. Dobiveno je 0,68 g (54,0 %) svjetlonarančastog praškastog produkta.  $T_t = 121\text{--}125\text{ }^\circ\text{C}$ .

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 8,43$  (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7,54–7,48 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,38–7,33 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,25–7,19 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 3,94 (d, 2H,  $J = 7,7$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2,18–2,07 (m, 1H, CH), 0,89 (d, 6H,  $J = 6,6$  Hz,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 150,8, 131,3, 123,0, 122,1, 121,7, 112,0, 110,2, 48,6, 27,3, 19,3$  (2C).

### 3.2.5. Opći postupak priprave 2-amino-1-fenilbenzimidazola 15 i *N*-supstituiranih derivata 2-amino-5-cijanobenzimidazola 16-18

U okrugloj tikvici otopi se odgovarajuća količina *N*-fenil-1,2-fenilendiamina **12** ili *N*-supstituiranog derivata 3-aminobenzonitrila **8-10** u smjesi  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  te se doda prethodno pripremljena otopina BrCN-a u acetonitrilu. Reakcijska smjesa se miješa 24 h na sobnoj temperaturi. Zatim se u smjesu doda aktivni ugljen, otopina se profiltrira i zaluži s  $\text{NH}_4\text{OH}$  do pH = 9. Smjesa se upari pod sniženim tlakom na manji volumen, a nastali talog profiltrira. Ako je potrebno, dobiveni talog se prekrystalizira iz etanola ili pročisti kolonskom kromatografijom na silikagelu uz  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  kao eluens.

#### Priprava 2-amino-1-fenilbenzimidazola 15

1,00 g (5,43 mmol) *N*-fenil-1,2-fenilendiamina **12** otopi se u smjesi  $\text{H}_2\text{O}$  (20,0 mL) i MeOH (20,0 mL) te se doda 0,57 g (5,43 mmol) BrCN-a otopljenog u 1,0 mL acetonitrila. Nastali produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom na silikagelu uz  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$  kao eluensom. Dobiveno je 0,57 g (50,5 %) svjetlorozog praškastog produkta.  $T_t = 149\text{--}152\text{ }^\circ\text{C}$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 7,66\text{--}7,60$  (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,54 (d, 1H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,50 (dd, 2H,  $J_1 = 8,4$  Hz,  $J_2 = 1,2$  Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,25 (d, 1H,  $J = 7,7$  Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,04 (td, 1H,  $J_1 = 7,8$  Hz,  $J_2 = 1,5$  Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 6,90 (td, 1H,  $J_1 = 7,5$  Hz,  $J_2 = 1,1$  Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 6,86 (dd, 1H,  $J_1 = 7,8$  Hz,  $J_2 = 0,9$  Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 6,44 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 154,3, 142,3, 135,2, 135,1, 130,6$  (2C), 128,8, 127,2 (2C), 121,9, 119,6, 115,3, 108,3.

### Priprava 2-amino-5-cijano-1-metilbenzimidazola 16

1,01 g (6,85 mmol) 3-amino-4-*N*-metilaminobenzonitrila **8** otopi se u smjesi  $\text{H}_2\text{O}$  (14,9 mL) i MeOH (14,9 mL) te se doda 0,73 g (6,85 mmol) BrCN-a otopljenog u 1,6 mL acetonitrila. Filtriranjem je dobiveno 0,57 g (48,3 %) bijelog praškastog produkta.  $T_t = 276\text{--}280$  °C.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 7,51\text{--}7,49$  (m, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,31–7,30 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,30 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 6,83 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 3,55 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 157,7, 143,3, 138,9, 122,9, 121,2, 118,2, 108,8, 102,5, 29,1$ .

### Priprava 2-amino-5-cijano-1-izobutilbenzimidazola 17

1,05 g (5,56 mmol) 3-amino-4-*N*-izobutilaminobenzonitrila **9** otopi se u smjesi  $\text{H}_2\text{O}$  (20,0 mL) i MeOH (40,0 mL) te se doda 0,59 g (5,56 mmol) BrCN-a otopljenog u 1,0 mL acetonitrila. Filtriranjem je dobiveno 0,55 g (46,5 %) sivog praškastog produkta.  $T_t = 262\text{--}266$  °C.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 7,50\text{--}7,48$  (m, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,34 (d, 1H,  $J = 8,0$  Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,28 (dd, 1H,  $J_1 = 7,9$  Hz,  $J_2 = 1,3$  Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 6,82 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 3,85 (d, 2H,  $J = 7,6$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2,13–2,06 (m, 1H, CH), 0,85 (d, 6H,  $J = 6,7$  Hz,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 157,5, 143,3, 138,7, 122,7, 121,2, 118,2, 109,3, 102,4, 48,9, 28,2, 19,9$  (2C).

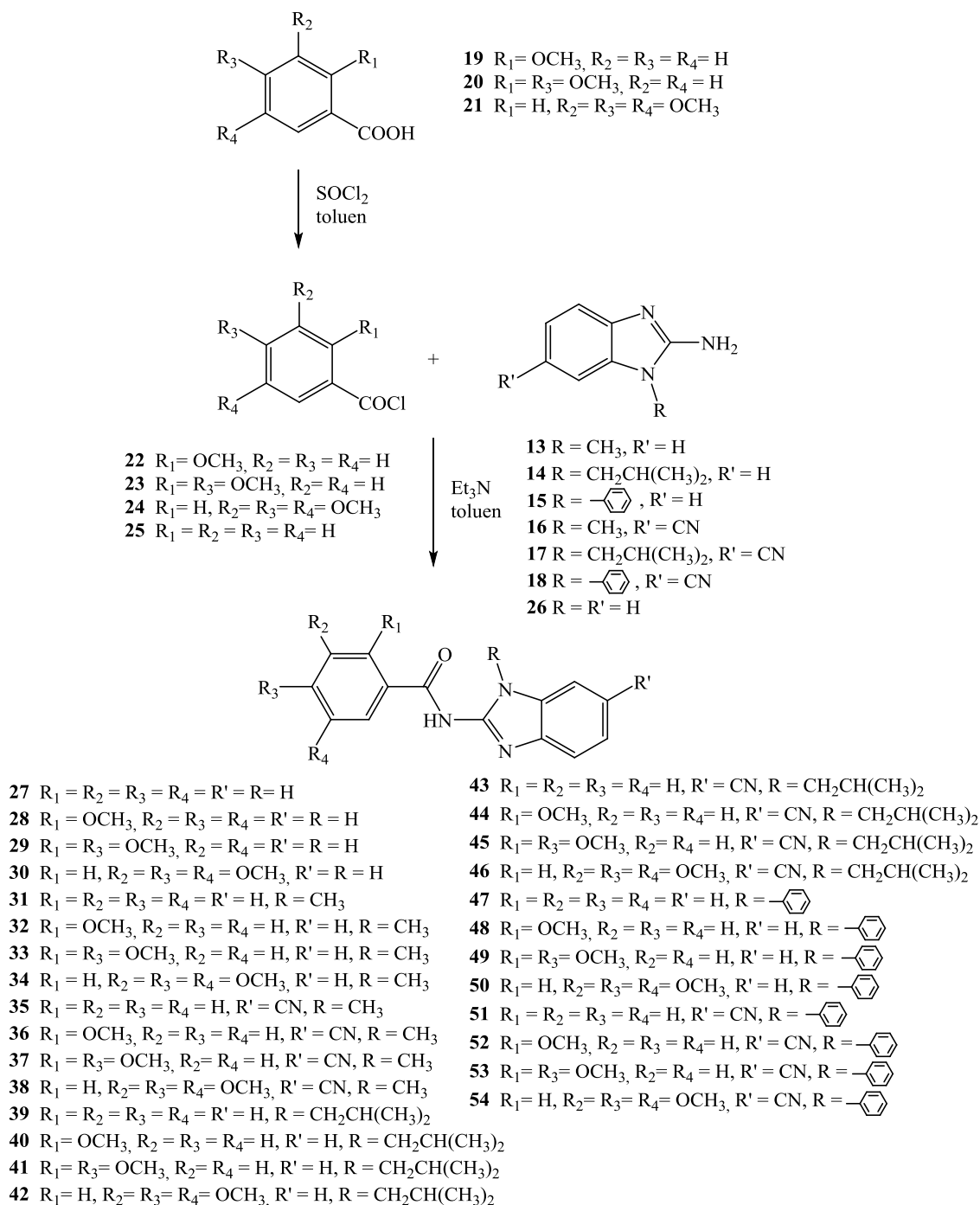
### Priprava 2-amino-5-cijano-1-fenilbenzimidazola 18

1,12 g (5,34 mmol) 3-amino-4-*N*-fenilaminobenzonitrila **10** otopi se u smjesi  $\text{H}_2\text{O}$  (25,0 mL) i MeOH (25,0 mL) te se doda 0,57 g (5,34 mmol) BrCN-a otopljenog u 1,0 mL acetonitrila. Dobiveni talog se prekrizalizira iz etanola. Dobiveno je 0,40 g (15,6 %) bijelog praškastog produkta.  $T_t > 300$  °C.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 7,70\text{--}7,60$  (m, 3H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,59–7,54 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,52–7,48 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,28 (dd, 1H,  $J_1 = 8,2$  Hz,  $J_2 = 1,5$  Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 6,93 (d, 1H,

$J = 8,2 \text{ Hz}$ ,  $H_{\text{arom.}}$ ), 6,70 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 156,7$ , 143,7, 138,9, 134,4, 130,7 (2C), 129,4, 127,4 (2C), 123,6, 120,9, 118,7, 108,9, 103,5.

### 3.3. Sinteza *N*-supstituiranih derivata benzamida i metoksi supstituiranih benzamida



**Shema 29.** Sinteza *N*-supstituiranih derivata benzamida i metoksi supstituiranih benzamida

### 3.3.1. Opći postupak pripreve metoksi supstituiranih benzoil-klorida 22-24

U okrugloj tikvici priredi se otopina odgovarajuće benzojeve kiseline u apsolutnom toluenu te se doda tionil-klorid. Reakcijska smjesa se zagrijava na temperaturi refluksa 24 h. Suvišak tionil-klorida upari se pod sniženim tlakom, a dobiveni produkt ispire se s apsolutnim toluenom 3 puta.

#### Priprava 2-metoksibenzoil-klorida 22

2,00 g (13,14 mmol) 2-metoksibenzojeve kiseline **19**, 10,0 mL apsolutnog toluena i 9,5 mL (131,45 mmol) tionil-klorida zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 2,19 g (98,2 %) tamnocrvenog uljastog produkta.

#### Priprava 2,4-dimetoksibenzoil-klorida 23

2,00 g (10,98 mmol) 2,4-dimetoksibenzojeve kiseline **20**, 11,0 mL apsolutnog toluena i 8,0 mL (109,79 mmol) tionil-klorida zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 2,16 g (98,0 %) tamnocrvenog kristaliničnog produkta.

#### Priprava 3,4,5-trimetoksibenzoil-klorida 24

2,50 g (11,79 mmol) 3,4,5-trimetoksibenzojeve kiseline **21**, 12,5 mL apsolutnog toluena i 8,6 mL (117,92 mmol) tionil-klorida zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 2,67 g (98,0 %) svjetlosmeđeg kristaliničnog produkta.

### 3.3.2. Opći postupak pripreve *N*-supstituiranih derivata benzamida i metoksi supstituiranih benzamida 27-54

U okrugloj tikvici priredi se otopina odgovarajućeg benzoil-klorida u apsolutnom toluenu, zatim se doda odgovarajući *N*-supstituirani 2-aminobenzimidazol ili 2-amino-5-cijanobenzimidazol i trietilamin te se reakcijska smjesa zagrijava na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveni se produkt nakon hlađenja profiltrira te ispire s razrijeđenom otopinom HCl i vodom. Po potrebi talog se prekrizalizira iz odgovarajućeg otapala.

#### Priprava *N*-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamida 27

0,1 mL (0,75 mmol) benzoil-klorida **25**, 0,10 g (0,75 mmol) 2-aminobenzimidazola **26**, 15,0 mL apsolutnog toluena i 0,13 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,15 g (83,7 %) svjetložutog praškastog produkta.  $T_f = 234-238$  °C.

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 12,62 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{benz.}}$ ) 8,16 (d, 2H,  $J$  = 7,3 Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,66–7,62 (m, 1H,  $J$  = 7,3 Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,58–7,54 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,54–7,52 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,23–7,19 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 167,8, 147,8, 133,7 (2C), 133,1, 132,4 (2C), 128,4 (2C), 128,3 (2C), 122,2 (2C), 113,4.

#### **Priprava *N*-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-2-metoksibenzamida 28**

0,13 g (0,75 mmol) 2-metoksibenzoil-klorida **22**, 0,10 g (0,75 mmol) 2-aminobenzimidazola **26**, 15,0 mL apsolutnog toluena i 0,2 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,10 g (47,9 %) žuto-smeđeg praškastog produkta.  $T_{\text{t}}$  = 224–227 °C.

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 12,13 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{benz.}}$ ), 7,88 (dd, 1H,  $J_1$  = 7,7,  $J_2$  = 1,7 Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,64 (td, 1H,  $J_1$  = 7,0 Hz,  $J_2$  = 1,7 Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,59–7,55 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,28 (d, 1H,  $J$  = 8,4 Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,25–7,23 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,16 (t, 1H,  $J$  = 7,5 Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 4,02 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 164,93, 157,84, 145,45 (2C), 134,65, 134,04, 131,08, 123,03 (3C), 121,52, 121,39, 114,42, 112,99, 56,80.

#### **Priprava *N*-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-2,4-dimetoksibenzamida 29**

0,15 g (0,75 mmol) 2,4-dimetoksibenzoil-klorida **23**, 0,10 g (0,75 mmol) 2-aminobenzimidazola **26**, 15,0 mL apsolutnog toluena i 0,13 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,08 g (37,7 %) žuto-smeđeg praškastog produkta.  $T_{\text{t}}$  = 249–253 °C.

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 11,53 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{benz.}}$ ), 8,00 (d, 1H,  $J$  = 8,7 Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,65–7,62 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,35–7,32 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 6,80 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 6,79 (d,  $J$  = 8,8 Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 4,12 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,90 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 165,0 (2C), 163,1 (2C), 159,6, 144,3, 133,2, 123,4, 113,6, 111,7, 107,0 (2C), 98,7 (2C), 56,7, 55,9.

#### **Priprava *N*-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-3,4,5-trimetoksibenzamida 30**

0,17 g (0,75 mmol) 3,4,5-trimetoksibenzoil-klorida **24**, 0,10 g (0,75 mmol) 2-aminobenzimidazola **26**, 15,0 mL apsolutnog toluena i 0,13 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,20 g (80,1 %) svjetloružičastog praškastog produkta.  $T_{\text{t}}$  = 276–280 °C.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 7,75–7,71 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,60 (s, 2H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,42–7,38 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 3,93 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 3,79 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ );

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 165,8, 153,3$  (3C), 145,1, 142,4, 130,1, 126,9, 124,7, 114,1, 106,8, 60,7, 56,8.

### **Priprava *N*-(1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamida 31**

0,08 mL (0,68 mmol) benzoil-klorida **25**, 0,10 g (0,68 mmol) 2-amino-1-metilbenzimidazola **13**, 10,0 mL apsolutnog toluena i 0,1 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,15 g (83,7 %) produkta.  $T_t = 243\text{--}245$  °C

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 8,22$  (dd, 2H,  $J_1 = 7,0$  Hz,  $J_2 = 1,5$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,62–7,55 (m, 3H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,54–7,50 (m, 2H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,35 (td, 1H,  $J_1 = 6,5$  Hz,  $J_2 = 1,2$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,31 (td, 1H,  $J_1 = 7,5$  Hz,  $J_2 = 1,0$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 3,80 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 133,3, 132,6, 130,5, 129,7$  (2C), 129,4, 129,0 (2C), 128,7, 124,3, 124,4, 113,3, 111,0, 45,9.

### **Priprava 2-metoksi-*N*-(1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamida 32**

0,12 g (0,68 mmol) 2-metoksibenzoil-klorida **22**, 0,10 g (0,68 mmol) 2-amino-1-metilbenzimidazola **13**, 15,0 mL apsolutnog toluena i 0,1 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,01 g (6,8 %) svjetložutog praškastog produkta.  $T_t = 147\text{--}150$  °C.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 7,85$  (td, 2H,  $J_1 = 7,8$  Hz,  $J_2 = 1,6$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,76 (dd, 1H,  $J_1 = 6,4$  Hz,  $J_2 = 1,6$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,70 (td, 1H,  $J_1 = 8,8$  Hz,  $J_2 = 1,8$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,54 (td, 1H,  $J_1 = 6,7$  Hz,  $J_2 = 1,4$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,50 (td, 1H,  $J_1 = 6,6$  Hz,  $J_2 = 1,3$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,33 (d, 1H,  $J = 8,3$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,20 (td, 1H,  $J_1 = 7,6$  Hz,  $J_2 = 0,8$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 4,00 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,92 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 166,0, 158,0, 143,6, 135,0, 131,1, 130,5, 129,5, 125,6, 125,4, 121,7, 121,4, 114,5, 113,1, 112,2, 56,8, 31,0$ .

### **Priprava 2,4-dimetoksi-*N*-(1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamida 33**

0,14 g (0,68 mmol) 2,4-dimetoksibenzoil-klorida **23**, 0,10 g (0,68 mmol) 2-amino-1-metilbenzimidazola **13**, 15,0 mL apsolutnog toluena i 0,1 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,08 g (37,7 %) bijelog praškastog produkta.  $T_t = 203\text{--}208$  °C.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 7,94$  (d, 1H,  $J = 8,7$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,88 (dd, 1H,  $J_1 = 6,7$  Hz,  $J_2 = 1,4$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,76 (dd, 1H,  $J_1 = 6,4$  Hz,  $J_2 = 1,5$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,53 (td, 1H,  $J_1 = 6,5$  Hz,  $J_2 = 1,3$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,50 (td, 1H,  $J_1 = 6,5$  Hz,  $J_2 = 1,3$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 6,85–6,83 (m, 1H,

H<sub>arom.</sub>), 6,80 (dd, 1H,  $J_1 = 8,7$  Hz,  $J_2 = 2,3$  Hz, H<sub>arom.</sub>), 4,07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 165,6, 164,2, 160,2, 143,5, 133,6, 130,5, 129,6, 125,6, 125,3, 114,6, 112,8, 112,1, 107,4, 99,4, 57,3, 56,4, 30,8.

#### **Priprava 3,4,5-trimetoksi-*N*-(1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamida 34**

0,16 g (0,68 mmol) 3,4,5-trimetoksibenzoil-klorida **24**, 0,10 g (0,68 mmol) 2-amino-1-metilbenzimidazola **13**, 10,0 mL apsolutnog toluena i 0,1 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,18 g (76,6 %) ljubičastog praškastog produkta.  $T_f = 232\text{--}236$  °C.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 7,70–7,67 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7,56 (s, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7,45–7,37 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 3,90 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 3,77 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 153,0 (3C), 141,6, 130,7 (2C), 129,4, 124,6, 124,4, 113,5, 111,3, 107,0 (2C), 60,7 (2C), 56,6 (2C), 30,5; MS (m/z): 342,2 ([M+1]<sup>+</sup>).

#### **Priprava *N*-(5-cijano-1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamida 35**

0,07 mL (0,58 mmol) benzoil-klorida **25**, 0,10 g (0,58 mmol) 2-amino-5-cijano-1-metilbenzimidazola **16**, 10,0 mL apsolutnog toluena i 0,1 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,10 g (62,4 %) svjetlosivog praškastog produkta.  $T_f = 258\text{--}262$  °C.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 12,94 (s, 1H, NH<sub>amid.</sub>), 8,27 (d, 2H,  $J = 7,2$  Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,81 (s, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7,71 (d, 2H,  $J = 7,8$  Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,66 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,56–7,46 (m, 3H, H<sub>arom.</sub>), 3,33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 153,3, 144,1, 137,6, 131,4, 128,9 (2C), 128,0 (2C), 127,0, 119,4 (2C), 115,1, 110,6, 104,1 (2C), 28,6.

#### **Priprava *N*-(5-cijano-1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-2-metoksibenzamida 36**

0,10 g (0,58 mmol) 2-metoksibenzoil-klorida **22**, 0,10 g (0,58 mmol) 2-amino-5-cijano-1-metilbenzimidazola **16**, 15,0 mL apsolutnog toluena i 0,2 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,12 g (69,9 %) bijelog praškastog produkta.  $T_f = 283\text{--}288$  °C.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 8,11 (s, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7,89 (d, 1H,  $J = 8,4$  Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,80 (td, 2H,  $J_1 = 8,5$  Hz,  $J_2 = 1,6$  Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,61 (td, 1H,  $J_1 = 8,7$  Hz,  $J_2 = 1,7$  Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,26 (d, 1H,  $J = 8,4$  Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,14 (t, 1H,  $J = 7,5$  Hz, H<sub>arom.</sub>), 3,94 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,82 (s, 3H,



CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 157,8 (2C), 135,8 (2C), 134,1, 130,9, 127,5, 121,1, 119,8 (2C), 112,9 (2C), 112,6, 105,7 (2C), 56,6, 30,9.

#### **Priprava *N*-(5-cijano-1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-2,4-dimetoksibenzamida 37**

0,12 g (0,58 mmol) 2,4-dimetoksibenzoil-klorida **23**, 0,10 g (0,58 mmol) 2-amino-5-cijano-1-metilbenzimidazola **16**, 15,0 mL apsolutnog toluena i 0,1 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,13 g (65,0 %) svjetlosivog praškastog produkta. T<sub>t</sub> = 235–240 °C.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 8,10 (s, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7,89 (d, 1H, *J* = 8,6 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,85 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,76 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 8,4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1,4 Hz, H<sub>arom.</sub>), 6,76 (d, 1H, *J* = 2,1 Hz, H<sub>arom.</sub>), 6,73 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 8,7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2,2 Hz, H<sub>arom.</sub>), 3,98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,88 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,77 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 166,2, 133,3 (2C), 132,0, 126,9, 126,0, 120,1 (2C), 112,3, 106,7, 105,2 (2C), 99,2 (2C), 83,0, 81,6, 56,8, 56,2, 30,8.

#### **Priprava *N*-(5-cijano-1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-3,4,5-trimetoksibenzamida 38**

0,13 g (0,58 mmol) 3,4,5-trimetoksibenzoil-klorida **24**, 0,10 g (0,58 mmol) 2-amino-5-cijano-1-metilbenzimidazola **16**, 15,0 mL apsolutnog toluena i 0,1 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,14 g (67,5 %) bijelog praškastog produkta. T<sub>t</sub> = 290–295 °C.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 12,88 (s, 1H, NH<sub>amid.</sub>), 7,82 (s, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7,71 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,65 (d, 1H, *J* = 8,3 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,59 (s, 2H, H<sub>arom.</sub>), 3,87 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 3,33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 173,9, 153,8, 152,8 (2C), 141,0, 134,1, 133,6, 129,6, 127,5, 119,9, 115,5, 111,1, 106,7, 106,3 (2C), 104,6, 60,6, 56,3 (2C), 29,1.

#### **Priprava *N*-(1-izobutil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamida 39**

0,06 mL (0,53 mmol) benzoil-klorida **25**, 0,10 g (0,53 mmol) 2-amino-1-izobutilbenzimidazola **14**, 15,0 mL apsolutnog toluena i 0,1 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,09 g (54,9 %) svjetlonarančastog praškastog produkta. T<sub>t</sub> = 145–150 °C.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 8,18 (dd, 2H, *J*<sub>1</sub> = 8,4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1,5 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,68 (d, 1H, *J* = 7,3 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,64 (d, 1H, *J* = 8,5 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,59 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,56–7,52 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7,38–7,31 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 4,24 (d, 2H, *J* = 7,3 Hz, CH<sub>2</sub>), 2,35–2,25

(m, 1H, CH), 0,96 (d, 6H,  $J = 6,7$  Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 132,3, 130,2, 129,3, 128,7, 124,0, 113,2, 111,2, 49,7, 28,2, 20,3.

#### **Priprava *N*-(1-izobutil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-2-metoksibenzamida 40**

0,09 g (0,53 mmol) 2-metoksibenzoil-klorida **22**, 0,10 g (0,53 mmol) 2-amino-1-izobutilbenzimidazola **14**, 15,0 mL apsolutnog toluena i 0,2 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,05 g (27,1 %) narančasto-crvenog uljastog produkta.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 12,79 (s, 1H, NH<sub>amid.</sub>), 7,63 (dd, 1H,  $J_1 = 7,6$  Hz,  $J_2 = 1,8$  Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,58–7,55 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7,53–7,48 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7,43–7,40 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7,28–7,26 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7,12 (d, 1H,  $J = 8,0$  Hz, H<sub>arom.</sub>), 6,99 (td, 1H,  $J_1 = 7,5$  Hz,  $J_2 = 1,0$  Hz, H<sub>arom.</sub>), 3,99 (d, 2H,  $J = 7,8$  Hz, CH<sub>2</sub>), 3,81 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,19–2,13 (m, 1H, CH), 0,91 (d, 6H,  $J = 6,7$  Hz, CH<sub>3</sub>).

#### **Priprava *N*-(1-izobutil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-2,4-dimetoksibenzamida 41**

0,11 g (0,53 mmol) 2,4-dimetoksibenzoil-klorida **23**, 0,10 g (0,53 mmol) 2-amino-1-izobutilbenzimidazola **14**, 15,0 mL apsolutnog toluena i 0,1 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,06 g (34,0 %) svjetlosmeđeg praškastog produkta.  $T_f = 128$ – $133$  °C.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 12,11 (s, 1H, NH<sub>amid.</sub>), 7,72 (s, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7,70 (s, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7,51–7,42 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 6,62 (d, 2H,  $J = 2,3$  Hz, H<sub>arom.</sub>), 6,58 (d, 1H,  $J = 2,4$  Hz, H<sub>arom.</sub>), 6,56 (d, 1H,  $J = 2,4$  Hz, H<sub>arom.</sub>), 3,83 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 3,81 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 1,35–1,07 (m, 1H, CH), 0,96 (d, 2H,  $J = 6,6$  Hz, CH<sub>2</sub>).

#### **Priprava *N*-(1-izobutil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-3,4,5-trimetoksibenzamida 42**

0,12 g (0,53 mmol) 3,4,5-trimetoksibenzoil-klorida **24**, 0,10 g (0,53 mmol) 2-amino-1-izobutilbenzimidazola **14**, 15,0 mL apsolutnog toluena i 0,1 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,11 g (55,1 %) svjetložutog praškastog produkta.  $T_f = 154$ – $158$  °C.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 7,65 (d, 1H,  $J = 7,5$  Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,62 (d, 1H,  $J = 7,1$  Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,53 (s, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7,37–7,28 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 4,21 (d, 2H,  $J = 7,0$  Hz, CH<sub>2</sub>), 3,88 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 3,75 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,35–2,28 (m, 1H, CH), 0,96 (d, 6H,  $J = 6,7$  Hz, CH<sub>3</sub>).

### Priprava *N*-(5-cijano-1-izobutil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamid 43

0,05 mL (0,47 mmol) benzoil-klorida **25**, 0,10 g (0,47 mmol) 2-amino-5-cijano-1-izobutilbenzimidazola **17**, 15,0 mL apsolutnog toluena i 0,1 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,03 g (17,4 %) bijelog praškastog produkta.  $T_f = 213\text{--}217\text{ }^\circ\text{C}$ .

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 8,23$  (d, 2H,  $J = 7,3$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,86 (s, 1H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,74 (d, 1H,  $J = 8,3$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,70 (dd, 1H,  $J_1 = 8,3$  Hz,  $J_2 = 1,5$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,56–7,53 (m, 1H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,51–7,48 (m, 2H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 4,11 (d, 2H,  $J = 7,4$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2,32–2,25 (m, 1H, CH), 0,95 (d, 6H,  $J = 6,7$  Hz,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 153,72$ , 137,92, 134,04, 131,93, 129,24 (3C), 128,60 (2C), 127,43, 119,88, 111,47, 104,60, 49,55, 28,16, 20,34.

### Priprava *N*-(5-cijano-1-izobutil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-2-metoksibenzamid 44

0,08 g (0,47 mmol) 2-metoksibenzoil-klorida **22**, 0,10 g (0,47 mmol) 2-amino-5-cijano-1-izobutilbenzimidazola **17**, 15,0 mL apsolutnog toluena i 0,1 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,03 g (16,2 %) produkta.  $T_f = 196\text{--}199\text{ }^\circ\text{C}$ .

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 8,10$  (s, 1H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,95 (d, 1H,  $J = 8,4$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,79 (d, 1H,  $J = 8,5$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,72 (dd, 1H,  $J_1 = 7,6$  Hz,  $J_2 = 1,6$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,59 (t, 1H,  $J = 7,5$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,24 (d, 1H,  $J = 8,4$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,12 (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 4,19 (d, 2H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,91 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,25–2,18 (m, 1H, CH), 0,90 (d, 6H,  $J = 6,6$  Hz,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 157,2$  (2C), 133,3, 130,2 (2C), 127,0, 120,6 (2C), 119,2 (2C), 112,5, 112,4, 105,2 (2C), 56,0, 50,0, 27,8 (2C), 19,5 (2C).

### Priprava *N*-(5-cijano-1-izobutil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-2,4-dimetoksibenzamid 45

0,09 g (0,47 mmol) 2,4-dimetoksibenzoil-klorida **23**, 0,10 g (0,47 mmol) 2-amino-5-cijano-1-izobutilbenzimidazola **17**, 15,0 mL apsolutnog toluena i 0,1 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,02 g (8,2 %) žutog kristaliničnog produkta.  $T_f = 138\text{--}142\text{ }^\circ\text{C}$ .

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 10,50$  (s, 1H,  $H_{\text{arom.}}$ ) 8,07 (šs, 1H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,82 (d, 2H,  $J = 8,0$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,68 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 6,72 (s, 1H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 6,68 (d, 1H,  $J = 8,0$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 4,05 (d, 2H,  $J = 7,3$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,94 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,86 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,20–2,13 (m, 1H, CH), 0,86 (d, 6H,  $J = 6,5$  Hz,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 159,2$ ,

134,4, 132,5 (2C), 125,9, 119,7 (2C), 118,8, 115,3, 105,4, 104,0 (2C), 98,7 (2C), 56,1, 55,6 (2C), 28,0, 19,7 (2C).

#### **Priprava *N*-(5-cijano-1-izobutil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-3,4,5-trimetoksibenzamida 46**

0,11 g (0,47 mmol) 3,4,5-trimetoksibenzoil-klorida **24**, 0,10 g (0,47 mmol) 2-amino-5-cijano-1-izobutilbenzimidazola **17**, 15,0 mL apsolutnog toluena i 0,08 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,12 g (62,3 %) bijelog praškastog produkta.  $T_t = 179\text{--}184\text{ }^\circ\text{C}$ .

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 12,88$  (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{amid.}}$ ), 7,83 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,73 (d, 1H,  $J = 8,3$  Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,70 (dd, 1H,  $J_1 = 8,3$  Hz,  $J_2 = 1,1$  Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,57 (s, 2H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 4,09 (d, 2H,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,86 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 2,36–2,32 (m, 1H, CH), 0,97 (d, 6H,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 173,2$ , 153,2, 152,3, 133,4, 133,1, 129,1, 127,0, 119,4, 115,1, 110,8, 106,1 (2C), 104,0 (2C), 60,1, 55,6 (2C), 49,2, 27,7, 19,9 (2C).

#### **Priprava *N*-(1-fenil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamida 47**

0,06 mL (0,48 mmol) benzoil-klorida **25**, 0,10 g (0,48 mmol) 2-amino-1-fenilbenzimidazola **15**, 15,0 mL apsolutnog toluena i 0,08 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,06 g (37,7 %) žutog igličastog produkta.  $T_t = 220\text{--}223\text{ }^\circ\text{C}$ .

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 13,01$  (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{amid.}}$ ), 8,04 (d, 2H,  $J = 5,5$  Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,72–7,66 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,63 (d, 1H,  $J = 7,4$  Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,57 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,47 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,42–7,38 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,30–7,28 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,25–7,22 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,17 (d, 1H,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 173,9$ , 152,5, 137,9, 134,2, 131,0, 129,6, 129,3 (2C), 129,2, 128,7, 128,4 (2C), 127,9 (2C), 127,3, 123,2, 123,0 (2C), 112,3, 109,6.

#### **Priprava 2-metoksi-*N*-(1-fenil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamida 48**

0,08 g (0,48 mmol) 2-metoksibenzoil-klorida **22**, 0,10 g (0,48 mmol) 2-amino-1-fenilbenzimidazola **15**, 15,0 mL apsolutnog toluena i 0,1 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,09 g (52,2 %) narančastog igličastog produkta.  $T_t = 200\text{--}203\text{ }^\circ\text{C}$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 7,99$  (dd, 1H,  $J_1 = 7,8$  Hz,  $J_2 = 1,5$  Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,87 (d, 1H,  $J = 8,0$  Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,85–7,77 (m, 5H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,68 (td, 1H,  $J_1 = 8,7$  Hz,  $J_2 = 1,8$  Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,54 (td, 1H,  $J_1 = 8,1$  Hz,  $J_2 = 0,9$  Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,47 (td, 1H,  $J_1 = 8,2$  Hz,  $J_2 = 1,0$  Hz,

$H_{\text{arom.}}$ ), 7,30 (d, 1H,  $J = 8,0$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,24 (d, 1H,  $J = 8,3$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,20 (t, 1H,  $J = 7,5$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 3,60 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 158,0$  (5C), 136,1, 131,7, 131,5, 131,3 (2C), 128,1 (2C), 125,8, 122,1, 115,4, 113,4, 111,5, 56,8.

#### **Priprava 2,4-dimetoksi-*N*-(1-fenil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamida 49**

0,10 g (0,48 mmol) 2,4-dimetoksibenzoil-klorida **23**, 0,10 g (0,48 mmol) 2-amino-1-fenilbenzimidazola **15**, 15,0 mL apsolutnog toluena i 0,08 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,10 g (57,4 %) svjetložutog praškastog produkta.  $T_t = 218\text{--}222$  °C.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 8,03$  (d, 1H,  $J = 8,8$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,86–7,81 (m, 6H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,53 (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,46 (t, 1H,  $J = 7,3$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,29 (d, 1H,  $J = 8,0$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 6,81 (dd, 1H,  $J_1 = 8,9$  Hz,  $J_2 = 2,2$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 6,73 (d, 1H,  $J = 2,2$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 3,88 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,55 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 159,9$ , 134,0, 131,4 (2C), 128,2 (2C), 125,7, 115,4, 111,5, 108,1, 99,5, 57,0, 56,5.

#### **Priprava 3,4,5-trimetoksi-*N*-(1-fenil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamida 50**

0,11 g (0,48 mmol) 3,4,5-trimetoksibenzoil-klorida **24**, 0,10 g (0,48 mmol) 2-amino-1-fenilbenzimidazola **15**, 15,0 mL apsolutnog toluena i 0,08 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,13 g (69,3 %) svjetlosmeđeg praškastog produkta.  $T_t = 139\text{--}143$  °C.

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 12,86$  (s, 1H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,73 (šs, 2H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,66–7,63 (m, 3H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,54 (t, 1H,  $J = 7,3$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,39 (šs, 2H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,31–7,28 (m, 1H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,27–7,23 (m, 2H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 3,76 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 3,70 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 173,40$ , 152,66 (2C), 152,44, 140,59, 134,74, 133,91, 129,82, 129,78, 129,56 (2C), 128,68, 127,68 (2C), 123,72, 123,55, 112,74, 110,13, 106,53 (2C), 60,53, 56,00 (2C).

#### **Priprava *N*-(5-cijano-1-fenil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamida 51**

0,05 mL (0,43 mmol) benzoil-klorida **25**, 0,10 g (0,43 mmol) 2-amino-5-cijano-1-fenilbenzimidazola **18**, 15,0 mL apsolutnog toluena i 0,07 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,09 g (61,3 %) svjetložutog praškastog produkta.  $T_t = 242\text{--}245$  °C.

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 13,15 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{amid.}}$ ), 7,99 (s, 2H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,67–7,65 (m, 6H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,58 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,50 (d, 1H,  $J$  = 6,5 Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,42 (t, 2H,  $J$  = 7,3 Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,31 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ).

#### **Priprava *N*-(5-cijano-1-fenil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-2-metoksibenzamida 52**

0,07 g (0,43 mmol) 2-metoksibenzoil-klorida **22**, 0,10 g (0,43 mmol) 2-amino-5-cijano-1-fenilbenzimidazola **18**, 15,0 mL apsolutnog toluena i 0,1 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,07 g (45,8 %) bijelog praškastog produkta.  $T_{\text{t}}$  = 226–230 °C.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 8,24 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,74–7,63 (m, 7H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,56 (dd, 1H,  $J_1$  = 11,4 Hz,  $J_2$  = 4,2 Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,38 (d, 1H,  $J$  = 8,4 Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,16 (d, 1H,  $J$  = 8,4 Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,07 (t, 1H,  $J$  = 7,5 Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 3,70 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 157,6, 137,0, 134,4, 133,6 (2C), 131,2 (2C), 130,6 (2C), 130,2, 127,5, 127,4 (2C), 121,4, 119,9 (2C), 112,9 (2C), 112,0, 105,6 (2C), 56,5.

#### **Priprava *N*-(5-cijano-1-fenil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-2,4-dimetoksibenzamida 53**

0,09 g (0,43 mmol) 2,4-dimetoksibenzoil-klorida **23**, 0,10 g (0,48 mmol) 2-amino-5-cijano-1-fenilbenzimidazola **18**, 15,0 mL apsolutnog toluena i 0,07 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,01 g (7,6 %) produkta.  $T_{\text{t}}$  = 182–185 °C.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 10,36 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{amid.}}$ ), 8,24 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,76 (d, 1H,  $J$  = 9,3 Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,68–7,61 (m, 6H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,33 (d, 1H,  $J$  = 8,4 Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 6,68–6,63 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 3,83 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,70 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 164,5, 163,1, 159,3, 147,7, 141,3, 137,8, 134,1, 133,4, 130,6 (2C), 129,9, 127,4 (2C), 126,9, 123,8, 120,2, 113,4, 111,6, 106,9, 105,0, 99,1, 56,6, 56,2.

#### **Priprava *N*-(5-cijano-1-fenil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-3,4,5-trimetoksibenzamida 54**

0,10 g (0,43 mmol) 3,4,5-trimetoksibenzoil-klorida **24**, 0,10 g (0,43 mmol) 2-amino-5-cijano-1-fenilbenzimidazola **18**, 10,0 mL apsolutnog toluena i 0,07 mL trietilamina zagrijava se na temperaturi refluksa 24 h. Dobiveno je 0,07 g (38,7 %) bijelog praškastog produkta.  $T_{\text{t}}$  = 169–173 °C.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 13,07 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{amid.}}$ ), 7,91 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,76 (d, 2H,  $J$  = 7,7 Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,69–7,66 (m, 3H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,59 (d, 1H,  $J$  = 7,3 Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,42 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,39 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,37 (d, 1H,  $J$  = 8,4 Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 3,88 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,75 (s, 6H,

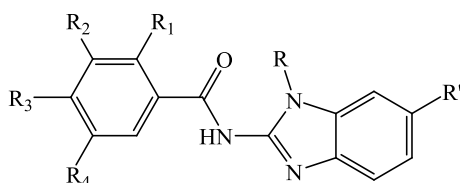
CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 173,8, 156,4, 153,1, 152,7 (2C), 140,9, 133,5, 133,4, 129,7, 129,2, 128,0, 127,8, 115,8, 111,1, 107,0 (2C), 106,6 (2C), 105,3 (2C), 100,5, 60,6, 56,4, 56,0.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**



## 4.1. Cilj rada

U ovom radu priređeni su potencijalno biološki aktivni *N*-supstituirani derivati benzamida i metoksi supstituiranih benzamida. Svi spojevi priređeni su uobičajenim metodama organske sintetske kemije te mikrovalovima potpomognutom sintezom. Glavni prekursori za sintezu ciljanih *N*-supstituiranih derivata 2-aminobenzimidazola **13-15** i 2-amino-5-cijanobenzimidazola **16-18** dobiveni su reakcijama ciklizacije uz korištenje BrCN-a u acetonitrilu iz *N*-izobutilbenzen-1,2-diamina **7** i *N*-supstituiranih derivata 3-aminobenzonitrila **8-10**. Metoksi supstituirani benzoil-kloridi **22-24** dobiveni su aktivacijom odgovarajućih kiselina **19-21** pomoću tionil-klorida u toluenu kao otapalu reakcijama nukleofilne supstitucije. Priređeni acilni kloridi **22-25** kondenzacijom s derivatima 2-aminobenzimidazola i 2-amino-5-cijanobenzimidazola **13-18** te 2-aminobenzimidazolom **26** prevedeni su zatim u ciljane spojeve **27-54** (Slika 26.). Struktura priređenih spojeva potvrđena je <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektroskopijom, a neki su spojevi dodatno okarakterizirani i masenom spektrometrijom. Ciljanim spojevima ispitana je i antioksidativna aktivnost pomoću DPPH i FRAP metode.

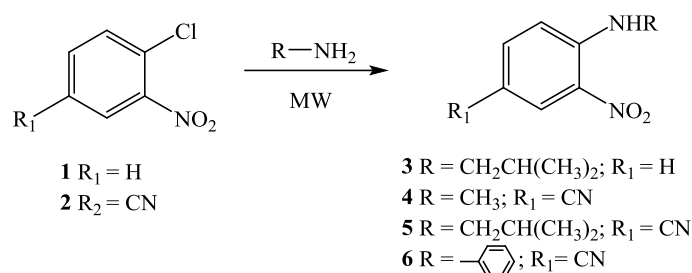


- |   |  |
|---|--|
| <b>27</b> R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = R' = R = H  | <b>43</b> R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = H, R' = CN, R = CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                    |
| <b>28</b> R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = R' = R = H   | <b>44</b> R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = H, R' = CN, R = CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> |
| <b>29</b> R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = R <sub>4</sub> = R' = R = H   | <b>45</b> R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = R <sub>4</sub> = H, R' = CN, R = CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> |
| <b>30</b> R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = OCH <sub>3</sub> , R' = R = H  | <b>46</b> R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = OCH <sub>3</sub> , R' = CN, R = CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> |
| <b>31</b> R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = R' = H, R = CH <sub>3</sub>   | <b>47</b> R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = R' = H, R =  |
| <b>32</b> R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = H, R' = H, R = CH <sub>3</sub>                                   | <b>48</b> R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = H, R' = H, R =  |
| <b>33</b> R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = R <sub>4</sub> = H, R' = H, R = CH <sub>3</sub>                                   | <b>49</b> R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = R <sub>4</sub> = H, R' = H, R =  |
| <b>34</b> R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = OCH <sub>3</sub> , R' = H, R = CH <sub>3</sub>                                   | <b>50</b> R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = OCH <sub>3</sub> , R' = H, R =  |
| <b>35</b> R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = H, R' = CN, R = CH <sub>3</sub>   | <b>51</b> R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = H, R' = CN, R =  |
| <b>36</b> R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = H, R' = CN, R = CH <sub>3</sub>                                  | <b>52</b> R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = H, R' = CN, R =   |
| <b>37</b> R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = R <sub>4</sub> = H, R' = CN, R = CH <sub>3</sub>                                  | <b>53</b> R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = R <sub>4</sub> = H, R' = CN, R =   |
| <b>38</b> R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = OCH <sub>3</sub> , R' = CN, R = CH <sub>3</sub>                                  | <b>54</b> R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = OCH <sub>3</sub> , R' = CN, R =   |
| <b>39</b> R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = R' = H, R = CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                       |  |
| <b>40</b> R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = H, R' = H, R = CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> |  |
| <b>41</b> R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = R <sub>4</sub> = H, R' = H, R = CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> |  |
| <b>42</b> R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = OCH <sub>3</sub> , R' = H, R = CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> |  |

Slika 26. Struktura ciljanih spojeva **27-54**

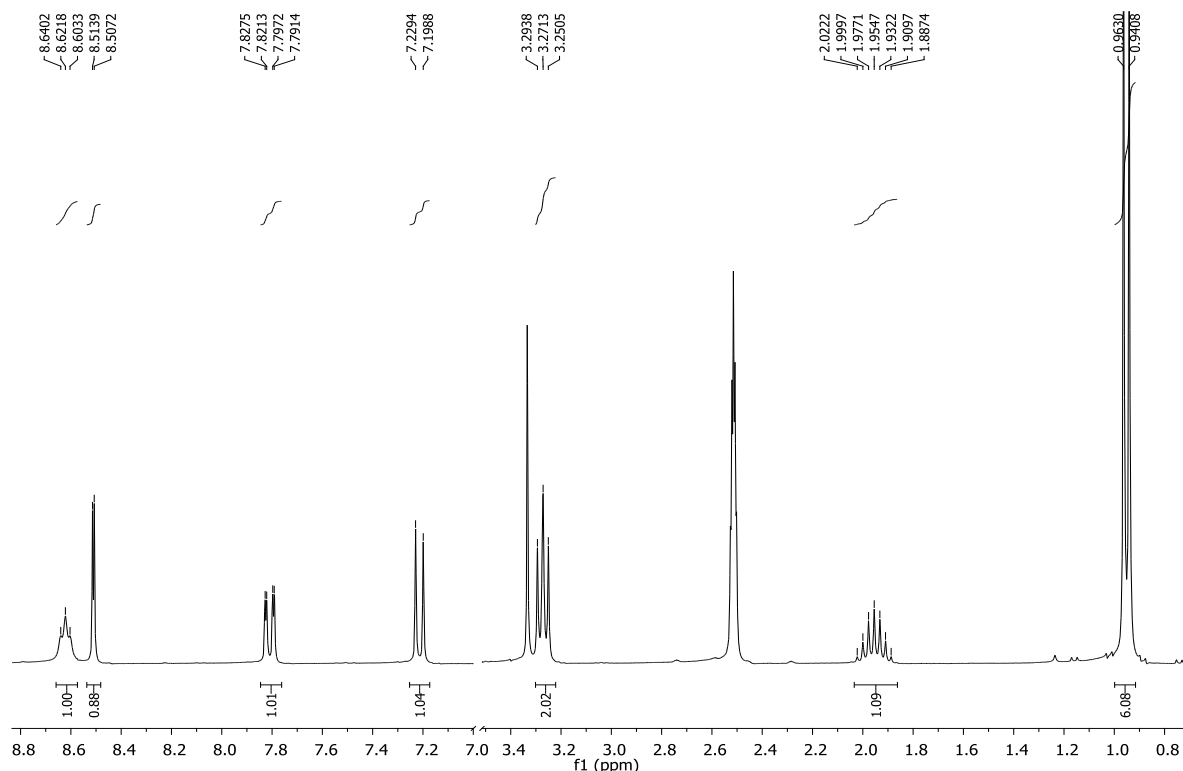
## 4.2. Sinteza ciljanih spojeva

Za sintezu ciljanih spojeva **27-54** potrebno je prvo bilo prirediti *N*-supstituirane derivate 2-aminobenzimidazola **13-15** i 2-amino-5-cijanobenzimidazola **16-18** kao glavne prekursore. Sinteza prekursora je provedena u 3 koraka. U prvom koraku, iz početnih spojeva 1-klor-2-nitrobenzena **1** i 4-klor-3-nitrobenzonitrila **2** pod utjecajem mikrovalnog zračenja nastali su *N*-izobutil-2-nitroanilin **3** i *N*-supstituirani derivati 3-nitrobenzonitrila **4-6** primjenom odgovarajućeg amina u suvišku. Reakcijama aminacije koje su potpomognute mikrovalovima priređeni su spojevi **3-6** (Shema 30.). Strukture dobivenih spojeva potvrđene su <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektroskopijom.



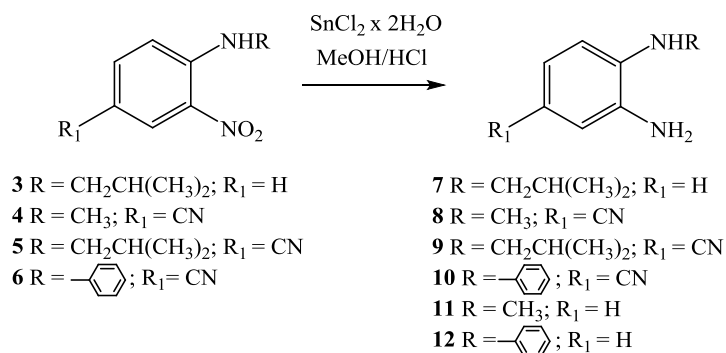
Shema 30. Sinteza spojeva **3-6**

Na Slici 27. prikazan je <sup>1</sup>H NMR spektar 4-*N*-izobutilamino-3-nitrobenzonitrila **5**. Signal na 8,62 ppm odgovara protonu NH skupine koji je pod utjecajem aromatskih protona pomaknut u niže magnetsko polje, a vidljiv je kao triplet. U aromatskom dijelu spektra javljaju se tri signala karakteristična za protone aromatskog prstena - u području od 8,51 do 7,21 ppm. Triplet na 3,27 ppm u alifatskom području spektra pripada dvjema protonima CH<sub>2</sub> skupine, multiplet u području između 2,03 i 1,86 ppm odgovara protonu CH skupine, dok je dublet na 0,95 ppm karakterističan za šest protona dviju CH<sub>3</sub> skupina.



**Slika 27.**  $^1\text{H}$  NMR spektar 4-*N*-izobutilamino-3-nitrobenzonitrila **5**

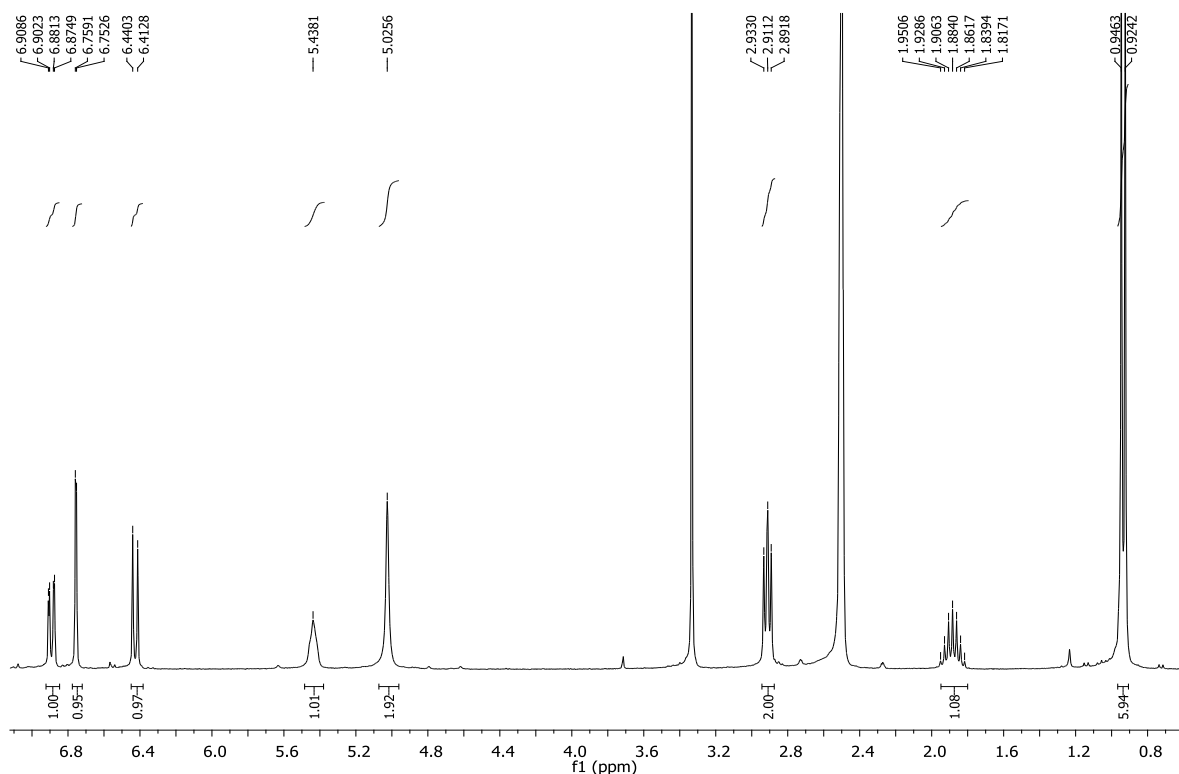
Sljedeći korak sinteze obuhvaćao je pripremu *N*-izobutil-1,2-fenilendiamina **7** i *N*-supstituiranih derivata 3-aminobenzonitrila **8-10** redukcijom derivata 2-nitroanilina **3** i 3-nitrobenzonitrila **4-6** sa  $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  u smjesi metanola i klorovodične kiseline (Shema 31.). Strukture dobivenih spojeva potvrđene su  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijom.



**Shema 31.** Sinteza spojeva **7-10**

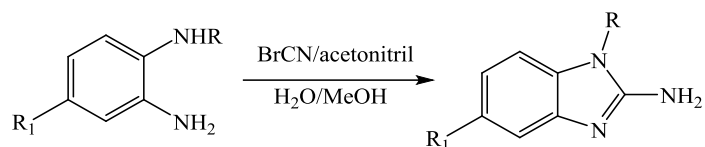
Na Slici 28. prikazan je  $^1\text{H}$  NMR spektar 3-amino-4-*N*-izobutilaminobenzonitrila **9**. Signali u području spektra od 6,89 do 6,43 ppm pripadaju trima aromatskim protonima. Pomakom u više polje na 5,44 ppm vidljiv je širok singlet karakterističan za proton NH skupine koji je u ovom slučaju jače zasjenjen elektronima nego što je to proton NH skupine kod spoja **5**.

Nadalje, singlet na 5,03 ppm odgovara protonima amino skupine što ukazuje na uspješnost redukcije derivata 3-nitrobenzonitrila **5**. U alifatskom području spektra vidljivi su protoni izobutilne skupine: triplet na 2,91 ppm za dva protona CH<sub>2</sub> skupine, multiplet u području od 1,95 do 1,80 ppm za proton CH skupine i dublet na 0,94 ppm za šest protona dviju CH<sub>3</sub> skupina.



**Slika 28.** <sup>1</sup>H NMR spektar 3-amino-4-*N*-izobutilaminobenzonitrila **9**


U trećem koraku sinteze priređeni su *N*-supstituirani derivati 2-aminobenzimidazola **13-15** i 2-amino-5-cijanobenzimidazola **16-18** reakcijama ciklizacije prethodno sintetiziranog *N*-izobutil-1,2-fenilendiamina **7**, derivata 3-aminobenzonitrila **8-10** te *N*-metil-1,2-fenilendiamina **11** i *N*-fenil-1,2-fenilendiamina **12**. Reakcijom s BrCN-om u acetonitrilu dolazi do ciklizacije prstena te nastaju derivati 2-aminobenzimidazola i 2-amino-5-cijanobenzimidazola **13-18** (Shema 32.). Strukture dobivenih spojeva potvrđene su <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektroskopijom, a spoj **13** dodatno je okarakteriziran i masenom spektrometrijom.




7 R = CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; R<sub>1</sub> = H

8 R = CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub> = CN

9 R = CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; R<sub>1</sub> = CN


10 R = ; R<sub>1</sub> = CN

11 R = CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub> = H

12 R = ; R<sub>1</sub> = H


13 R = CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub> = H

14 R = CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; R<sub>1</sub> = H

15 R = ; R<sub>1</sub> = H

16 R = CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub> = CN

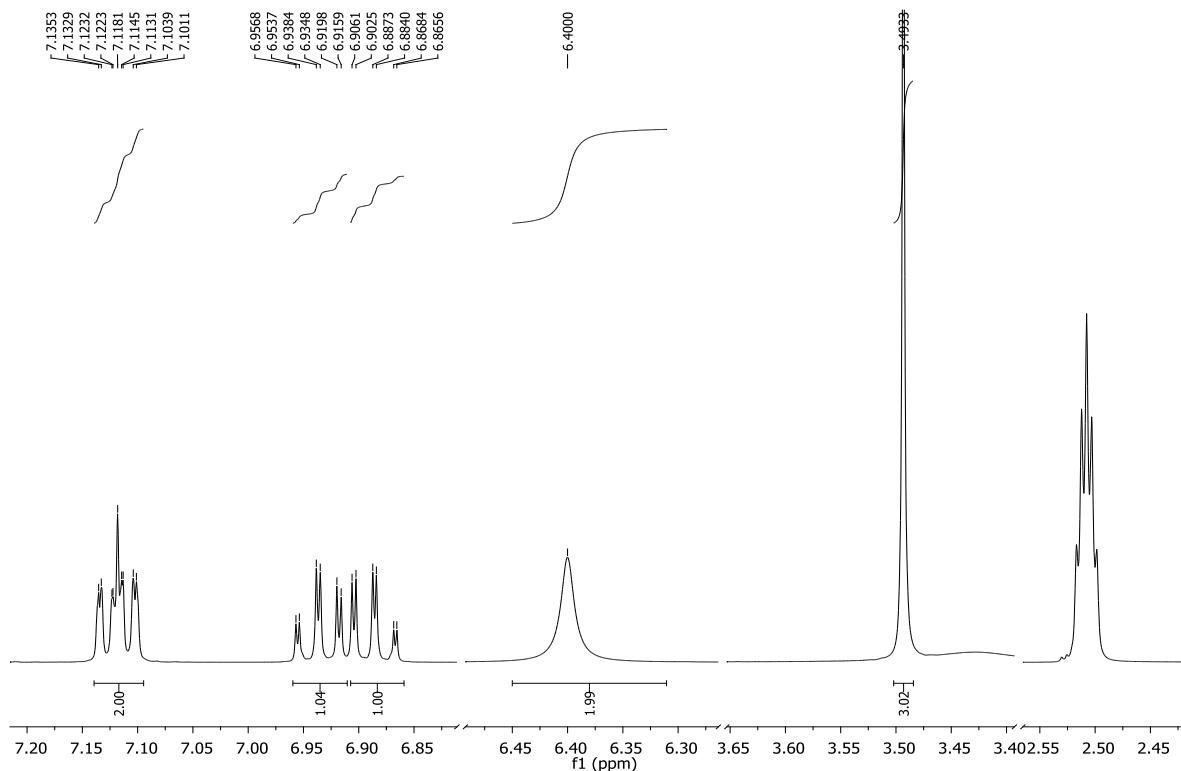
17 R = CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; R<sub>1</sub> = CN

18 R = ; R<sub>1</sub> = CN

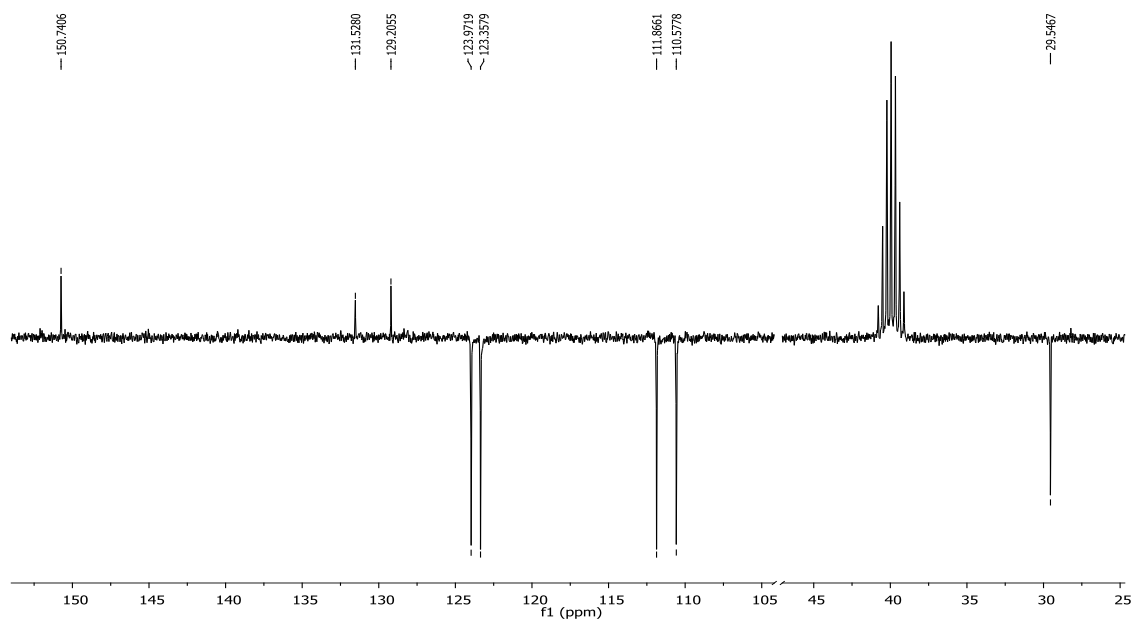
### Shema 32. Sinteza spojeva 13-18

Na Slici 29a. prikazan je <sup>1</sup>H NMR spektar 2-amino-1-metilbenzimidazola **13**. Iz priloženog spektra su jasno vidljivi signali četiri aromatskih protona u području od 7,14 do 6,89 ppm, singlet dvaju protona amino skupine na 6,40 ppm te singlet triju protona CH<sub>3</sub> skupine na 3,49 ppm vezanih za benzimidazolnu jezgru. Dodatnu potvrdu strukture dobivenog spoja **13** dao je <sup>13</sup>C NMR spektar (Slika 29b.). U aromatskom području spektra vidljivo je tri signala koji odgovaraju kvaternim ugljikovim atomima te četiri signala koji pripadaju aromatskim ugljicima CH skupina. Jedan karakterističan signal u alifatskom području spektra odgovara ugljikovom atomu CH<sub>3</sub> skupine.

a)



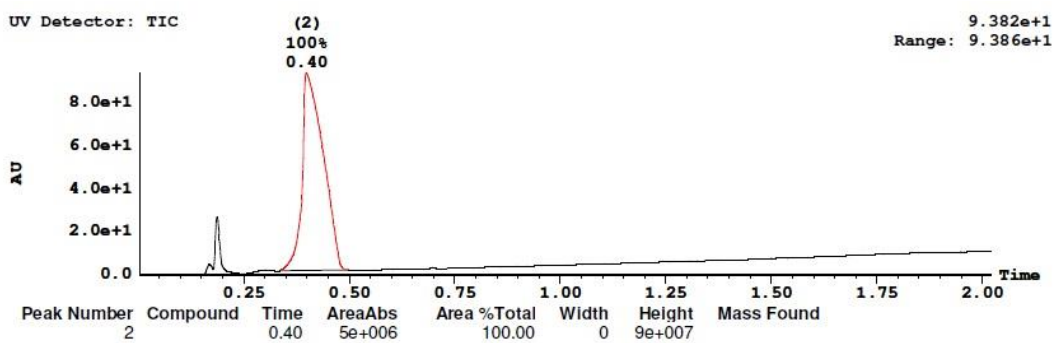
b)



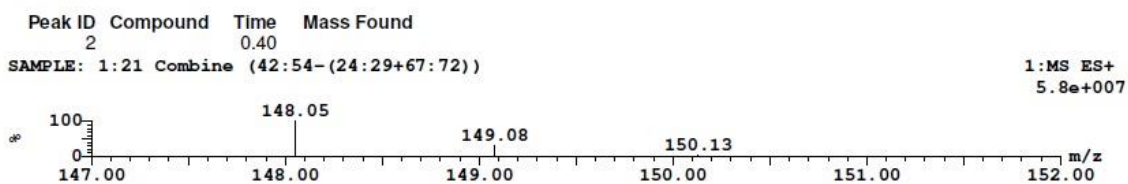
**Slika 29.** a)  $^1\text{H}$  NMR spektar i b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar 2-amino-1-metilbenzimidazola **13**

Struktura sintetiziranog 2-amino-1-metilbenzimidazola **13** dodatno je potvrđena i kromatogramom (Slika 30a.) te masenim spektrom (Slika 30b.). Maseni spektar daje molekularni ion na 148,1 m/z. Sintetiziran je spoj visoke čistoće.

a)



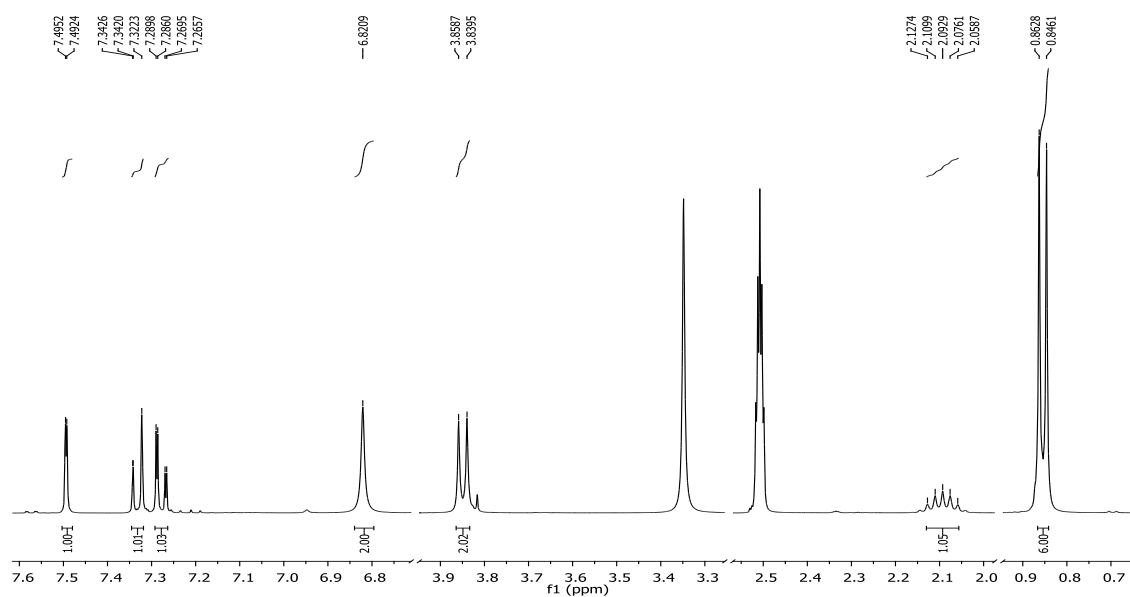
b)



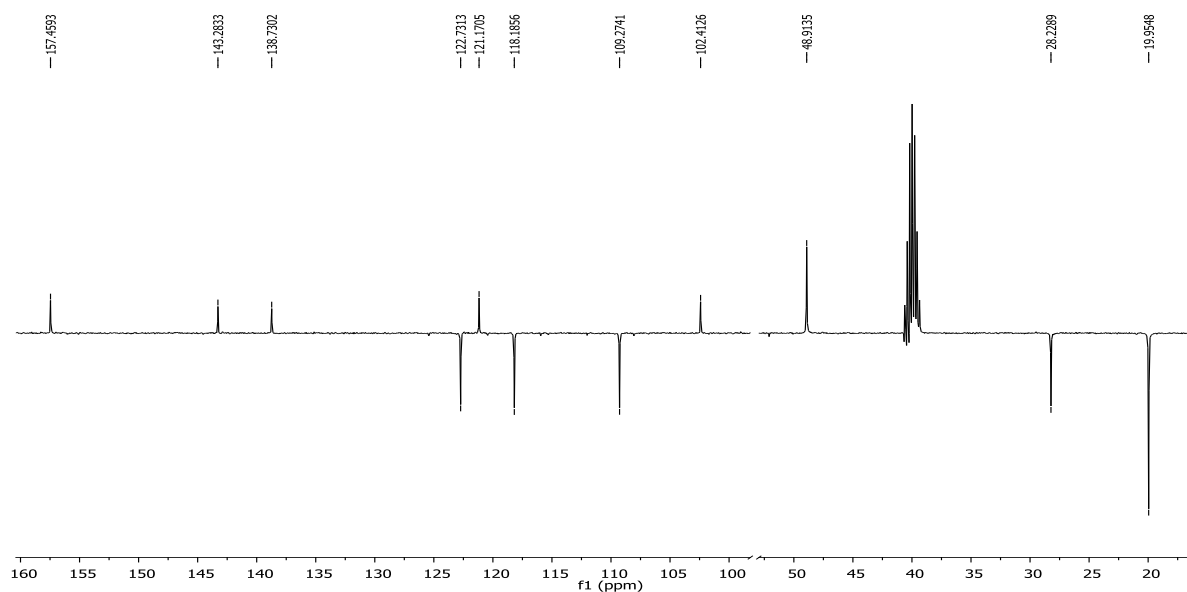
**Slika 30.** a) Kromatogram i b) maseni spektar 2-amino-1-metilbenzimidazola **13**

Na Slici 31a. prikazan je  $^1\text{H}$  NMR spektar 2-amino-5-cijano-1-izobutilbenzimidazola **17**. U nezasjenjenom području spektra od 7,50 do 7,28 ppm vidljivi su signali triju aromatskih protona. Kemijski pomak od 6,82 ppm pripada singletu dvaju protona amino skupine. U alifatskom dijelu spektra na 3,85 ppm vidljiv je dublet dvaju protona  $\text{CH}_2$  skupine, multiplet od 2,13 do 2,06 ppm za jedan proton  $\text{CH}$  skupine te dublet na 0,85 ppm za šest protona dvije  $\text{CH}_3$  skupine. Na Slici 31b. nalazi se  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **17**.

a)



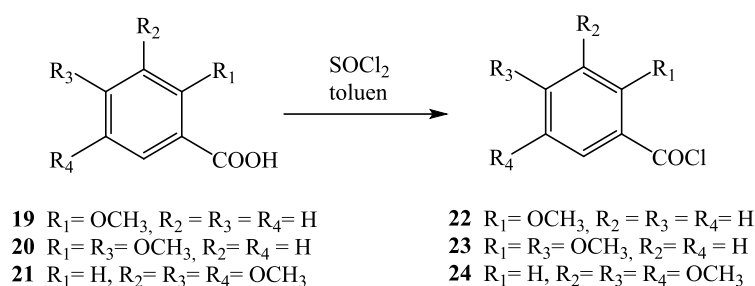
b)



Slika 31. a)  $^1\text{H}$  NMR spektar i b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar 2-amino-5-cijano-1-izobutilbenzimidazola

U aromatskom području spektra mogu se uočiti četiri signala koji odgovaraju kvaternim ugljikovim atomima, tri signala koji pripadaju aromatskim ugljicima CH skupina te jedan signal koji pripada ugljiku CN skupine. U zasjenjenom, alifatskom području spektra vidljivo je tri signala koji pripadaju izobutilnom supstituentu.

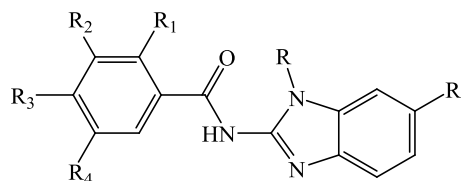
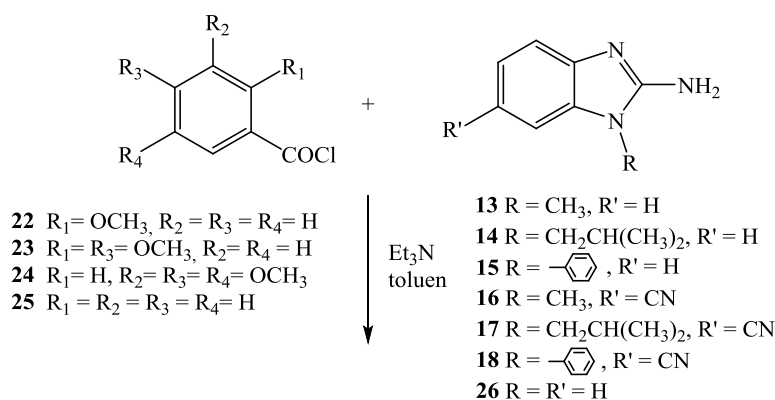
Metoksi supstituirani benzoil-kloridi **22-24** priređeni su iz odgovarajućih karboksilnih kiselina **19-21** reakcijama nukleofilne supstitucije s tionil-kloridom u apsolutnom toluenu kao otapalu, čime je postignuta aktivacija spojeva za daljnji stupanj sinteze (Shema 33.).



**Shema 33.** Priprava spojeva **22-24**

Naposljetku su reakcijama kondenzacije derivata 2-aminobenzimidazola i 2-amino-5-cijanobenzimidazola **13-18** te 2-aminobenzimidazola **26** s odgovarajućim benzoil-kloridima **22-25** u apsolutnom toluenu i uz dodatak trietilamina u suvišku dobiveni *N*-supstituirani derivati benzamida i metoksi supstituiranih benzamida **27-54** (Shema 34.). Reakcija kondenzacije u kojoj nastaje amidna veza između acilne skupine benzoil-klorida i amino skupine benzimidazola, provedena je zagrijavanjem na temperaturi refluksa 24 h nakon čega su hlađenjem istaložili željeni produkti. Strukture konačnih spojeva potvrđene su <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektroskopijom.



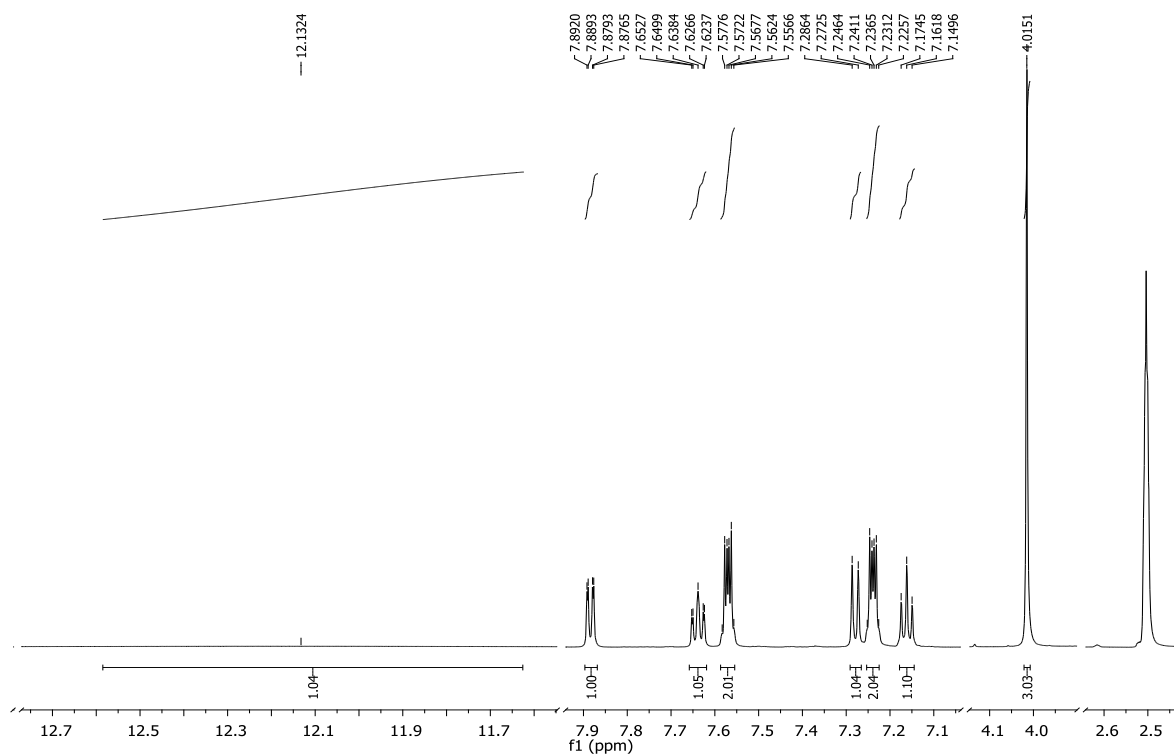


- 27**  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R' = R = \text{H}$   
**28**  $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = R_3 = R_4 = R' = R = \text{H}$   
**29**  $R_1 = R_3 = \text{OCH}_3, R_2 = R_4 = R' = R = \text{H}$   
**30**  $R_1 = \text{H}, R_2 = R_3 = R_4 = \text{OCH}_3, R' = R = \text{H}$   
**31**  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R' = \text{H}, R = \text{CH}_3$   
**32**  $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}, R' = \text{H}, R = \text{CH}_3$   
**33**  $R_1 = R_3 = \text{OCH}_3, R_2 = R_4 = \text{H}, R' = \text{H}, R = \text{CH}_3$   
**34**  $R_1 = \text{H}, R_2 = R_3 = R_4 = \text{OCH}_3, R' = \text{H}, R = \text{CH}_3$   
**35**  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}, R' = \text{CN}, R = \text{CH}_3$   
**36**  $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}, R' = \text{CN}, R = \text{CH}_3$   
**37**  $R_1 = R_3 = \text{OCH}_3, R_2 = R_4 = \text{H}, R' = \text{CN}, R = \text{CH}_3$   
**38**  $R_1 = \text{H}, R_2 = R_3 = R_4 = \text{OCH}_3, R' = \text{CN}, R = \text{CH}_3$   
**39**  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R' = \text{H}, R = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$   
**40**  $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}, R' = \text{H}, R = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$   
**41**  $R_1 = R_3 = \text{OCH}_3, R_2 = R_4 = \text{H}, R' = \text{H}, R = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$   
**42**  $R_1 = \text{H}, R_2 = R_3 = R_4 = \text{OCH}_3, R' = \text{H}, R = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
- 43**  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}, R' = \text{CN}, R = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$   
**44**  $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}, R' = \text{CN}, R = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$   
**45**  $R_1 = R_3 = \text{OCH}_3, R_2 = R_4 = \text{H}, R' = \text{CN}, R = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$   
**46**  $R_1 = \text{H}, R_2 = R_3 = R_4 = \text{OCH}_3, R' = \text{CN}, R = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$   
**47**  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R' = \text{H}, R = \text{C}_6\text{H}_5$   
**48**  $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}, R' = \text{H}, R = \text{C}_6\text{H}_5$   
**49**  $R_1 = R_3 = \text{OCH}_3, R_2 = R_4 = \text{H}, R' = \text{H}, R = \text{C}_6\text{H}_5$   
**50**  $R_1 = \text{H}, R_2 = R_3 = R_4 = \text{OCH}_3, R' = \text{H}, R = \text{C}_6\text{H}_5$   
**51**  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}, R' = \text{CN}, R = \text{C}_6\text{H}_5$   
**52**  $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}, R' = \text{CN}, R = \text{C}_6\text{H}_5$   
**53**  $R_1 = R_3 = \text{OCH}_3, R_2 = R_4 = \text{H}, R' = \text{CN}, R = \text{C}_6\text{H}_5$   
**54**  $R_1 = \text{H}, R_2 = R_3 = R_4 = \text{OCH}_3, R' = \text{CN}, R = \text{C}_6\text{H}_5$

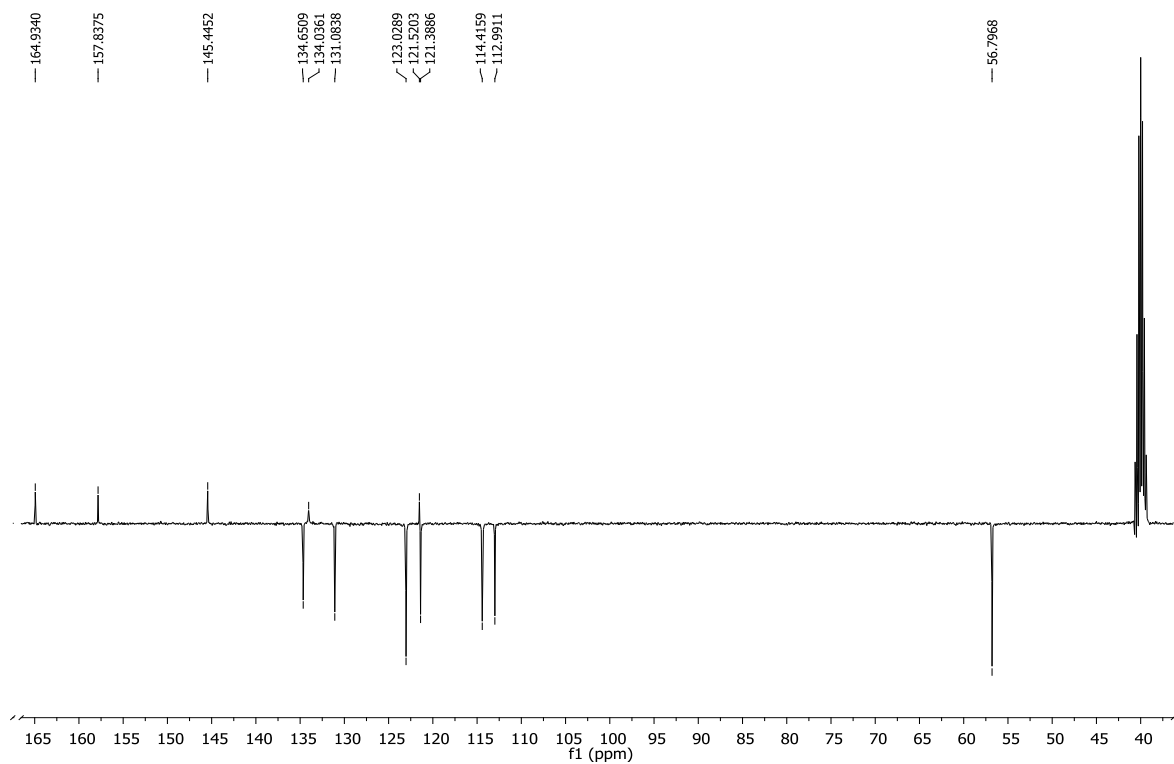
### Shema 34. Priprava ciljanih spojeva 27-54

Na Slici 32a. prikazan je  $^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-2-metoksibenzamida **28**. Na 12,13 ppm nalazi se signal za jedan proton vezan na dušik benzimidazola, dok signal protona amidne veze nije vidljiv. U aromatskom dijelu spektra u području od 7,88 do 7,16 ppm mogu se uočiti signali za osam aromatskih protona benzenske i benzimidalone jezgre. Singlet na 4,02 ppm u alifatskom području spektra odgovara trima protonima  $\text{OCH}_3$  skupine. Struktura spoja **28** potvrđena je i  $^{13}\text{C}$  NMR spektrom prikazanim na Slici 32b. Na spektru su s gornje strane vidljivi signali kvaternih ugljika, pri čemu signal na 164,93 ppm odgovara ugljiku amidne veze. S donje strane spektra, u aromatskom području, nalaze se signali koji odgovaraju ugljicima CH skupina, a na 56,80 ppm nalazi se signal ugljika  $\text{OCH}_3$  skupine.

a)

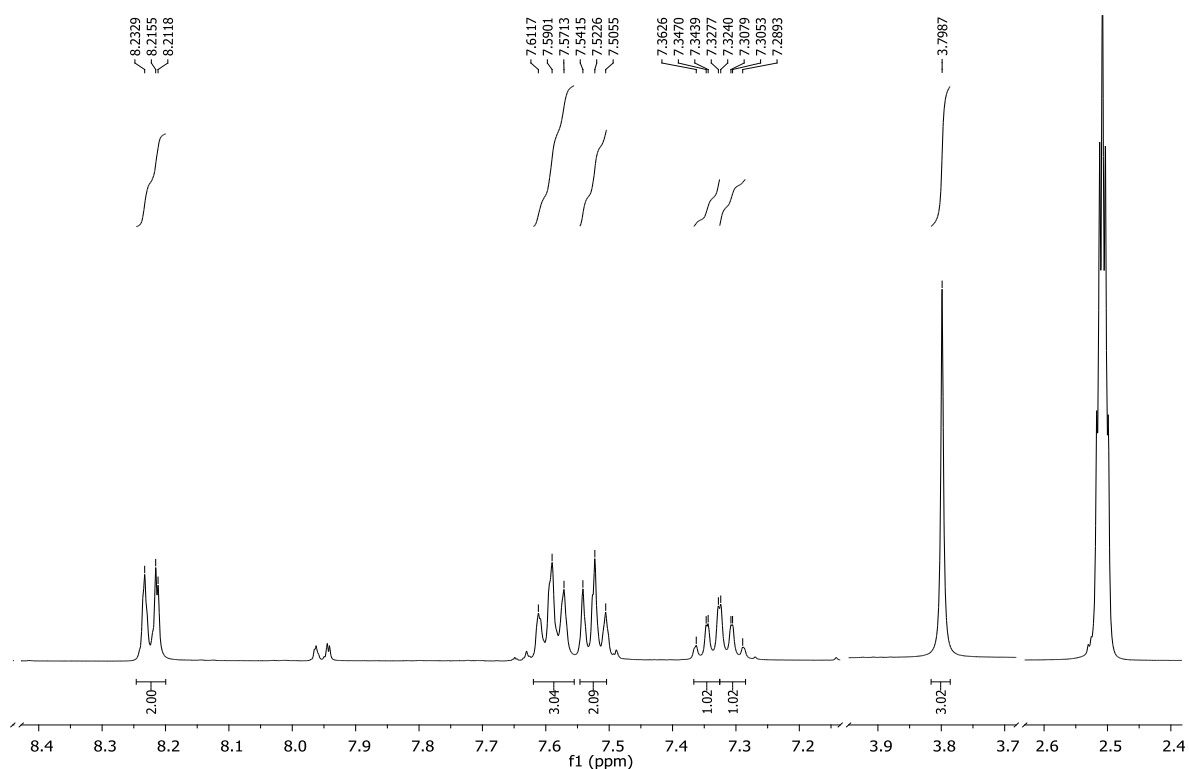


b)

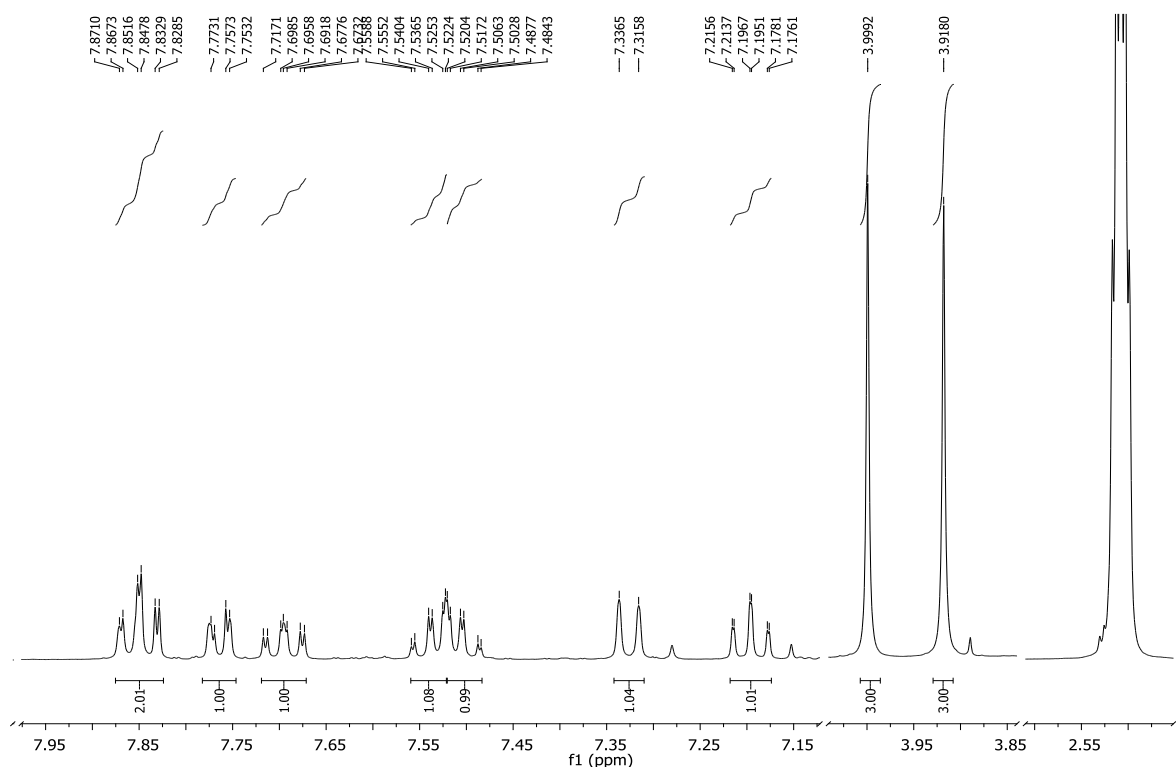


Slika 32. a)  $^1\text{H}$  NMR spektar b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-2-metoksibenzamida **28**

$^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamida **31** prikazan je na Slici 33. U aromatskom području spektra od 8,22 do 7,31 ppm nalaze se signali za devet protona benzenske i benzimidazolne jezgre, dok proton amidne veze nije vidljiv. Kemijski pomak od 3,80 ppm pripada singletu triju protona  $\text{CH}_3$  skupine vezane na benzimidazolni dušik. Na Slici 34. prikazan je  $^1\text{H}$  NMR spektar 2-metoksi-*N*-(1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamida **32** koji u odnosu na spoj **31** ima jednu  $\text{OCH}_3$  skupinu na položaju 2 na benzenu što je i vidljivo iz spektra. U alifatskom dijelu spektra vidljiva su dva singleta na 4,00 ppm i 3,92 ppm koji odgovaraju protonima  $\text{OCH}_3$  i  $\text{CH}_3$  skupine. Također, na spektru je vidljivo i osam aromatskih protona u području od 7,85 do 7,20 ppm.

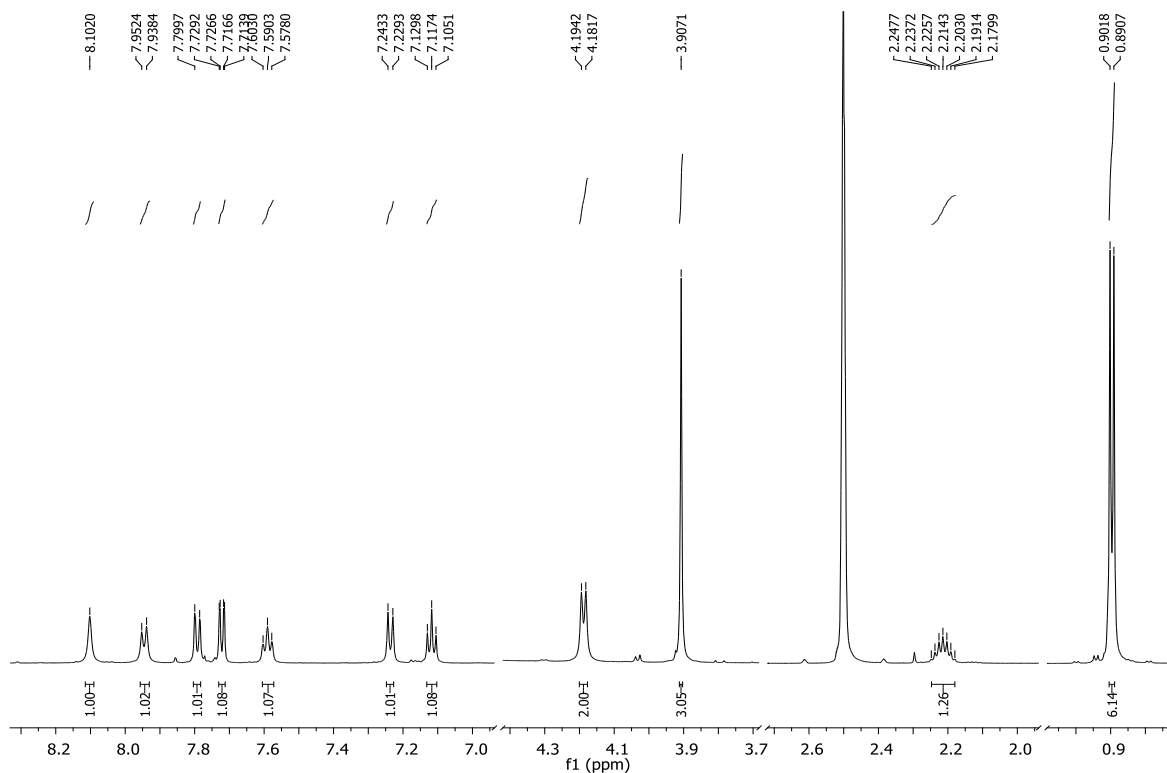


**Slika 33.**  $^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamida **31**



**Slika 34.**  $^1\text{H}$  NMR spektar 2-metoksi-*N*-(1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamida **32**

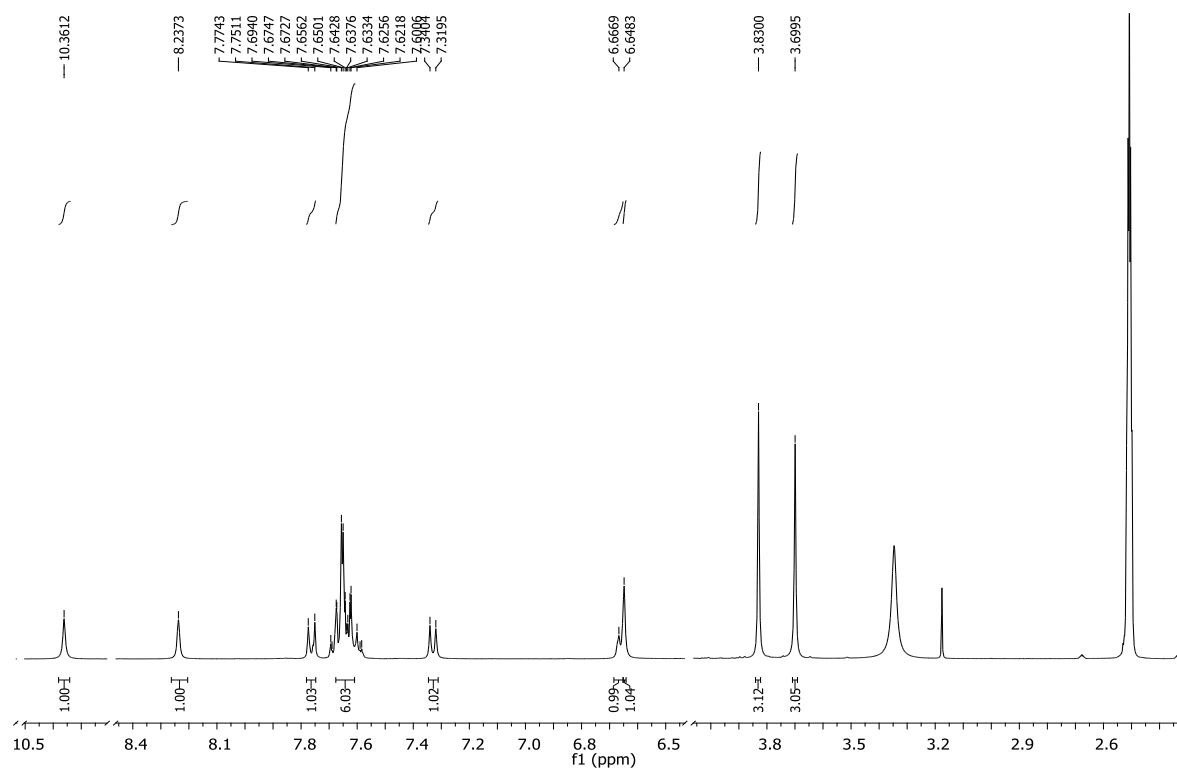
$^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(5-cijano-1-izobutil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-2-metoksibenzamida **44** prikazan je na Slici 35. U nezasjenjenom, aromatskom dijelu spektra od 8,10 do 7,12 ppm vidljivi su signali za sedam protona vezanih na benzimidazolnu te benzensku jezgru. Signali izobutilne skupine vidljivi su u alifatskom području spektra: dublet dvaju protona  $\text{CH}_2$  skupine na 4,19 ppm, multiplet jednog protona  $\text{CH}$  skupine u području od 2,25 do 2,18 ppm te dublet šest protona za dvije  $\text{CH}_3$  skupine na 0,90 ppm. Također, na 3,91 ppm nalazi se singlet triju protona  $\text{OCH}_3$  skupine.



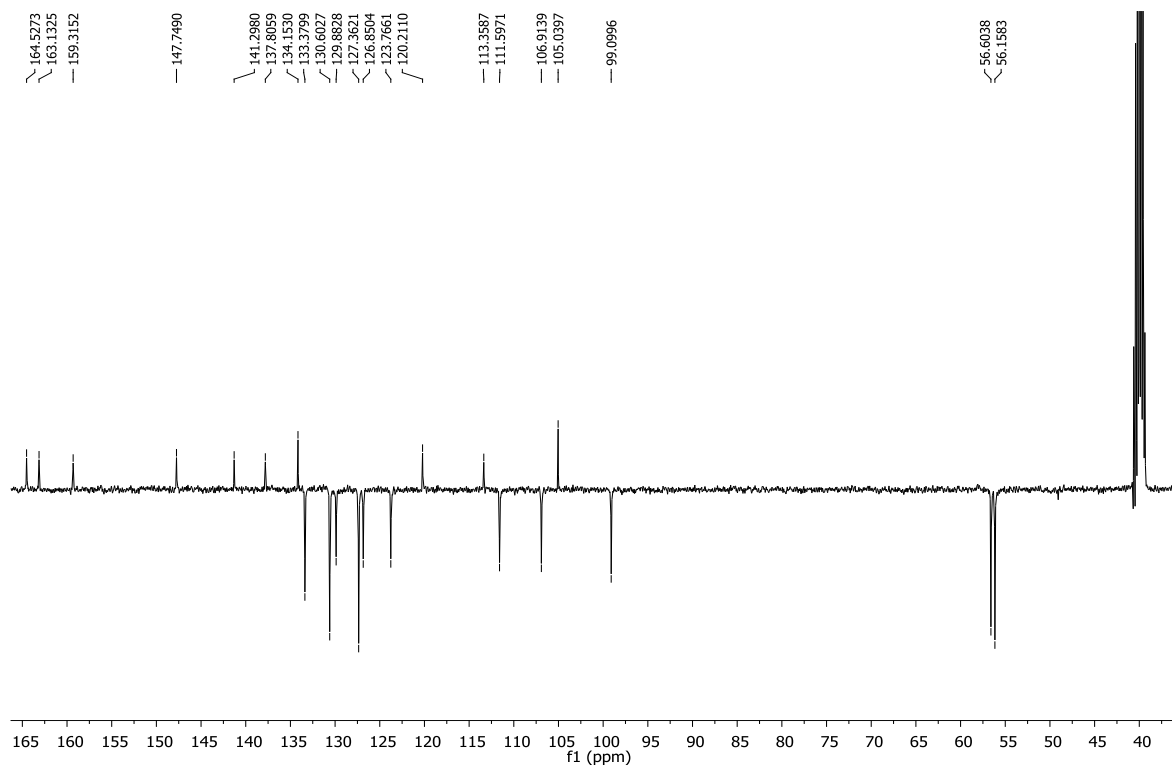
**Slika 35.**  $^1\text{H}$  NMR *N*-(5-cijano-1-izobutil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-2-metoksibenzamida **44**

Na Slici 36a. prikazan je  $^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(5-cijano-1-fenil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-2,4-dimetoksibenzamida **53**. Na 10,36 ppm nalazi se signal protona vezanog na dušik amidne veze. U nezasjenjenom području spektra od 8,24 do 6,65 ppm vidljivo je jedanaest protona benzimidazolne te dviju benzenskih jezgri. Dva singleta u alifatskom dijelu spektra na 3,83 i 3,70 ppm pripadaju protonima dviju  $\text{OCH}_3$  skupina. Na Slici 36b. prikazan je  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **53** gdje je u aromatskom dijelu spektra vidljivo deset signala kvaternih ugljikovih atoma, od kojih signal na 164,5 ppm odgovara karbonilnom ugljiku amidne veze, dok su preostali signali karakteristični za ugljike CH skupina. Signali u alifatskom području spektra na 56,6 i 56,2 ppm odgovaraju ugljicima dviju  $\text{OCH}_3$  skupina.

a)



b)

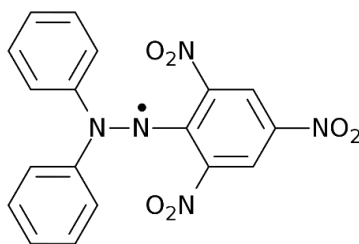


**Slika 36.** a)  $^1\text{H}$  NMR spektar i b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-(5-cijano-1-fenil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-2,4-dimetoksibenzamida **53**

### 4.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti

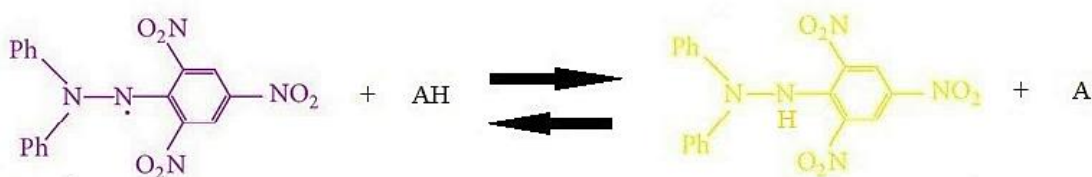
#### 4.3.1. DPPH metoda

Brza i jednostavna metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti sintetiziranih spojeva uključuje uporabu stabilnog slobodnog radikala, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH $\cdot$ ) (Slika 37.).<sup>135</sup> DPPH metodu razvio je M. Blois<sup>136</sup> 1958. godine određivanjem antioksidativne aktivnosti cisteina. Navedena metoda bila je najbolji model za procjenu sposobnosti deaktiviranja slobodnih radikala bilo kojeg novog lijeka.<sup>137</sup> Metoda DPPH (eng. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) je metoda "hvatanja" slobodnih DPPH $\cdot$  radikala odgovarajućim antioksidansom, a temelji se na redukciji radikala. Mjeri se apsorbancija otopine potencijalnog antioksidansa nakon reakcije s DPPH $\cdot$  radikalom. DPPH $\cdot$  je okarakteriziran kao stabilni slobodni radikal zbog delokalizacije elektrona preko cijele molekule, pa on ne dimerizira poput većine drugih slobodnih radikala. Delokalizacija uzrokuje ljubičastu boju s apsorbancijom na 517 nm u otopini etanola.



**Slika 37.** Struktura 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH $\cdot$ ) radikala

Antioksidans reagira s DPPH-om pri čemu se nespareni elektron jednog dušikovog atoma u DPPH $\cdot$  radikalnu reducira primanjem vodikovog atoma iz antioksidansa dajući odgovarajući hidrazin (Slika 38.).<sup>138</sup> Tijekom redukcije dolazi do gubitka intenzivno ljubičaste boje DPPH $\cdot$  radikala i promjene boje u žutu. Što je veća dekolorizacija DPPH $\cdot$  radikala, raste redukcijska moć antioksidansa. Navedenom reakcijom nastaje reducirani DPPHH, a antioksidans postaje slobodni radikal (A $\cdot$ ).<sup>139</sup>



**Slika 38.** Promjena boje DPPH $\cdot$  radikala pri doniranju vodikovog atoma od strane antioksidansa<sup>139</sup>

Sposobnost reduciranja DPPH· radikala odgovarajućim antioksidansom prati se spektrofotometrijski pri 517 nm. Mjerenje se izvodi primjenom višekanalnog čitača mikrotitarskih pločica (ELISA, bio-tek instruments inc.) s automatskim miješajem i snimanjem podataka na računalo. U 100 µL otopine spojeva različitih koncentracija dodano je 100 µL DPPH ( $C_{\text{DPPH}} = 100 \mu\text{mol/mL}$ ) i ostavljeno je 30 minuta na tamnom mjestu na sobnoj temperaturi. Isti je postupak ponovljen i s 50 µL DPPH. Kao slijepa proba korišten je 96 %-tni etanol. Nakon 30 minuta, vrijednosti apsorbancija očitane su na ELISA čitaču pri 517 nm. Rezultati mjerenja izraženi su kao postotak inhibicije DPPH· radikala koji se računa prema izrazu:

$$\% \text{ inhibicije DPPH}\cdot = \frac{(A_{CO} - A_{A30})}{A_{CO}} \cdot 100$$

Pri čemu je:

$A_{CO}$  – apsorbancija kontrole (otopina DPPH· radikala bez dodatka otopine spoja koje ispitujemo) pri  $t = 0$  minuta

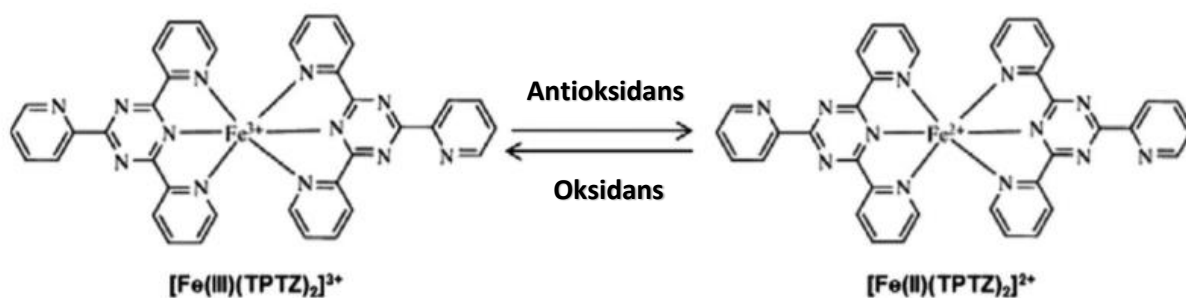
$A_A$  – apsorbancija odgovarajućeg antioksidansa nakon  $t = 30$  minuta

#### 4.3.2. FRAP metoda

FRAP (eng. *ferric reducing/antioxidant power*) metoda jest jednostavna i jeftina metoda mjerenja antioksidativne sposobnosti nekog spoja. Sastoji se od mjerenja promjene u apsorbanciji pri 593 nm, koja je posljedica formiranja plavo obojenog  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ -TPTZ) iz bezbojnog oksidiranog  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TPTZ oblika procesom prijenosa elektrona s antioksidansa.<sup>140</sup> 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. Polureakcija koja ima manje pozitivan redoks potencijal pri reakcijskim uvjetima nego  $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ -TPTZ polureakcija ( $E^\circ = +0,77 \text{ V}$ ), pokrenut će redukciju  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TPTZ oblika (Slika 39.).<sup>141</sup>





**Slika 39.** Reakcija prijelaza  $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$  iona u  $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$  ion<sup>141</sup>

Mjerenje aktivnosti FRAP metodom provodi se na način da se najprije pripremi FRAP reagens miješanjem 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  $\text{FeCl}_3$  (20 mM) te 2,4 mL destilirane vode. U sljedećem koraku 20  $\mu\text{L}$  uzorka pomiješa se s 280  $\mu\text{L}$  FRAP reagensa te se 4 min ostavi na temperaturi 37  $^\circ\text{C}$ , a zatim se mjeri apsorbancija pri 593 nm.

Baždarni pravac napravljen je pomoću 1 mM otopine željezo-sulfata ( $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ).

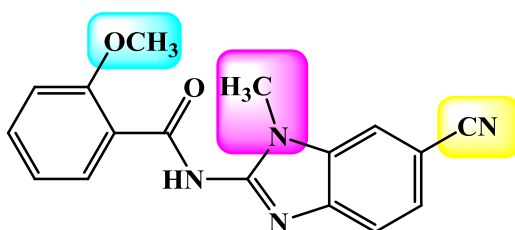
Rezultati dobiveni ispitivanjem antioksidativne aktivnosti novopripređenih amidnih derivata benzimidazola **27-54** prikazani su u Tablici 11. Kao standard za uspoređivanje aktivnosti prilikom ispitivanja korišten je poznati antioksidans BHT (butilirani hidroksitoluen). Iz dobivenih rezultata ispitivanja inhibicije DPPH može se uočiti da najbolje rezultate pokazuju *N*-metilbenzimidazolil supstituirani derivat **31**, *N*-izobutil-5(6)-cijanobenzimidazolil supstituirani derivat s jednom metoksi skupinom **44**, *N*-izobutilbenzimidazolil supstituirani derivat **39**, *N*-izobutilbenzimidazolil supstituirani derivat s tri metoksi skupine **42**, *N*-metil-5(6)-cijanobenzimidazolil supstituirani derivat s jednom metoksi skupinom **36** i *N*-izobutil-5(6)-cijanobenzimidazolil supstituirani derivat s dvije metoksi skupine **45**. Umjerenu inhibicijsku aktivnost pokazuju i trimetoksi supstituirani derivat **30**, fenilni derivat **48** s jednom metoksi skupinom i **49** s dvije metoksi skupine. Najbolju antioksidativnu aktivnost prema FRAP metodi pokazuju *N*-metil-5(6)-cijanobenzimidazolil supstituirani derivat s dvije metoksi skupine **37**, *N*-fenil-5(6)-cijanobenzimidazolil supstituirani derivat s dvije metoksi skupine **53** i *N*-metil-5(6)-cijanobenzimidazolil supstituirani derivat s jednom metoksi skupinom **36**. Uzimajući u obzir rezultate ispitivanja antioksidativne aktivnosti za obje metode, najaktivniji je *N*-metil-5(6)-cijanobenzimidazolil supstituirani derivat s jednom metoksi skupinom **36** koji se može izdvojiti kao predvodni ili vodeći spoj za daljnje optimiranje strukture u svrhu poboljšanja antioksidativne aktivnosti.

**Tablica 11.** Antioksidativna aktivnost ispitivanih derivata amida benzimidazola 27-54

| Spoj       | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>   | R <sub>3</sub>   | R <sub>4</sub>   | R' | R   | % inhibicije DPPH· | FRAP<br>mmolFe <sup>2+</sup> /m<br>g spoja |
|------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----|---|--------------------|--|
| 27         | H                | H                | H                | H                | H  | H   | 14,2               | -  |
| 28         | OCH <sub>3</sub> | H                | H                | H                | H  | H   | 19,9               | 166,61                                     |
| 29         | OCH <sub>3</sub> | H                | OCH <sub>3</sub> | H                | H  | H   | 18,6               | 5,59                                       |
| 30         | H                | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | H  | H   | 42,1               | 358,81                                     |
| 31         | H                | H                | H                | H                | H  | CH <sub>3</sub>                                   | 57,6               | 110,16                                     |
| 32         | OCH <sub>3</sub> | H                | H                | H                | H  | CH <sub>3</sub>                                   | 42,6               | -  |
| 33         | OCH <sub>3</sub> | H                | OCH <sub>3</sub> | H                | H  | CH <sub>3</sub>                                   | 25,6               | 124,28                                     |
| 34         | H                | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | H  | CH <sub>3</sub>                                   | 45,3               | 160,27                                     |
| 35         | H                | H                | H                | H                | CN | CH <sub>3</sub>                                   | -                  | 124,28                                     |
| 36         | OCH <sub>3</sub> | H                | H                | H                | CN | CH <sub>3</sub>                                   | 50,5               | 429,60                                     |
| 37         | OCH <sub>3</sub> | H                | OCH <sub>3</sub> | H                | CN | CH <sub>3</sub>                                   | -                  | 618,10                                     |
| 38         | H                | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | CN | CH <sub>3</sub>                                   | 21,4               | 338,50                                     |
| 39         | H                | H                | H                | H                | H  | CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 53,0               | 179,70                                     |
| 40         | OCH <sub>3</sub> | H                | H                | H                | H  | CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 21,9               | -  |
| 41         | OCH <sub>3</sub> | H                | OCH <sub>3</sub> | H                | H  | CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 3,8                | 5,80                                       |
| 42         | H                | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | H  | CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 51,1               | 217,20                                     |
| 43         | H                | H                | H                | H                | CN | CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 20,3               | 203,50                                     |
| 44         | OCH <sub>3</sub> | H                | H                | H                | CN | CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 53,2               | 154,30                                     |
| 45         | OCH <sub>3</sub> | H                | OCH <sub>3</sub> | H                | CN | CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 47,7               | -  |
| 46         | H                | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | CN | CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 5,7                | 243,30                                     |
| 47         | H                | H                | H                | H                | H  | fenil   | 4,9                | 184,70                                     |
| 48         | OCH <sub>3</sub> | H                | H                | H                | H  | fenil   | 36,7               | -  |
| 49         | OCH <sub>3</sub> | H                | OCH <sub>3</sub> | H                | H  | fenil   | 33,6               | -  |
| 50         | H                | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | H  | fenil   | 4,0                | 236,90                                     |
| 51         | H                | H                | H                | H                | CN | fenil   | 5,2                | 138,98                                     |
| 52         | OCH <sub>3</sub> | H                | H                | H                | CN | fenil   | 26,8               | 221,31                                     |
| 53         | OCH <sub>3</sub> | H                | OCH <sub>3</sub> | H                | CN | fenil   | 15,6               | 506,70                                     |
| 54         | H                | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | CN | fenil   | 4,4                | 132,56                                     |
| <b>BHT</b> | -                | -                | -                | -                | -  | -   | -                  | 679,15                                     |

Nadalje, iz dobivenih se rezultata može zaključiti da broj metoksi skupina na fenilnoj jezgri koja je amidnom vezom povezana s benzimidazolnom jezgrom značajno utječe na antioksidativnu aktivnost. Također, primijećen je i značajan utjecaj supstituenta na N atomu benzimidazolne jezgre na antioksidativnu aktivnost. Iako *N*-metil-5(6)-cijanobenzimidazolil supstituirani derivat s jednom metoksi skupinom **36** pokazuje najizraženiju antioksidativnu aktivnost u obje korištene metode, najveći utjecaj na povećanje aktivnosti ima izobutilni supstituent na N atomu benzimidazolne jezgre.

Zaključno, priređeni amidni derivati *N*-supstituiranih derivata benzimidazola s promjenjivim brojem metoksi skupina na fenilnoj jezgri i različitom vrstom supstituenta vezanog na N atom benzimidazolne jezgre, pokazuju obećavajuću antioksidativnu aktivnost. Daljnjim optimiranjem strukture, posebice *N*-metil-5(6)-cijanobenzimidazolil supstituiranog derivata s jednom metoksi skupinom **36** (Slika 40.), mogla bi se poboljšati antioksidativna aktivnost.



**Slika 40.** Predvodni derivat **36** s najizraženijom antioksidativnom aktivnosti u obje korištene metode

## **5. ZAKLJUČCI**

- U ovom radu priređeni su sljedeći spojevi: *N*-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamid **27**, *N*-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-2-metoksibenzamid **28**, *N*-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-2,4-dimetoksibenzamid **29**, *N*-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-3,4,5-trimetoksibenzamid **30**, *N*-(1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamid **31**, 2-metoksi-*N*-(1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamid **32**, 2,4-dimetoksi-*N*-(1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamid **33**, 3,4,5-trimetoksi-*N*-(1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamid **34**, *N*-(5-cijano-1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamid **35**, *N*-(5-cijano-1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-2-metoksibenzamid **36**, *N*-(5-cijano-1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-2,4-dimetoksibenzamid **37**, *N*-(5-cijano-1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-3,4,5-trimetoksibenzamid **38**, *N*-(1-izobutil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamid **39**, *N*-(1-izobutil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-2-metoksibenzamid **40**, *N*-(1-izobutil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-2,4-dimetoksibenzamid **41**, *N*-(1-izobutil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-3,4,5-trimetoksibenzamid **42**, *N*-(5-cijano-1-izobutil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamid **43**, *N*-(5-cijano-1-izobutil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-2-metoksibenzamid **44**, *N*-(5-cijano-1-izobutil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-2,4-dimetoksibenzamid **45**, *N*-(5-cijano-1-izobutil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-3,4,5-trimetoksibenzamid **46**, *N*-(1-fenil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamid **47**, 2-metoksi-*N*-(1-fenil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamid **48**, 2,4-dimetoksi-*N*-(1-fenil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamid **49**, 3,4,5-trimetoksi-*N*-(1-fenil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamid **50**, *N*-(5-cijano-1-fenil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)benzamid **51**, *N*-(5-cijano-1-fenil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-2-metoksibenzamid **52**, *N*-(5-cijano-1-fenil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-2,4-dimetoksibenzamid **53**, *N*-(5-cijano-1-fenil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-3,4,5-trimetoksibenzamid **54**.
- Glavni prekursori, *N*-supstituirani derivati 2-aminobenzimidazola **13-15** i 2-amino-5-cijanobenzimidazola **16-18**, dobiveni su trostupanjskom sintezom polazeći od 1-klor-2-nitrobenzena **1** i 4-klor-3-nitrobenzonitrila **2**.
- Mikrovalovima potpomognutim reakcijama aminacije iz polaznih su spojeva **1** i **2** u prisutnosti odgovarajućih amina priređeni *N*-izobutil-2-nitroanilin **3** i *N*-supstituirani derivati 3-nitrobenzonitrila **4-6**.
- Redukcijom spojeva **3-6** s SnCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O priređeni su *N*-izobutil-1,2-fenilendiamin **7** i *N*-supstituirani derivati 3-aminobenzonitrila **8-10**.
- Iz spojeva **7-10** te kupovnih, *N*-metil-1,2-fenilendiamina **11** i *N*-fenil-1,2-fenilendiamina **12**, reakcijama ciklizacije uz BrCN u acetonitrilu priređeni su prekursori **13-18**.
- Metoksi supstituirani benzoil-kloridi **22-24** priređeni su iz odgovarajućih karboksilnih kiselina **19-21** reakcijama nukleofilne supstitucije s tionil-kloridom u toluenu.

- Reakcijama kondenzacije *N*-supstituiranih derivata 2-aminobenzimidazola, 2-amino-5-cijanobenzimidazola **13-18** i 2-aminobenzimidazola **26** s odgovarajućim benzoil-kloridima **22-25** u apsolutnom toluenu uz trietilamin priređeni su *N*-supstituirani derivati benzamida i metoksi supstituiranih benzamida **27-54**.
- Strukture novosintetiziranih spojeva potvrđene su <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektroskopijom, a nekim je spojevima struktura dodatno okarakterizirana i masenom spektrometrijom.
- Spojevima **27-54** ispitana je antioksidativna aktivnost korištenjem DPPH i FRAP metode.
- Najveću antioksidativnu aktivnost primjenom DPPH metode pokazali su spojevi **31, 36, 39, 42, 44** i **45**, dok su se spojevi **36, 37** i **53** pokazali najaktivnijim primjenom FRAP metode.
- Iz dobivenih rezultata vidljivo je da na antioksidativnu aktivnost utječe broj metoksi skupina na fenilnoj jezgri te supstituent na dušikovom atomu benzimidazolne jezgre, pri čemu se najboljim u obje metode pokazao *N*-metil-5(6)-cijanobenzimidazolil supstituirani derivat **36** s jednom metoksi skupinom na fenilnoj jezgri.

## **6. ZAHVALE**

*Iznimno se zahvaljujemo našoj mentorici prof. dr. sc. Marijani Hranjec na ukazanom povjerenju, susretljivosti, srdačnosti, strpljenju te stručnom vođenju i pomoći koje nam je pružila prilikom izrade i pisanja ovog rada.*

*Veliko hvala asistentici Anji Beč, mag. app. chem na ljubaznosti, susretljivosti, stručnoj pomoći te uvijek ugodnoj radnoj atmosferi u laboratoriju tijekom provođenja eksperimentalnog dijela ali i pisanja rada.*

*Također se zahvaljujemo dr. sc. Kristini Starčević i asistentici Petri Roškarić, mag. appl. chem. sa Zavoda za kemiju i biokemiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na pomoći pri određivanju antioksidativne aktivnosti.*

*Zahvaljujemo se svim ostalim djelatnicima Zavoda za organsku kemiju na pristupačnosti i ugodnoj radnoj atmosferi.*

*Posebno se zahvaljujemo svojim obiteljima na velikoj podršci tijekom čitavog školovanja.*



## **7. LITERATURA**

1. A. K. Ghose, V. N. Viswanadhan, J. J. Wendoloski, *J. Comb. Chem.* **1** (1999) 55–68.
2. J. S. Carey, D. Laffan, C. Thomson, M. T. Williams, *Org. Biomol. Chem.* **4** (2006) 2337–2347.
3. T. J. Deming, *Prog. Polym. Sci.* **32** (2007) 858–875.
4. D.L.Nelson, M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry* (2013) 155–170.
5. L. Stryer, *Biochemistry* (1995) 17–25.
6. C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **61** (2005) 10827–10828.
7. P. Muller, *Pure and Applied Chemistry* **66** (1994) 1077–1184.
8. B. S. Jursic, Z. Zdravkovski, *Synth. Commun.* **23** (1993) 2761–2770.
9. V. Gotor, *Bioorg. Med. Chem.* **7** (1999) 2189–2197.
10. F. Van Rantwijk, M. A. P. J. Hacking and R. A. Sheldon, *Monatsh. Chem.* **131** (2000) 549–569.
11. E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.* **38** (2009) 606–631.
12. <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/schmidt-reaction.shtm> (pristupljeno 12. veljače 2020.)
13. <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/ugi-reaction.shtm> (pristupljeno 12. veljače 2020.)
14. B. R. Kim, H.-G. Lee, S.-B. Kang, G. H. Sung, J.-J. Kim, J. K. Park, S.-G. Lee, Y.-J. Yoon, *Synthesis* **44** (2012) 42–50.
15. R. Bishop, *Ritter-type Reactions. Comprehensive Organic Synthesis* (1991) 261–300.
16. K. L. Reddy, *Tetrahedron Lett.* **44** (2003) 1453–1455.
17. E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.* **38** (2009) 606–631.
18. M. W. Williams, G. T. Young, *J. Chem. Soc.* (1963) 881–889.
19. B. Weinstein, A. E. Pritchard, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1** (1972) 1015–1020.
20. A. Bodanszky, L. E. Conklin, *Chem. Commun.* (1967) 773–774.
21. C. Van der Auwera, S. Van Damme, M. J. O. Anteunis, *Int. J. Pept. Protein Res.* **29** (1987) 464–471.
22. G. W. Anderson, F. M. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.* **80** (1958) 2902–2903.
23. N. Izumiya, M. Muraoka, *J. Am. Chem. Soc.*, **91** (1969) 2391–2392.
24. E. Fischer, E. Fourneau, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **34** (1901) 2688–2877.
25. J. Pizey, S. Wiley, *Synthetic Reagents* **1** (1974) 321–357
26. (a) R. Adams, L. H. Ulrich, *J. Am. Chem. Soc.* **42** (1920) 599–611. (b) I. Kuwajima, H. Urabe, In *Organic Syntheses* **8** (1993) 486–489.

27. S. Knapp, F.S. Gibson. In *Organic Syntheses* **9** (1998) 516–521.
28. A. J. Pearson, W. R. Roush, *Handbook of Reagents for Organic Synthesis: Activating Agents and Protecting Groups* (1999) 333.
29. J. Klosa, *J. Prakt. Chem (Leipzig)* **19** (1962) 45-55.
30. M. F. Antell, S. Patai, *The Chemistry of Acyl Halides* (1972) 40-44.
31. K. Venkataraman, D.R. Wagle, *Tetrahedron Lett.* **32** (1979) 3037–3040.
32. F. Sanchez-Sancho, E. Mann, B. Herradon, *Synlett* **4** (2000) 509–513.
33. E. Bouron, G. Goussard, C. Marchand, M. Bonin, X. Pannecoucke, J. Quirion, H. Husson, *Tetrahedron Lett.* **40** (1999) 7227–7230.
34. U. Ragnarsson, L. Grehn, *Acc. Chem. Res.* **31** (1998) 494–501.
35. H. M. Meshram, G. S. Reddy, M. M. Reddy, J. S. Yadav, *Tetrahedron Lett.* **39** (1998) 4103–4106.
36. F.I. Luknitskii, B.A. Vovsi, *Usp. Khim.* **38** (1969) 1072–1088.
37. Y. Klausner, M. Bodansky, *Synthesis* (1974), 549–559.
38. Th. Curtius, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **35** (1902) 3226–3228.
39. (a) T. Curtius, *Ber.* **23** (1890) 3023. (b) T. Curtius, *J. Prakt. Chem. [2]* **50** (1894) 275. (c) P. A. S. Smith, *Org. React.* **3** (1946) 337–449.
40. T. Shioiri, K. Ninomiya, S.Y. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.* **94** (1972) 6203–6205.
41. R. Paul, W. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.* **82** (1960) 4596–4600.
42. H. A. Staab, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **609** (1957) 75–83.
43. H. A. Staab, M. Lueking, F. H. Duerr, *Chem. Ber.* **95** (1962) 1275–1283.
44. D. J. Dale, J. Draper, P.J. Dunn, M. L. Hughes, F. Hussain, P.C. Levett, G.B. Ward, A.S. Wood, *Org. Process Res. Dev.* **6** (2002) 767–772.
45. M. Mikolajczyk, P. Kielbasinski, *Tetrahedron* **37** (1981) 233–284.
46. C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **61** (2005) 10827–10852.
47. J. R. Vaughan, R. L. Osato, *J. Am. Chem. Soc.* **73** (1951) 5553.
48. S.J. Wittenberger, M.A. McLaughlin, *Tetrahedron Lett.* **40** (1999) 7175–7178.
49. S. Kumar, *Asian Journal of Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences.* **1** (2014) 27–44.
50. I. K. Celikyurt, *Pharm Anal Acta* **3** (2011) 2153–2435.
51. H. A. Matill, *Annu Rev Biochem.* **16** (1947) 177–192.
52. A. Szent-Györgyi, *Biochem. J.* **22** (1928) 1387–1409.
53. I. Pinchuk, H. Shoval, Y. Dotan, D. Lichtenberg, *Chemistry and Physics of Lipids* **165** (2012) 638–647.

54. A. A. Hamid, O. O. Aiyelaagbe, L. A. Usman, O. M. Ameen, A. Lawal, *Afr. J. Pure Appl. Chem.* **4** (2010) 142–151.
55. J. Ghosh, E. Myers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95** (1998) 13182–13187.
56. G. Y. Yin,, Y.F. Yin, X.F. He, *Chin. J. Integr. Tradit. Western Med.*, **15** (1995) 601–603.
57. Y. S. Bae, S.W. Kang, M.S. Seo, I.C. Baines, E. Tekle, P.B. Chock, S.G. Rhee, *J. Biol. Chem.*, **272** (1997) 217–221.
58. Y. Z. Fang, S. Yang, G.Y. Wu, *Nutrition*, **18** (2002) 872–879.
59. M. Baunthiyal, V. Singh, S. Dwivedi, *Int. J. Pharmacol.*, **13** (2017) 874–889.
60. J. C. Kefer, A. Agarwal, E. Sabanegh, *Int J Urol*, **16** (2009) 449–457.
61. K. D. Entian, F. K. Zimmermann, *Mol. Gen. Genet.*, **177** (1980) 345–350.
62. P. Dörmann, *Planta* **225** (2007) 269–276.
63. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, Dietary Reference Intakes: Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington, DC: National Academy Press, 2000.
64. R. J. Glynn, P. M. Ridker, S. Z. Goldhaber, R. Y. Zee, J. E. Buring, *Circulation*, **116** (2007) 1497–1503.
65. S. D. Flanagan, S. H. Barondes, *J. Biol. Chem.*, **250** (1975) 1484–1489.
66. X. Liang, C. Ma, X. Yan, X. Liu, F. Liu, *Trends in Food Science & Technology* **93** (2019) 185–196.
67. A. V. Rao, S. Agarwal, *Journal of the American College of Nutrition*, **19** (2000) 563–569.
68. P. DiMascio, S. Kaiser, H. Sies, *Arch Biochem Biophys* **274** (1989) 532–538.
69. R. F. Burk, *Nutrition in Clinical Care*, **5** (2002) 75–79.
70. M. E. Embuscado, *Journal of Functional Foods*, **18** (2015) 811–819.
71. A. Meister, S. S. Tate, *Annu Rev Biochem.* **45** (1976) 559–604.
72. J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon, Antioxidants in food: practical application, Cambridge, England *Woodhead Publishing Limited*, (2000) 22–70.
73. A. W. Yehye , N. A. Rahman, A. Ariffin, S. B. A. Hamid, A. A. Alhadi, F. A. Kadir, M. Yaeghoobi, *Eur J Med Chem.*, **101** (2015) 295–312.
74. N. M. Iovine, S. Pursnani, A. Voldman, G. Wasserman, M. J. Blaser, Y. Weinrauch, *Infection and Immunity* **76** (2008) 986–993.
75. S. M. Khopde, K. I. Priyadarshi, H. Mohaan, V. B. Gawandi, J. G. Satav, J. V. Yakhmi, M. M. Banavalikar, M. K. Biyani, J. P. Mittal, *Curr Sci*, **81** (2001) 185–190.
76. N. tailor, M. Sharma, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **13** (2013) 280–297.
77. K. Neha, M. R. Haider, A. Pathak, M. S. Yar, *Eur J Med Chem* **178** (2019) 687–704

78. A. Ayala, F. M. Muñoz, S. Argüelles, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2014** (2014) 1–31.
79. B. Halliwell, S. Chirico, *Am J Clin Nutr*, **57** (1993) 715–725.
80. R. J. Schaur, H. Zollner, H. Esterbauer, Biological effects of aldehydes with particular attention to 4-hydroxynonenal and malonaldehyde, U: C. Vigo-Pelfrey (ed.), *Membrane lipid oxidation*. CRC Press, Boca Raton, Florida, (1991) 141–163.
81. A. Č. Gašparović, T. Lovaković, N. Žarković, *Period biol*, **112** (2010) 433–439.
82. R. J. Schaur, *Molecular Aspects of Medicine*, **24** (2003) 149–159.
83. H. Esterbauer, P. Eckl, A. Ortner, *Mutation Research*, **238** (1990) 223–233.
84. H. Esterbauer, K. H. Cheeseman, *Methods in Enzymology*, **186** (1990) 407–421.
85. M. Giera, H. Lingeman, W. M. A. Niessen, *Chromatographia*, **75** (2012) 433–440.
86. K. A. Massey, A. Nicolaou, *Biochemical Society Transactions*, **39** (2011) 1240–1246.
87. H. Esterbauer, R. J. Schaur, H. Zollner, *Free Radical Biology and Medicine*, **11** (1991) 81–128.
88. A. Negre-Salvayre, C. Coatrieux, C. Ingueneau, R. Salvayre, *British Journal of Pharmacology*, **153** (2008) 6–20.
89. C. Michiels, M. Raes, O. Toussaint, J. Remacle, *Free Radic Biol Med* **17** (1994) 235–248.
90. D. H. Boschelli, D. T. Connor, D. A. Bornemeier, R. D. Dyer, J. A. Kennedy, P. J. Kuipers, G. C. Okonkwo, D. J. Schrier, C. D. Wright, *J. Med. Chem.* **36** (1993) 1802–1810.
91. E. D. Shams, A. A. B. Hazzaa, *Pharmazie* **29** (1974) 761–763.
92. A. Tsotinis, A. Varvaresou, T. Calogeropoulou, T. Siatra- Papastaikoudi, A. Tiligada, *Arzneim.-Forsch./ Drug Res.* **47** (1997) 307–310.
93. J.T. Witkowski, R. K. Robins, G. P. Khare, R. W. Sidwell, *J. Med. Chem.* **16** (1973) 935–937.
94. I. Andreadou, A. Tasouli, E. Bofilis, M. Chrysselis, E. Rekka, A. Tsantili-Kakoulidou, E. Iliodromitis, T. Siatra, D. T. Kremastinos, *Chem. Pharm. Bull.* **50** (2002) 165–168.
95. P. Marakos, S. Papakonstantinou-Garoufalias, E. Tani, P.N. Kourounakis, G. Athanasiou, A. Chytyroglou-Lada, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **52** (2002) 572–577.
96. H. F. Ridley, R. G. W. Spickett, G. M. Timmis, *J. Heter. Chem.* **2** (1965) 453–456.
97. H. Heaney, S. V. Ley, *J. Chem. Soc. Perkin* **1** (1973) 499–500.
98. P. A. S. Smith, R. Adams, W. E. Bachmann, L. F. Fieser, J. R. Johnson, H. R. Snyder, *Organic Reactions* **3** (1949) 337.
99. T. Siatra-Papastaikoudi, A. Tsotinis, C. P. Raptopoulou, C. Sambani, H. Thomou, *Eur. J. Med. Chem.* **30** (1995) 107–114.

100. A. Varvaresou, T. Siatra-Papastaikoudi, A. Tsotinis, A. Tsantili- Kakoulidou, A. Vamvakides, *Farmacology* **53** (1998) 320–326.
101. M. Iscan, E. Arinc, N. Vural, M. Y. Iscan, *Comp. Biochem. Physiol.* **77C** (1984) 177–190.
102. I. I. Koleva, T. A. Van Beek, J. P. Linssen, A. De Groot, L. N. Evstatieva, *Phytochem. Anal.* **13** (2002) 8–17.
103. J. A. Horstman, M. Z. Wrona, G. Dryhurst, *Bioorg Chem* **30** (2002) 371–382.
104. R. Hardeland, B. Poeggeler, *J Pineal Res* **34** (2003) 233–241.
105. B. Can-Eke, M. O. Puskullu, E. Buyukbingol, M. A. Iscan, *Chem Biol Interact* **113** (1998) 65–77.
106. C. L. Moyle, M. Chern, (1964); US 3152142.
107. M. Y. Iscan, E. Buyukbingol, M. Iscan, F. Sahin, C. Safak, *Comp Biochem Physiol* **92** (1989) 109–115.
108. H. Orhan, G. Sahin, *Exp Toxicol Path* **53** (2001) 133–140.
109. C. Kuş, F. Sözüdönmez, N. Altanlar, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **342** (2009) 54–60.
110. H. Kogen, N. Toda, K. Tago, S. Marumoto, K. Takami, M. Ori, N. Yamada, K. Koyama, S. Naruto, K. Abe, R. Yamazaki, T. Hara, A. Aoyagi, Y. Abe, T. Kaneko, *Org. Lett.* **4** (2002) 3359–3362.
111. J. J. Harnett, M. Auguet, I. Viosat, C. Dolo, D. Bigg, P. E. Chabrier, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12** (2002) 1439–1442.
112. J. E. De Araújo, J. P. Huston, M. Brandão, *Eur. J. Pharm.* **432** (2001) 43–51.
113. W. Nawrocka, M. Zimecki, *Arch. Pharm.* **331** (1998) 249–253.
114. G. Trapani, M. Franco, A. Latrofa, G. Genchi, V. Iacobazzi, C. A. Ghiani, E. Maciocco, G. Liso, *Eur. J. Med. Chem.* **32** (1997) 83–89.
115. W. Nawrocka, B. Sztuba, M. W. Kowalska, H. Liszkiewicz, J. Wietrzyk, A. Nasulewicz, M. Pelczynska, A. Opolski, *Pharmacology* **59** (2004) 83–91.
116. H. Antaki, V. J. Petrow, *J. Chem. Soc.* **3** (1951) 551–555.
117. C. Liégeois, G. Lermusieau, S. Collin, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 1129–1134.
118. H. Kühn, J. Belkner, R. Wiesner, A. R. Brash, *J. Biol. Chem.* **265** (1990) 18351–18361.
119. M. Maccarrone, A. Baroni, A. Finazzi-Agro, *Arch. Biochem. Biophys.* **356** (1998) 35–40.
120. I. Shureiqi, S. M. Lippman, *Cancer Res.* **61** (2001) 6307–6312.
121. L. Zhao, C. D. Funk, *Trends Cardiovasc. Med.* **14** (2004) 191–195.
122. K. Muller, *Arch. Pharm.* **327** (1994) 3–19.
123. D. Fokas, D. Yang, J. Li, L. Yu, C. M. Baldino, *Synthesis* **47** (2005).

124. L. Racane, R. Stojković, V. Tralić- Kulenović, H. Cerić, M. Đaković, K. Ester, A. Mišir Krpan, M. Radić Stojković, *Eur. J. Med. Chem.* **86** (2014) 406.
125. T. Kulišić, A. Radonić, V. Katalinić, M. Miloš, *Food Chem.* **85** (2004) 633.
126. I. F. F. Benzie, J. J. Strain, *Anal. Biochem.* **239** (1996) 70.
127. M. Hranjec, I. Sović, I. Ratkaj, G. Pavlović, N. Ilić, L. Valjalo, K. Pavelić, S. Kraljević Pavelić, G. Karminski-Zamola, *Eur J Med Chem* **59** (2013) 111.
128. M. Hranjec, M. Kralj, I. Piantanida, M. Sedić, L. Šuman, K. Pavelić, G. Karminski-Zamola, *J Med Chem* **50** (2007) 5696–5711.
129. K. Starčević, M. Kralj, K. Ester, I. Sabol, M. Grce, K. Pavelić, G. Krminski Zamola, *Bioorg Med Chem* **15** (2007) 4419.
130. G. Cruciani, P. Crivori, P.-A. Carrupt, B. Testa, *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* **5031** (2000) 17–30.
131. G. Cruciani, M. Pastor, W. Guba, *Eur. J. Pharm. Sci.* **11** (2000) 29–39.
132. M. Taha, N. H. Ismail, W. Jamil, H. Rashwan, S. M. Kashif, A. A. Sain, M. I. Adenan, E. H. Anouar, M. Ali, F. Rahim, K. M. Khan, *Eur. J. Med. Chem.* **84** (2014) 731–738.
133. B. Zhou, B. Li, W. Yi, X. Bu, L. Ma, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23** (2013) 3759–3763.
134. L. Racane, M. Cindrić, N. Perin, P. Roškarić, K. Starčević, T. Mašek, M. Maurić, J. Dogan, G. Karminski-Zamola, *Croat. Chem. Acta* **90** (2017) 187–195.
135. K. R. Kirtikar, B.D. Basu, *Indian medicinal plants* (2006) 993–994.
136. M. Blois, *Antioxidant determinations by the use of a stable free radical* **181** (1958) 1199–1200.
137. H. Wagner, S. Bladet, et.al, *Plant Drug Analysis* (1996) 195–214.
138. E.S. Contreras-Guzman, F.C. Strong, *Determination of tocopherols (Vitamin E) by reduction of cupric ion.* **65** (1982) 1215–1222.
139. S. B. Kedare, R. P. Singh, *J Food Sci Technol* **48** (2011) 412–422.
140. V. Katalinic, D. Modun, I. Music, M. Boban, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **140** (2005) 47–52.
141. I. F. F. Benzie, J. J. Strain, *Analytical Biochemistry* **239** (1996) 70–76.

## **8. SAŽETAK**



**Sinteza, strukturna karakterizacija i antioksidativna aktivnost novih amidnih derivata  
*N*-supstituiranih benzimidazola**

U ovom radu opisana je sinteza novih *N*-supstituiranih derivata benzamida i metoksi supstituiranih benzamida, karakterizacija njihove strukture te ispitivanje potencijalne antioksidativne aktivnosti ovih spojeva. Sinteze novih amidnih derivata benzimidazola **27-54** provedene su klasičnim reakcijama organske kemije i reakcijama potpomognutim mikrovalovima u nekoliko sintetskih koraka. Aminacijskim reakcijama početnih reaktanata, 1-klor-2-nitrobenzena **1** i 4-klor-3-nitrobenzonitrila **2** pod utjecajem mikrovalnog zračenja, priređeni su *N*-izobutil-2-nitroanilin **3** i *N*-supstituirani derivati 3-nitrobenzonitrila **4-6**. Redukcijom spojeva **3-6** s  $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  priređeni su *N*-izobutil-1,2-fenilendiamin **7** i *N*-supstituirani derivati 3-aminobenzonitrila **8-10**. Reakcijama ciklizacije spojeva **7-10** s BrCN u acetonitrilu priređeni su glavni prekursori, *N*-supstituirani derivati 2-aminobenzimidazola **13-15** i 2-amino-5-cijanobenzimidazola **16-18**. Metoksi supstituirani benzoil-kloridi **22-24** priređeni su reakcijama nukleofilne supstitucije iz odgovarajućih karboksilnih kiselina **19-21** s tionil-kloridom u toluenu. Reakcijama kondenzacije benzoilnih klorida **22-25** s *N*-supstituiranim derivatima 2-aminobenzimidazola i 2-amino-5-cijanobenzimidazola **13-18** te 2-aminobenzimidazolom **26** priređeni su konačni amidni derivati **27-54**. Strukture svih novosintetiziranih spojeva potvrđene su primjenom  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijom dok je produkt **13** dodatno okarakteriziran i masenom spektrometrijom.

Ispitivanje antioksidativne aktivnosti novosintetiziranih amidnih derivata benzimidazola **27-54** provedeno je primjenom DPPH i FRAP metode. Prema dobivenim rezultatima, najbolju inhibiciju DPPH $\cdot$  radikala pokazuju produkti **31, 44, 39, 42, 36** i **45**, dok prema FRAP metodi najveću aktivnost pokazuju spojevi **37, 53** i **36**. Uspoređujući vrijednosti antioksidativne aktivnosti u obje metode, najaktivniji spoj je *N*-metil-5(6)-cijanobenzimidazolil supstituirani derivat **36** s jednom metoksi skupinom. Najveći utjecaj na povećanje aktivnosti sintetiziranih spojeva ima izobutilni supstituent na *N* atomu benzimidazolne jezgre.

**Ključne riječi:** aminacija, benzamidi, benzimidazoli, antioksidativna aktivnost, DPPH metoda, FRAP metoda

## **9. SUMMARY**

### **Synthesis, structural characterization and antioxidative activity of novel *N*-substituted benzimidazole amide derivatives**

This work presents the synthesis of novel *N*-substituted benzamide derivatives and methoxy substituted benzamides, characterization of their structure and examination of potential antioxidant activity of these compounds. The synthesis of novel benzimidazole amide derivatives were performed by classical organic chemistry reactions and microwave-assisted reactions in several synthetic steps. By amination reactions of initial reactants, 1-chloro-2-nitrobenzene **1** and 4-chloro-3-nitrobenzotrile **2**, under microwave radiation *N*-isobutyl-2-nitroaniline **3** and *N*-substituted derivatives of 3-nitrobenzotrile **4-6** were prepared. *N*-isobutyl-1,2-phenylenediamine **7** and *N*-substituted derivatives of 3-aminobenzotrile **8-10** were synthesized by reduction of compounds **3-6** with  $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ . The ring closure reactions of compounds **7-10** with  $\text{BrCN}$  in acetonitrile formed major precursors, *N*-substituted derivatives of 2-aminobenzimidazole **13-15** and 2-amino-5-cyanobenzimidazole **16-18**. Methoxy substituted benzoyl-chlorides **22-24** were obtained by nucleophilic substitution reactions from corresponding carboxylic acids **19-21** using thionyl chloride in toluene. The targeted compounds **27-54** were synthesized by condensation reactions of benzoyl-chlorides **22-25** with *N*-substituted derivatives of 2-aminobenzimidazole and 2-amino-5-cyanobenzimidazole **13-18** and 2-aminobenzimidazole **26**. Structures of all newly prepared compounds were confirmed by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy while some of them were additionally characterized by mass spectrometry.

Antioxidant activity determination of newly synthesized benzimidazole amide derivatives **27-54** was performed by DPPH and FRAP method. According to the obtained results, the best inhibition of DPPH $\cdot$  radicals is shown by compounds **31, 44, 39, 42, 36** and **45** while using FRAP method, compounds **37, 53** and **36** show the highest activity. Comparing values of antioxidant activity in both methods, the most active compound is *N*-methyl-5(6)-cyanobenzimidazolyl substituted derivative **36** with one methoxy group. Isobutyl substituent at *N* atom of the benzimidazole core has the greatest impact on increasing activity of synthesized compounds.

**Key words:** amination, benzamides, benzimidazoles, antioxidant activity, DPPH method, FRAP method

## **10. ŽIVOTOPISI**

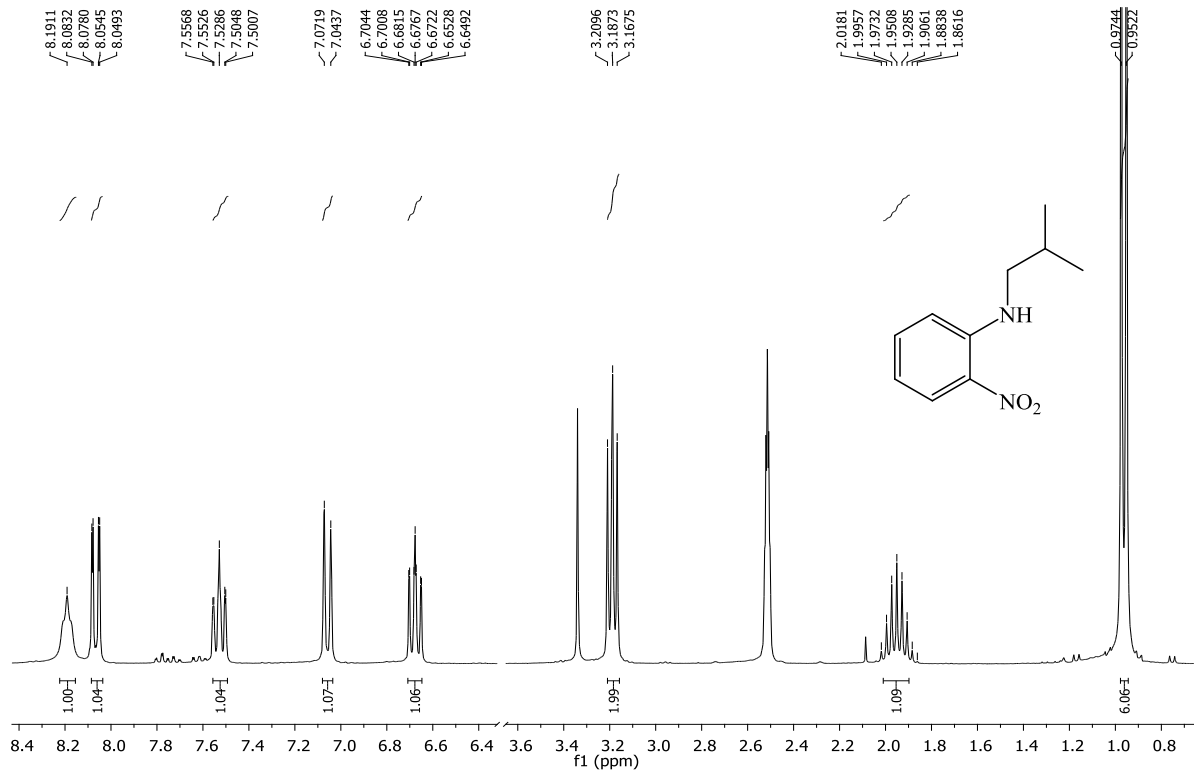
**Patricia Debogović** rođena je 22. studenog 1995. godine u Zagrebu. Osnovnu školu Ivane Brlić-Mažuranić u Prigorju Brdovečkom završila je 2010. godine nakon čega je upisala Gornjogradsku gimnaziju u Zagrebu, program opće gimnazije. Maturirala je 2014. godine s odličnim uspjehom te iste je godine upisala preddiplomski studij Primijenjena kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom preddiplomskog studija studentsku stručnu praksu odradila je u Plivi na odjelu Kontrole kvalitete. Završni rad iz područja organske kemije "*Flow*-fotokemija: Primjena u sintezi benzobicyclo[3.2.1.]-skeleta" pod mentorstvom prof. dr. sc. Irene Škorić obranila je 2018. godine i postala sveučilišna prvostupnica primijenjene kemije. Iste godine upisuje diplomski studij, smjer Primijenjena organska kemija. Tijekom dosadašnjeg obrazovanja osposobljena je za rad na računalu, aktivno se služi engleskim jezikom u govoru i pismu, a poznaje i osnove španjolskog i švedskog jezika.

**Marija Kos** rođena je 15. srpnja 1995. godine u Varaždinu. Osnovnu školu Sveti Đurđ završila je 2010. godine, a zatim upisuje Prvu gimnaziju Varaždin. Preddiplomski studij Primijenjene kemije na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije upisuje 2014. godine. Završni rad iz područja organske kemije "Sinteza i spektroskopska karakterizacija amido-supstituiranih pentacikličkih derivata benzimidazola" pod vodstvom mentorice prof. dr. sc. Marijane Hranjec obranila je 2018. godine i postala sveučilišna prvostupnica primijenjene kemije. Iste godine upisuje diplomski studij, smjer Primijenjena organska kemija. Sudjelovala je na XIII. Susretu mladih kemijskih inženjera 2020. godine, s posterskim priopćenjem pod nazivom "Sinteza i strukturna karakterizacija novih potencijalno biološki aktivnih amidnih derivata benzimidazola". Tijekom dosadašnjeg obrazovanja stekla je znanje rada na računalu. Pohađala je radionicu – Osiguranje kvalitete antikorozivne zaštite (AKZ) premazima i prevlakama. Stručnu praksu odradila je u Plivi na odjelu Kontrole kvalitete i volontirala je na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za biokemiju proteina i molekulsko modeliranje. Aktivno se služi engleskim jezikom, a poznaje i osnove njemačkog jezika. Posjeduje vozačku dozvolu B kategorije te se u slobodno vrijeme bavi sportom.

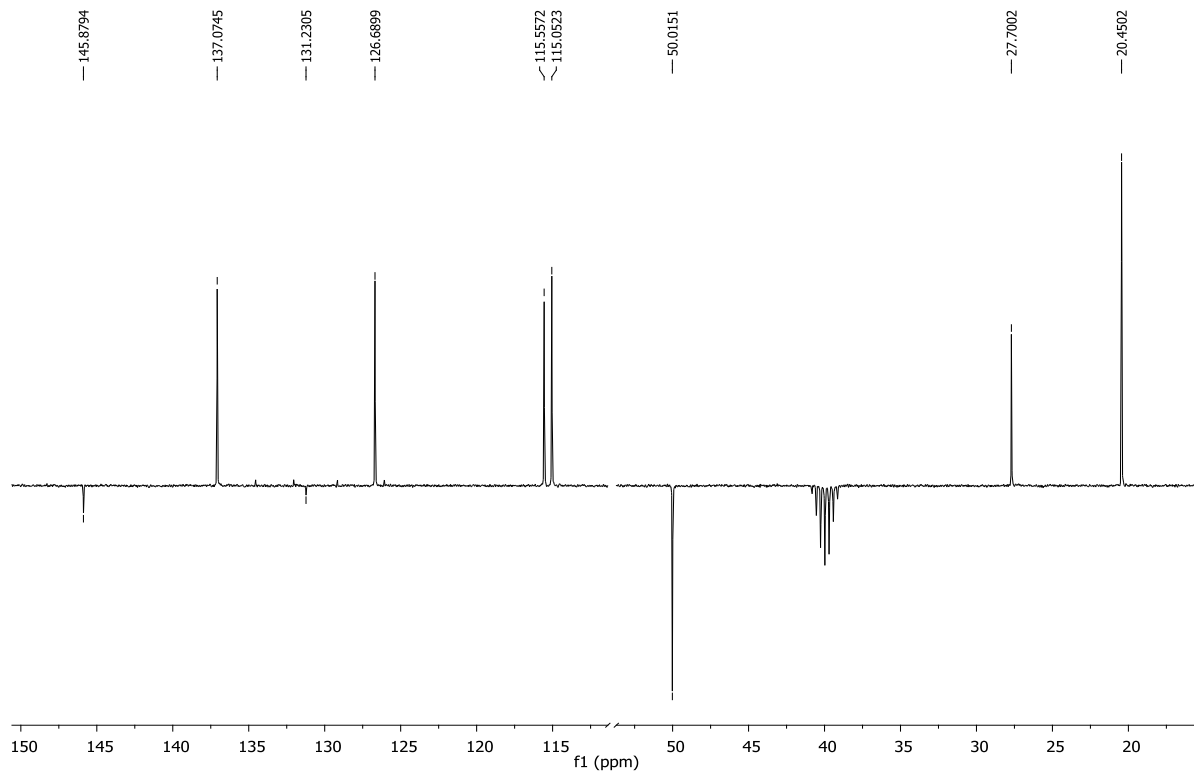
## **11. PRILOZI**

**Prilog 1.**

**a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 3**

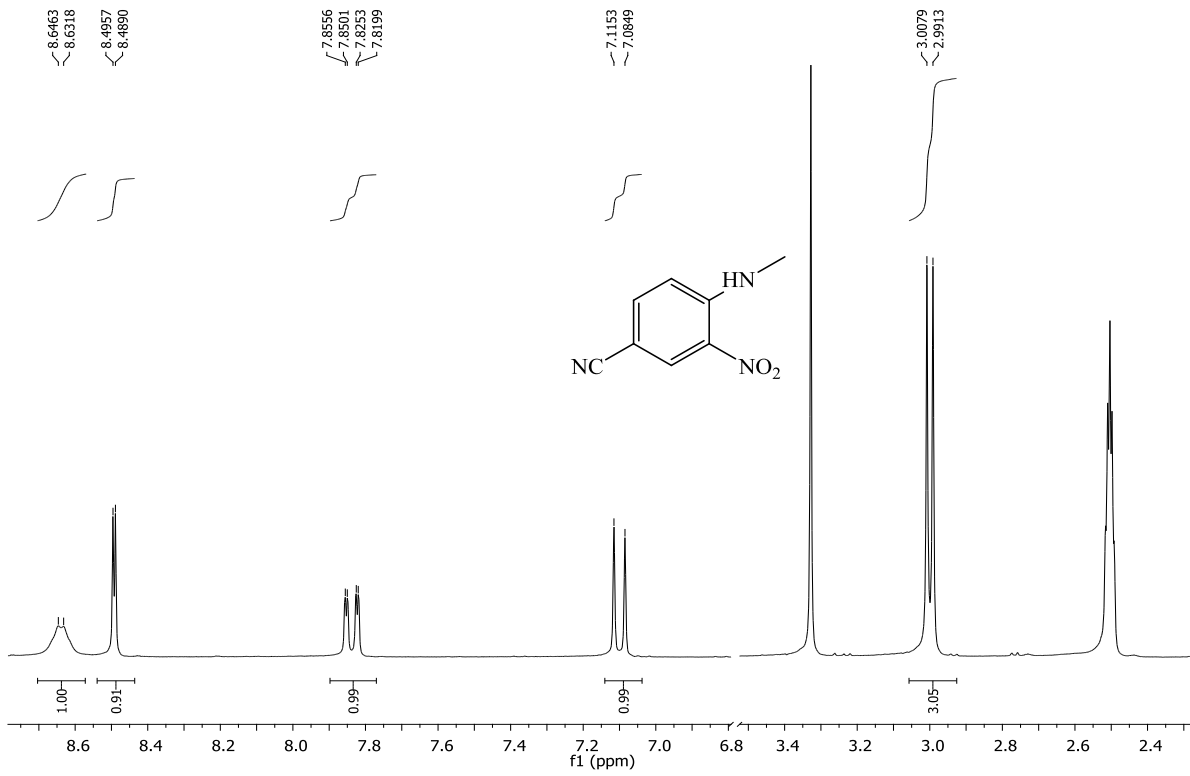


**b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 3**

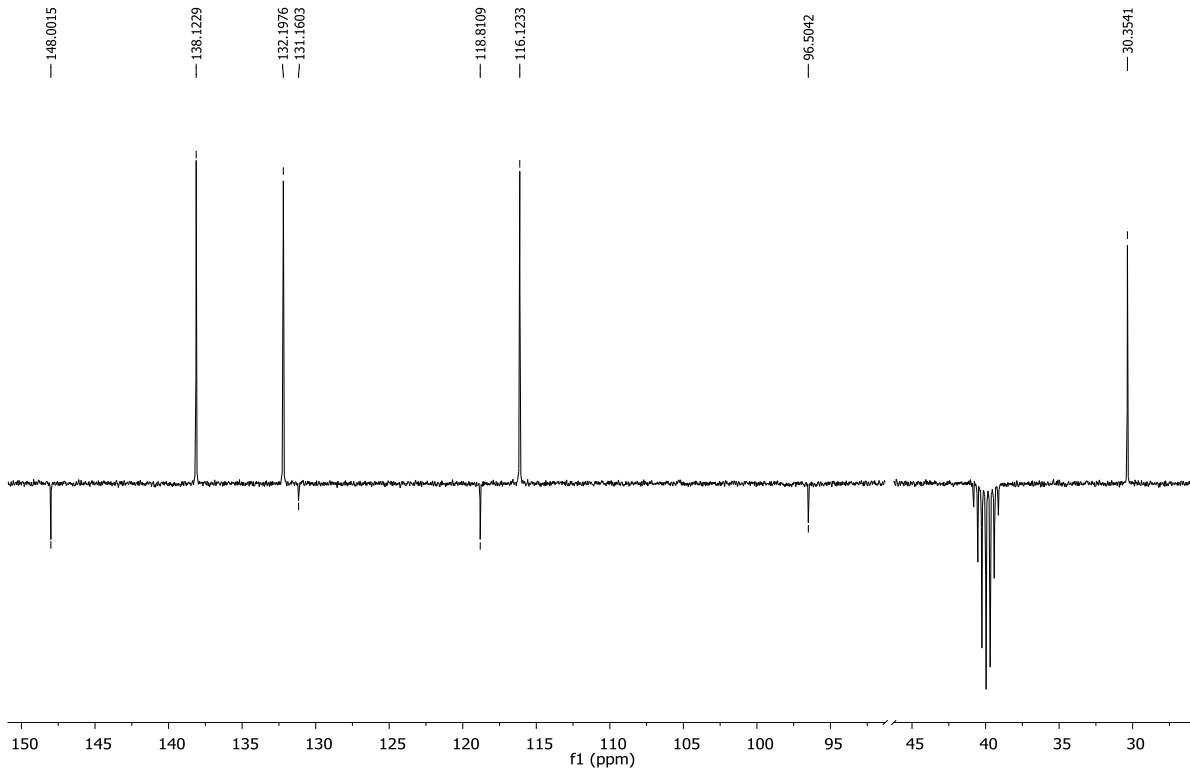


**Prilog 2.**

**a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 4**



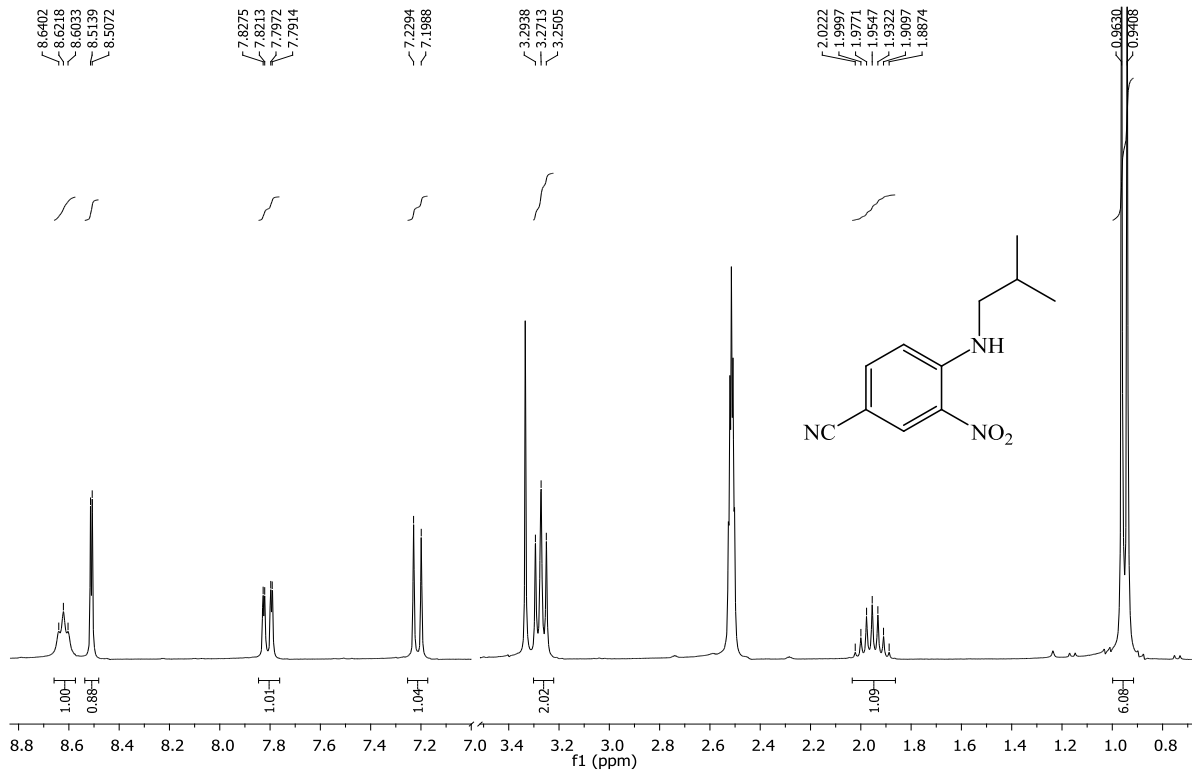
**b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 4**



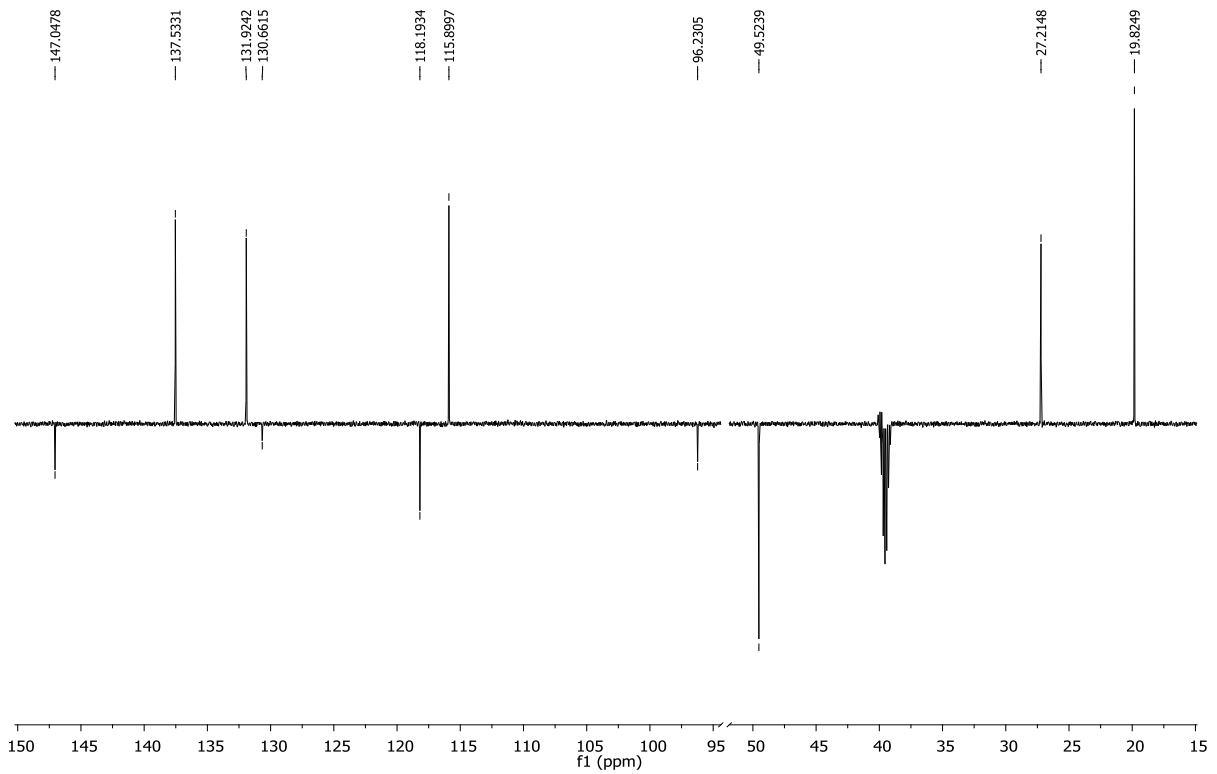


**Prilog 3.**

**a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 5**

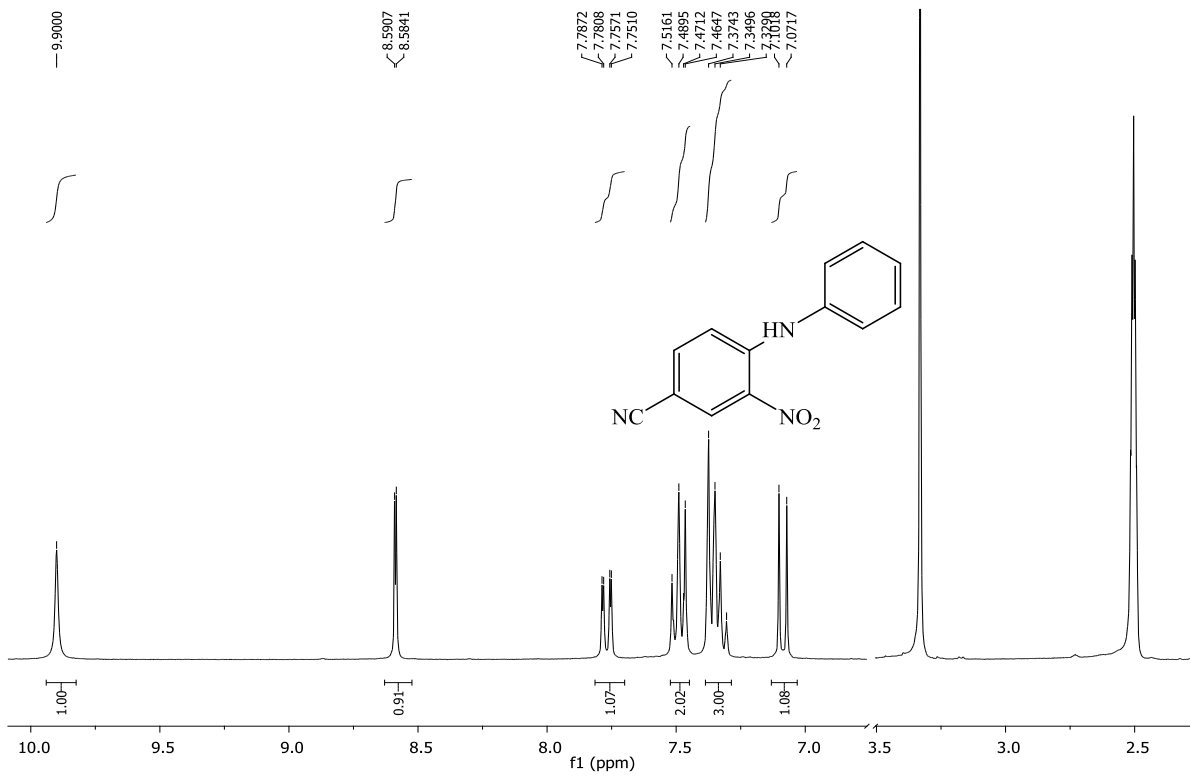


**b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 5**

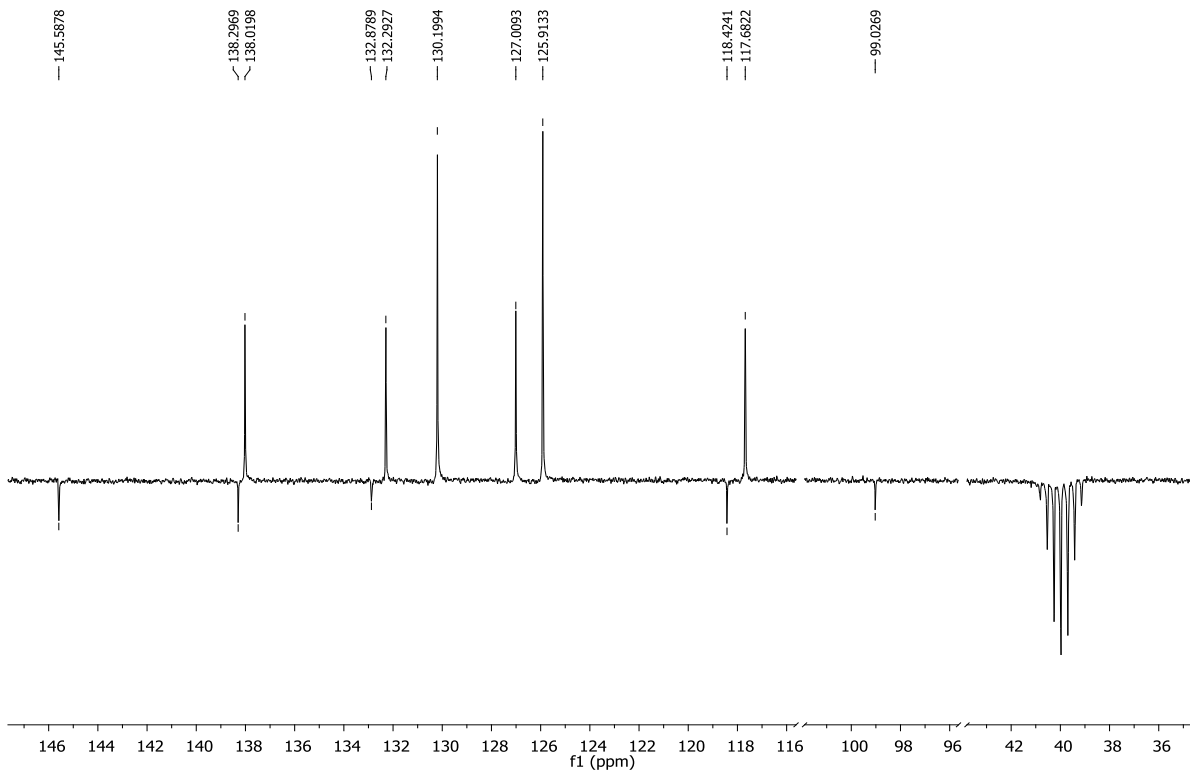


**Prilog 4.**

**a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 6**

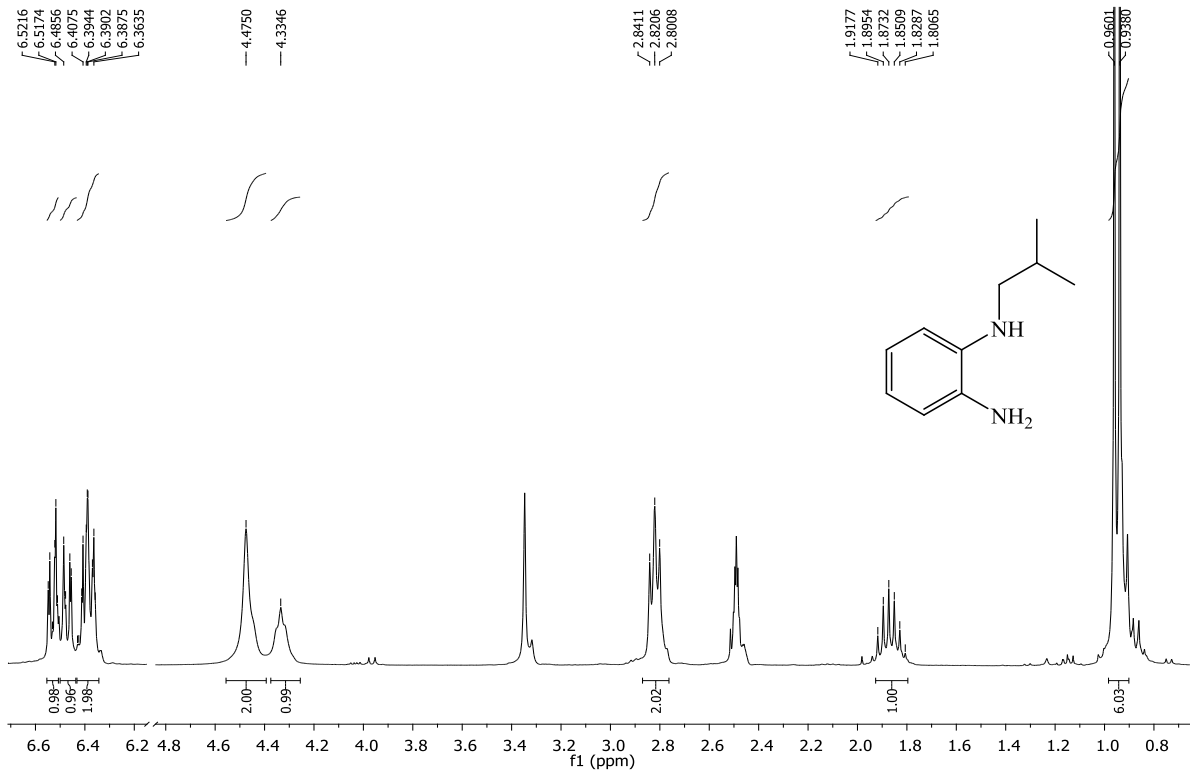


**b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 6**



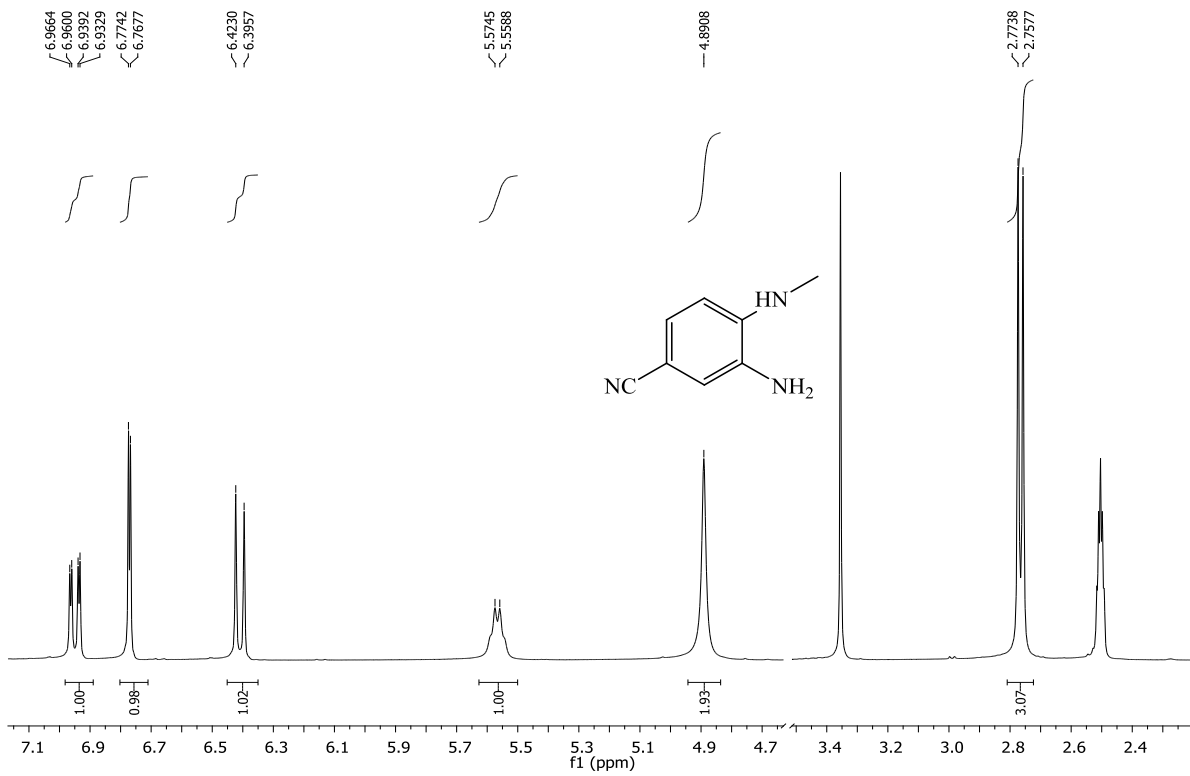
**Prilog 5.**

**a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 7**

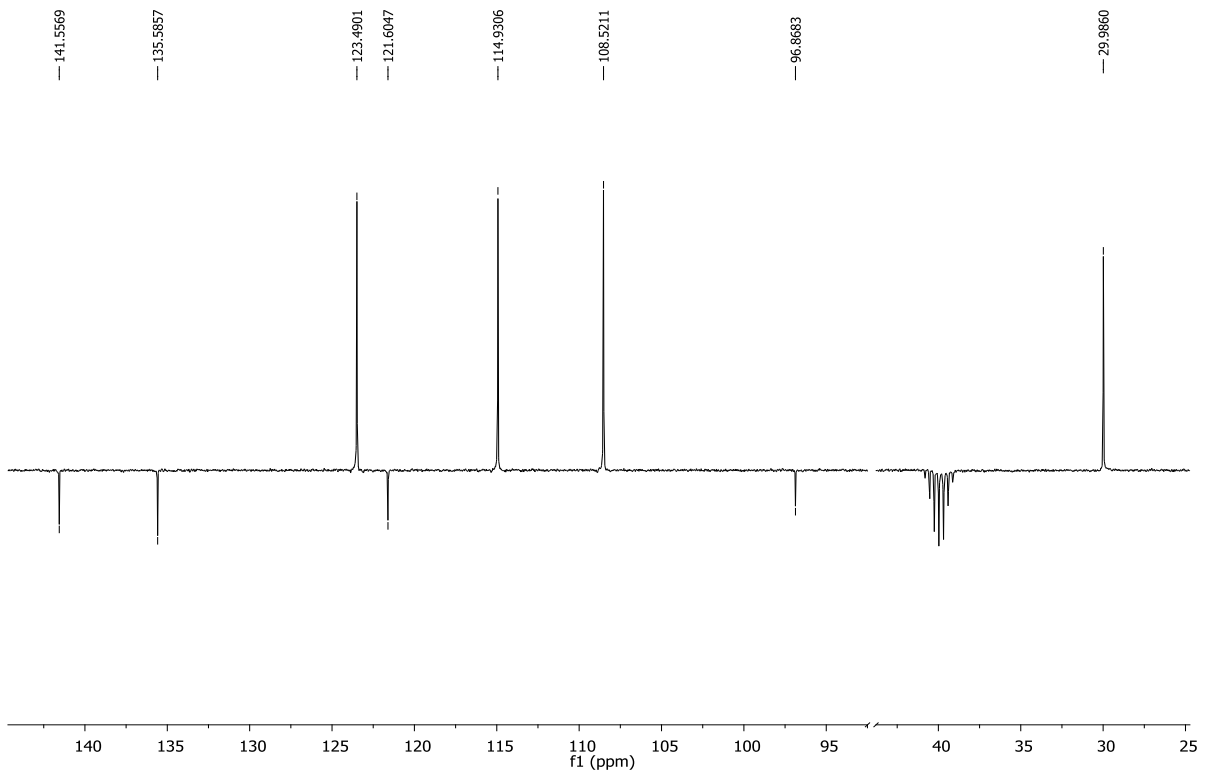


**Prilog 6.**

**a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **8****

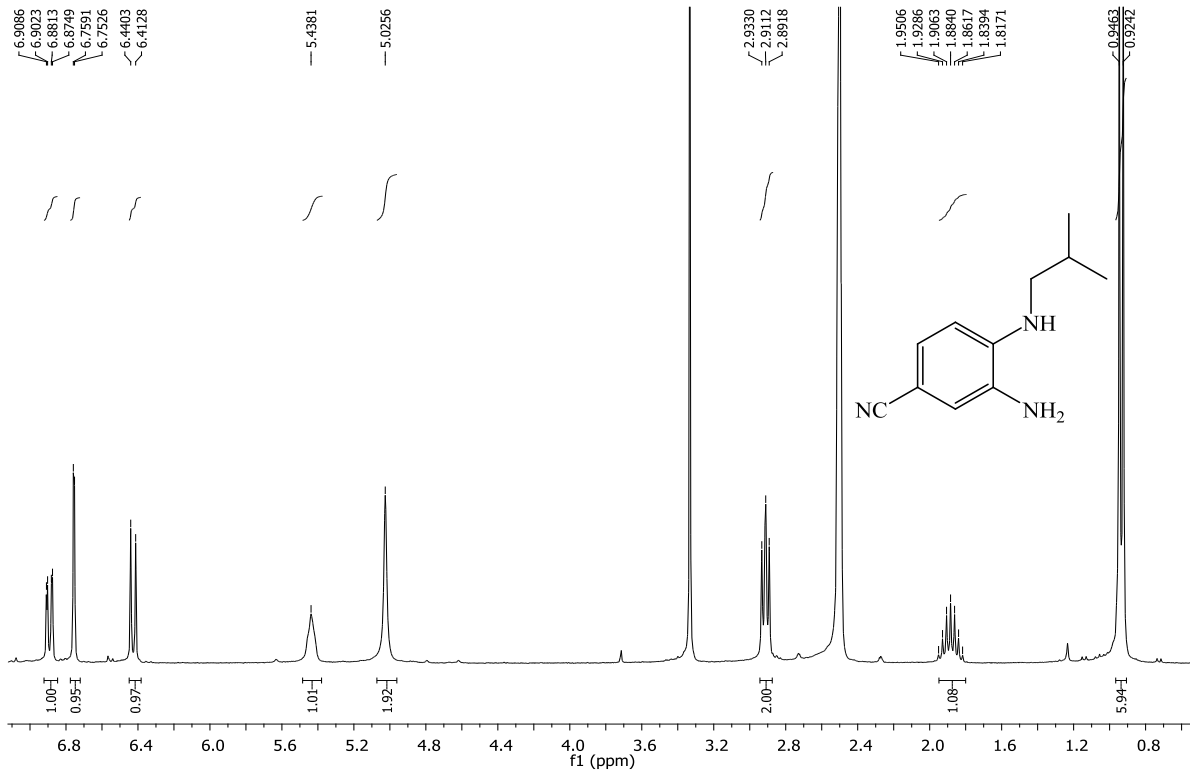


**b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **8****

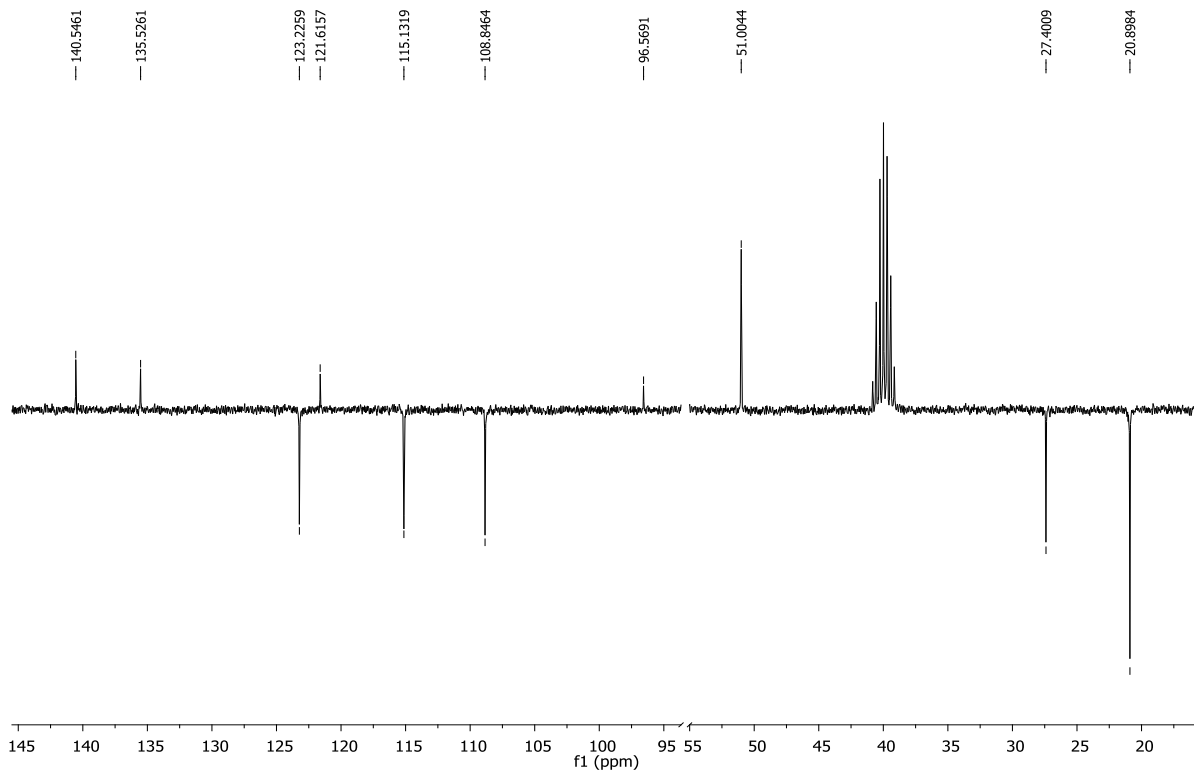


**Prilog 7.**

**a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 9**

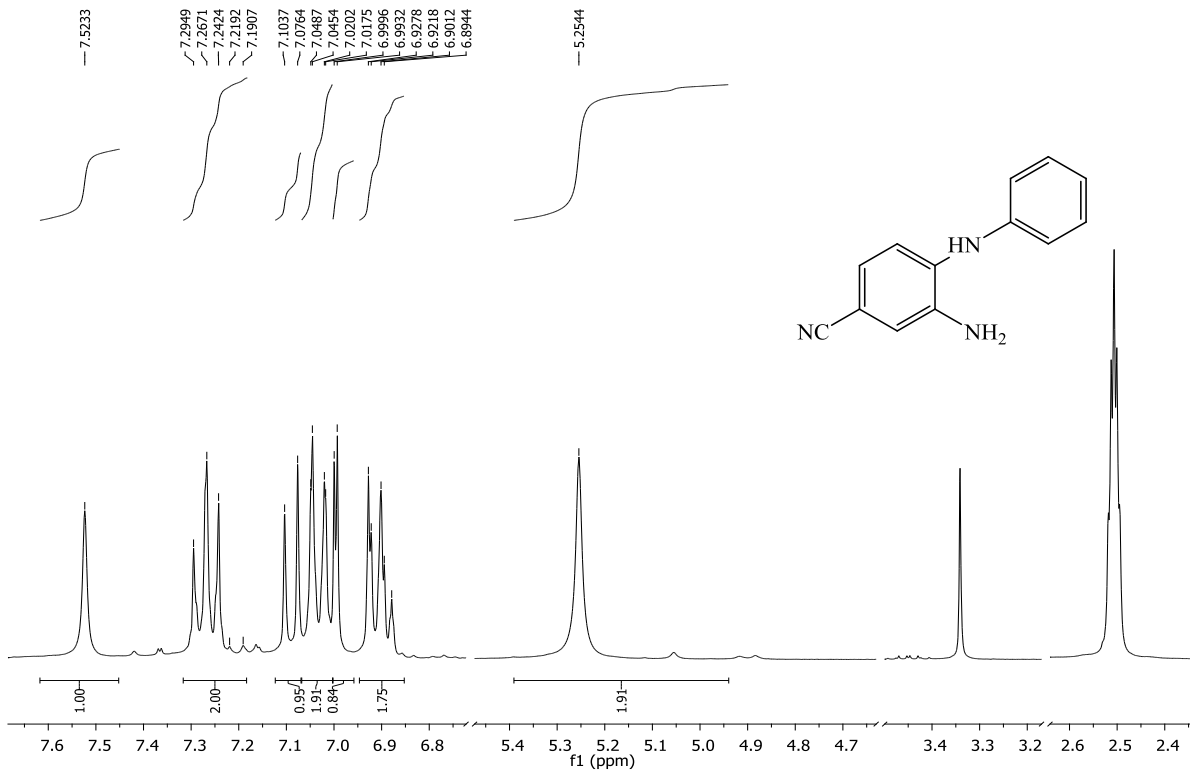


**b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 9**

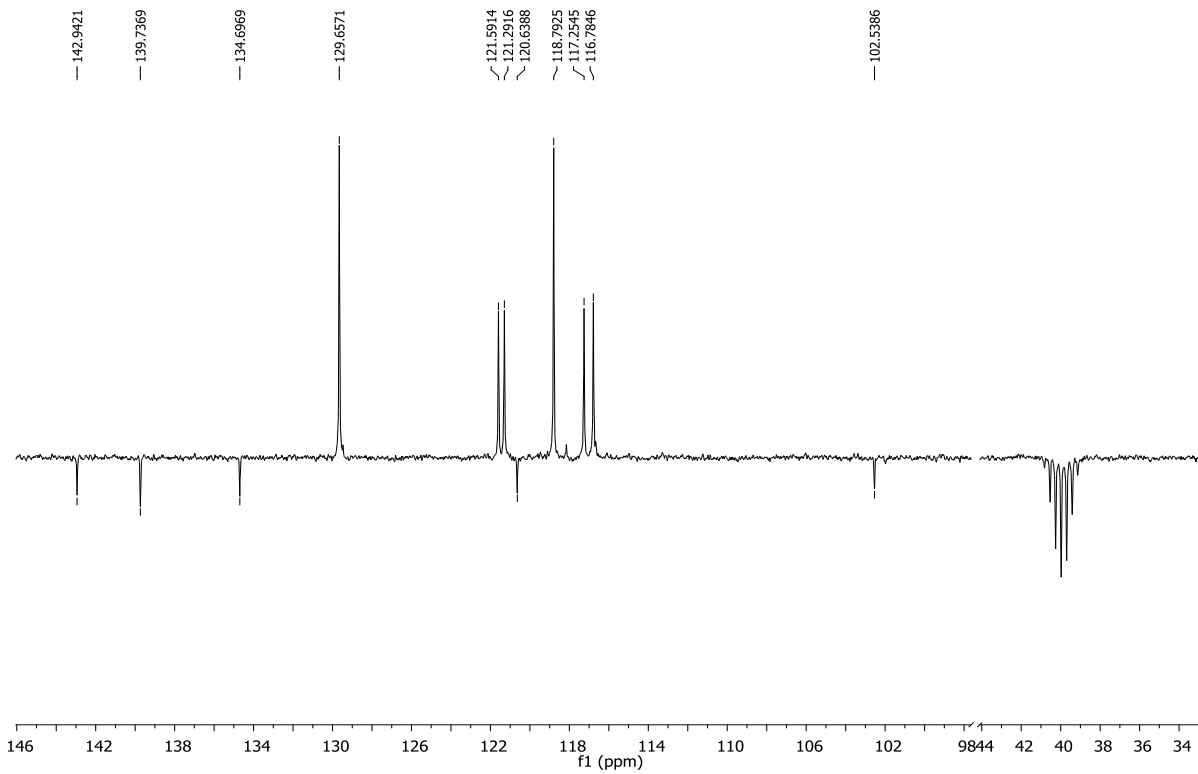


**Prilog 8.**

**a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 10**

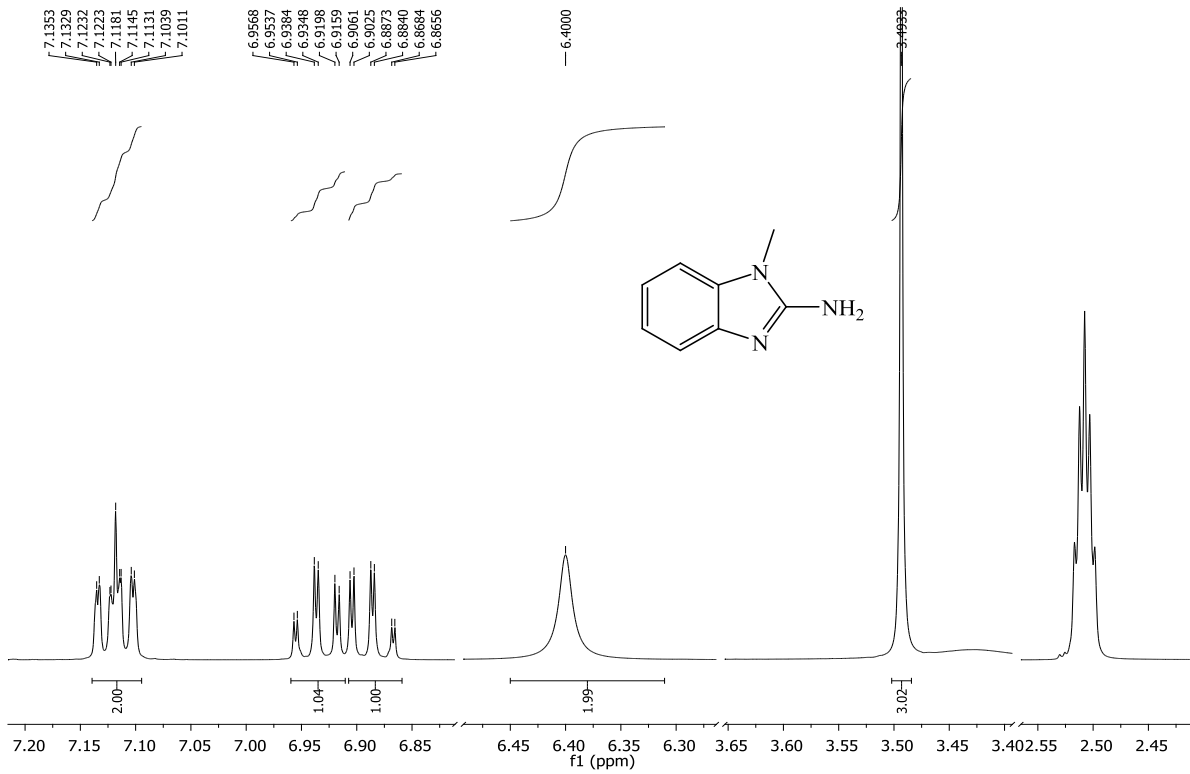


**b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 10**

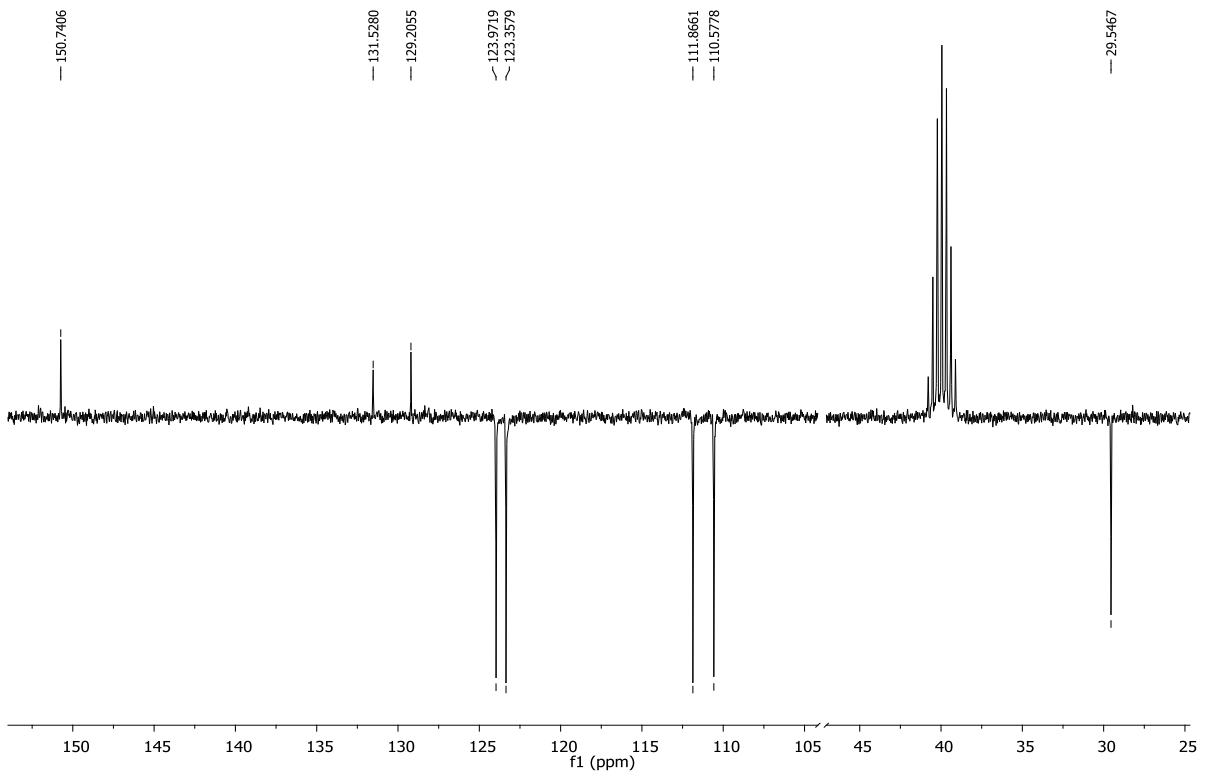


**Prilog 9.**

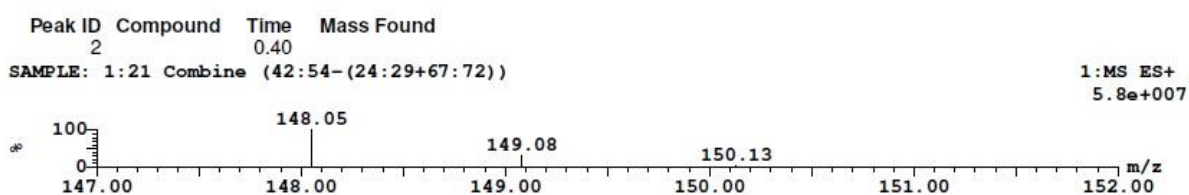
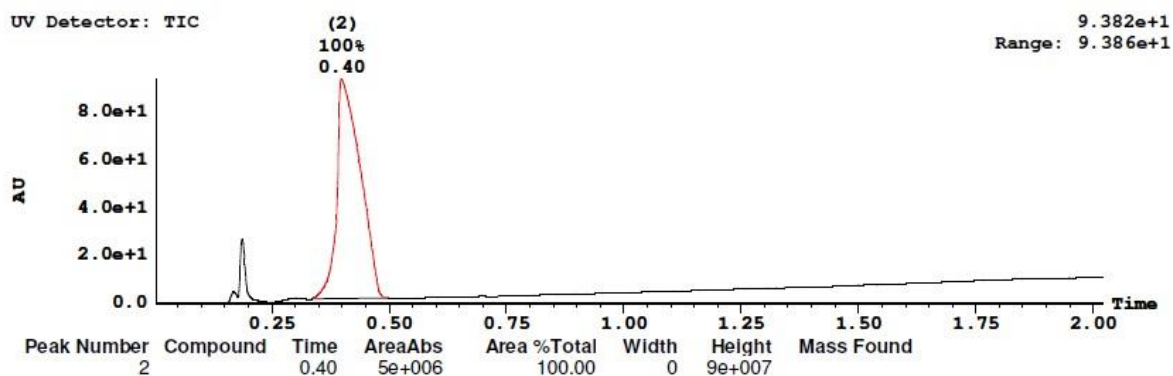
**a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 13**



**b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 13**



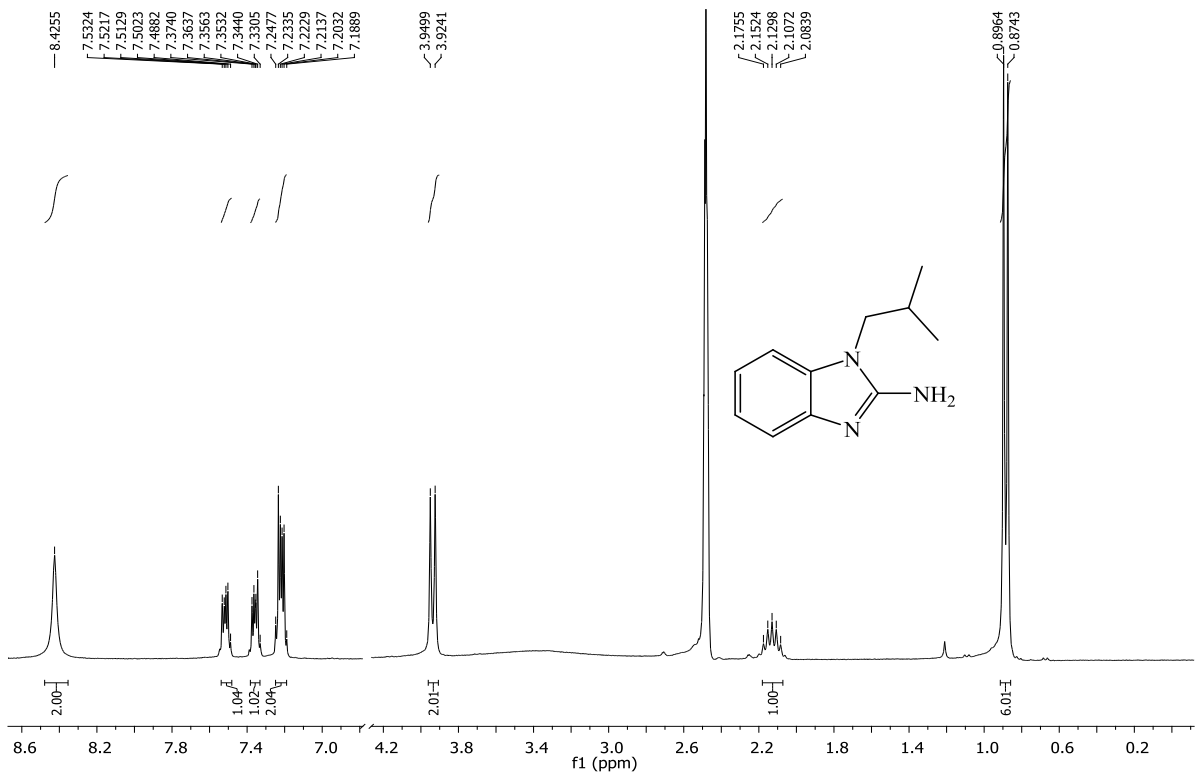
c) Kromatogram i MS spektar spoja 13



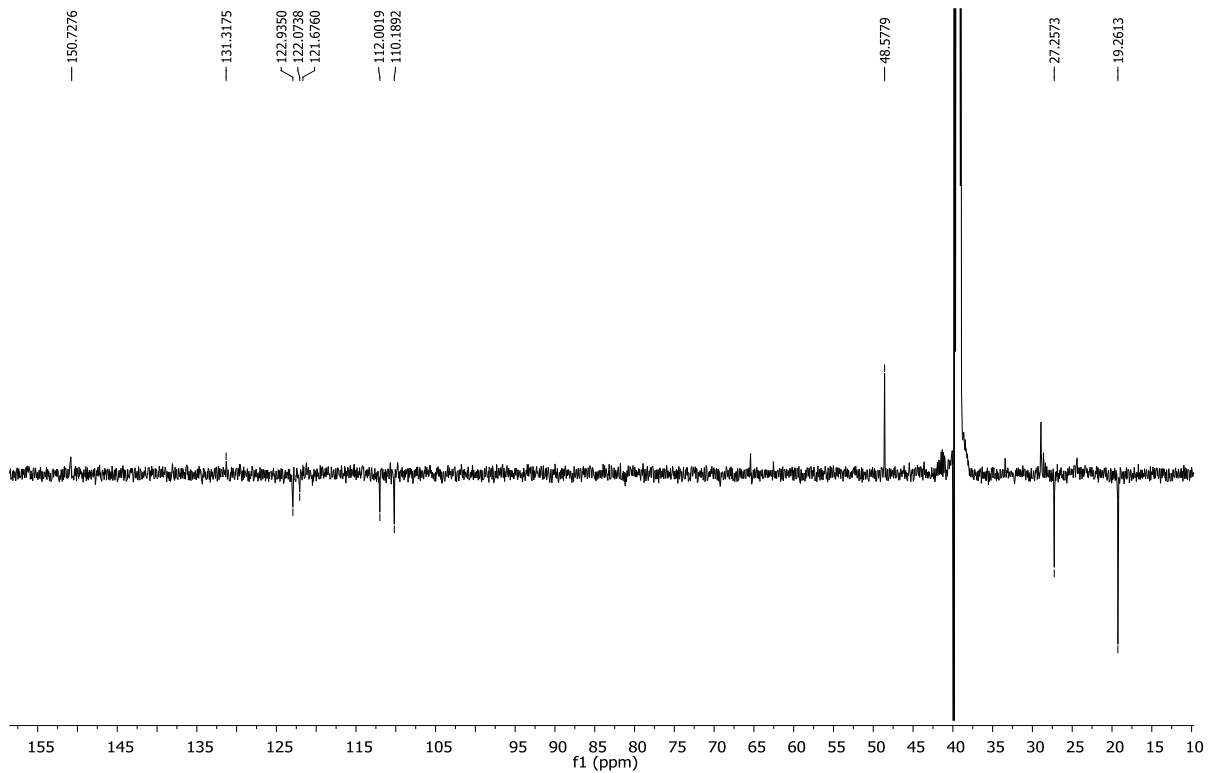


**Prilog 10.**

**a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 14**

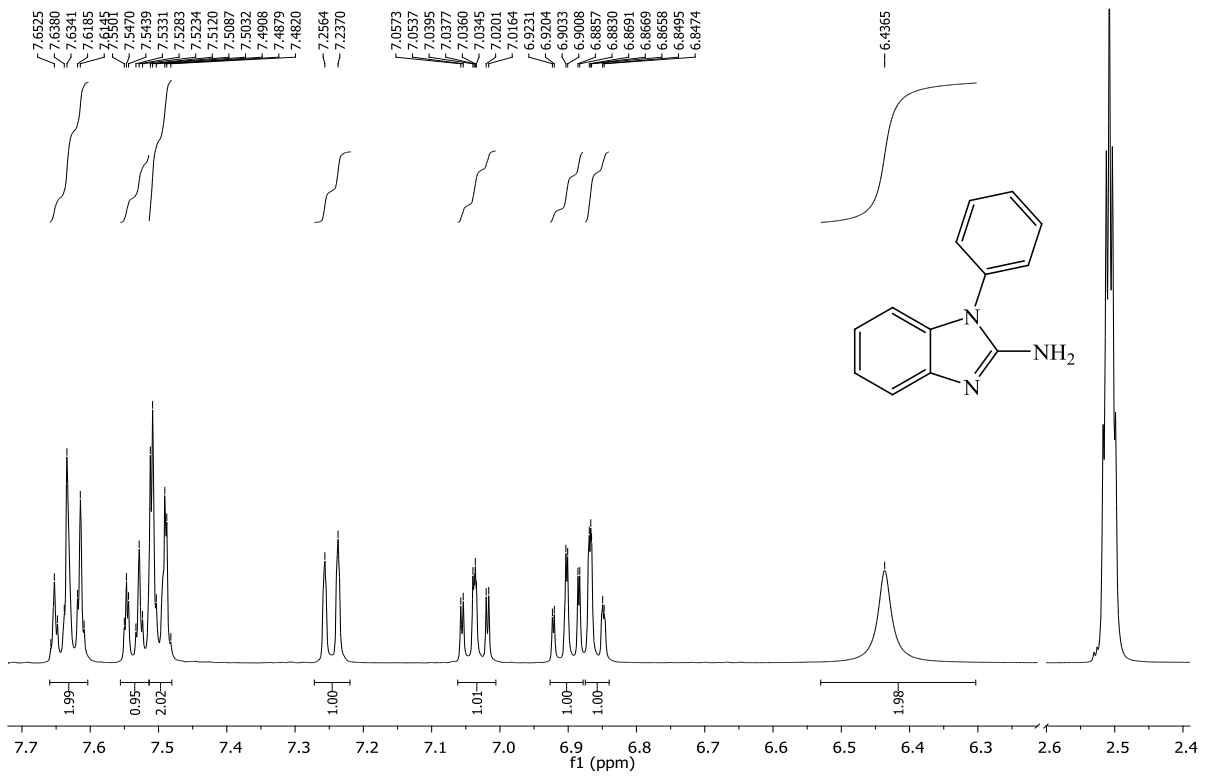


**b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 14**

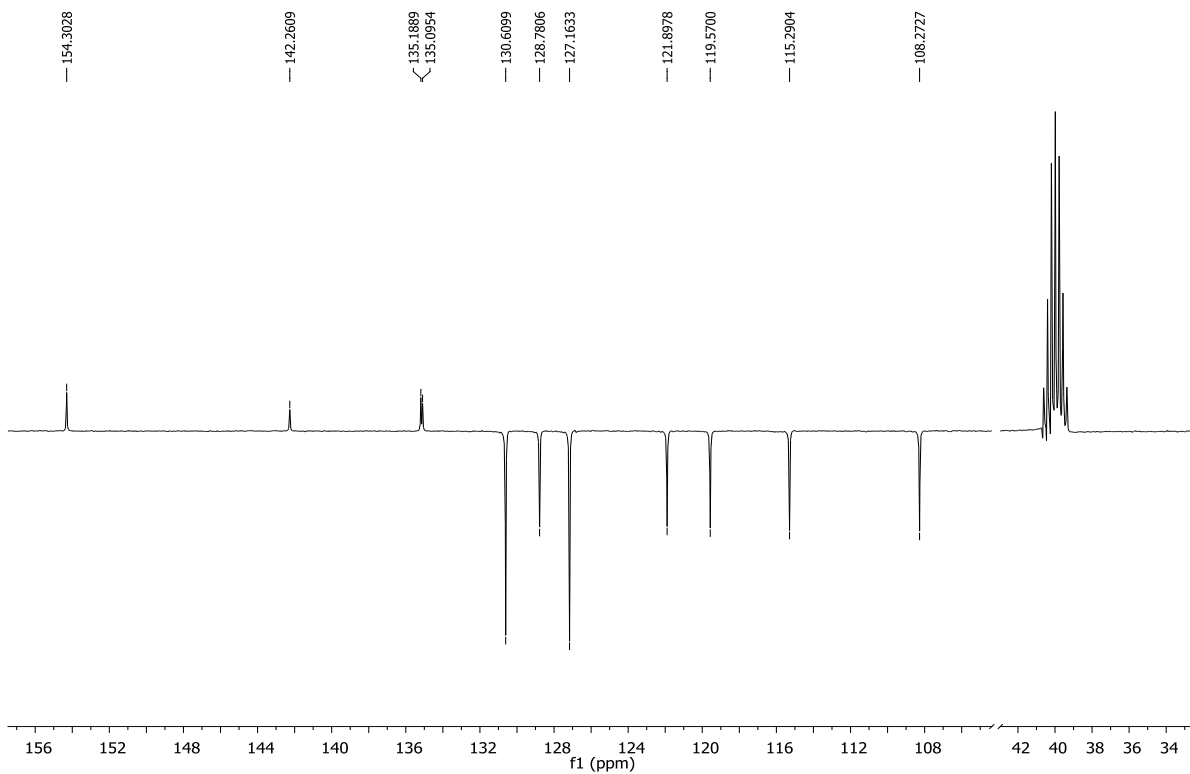


**Prilog 11.**

**a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 15**

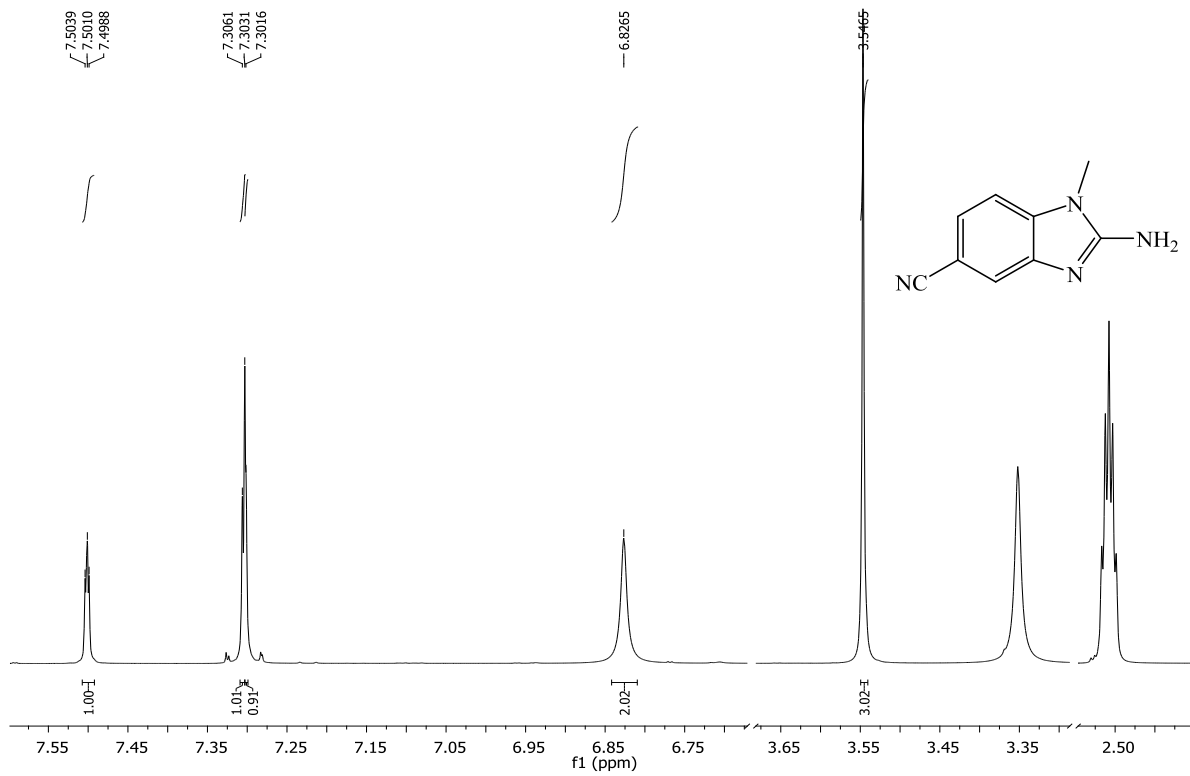


**b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 15**

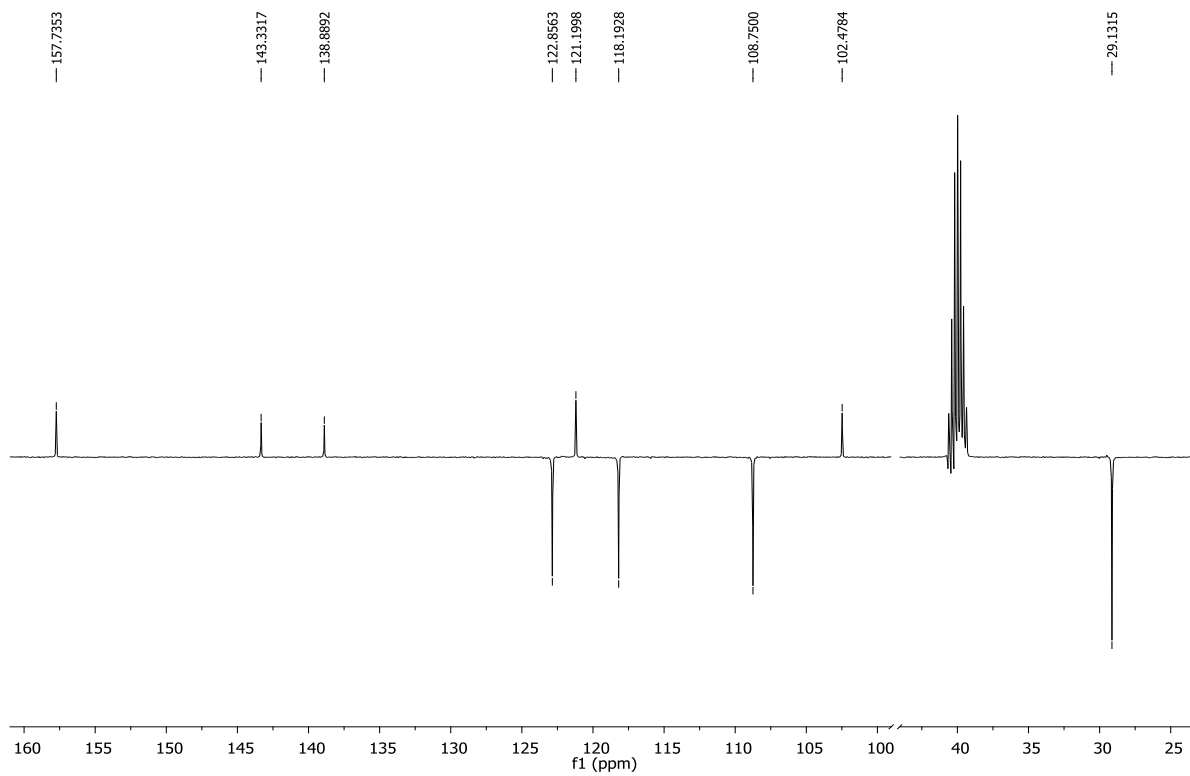


**Prilog 12.**

**a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 16**

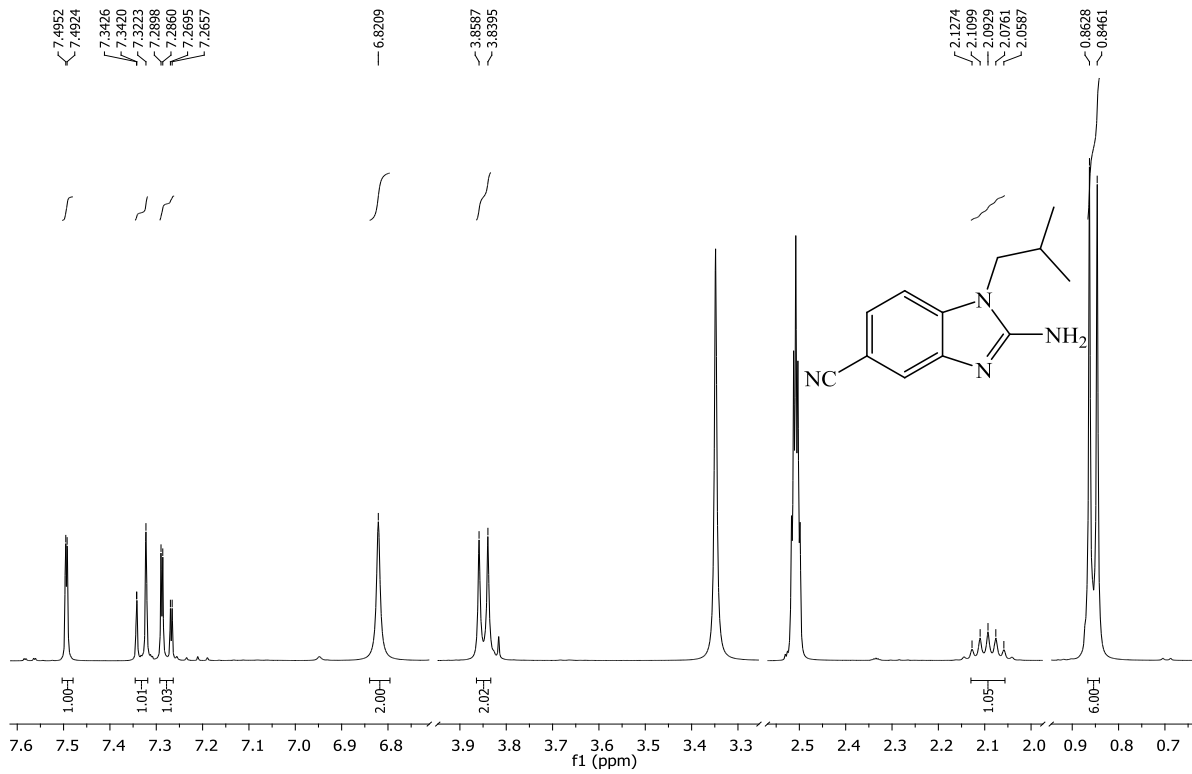


**b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 16**

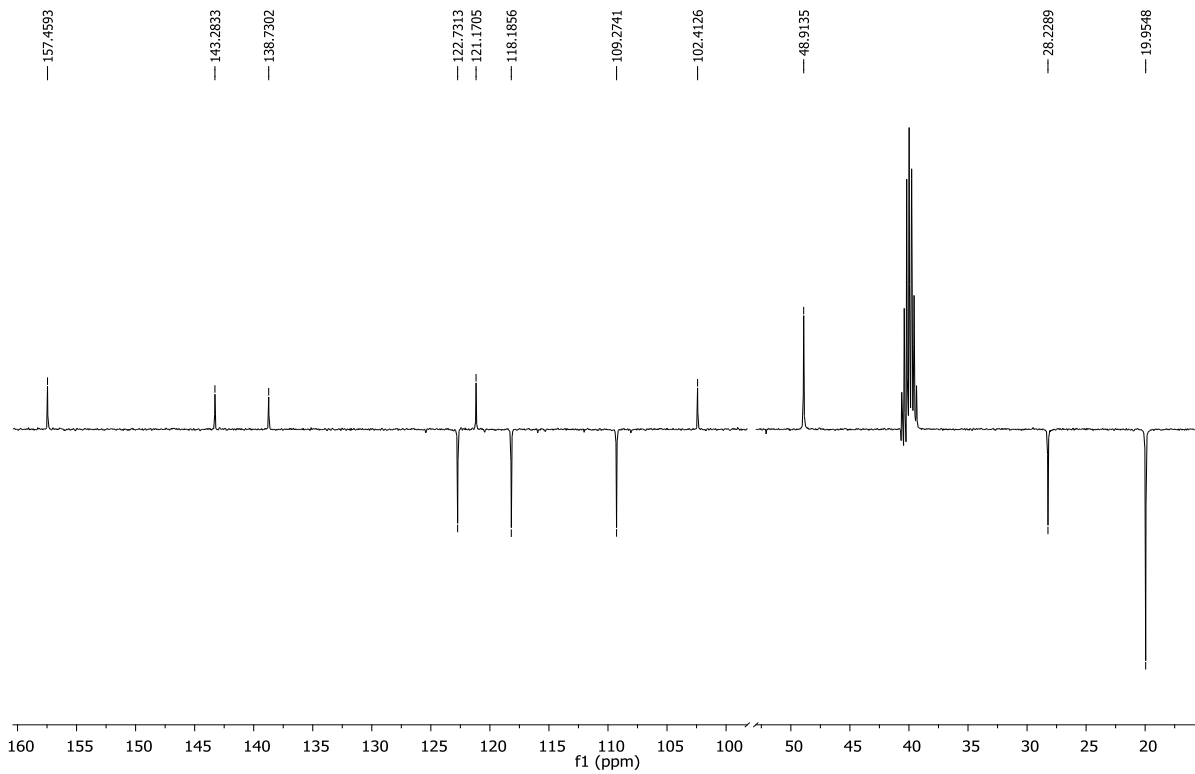


**Prilog 13.**

**a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 17**

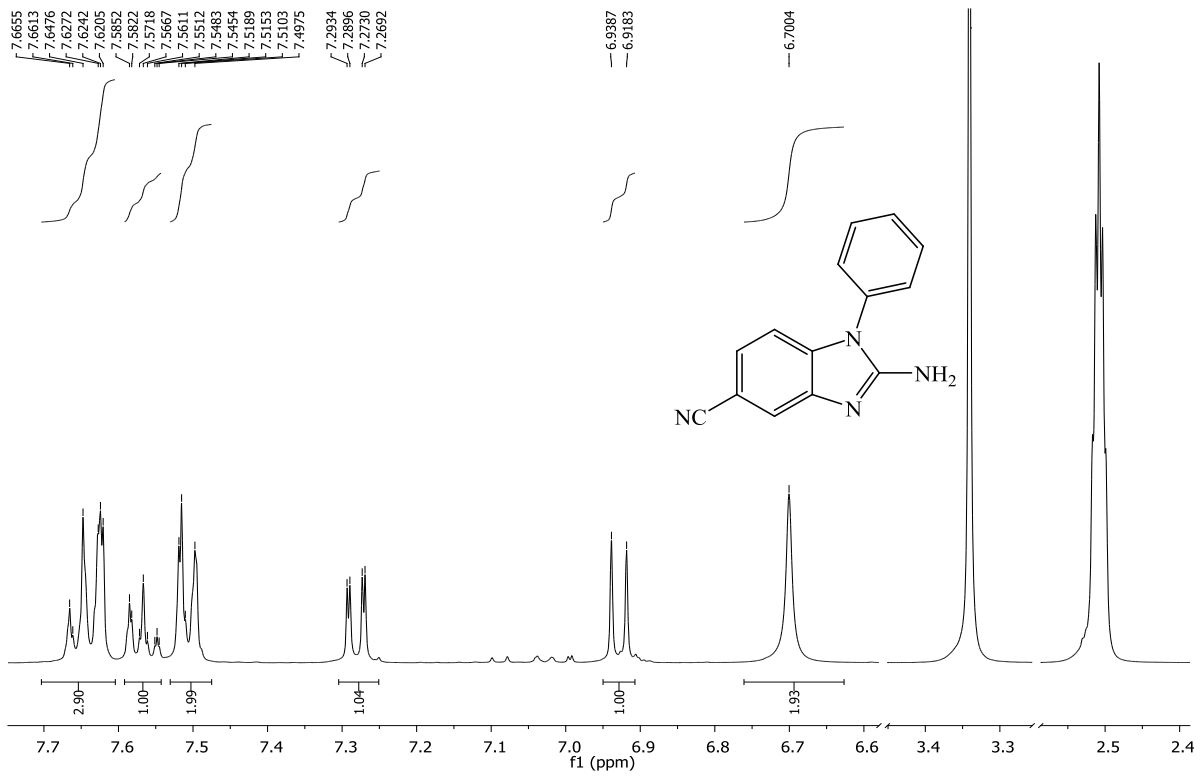


**b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 17**

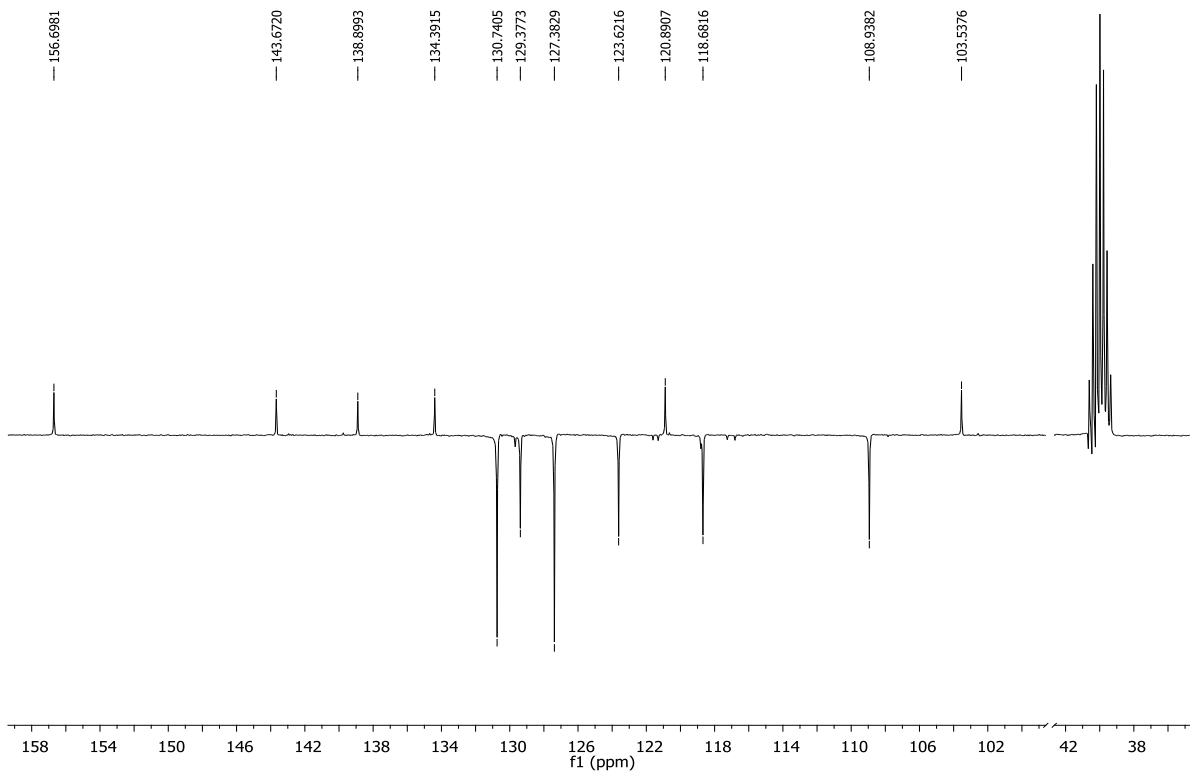


**Prilog 14.**

**a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 18**

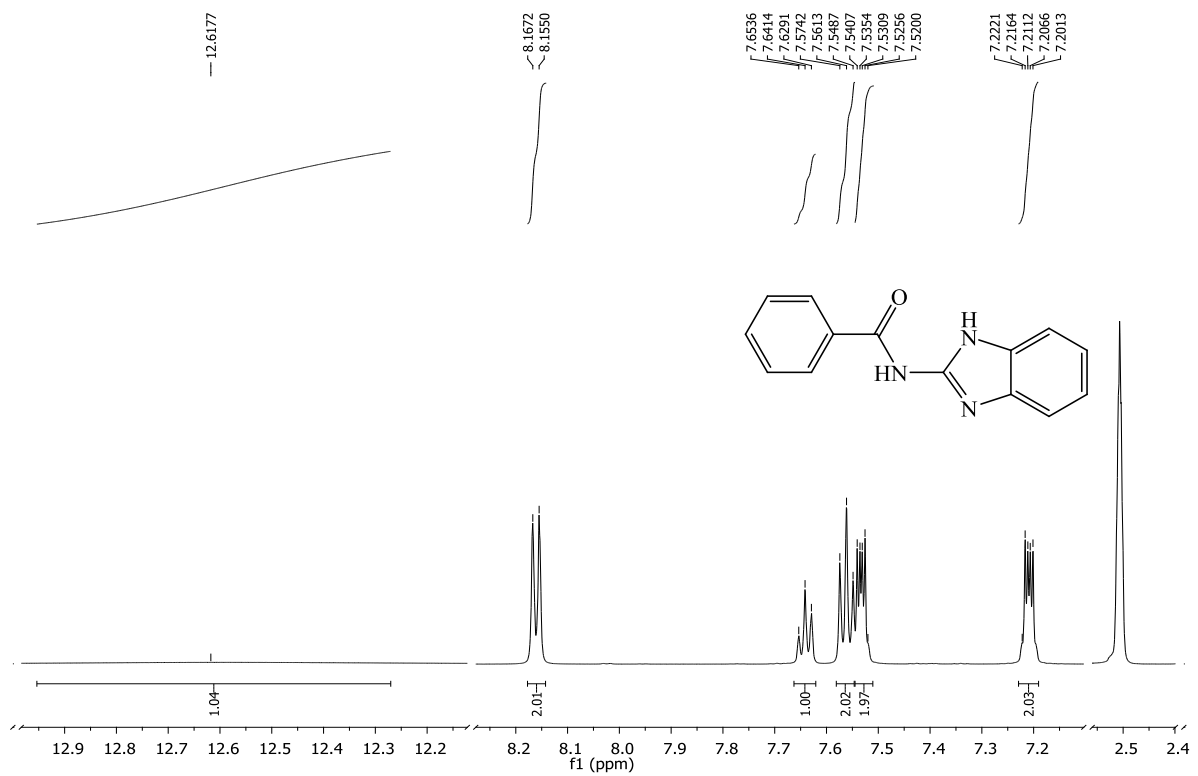


**b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 18**

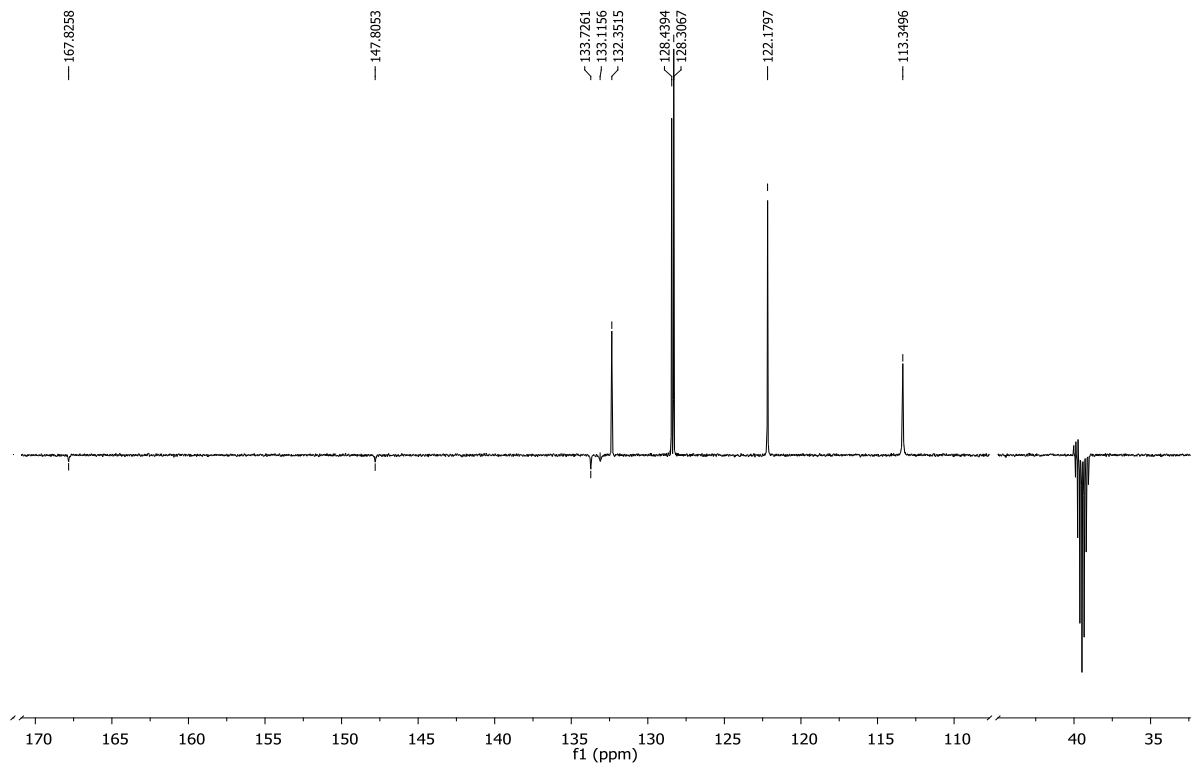


Prilog 15.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **27**

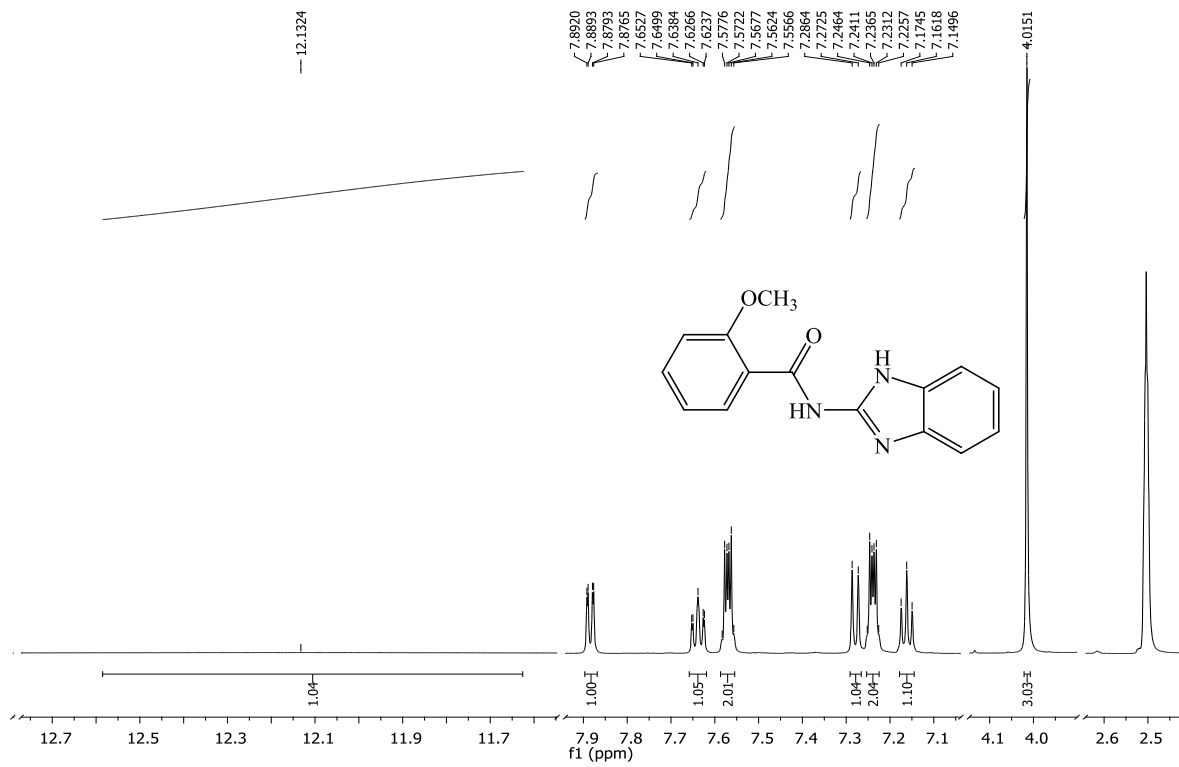


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **27**

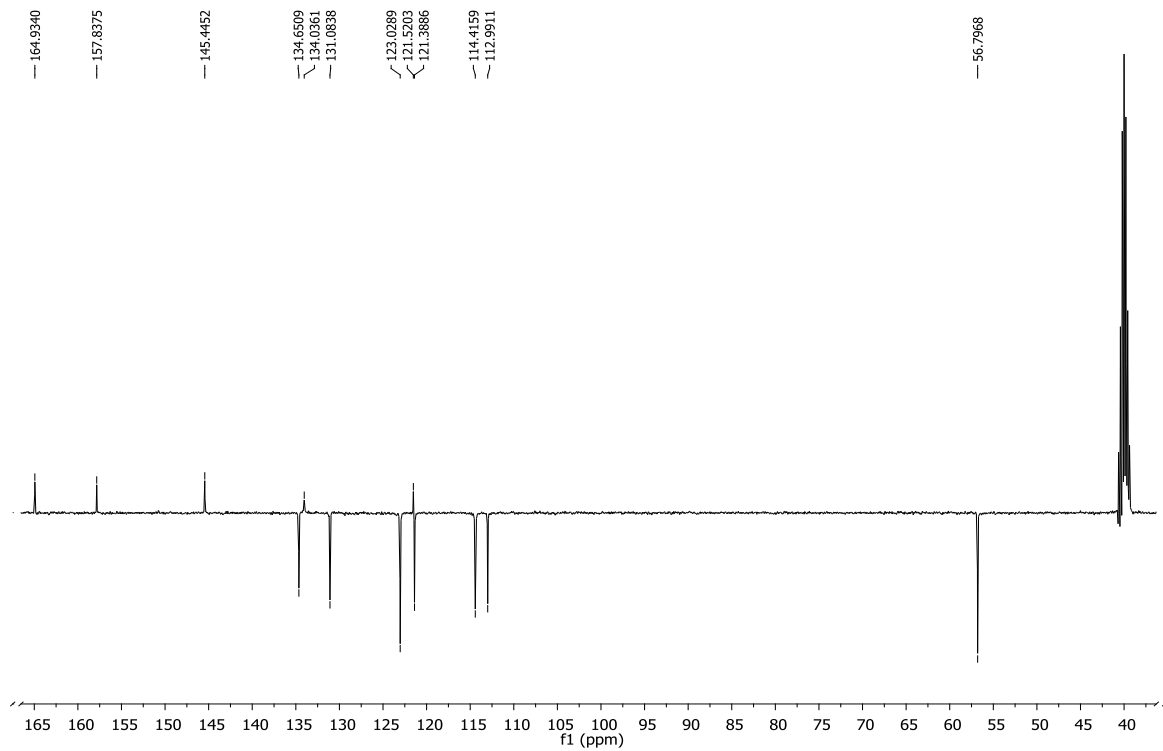


Prilog 16.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **28**

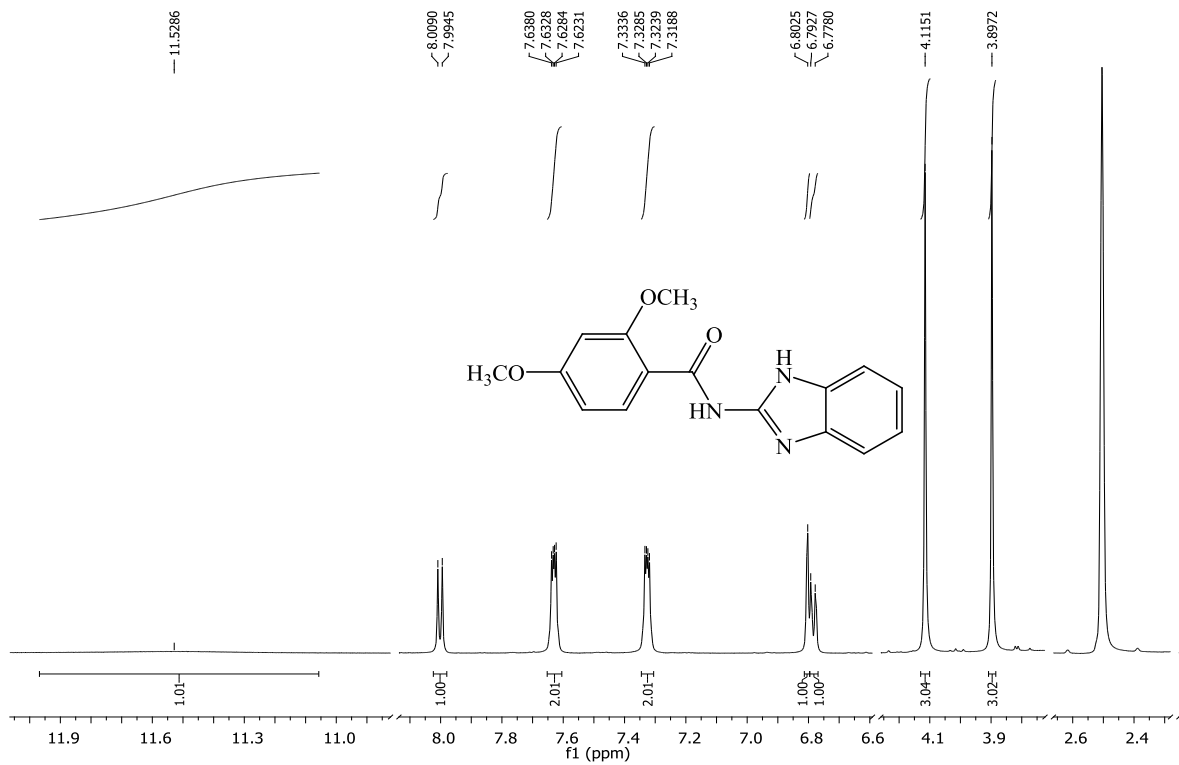


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **28**

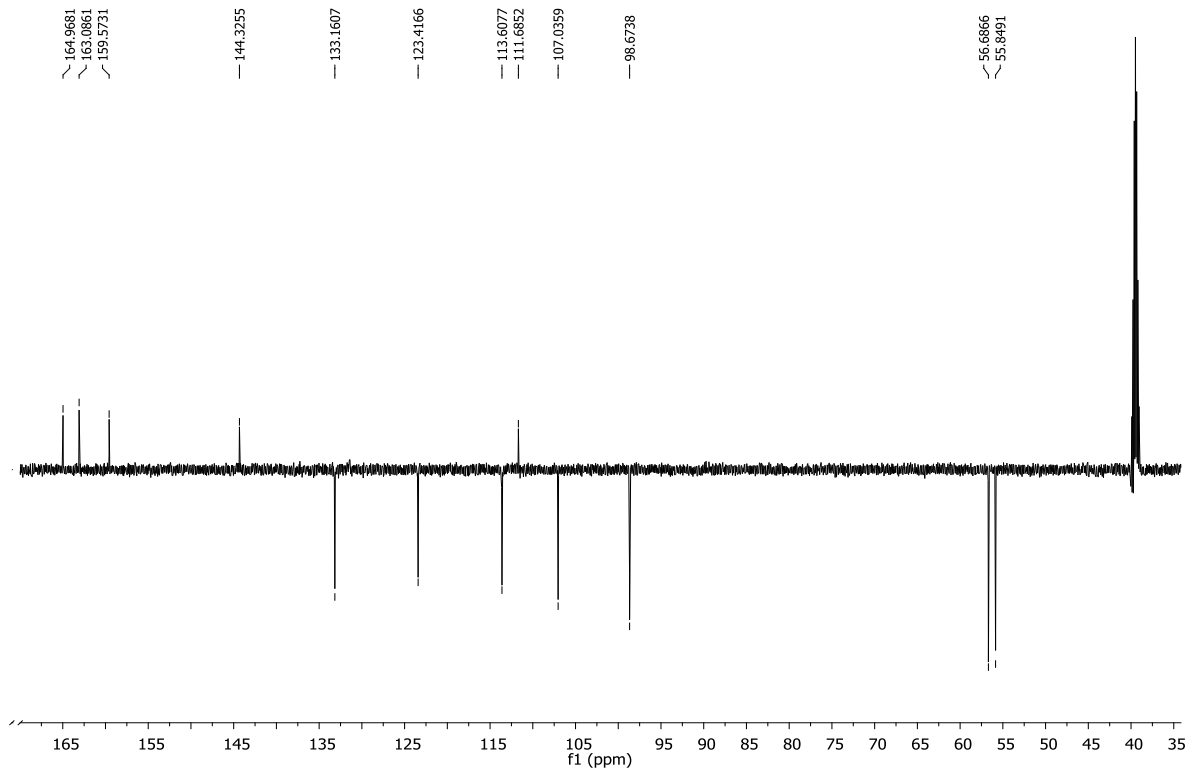


Prilog 17.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 29



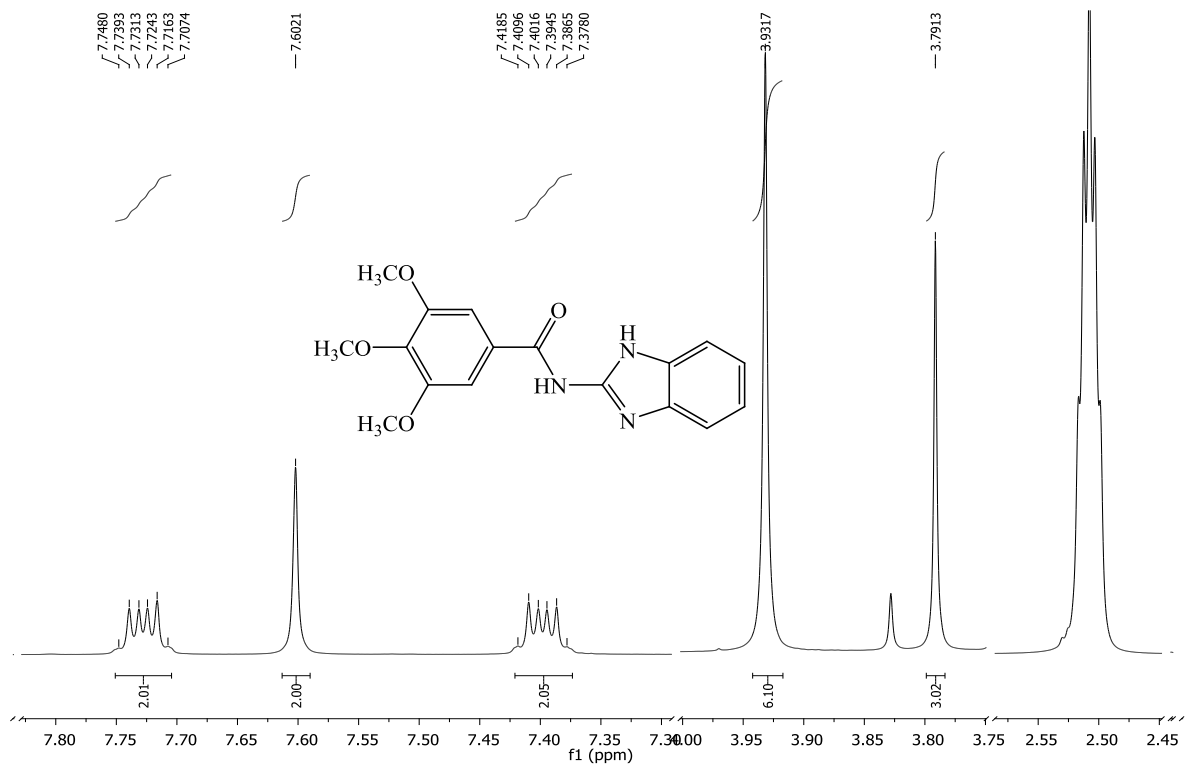
b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 29



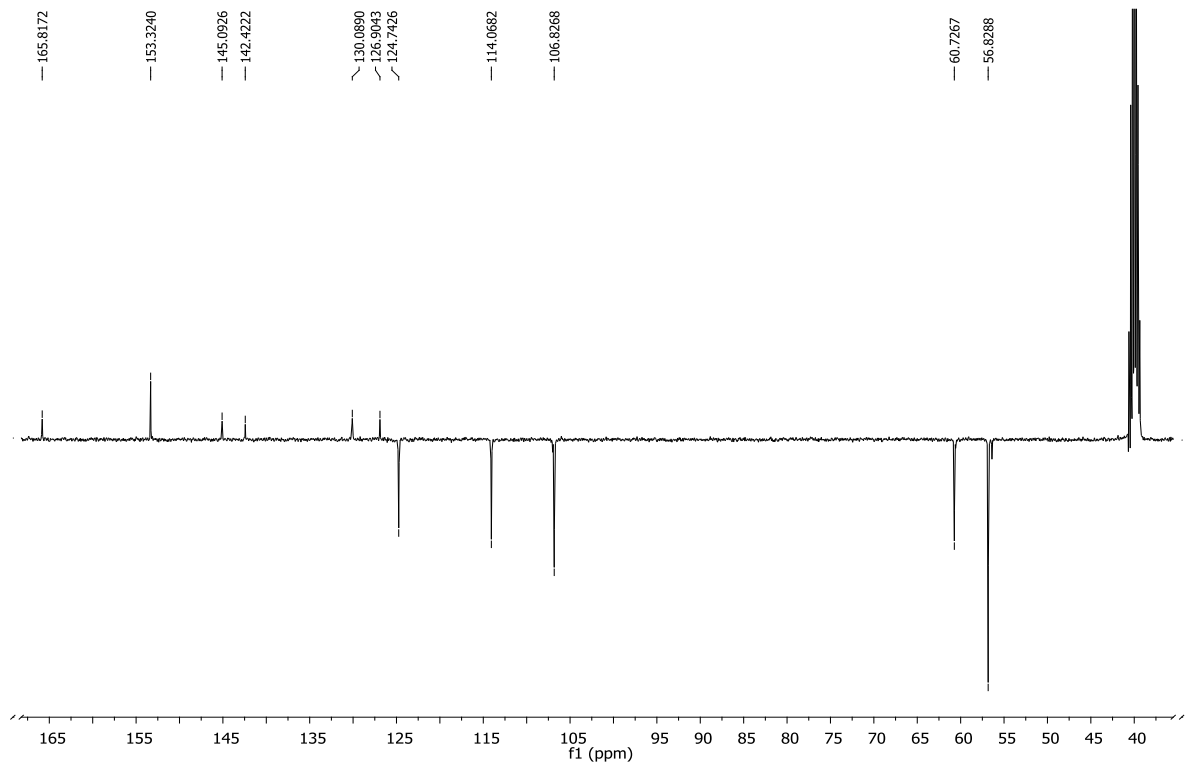


**Prilog 18.**

**a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 30**

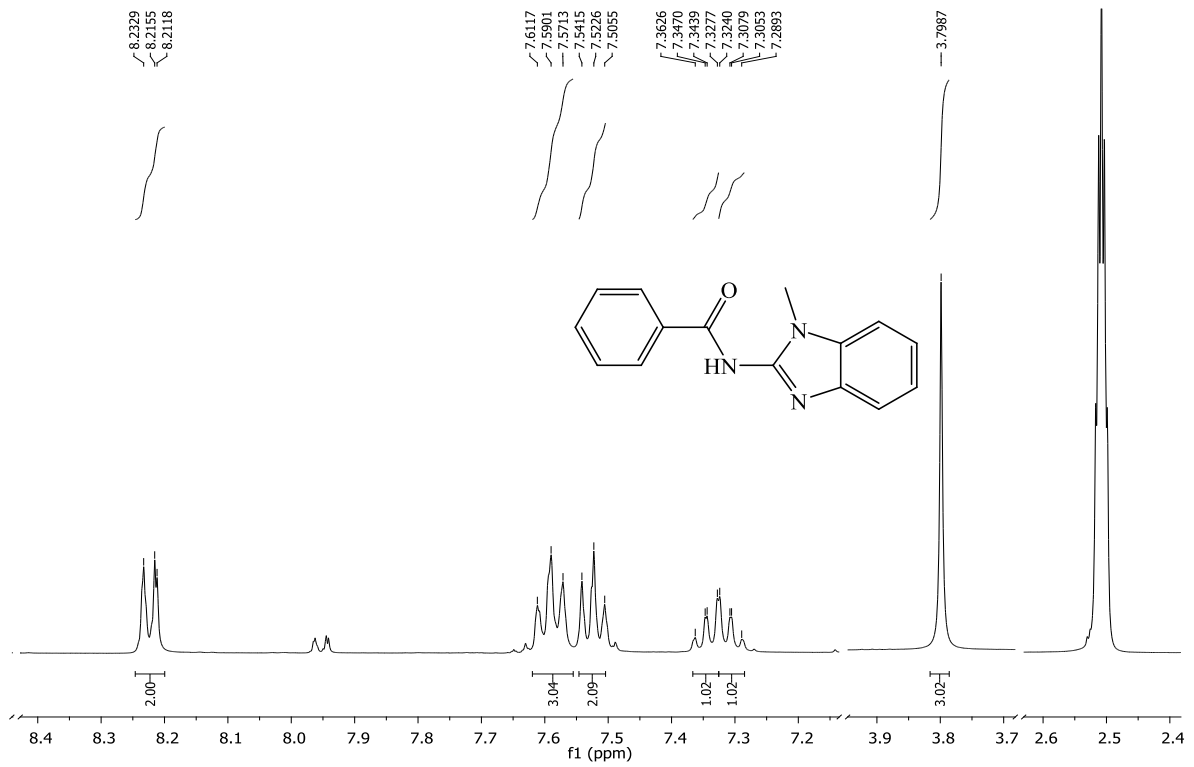


**b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 30**

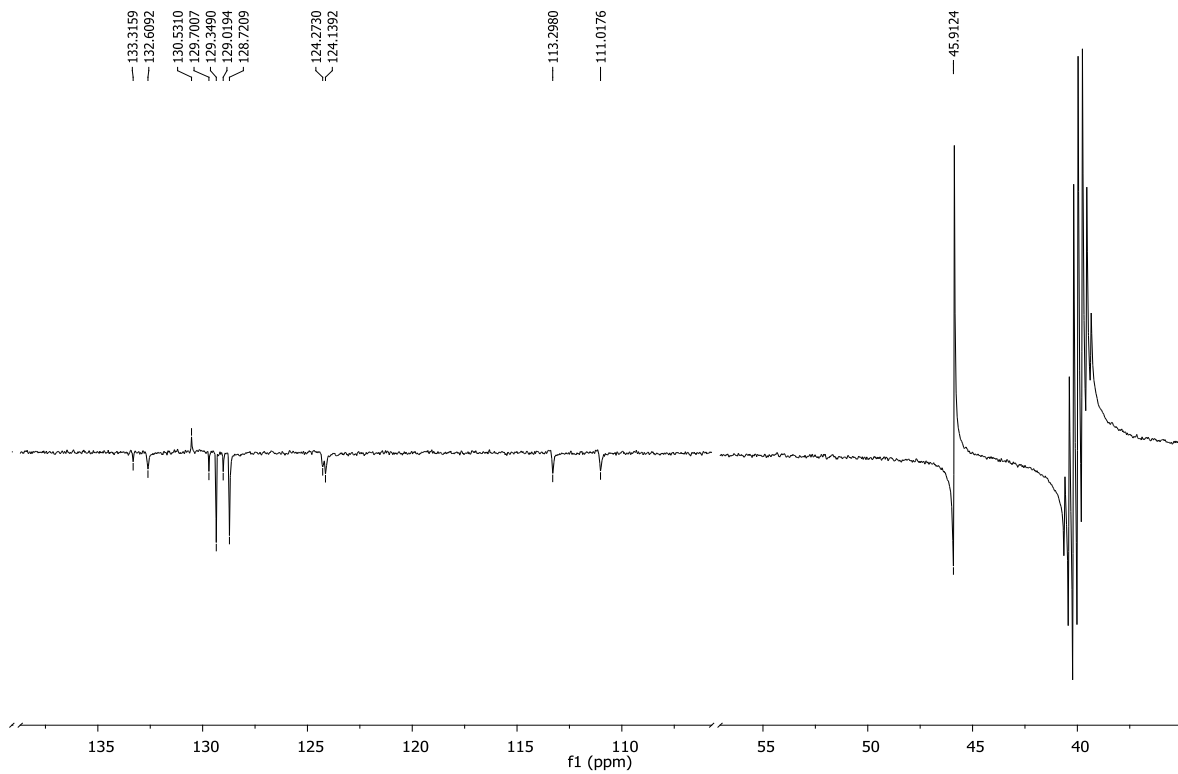


**Prilog 19.**

**a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 31**

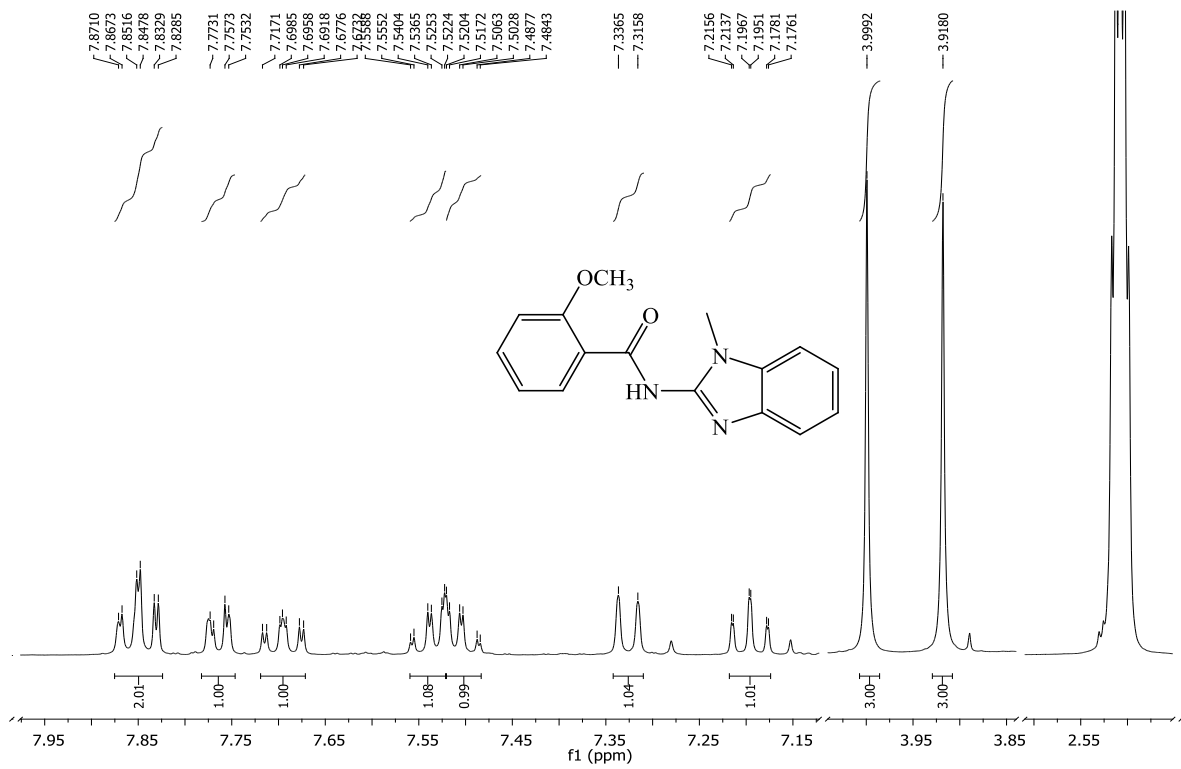


**b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 31**

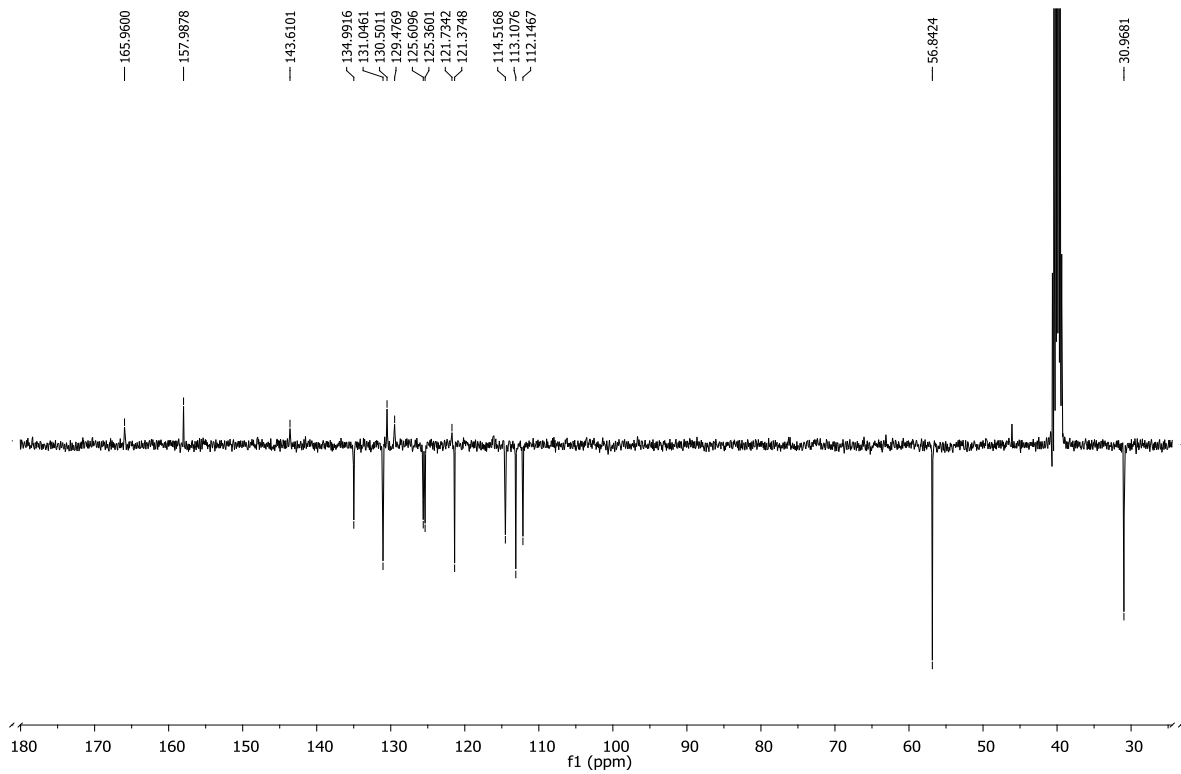


Prilog 20.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **32**

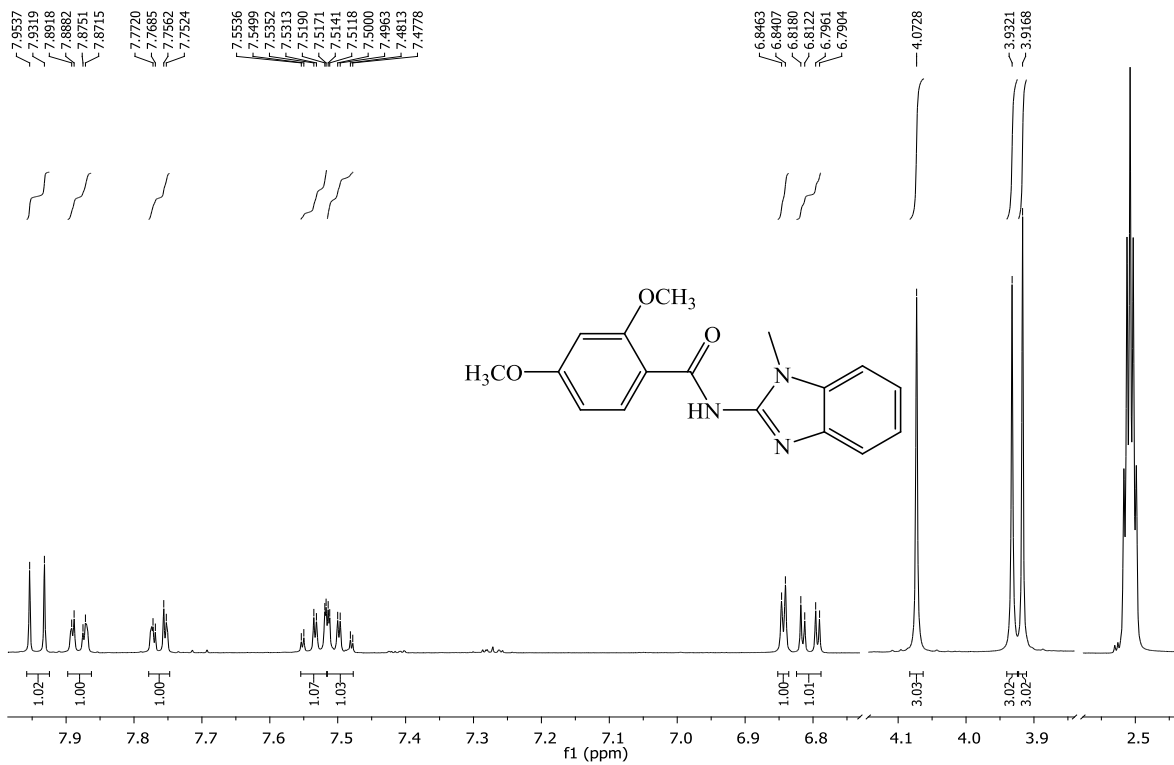


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **32**

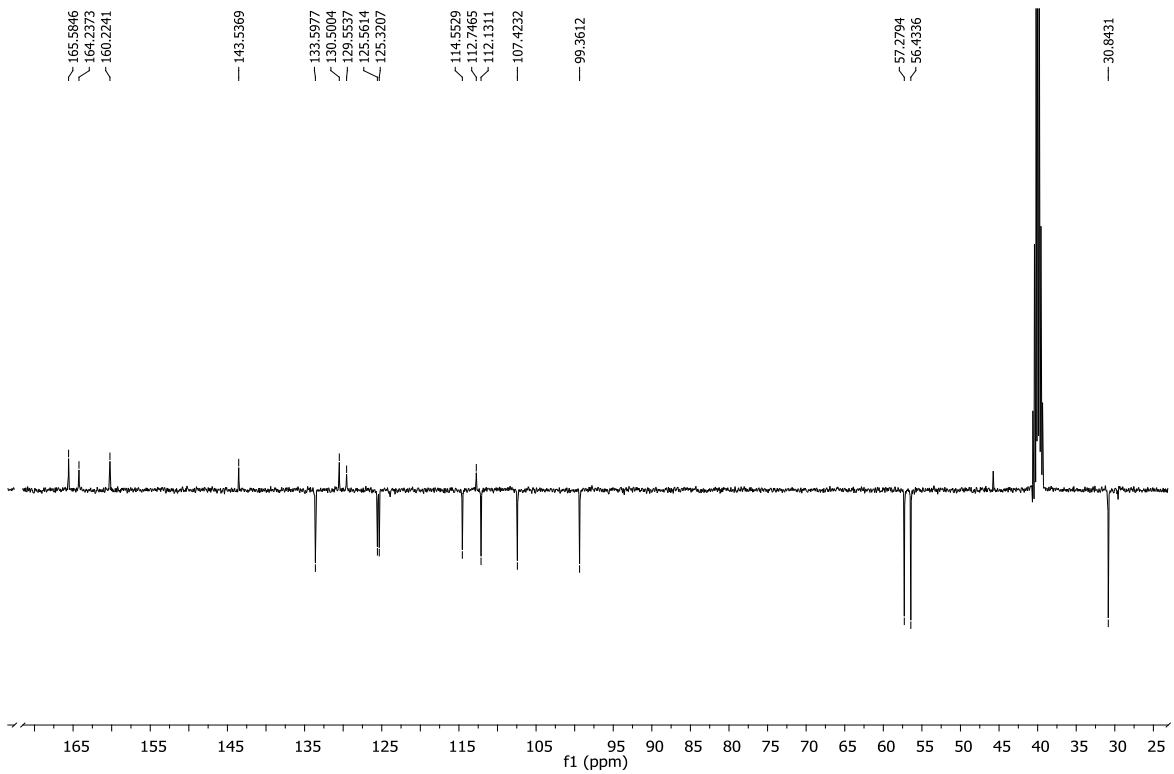


Prilog 21.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 33

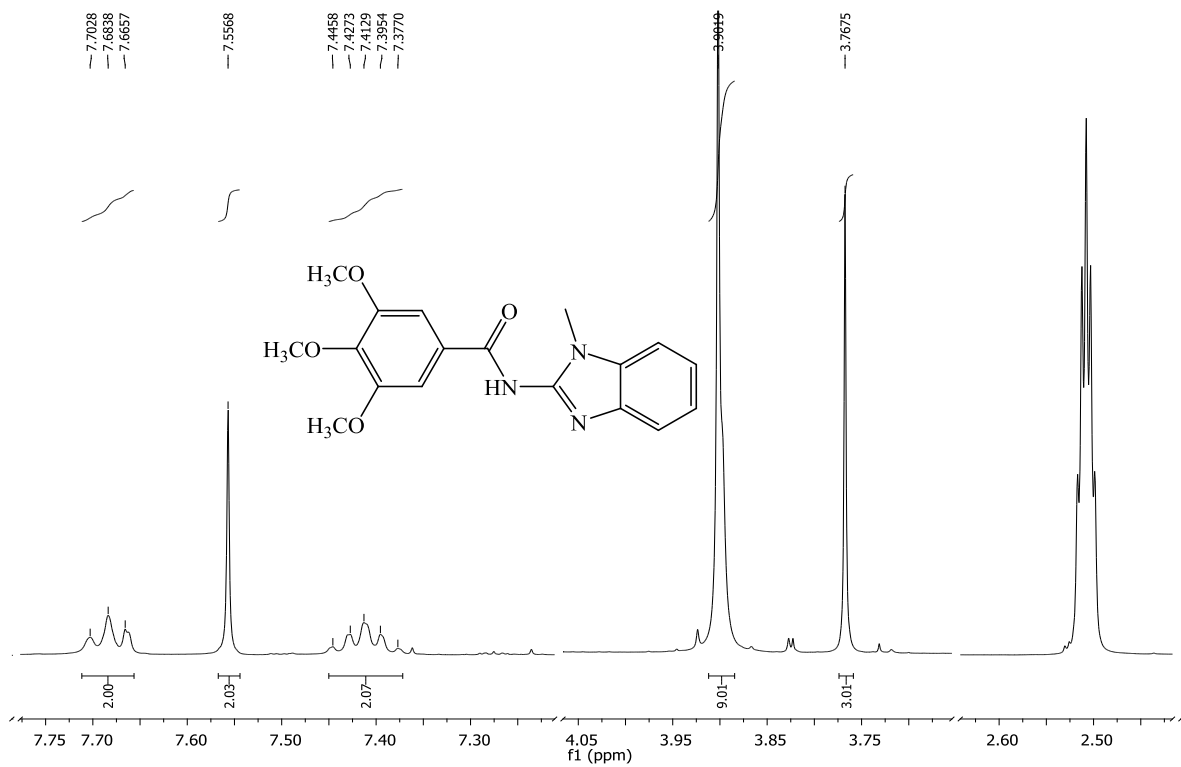


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 33

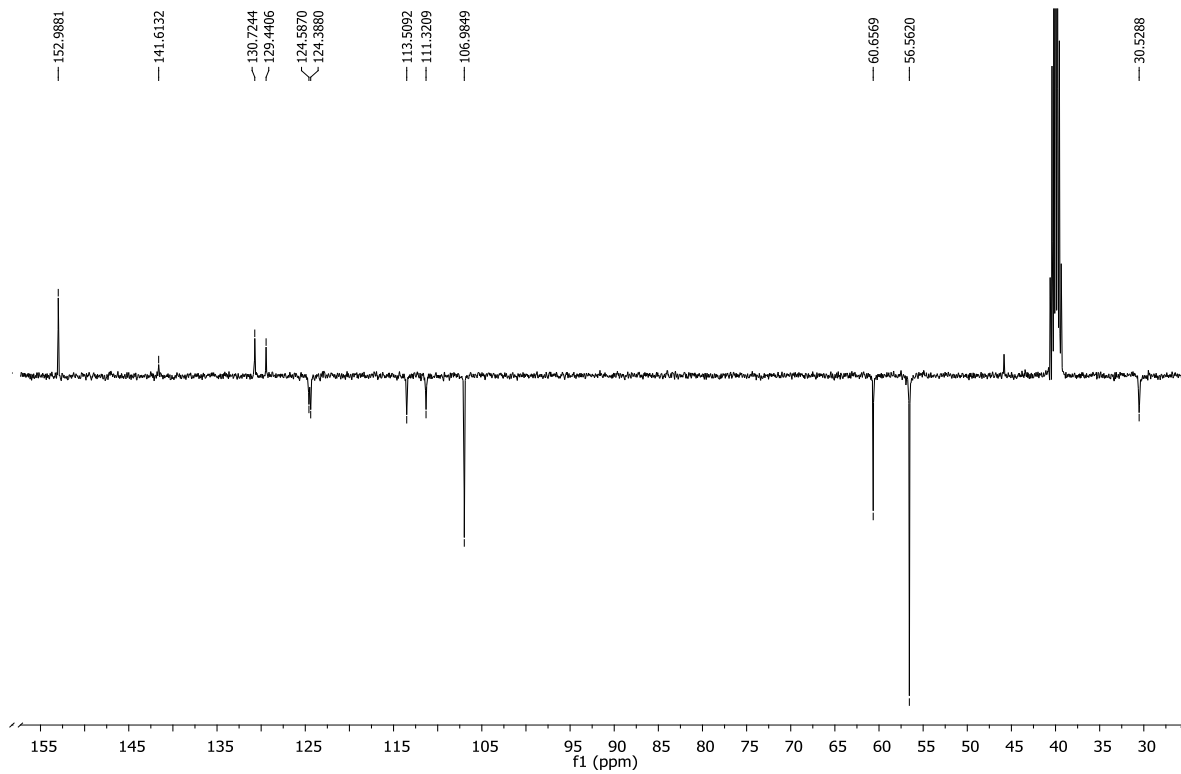


Prilog 22.

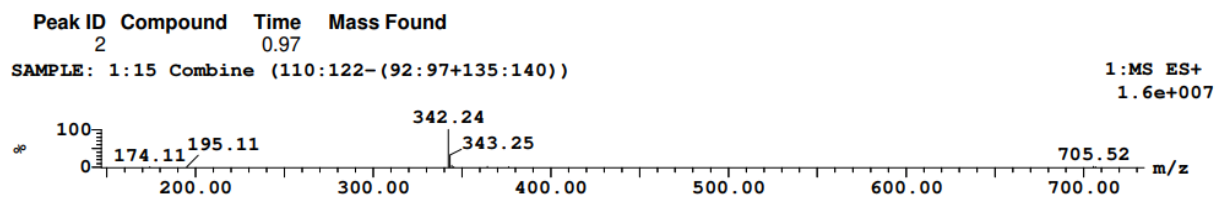
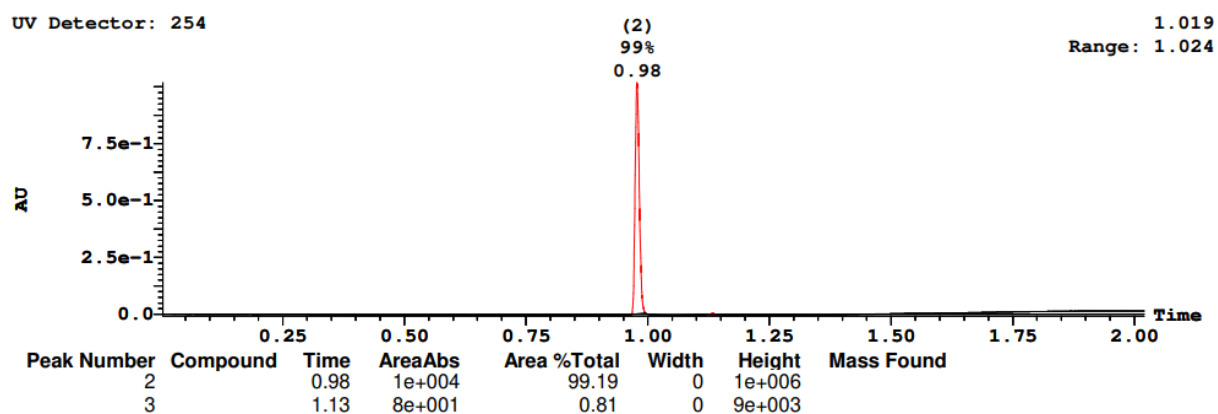
a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **34**



b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **34**

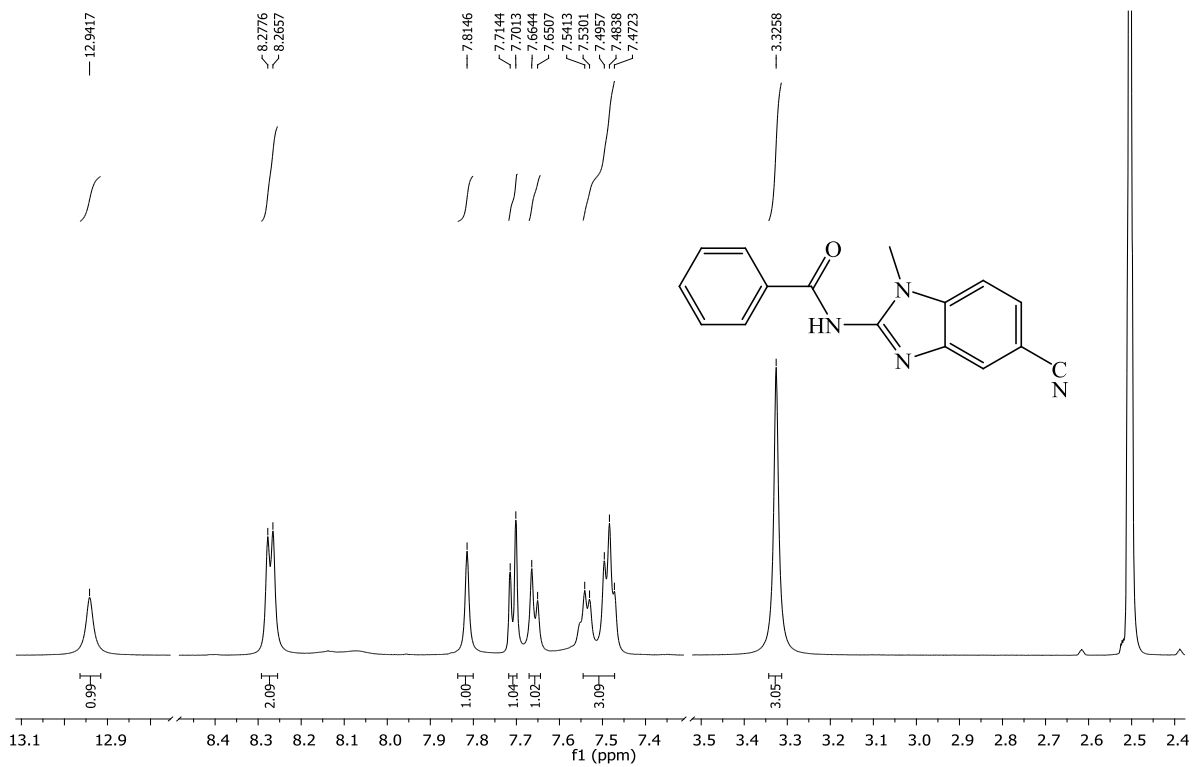


c) Kromatogram i MS spektar spoja **34**

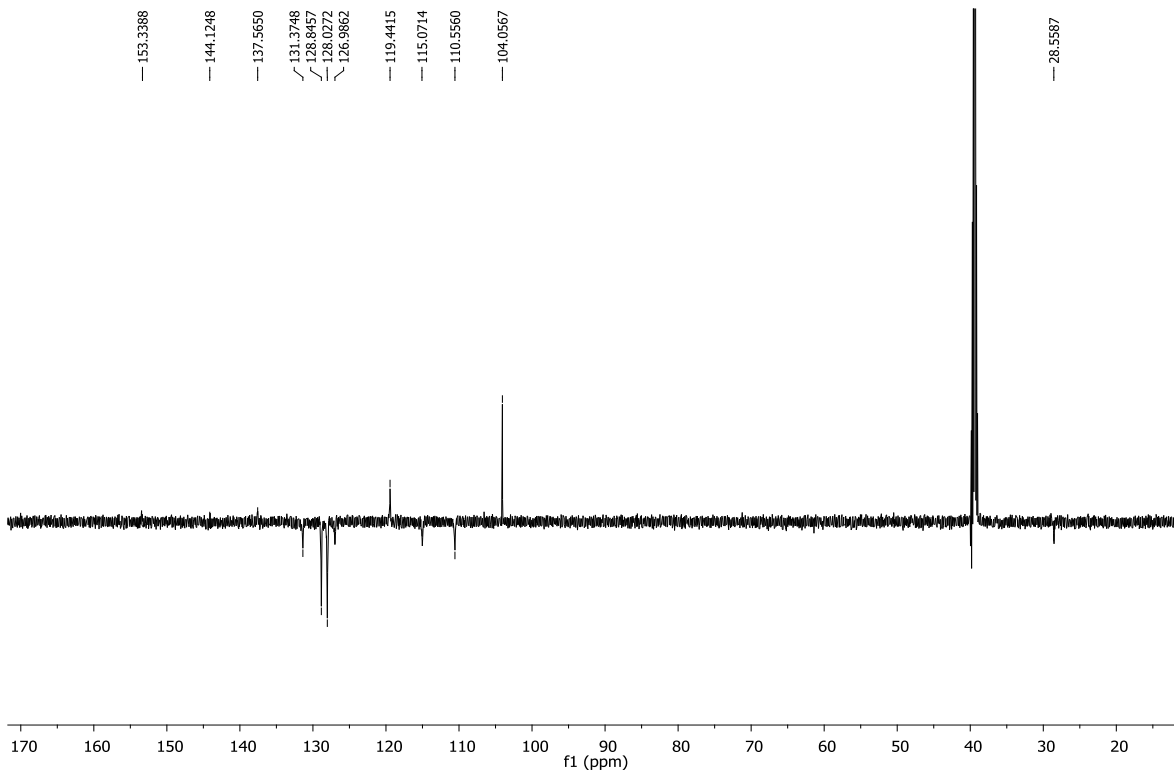


Prilog 23.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **35**

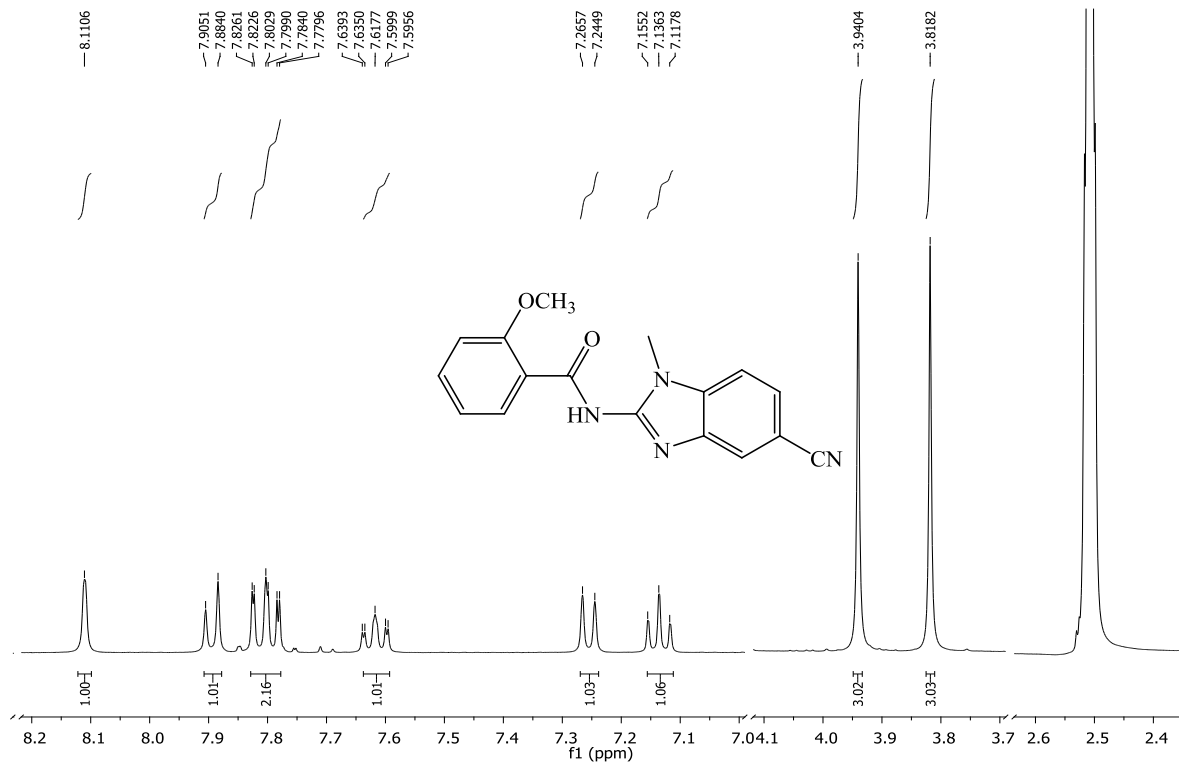


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **35**

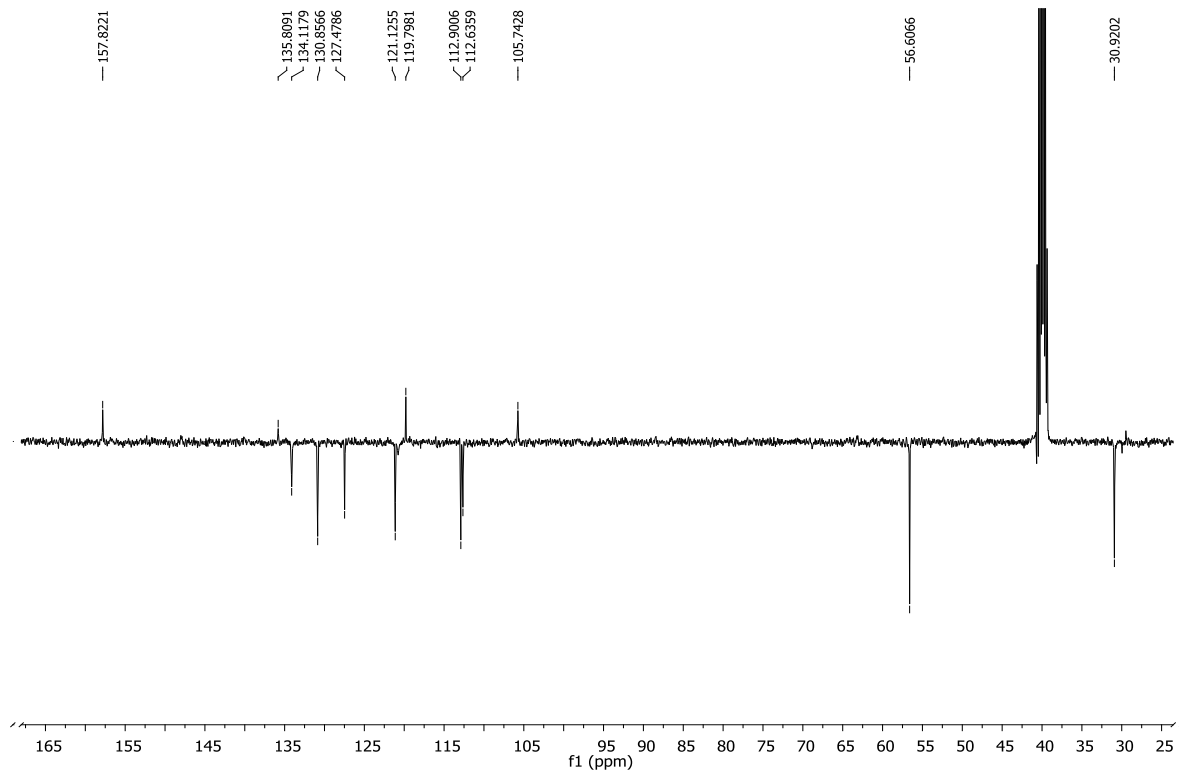


Prilog 24.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **36**



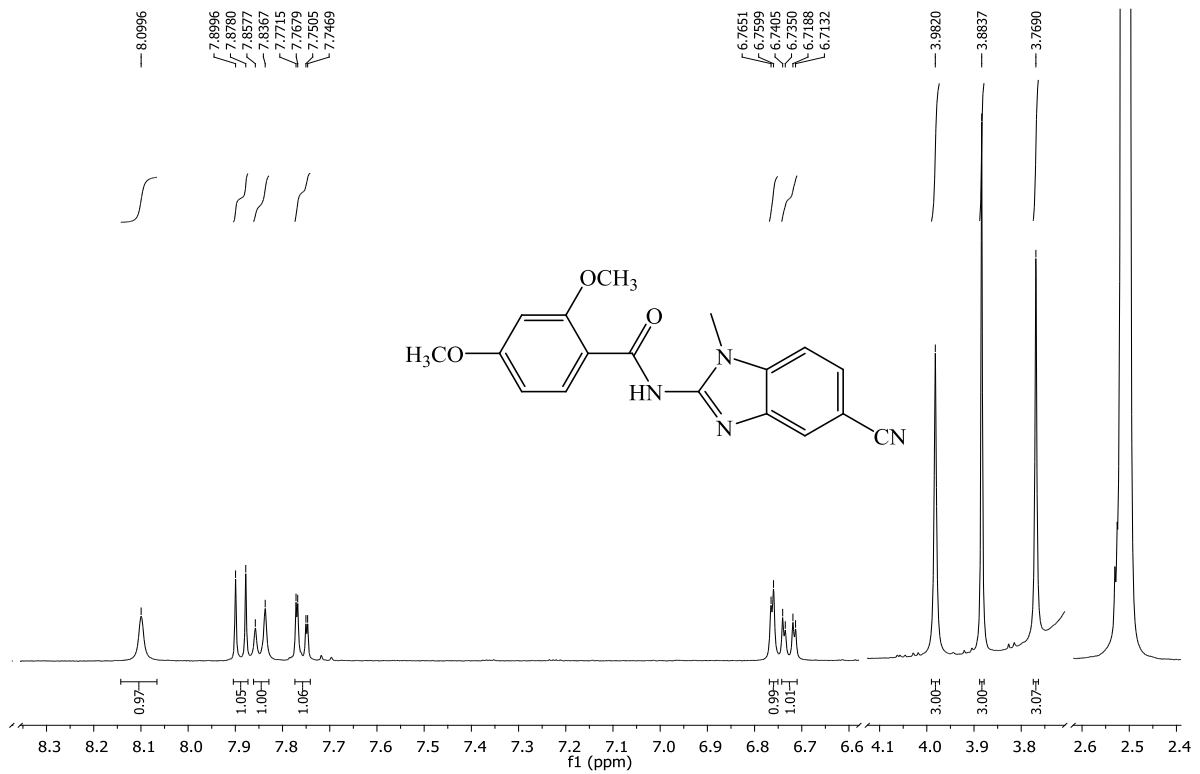
b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **36**



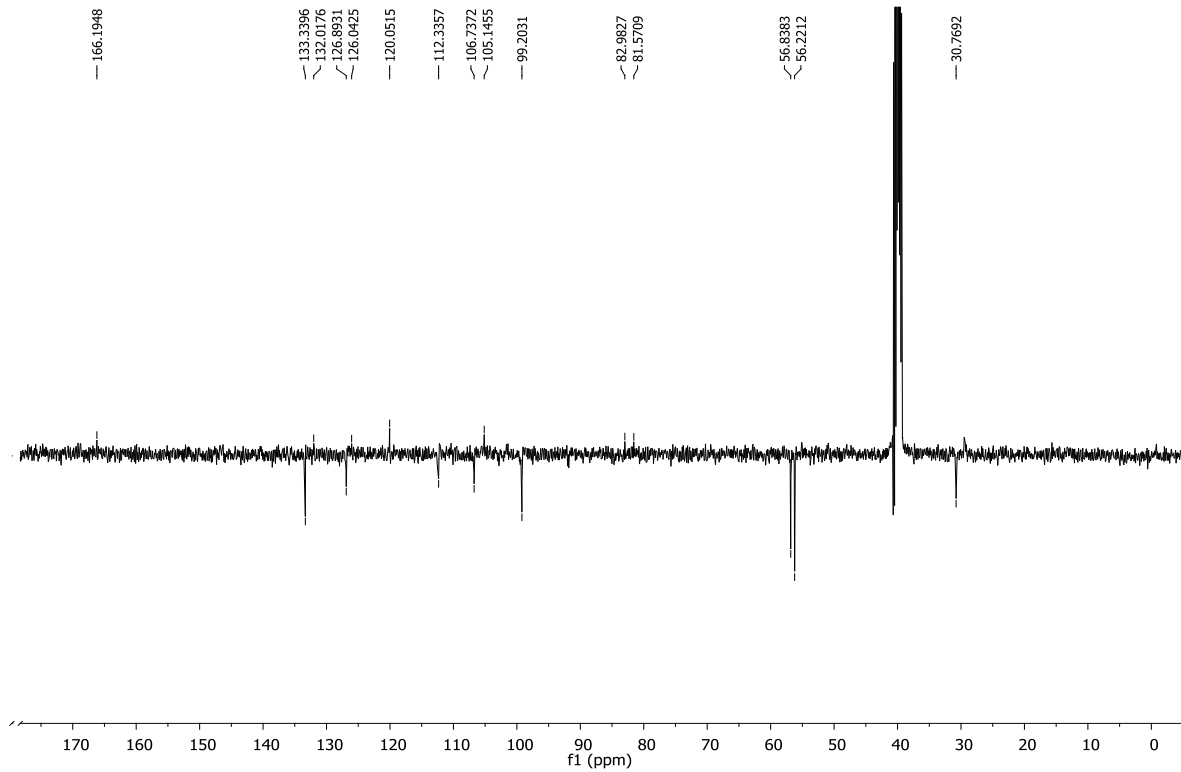


Prilog 25.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 37

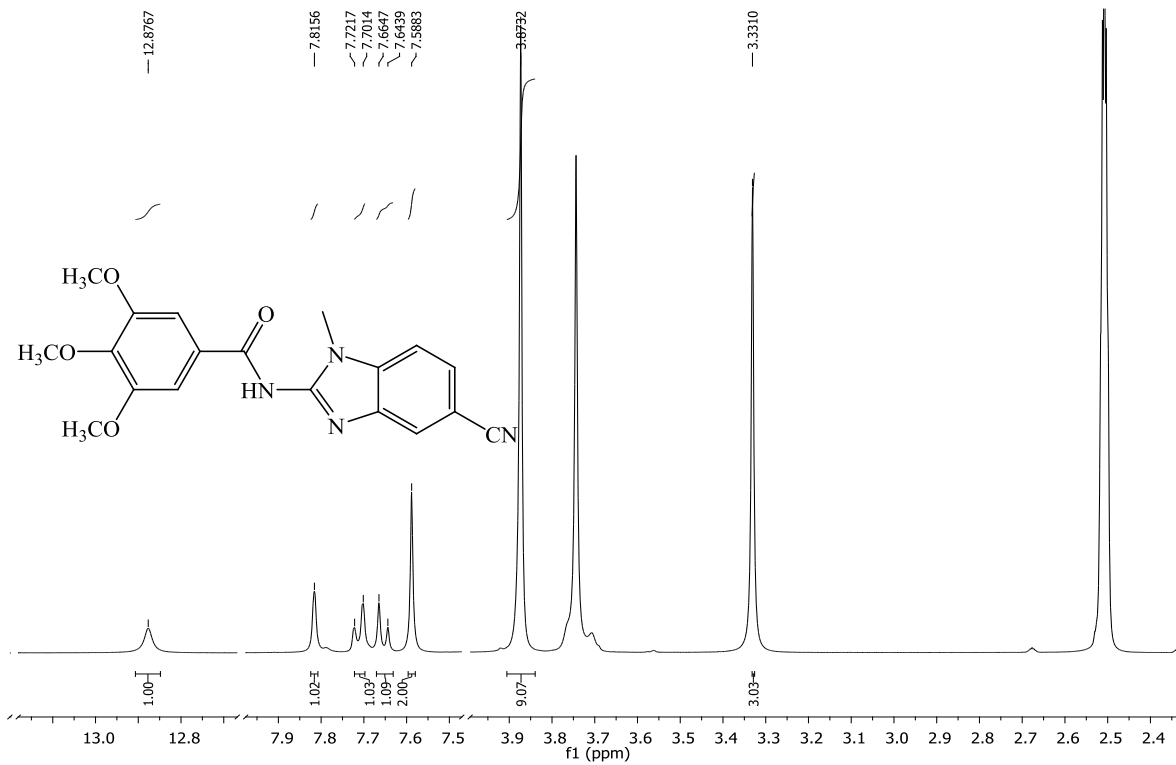


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 37

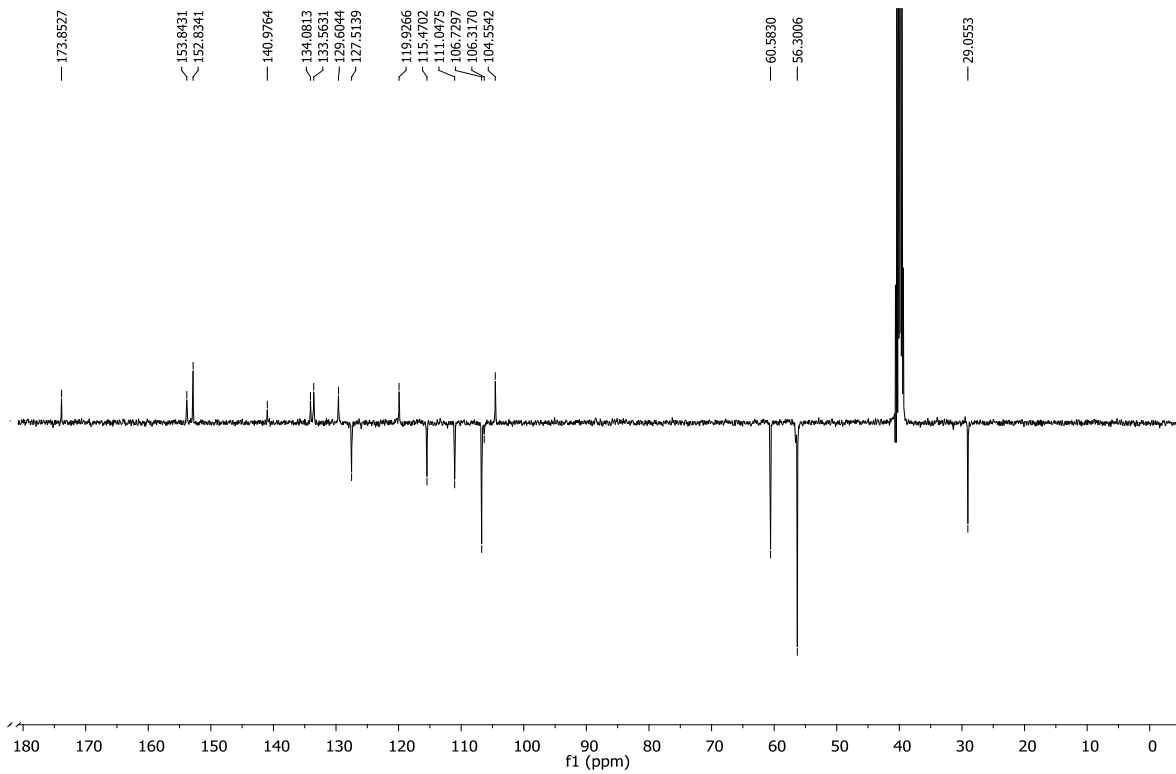


Prilog 26.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **38**

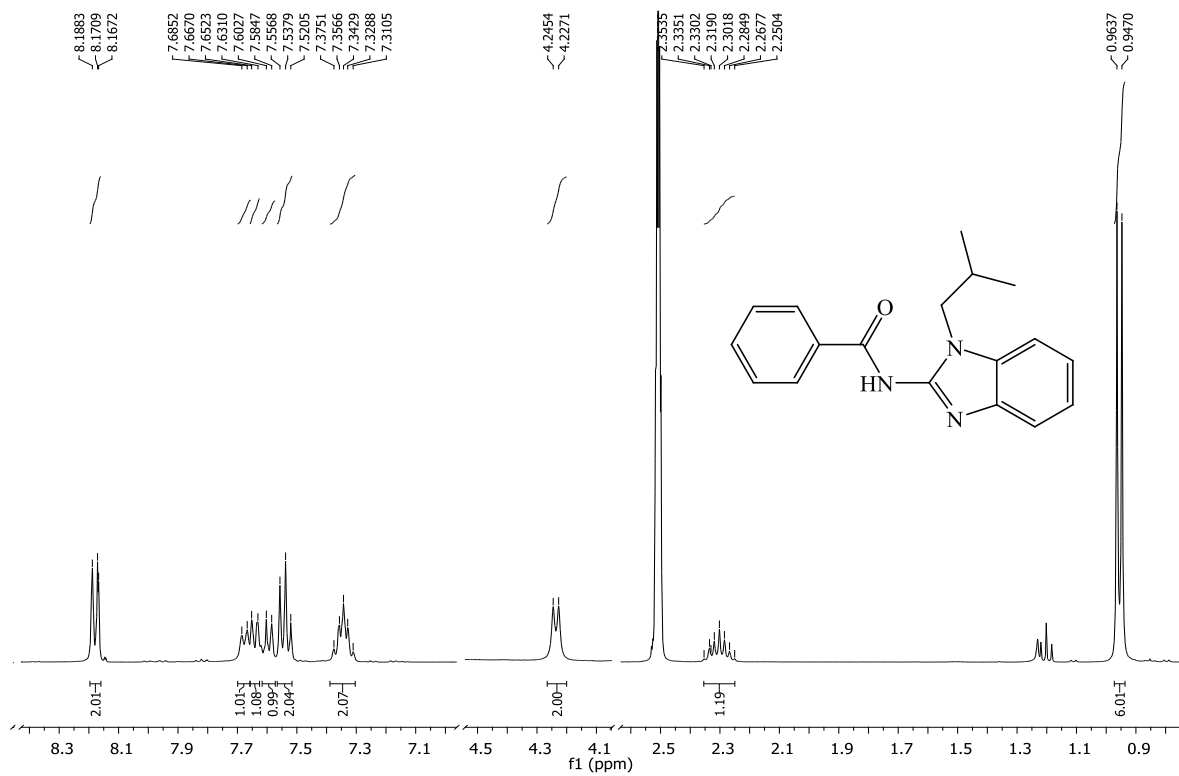


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **38**

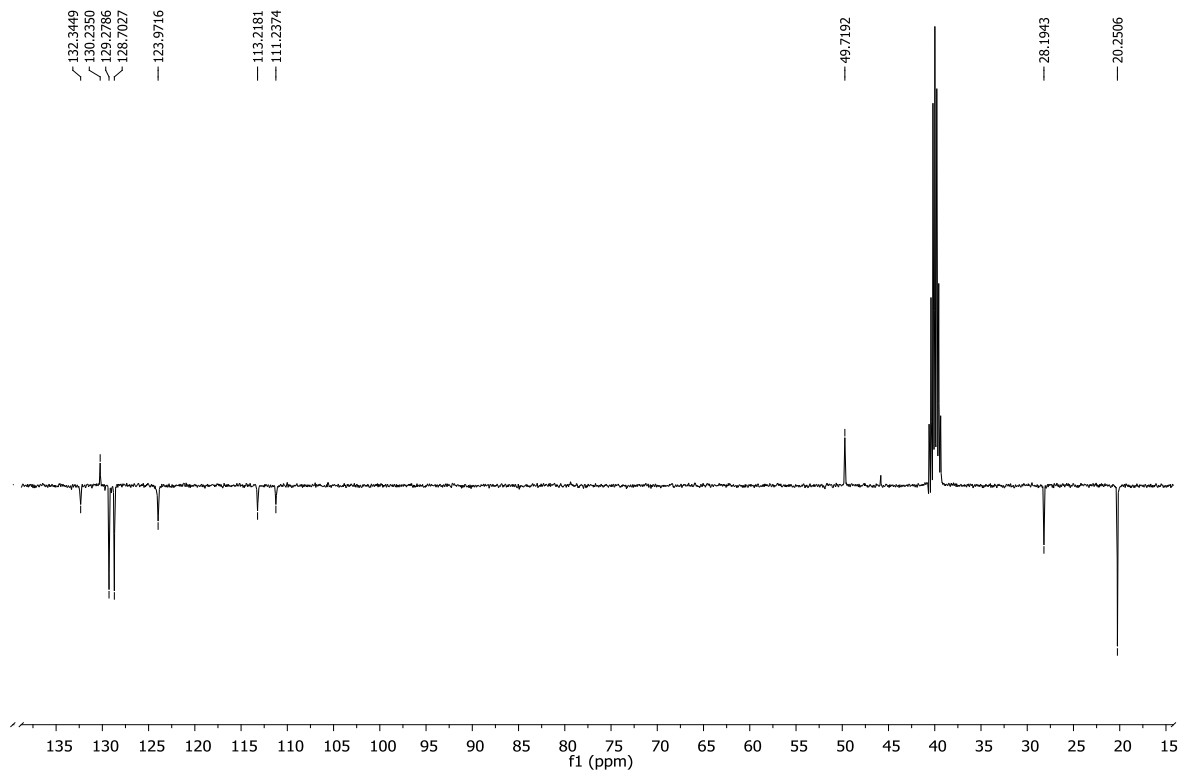


Prilog 27.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **39**

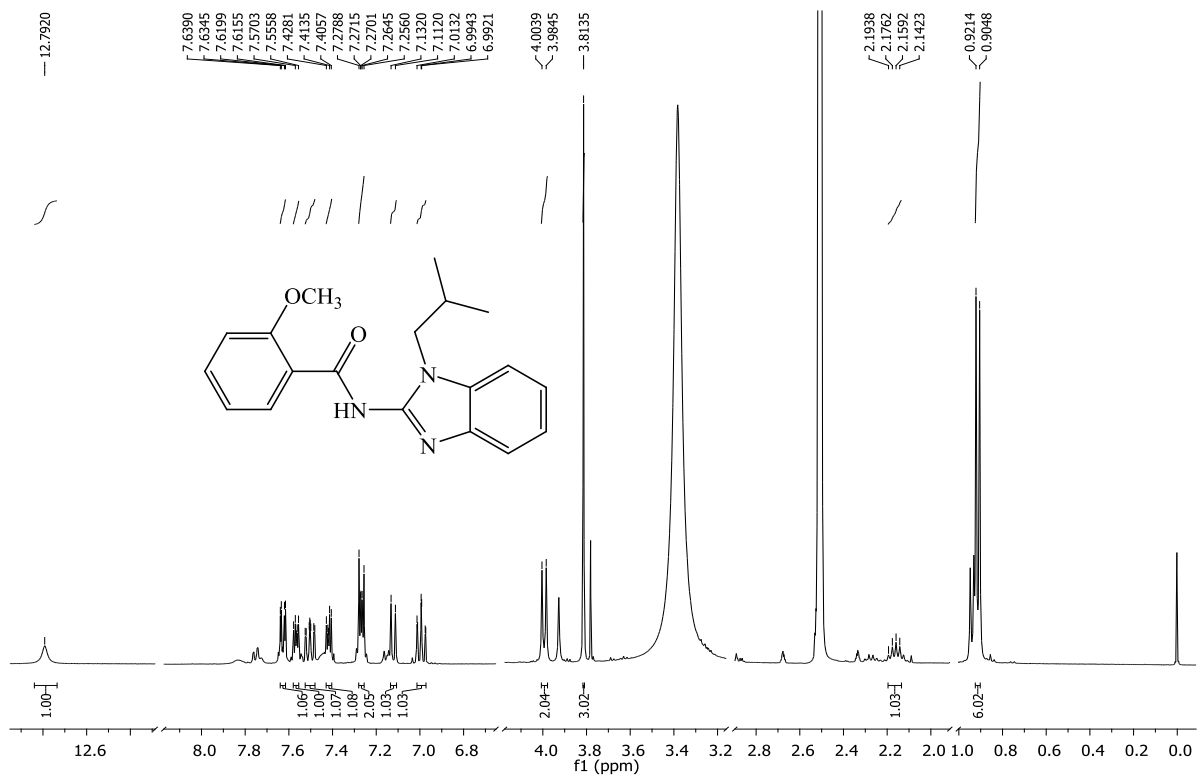


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **39**



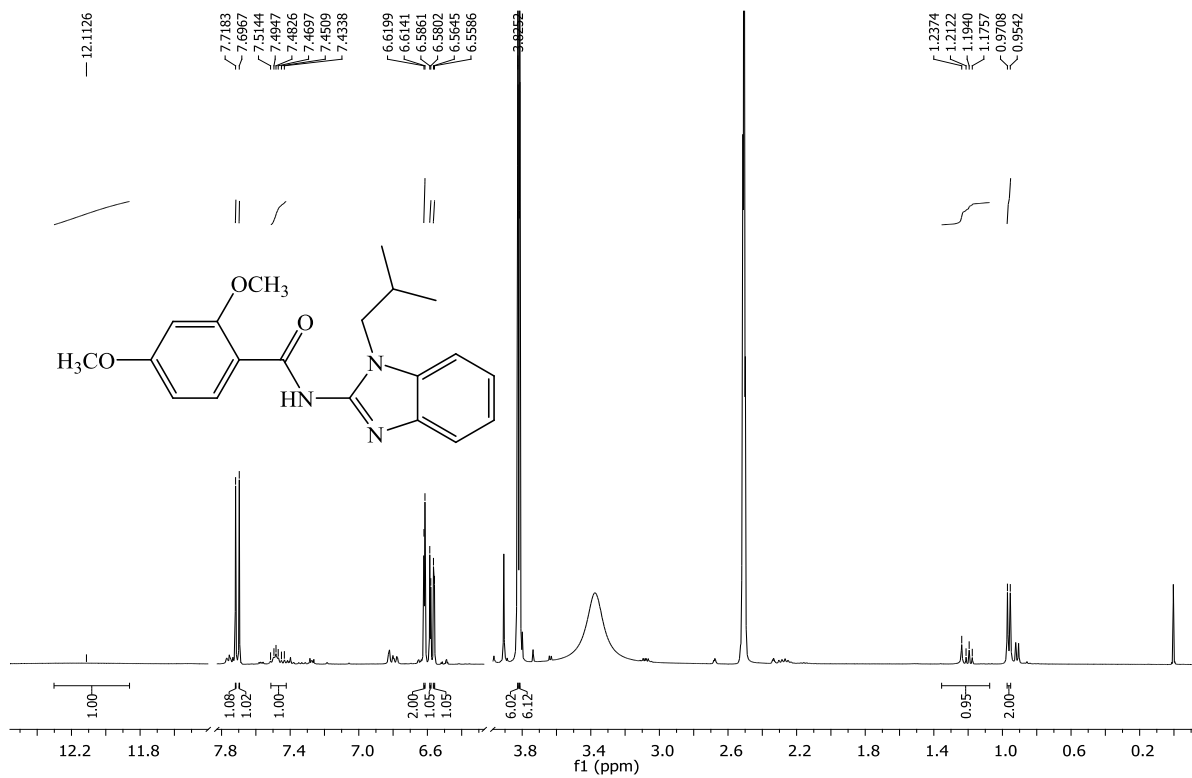
Prilog 28.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 40



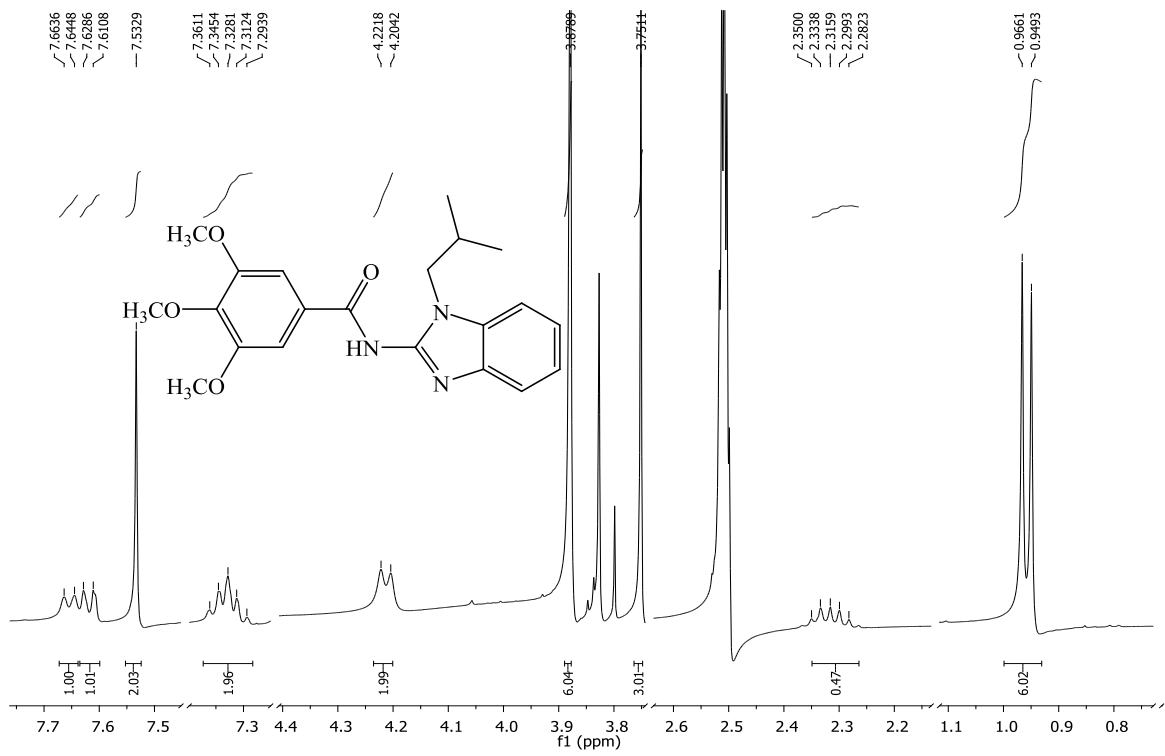
**Prilog 29.**

**a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **41****



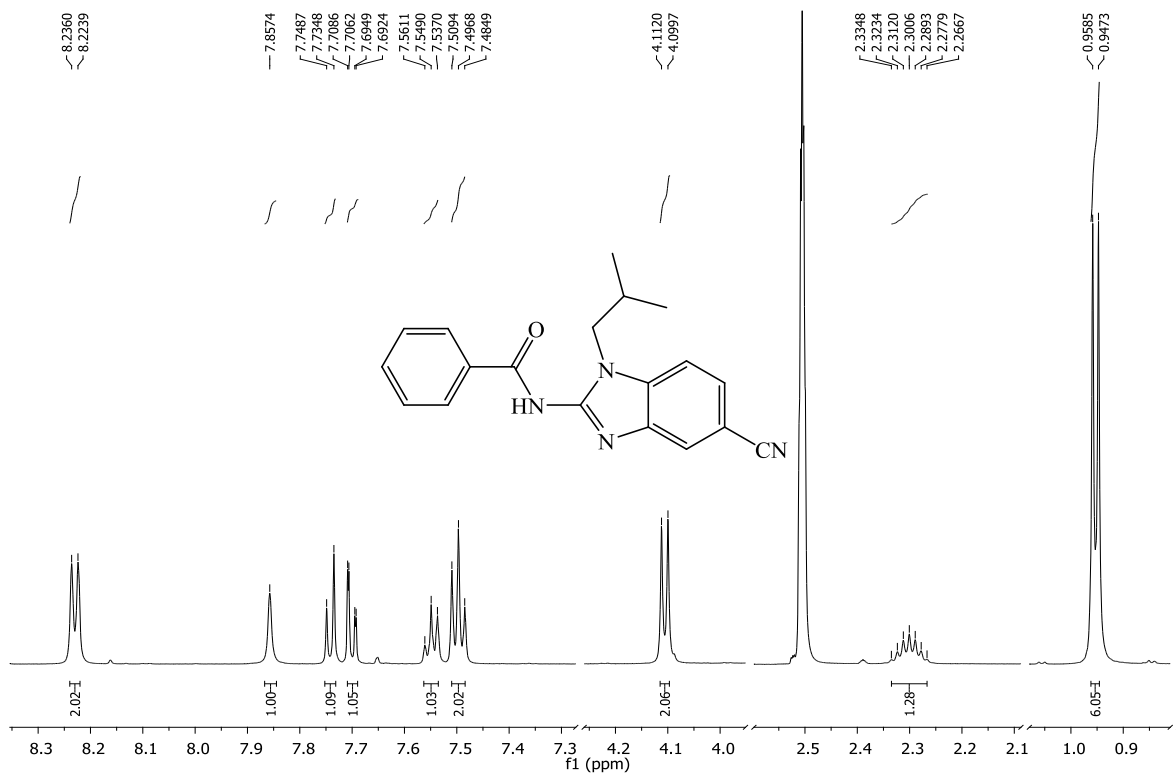
**Prilog 30.**

**a) <sup>1</sup>H NMR spektar spoja 42**

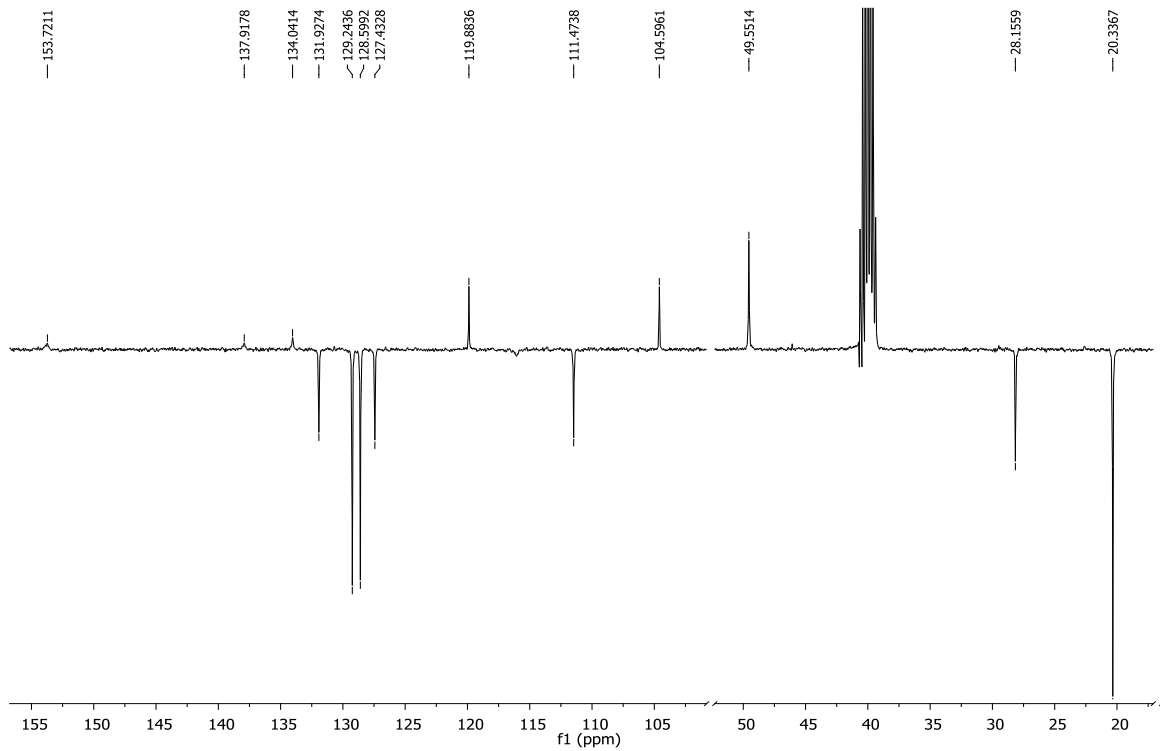


Prilog 31.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **43**

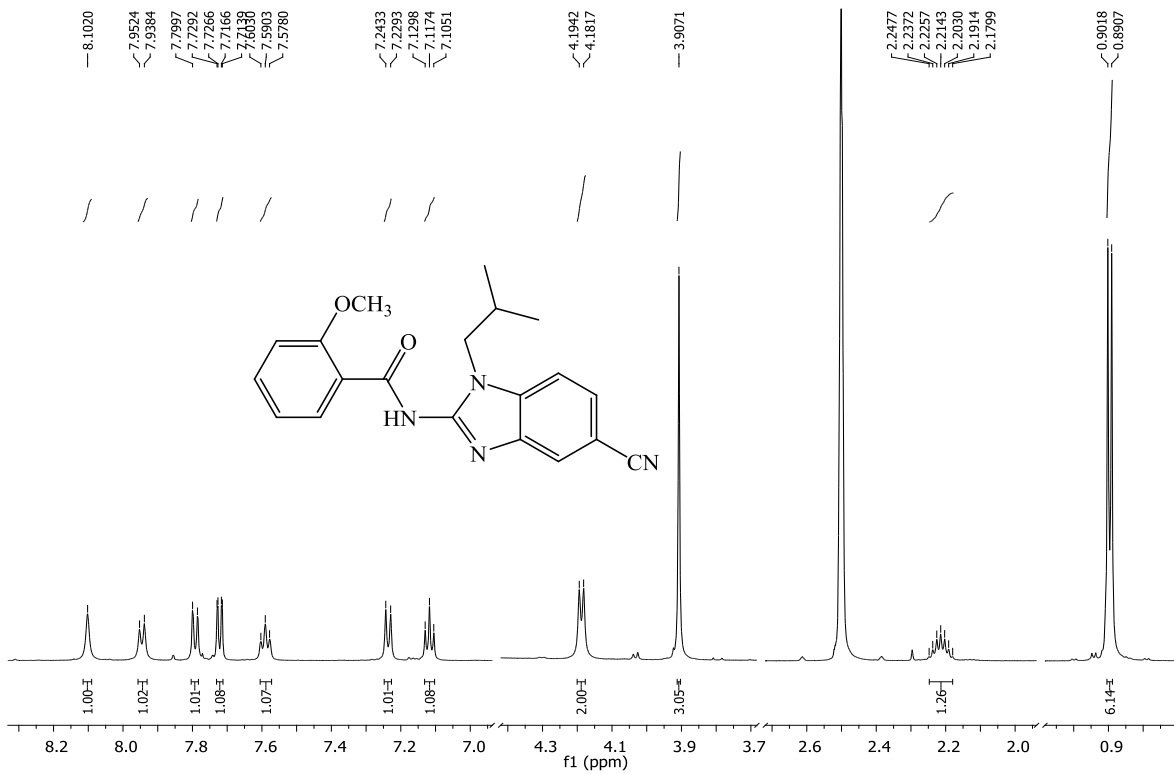


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **43**

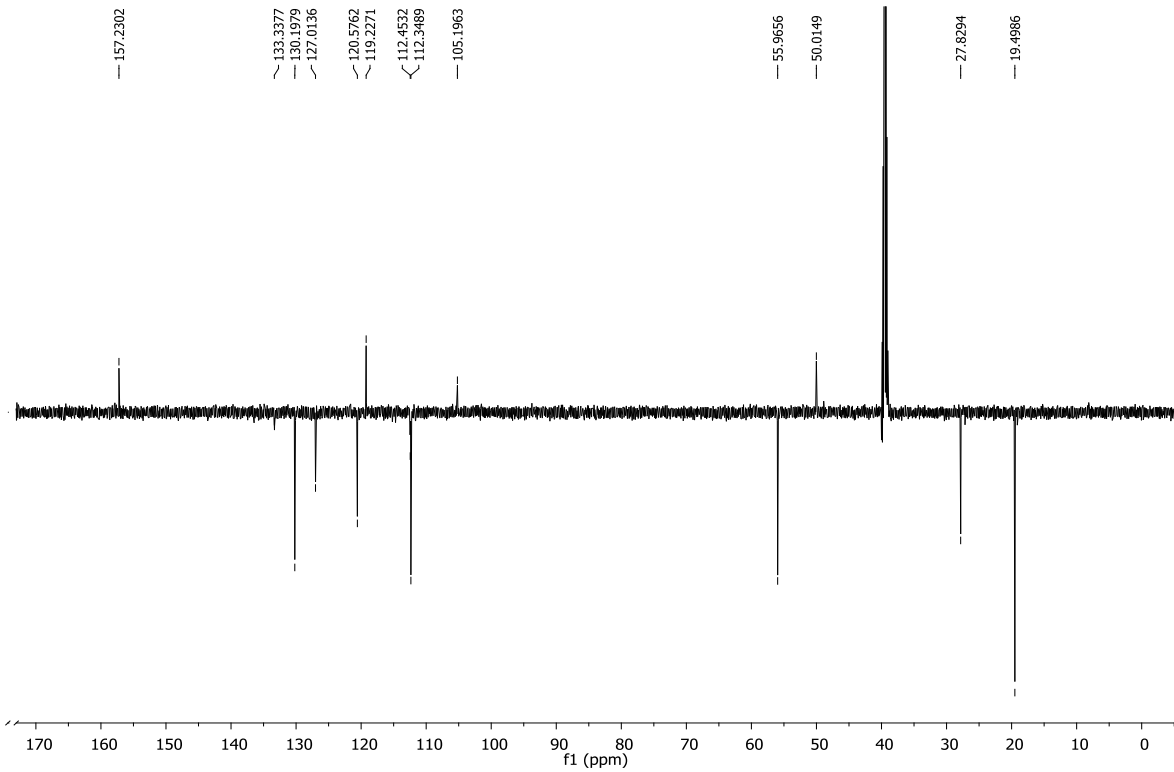


Prilog 32.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **44**



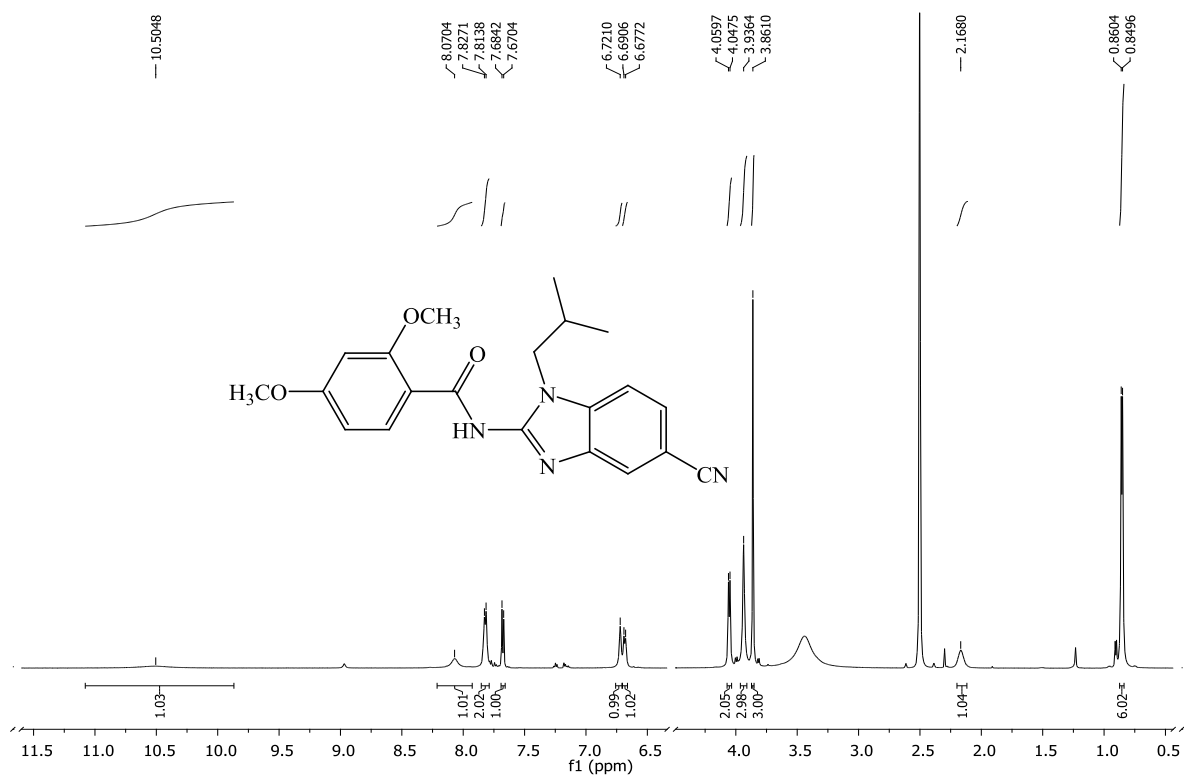
b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **44**



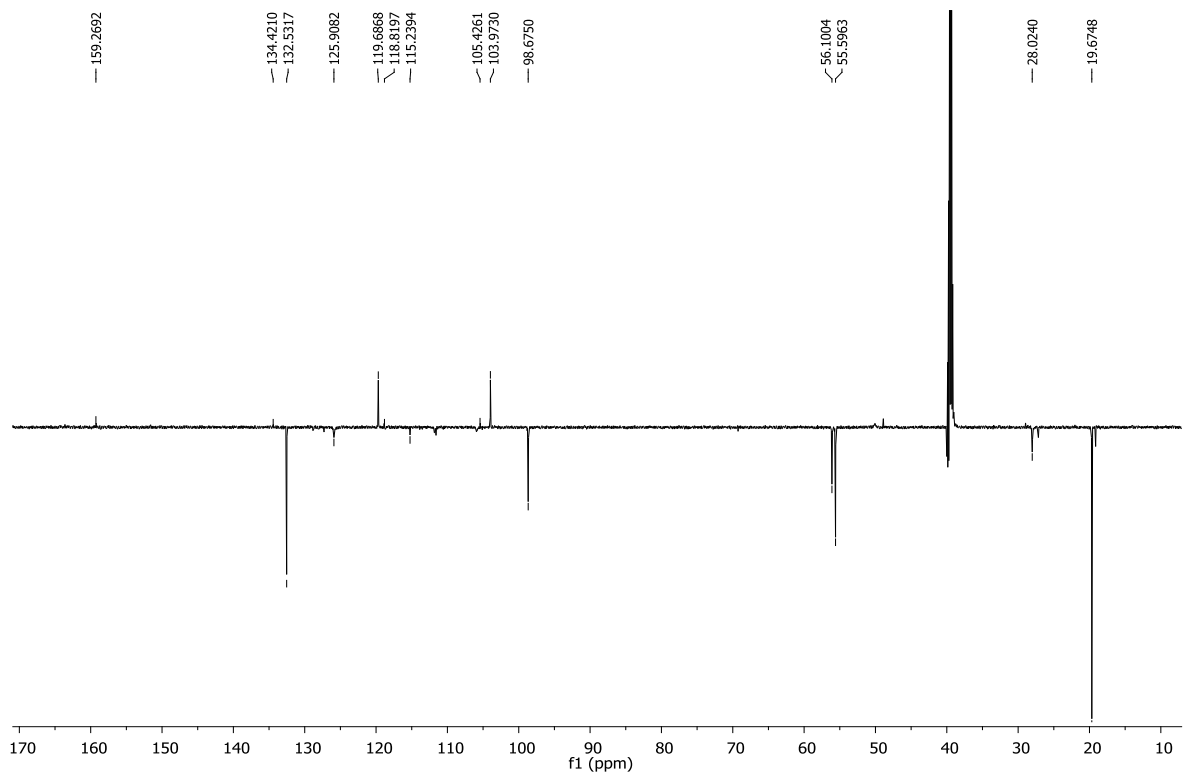


Prilog 33.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 45

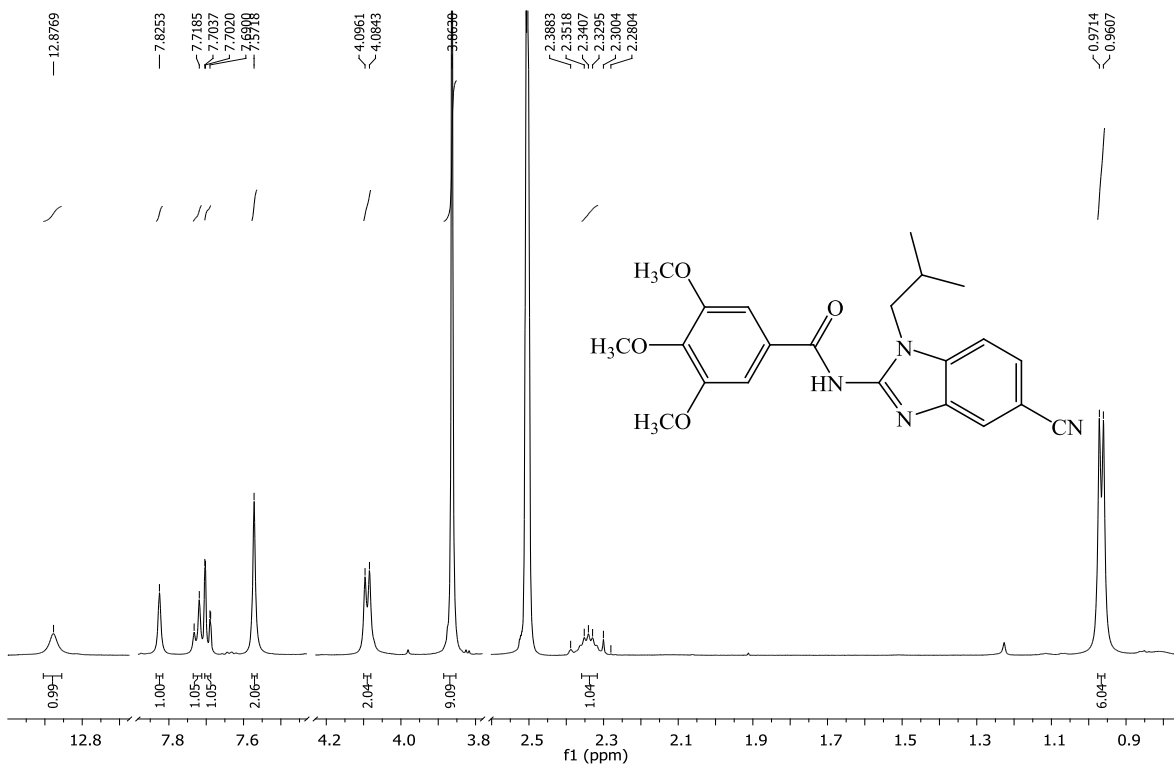


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 45

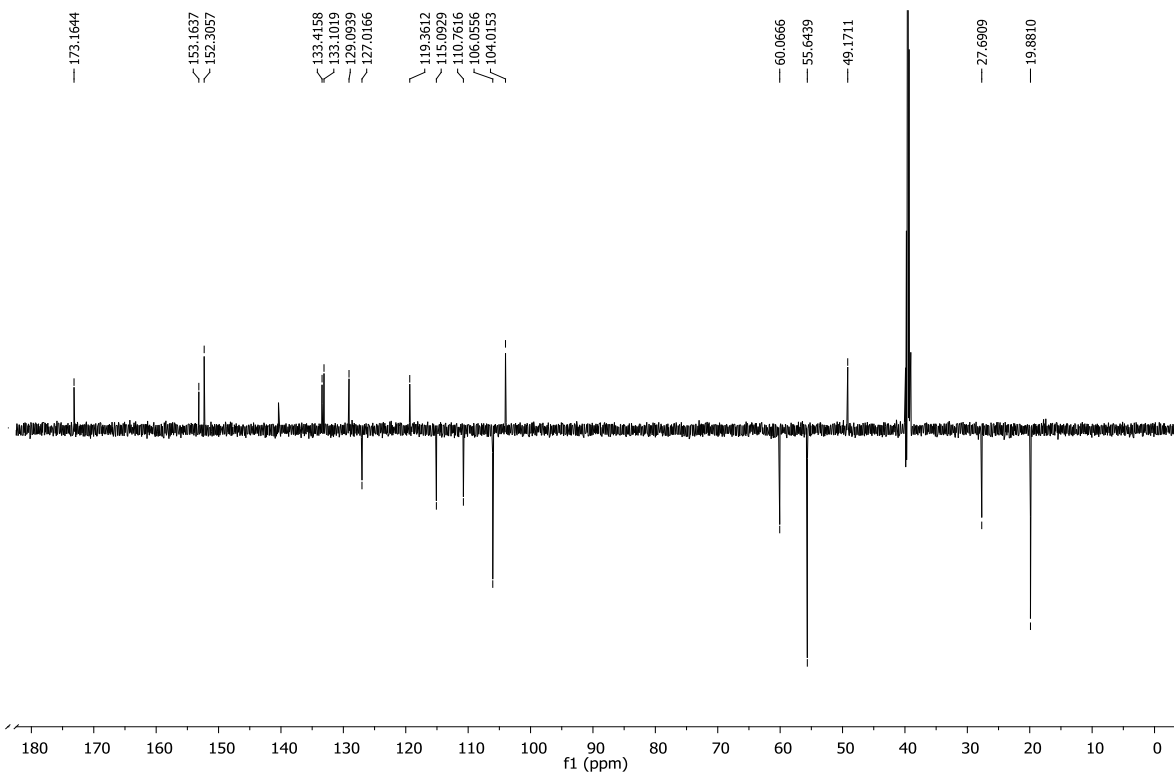


Prilog 34.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 46

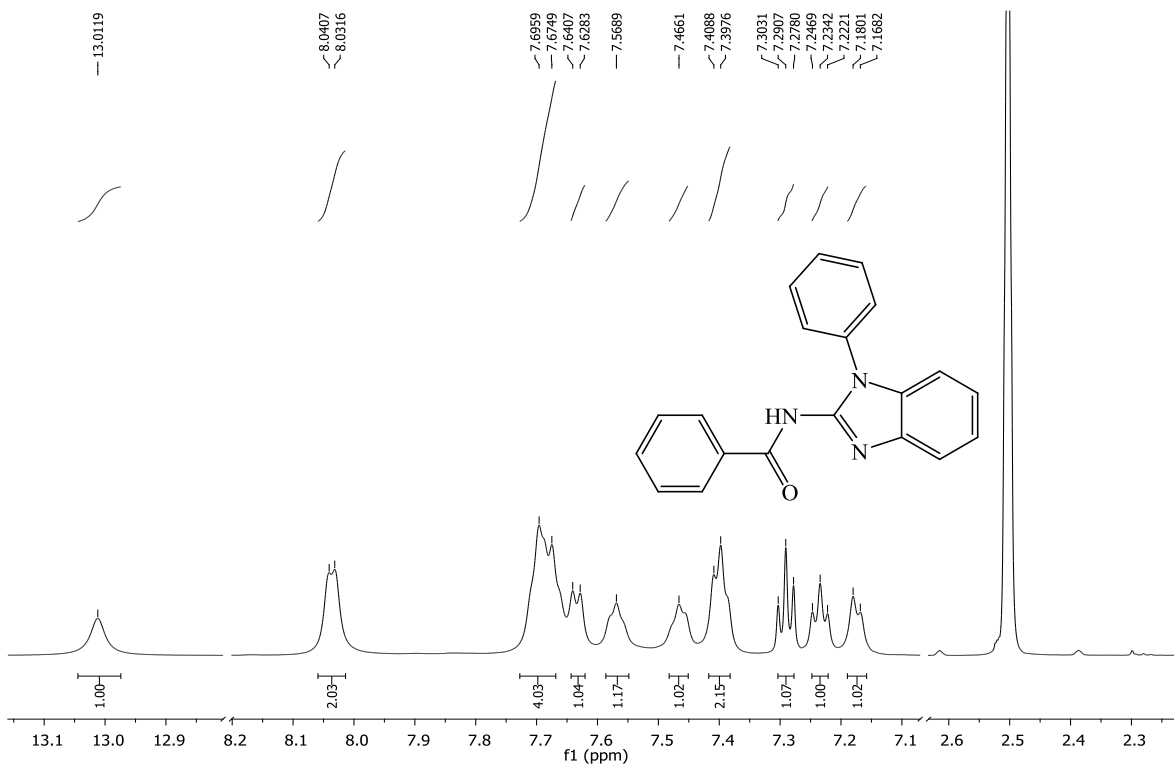


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 46

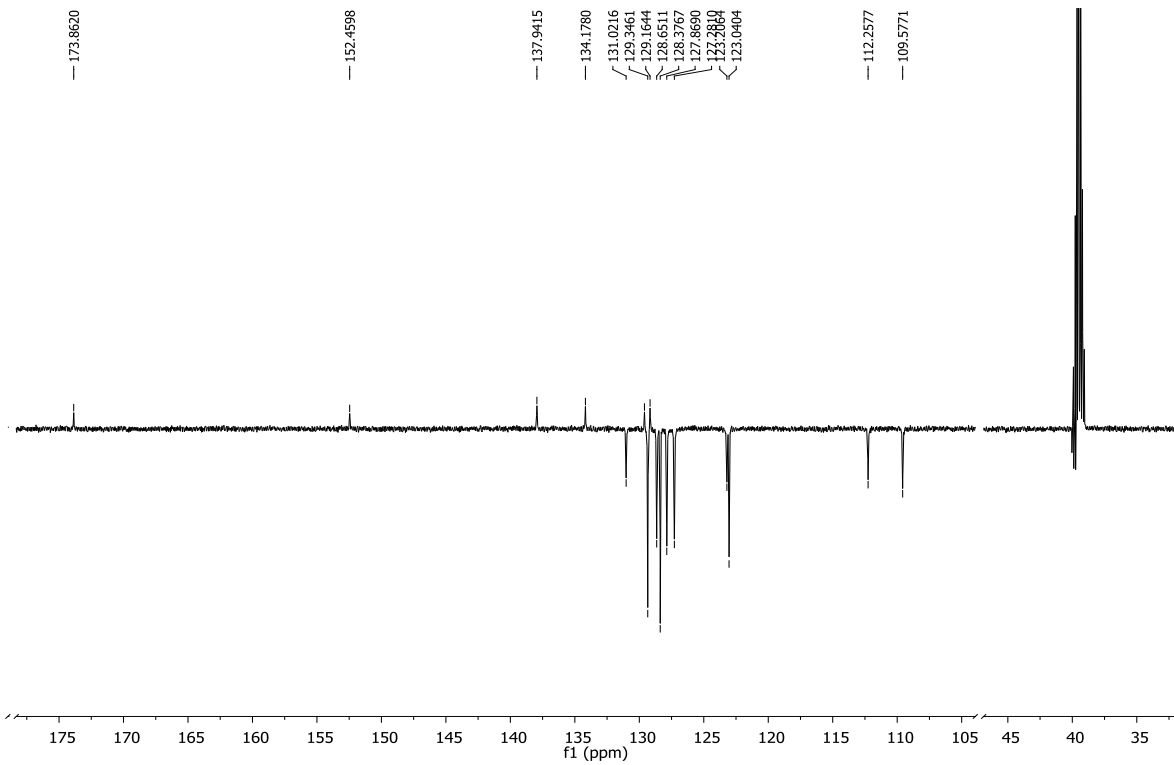


Prilog 35.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **47**

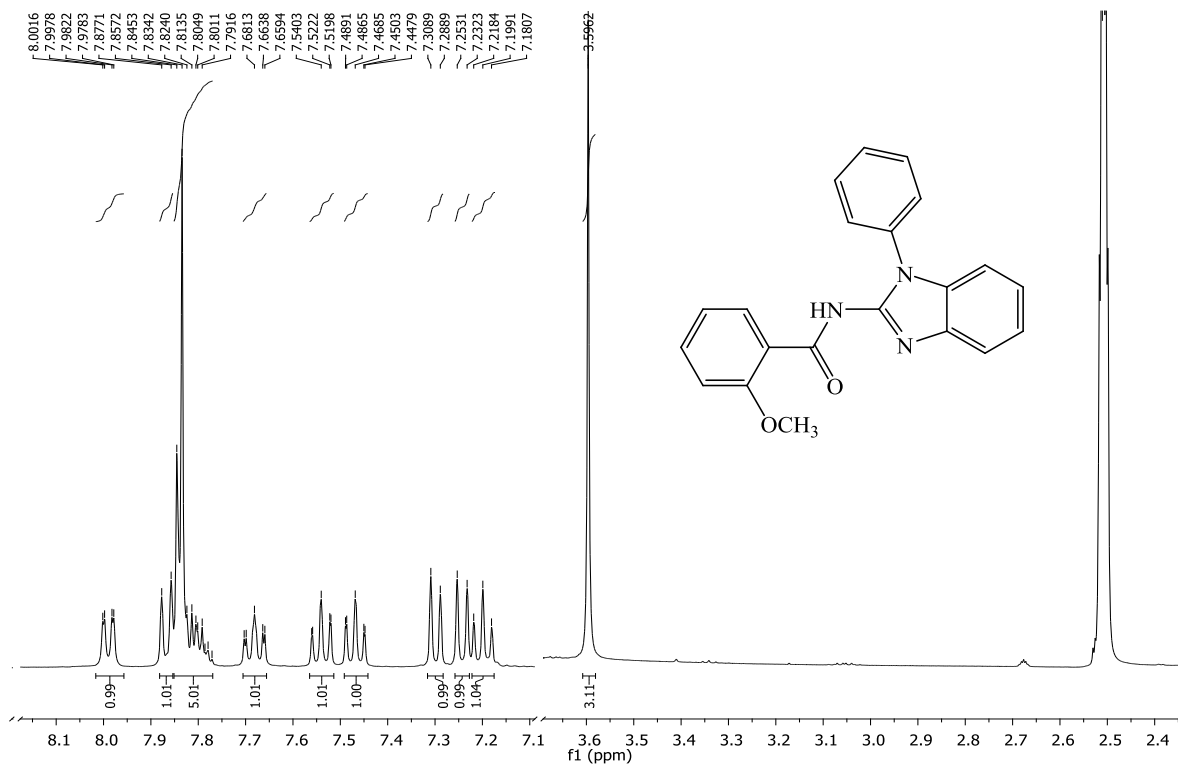


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **47**

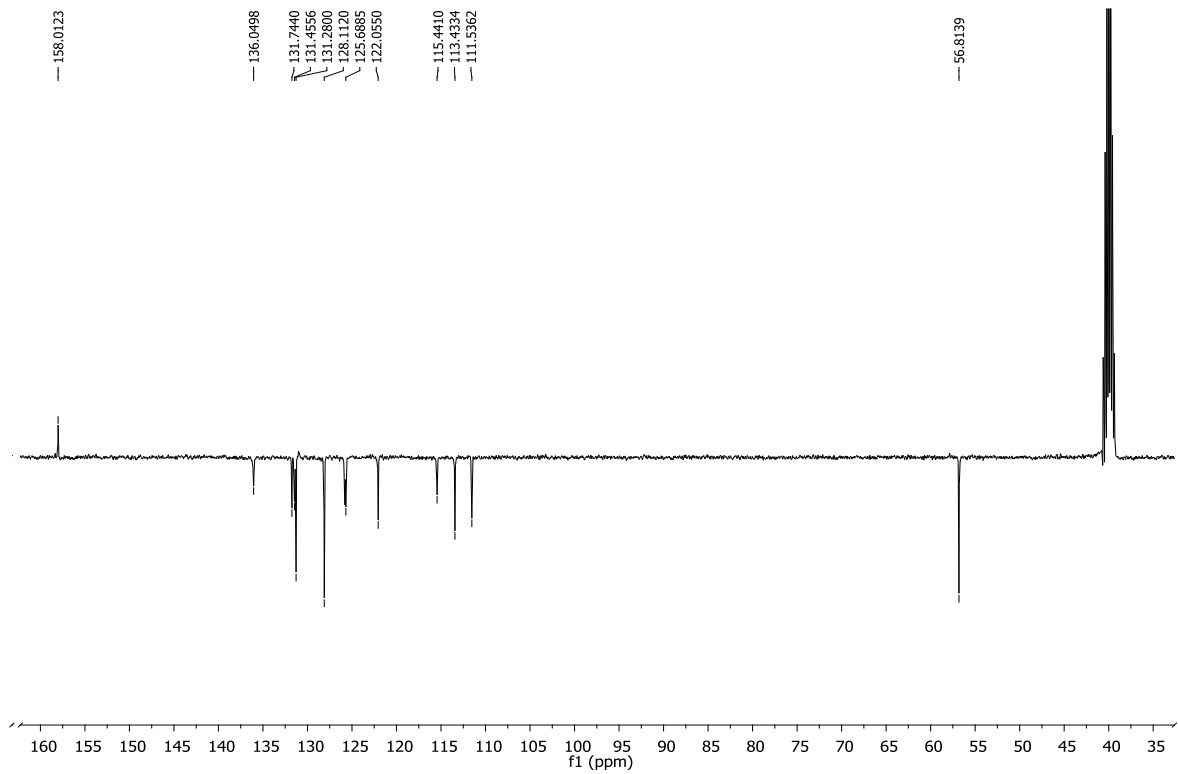


Prilog 36.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **48**

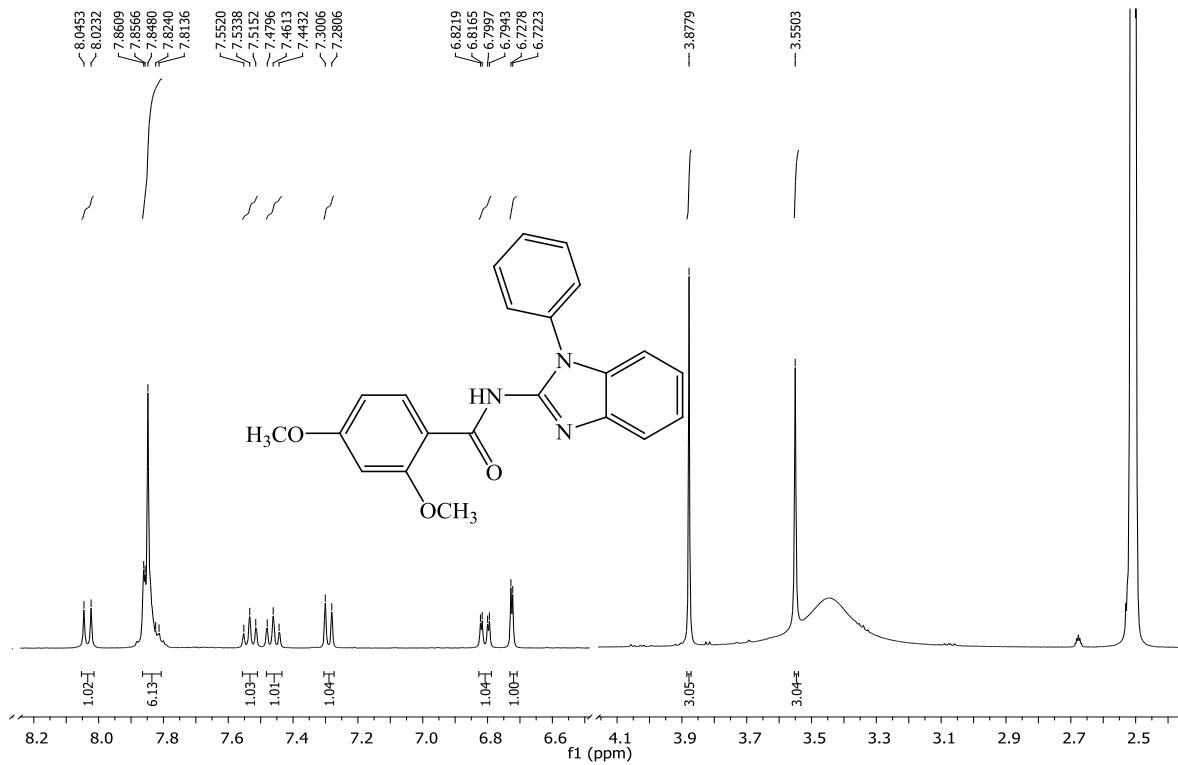


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **48**

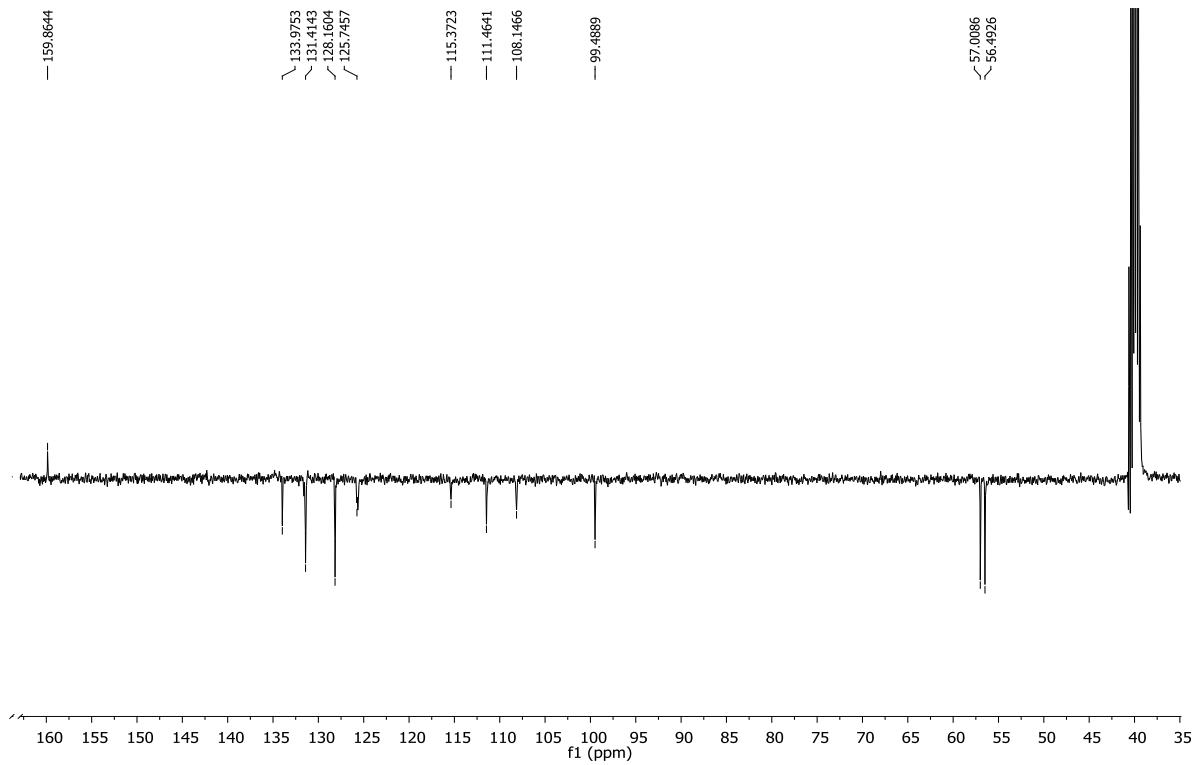


Prilog 37.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **49**

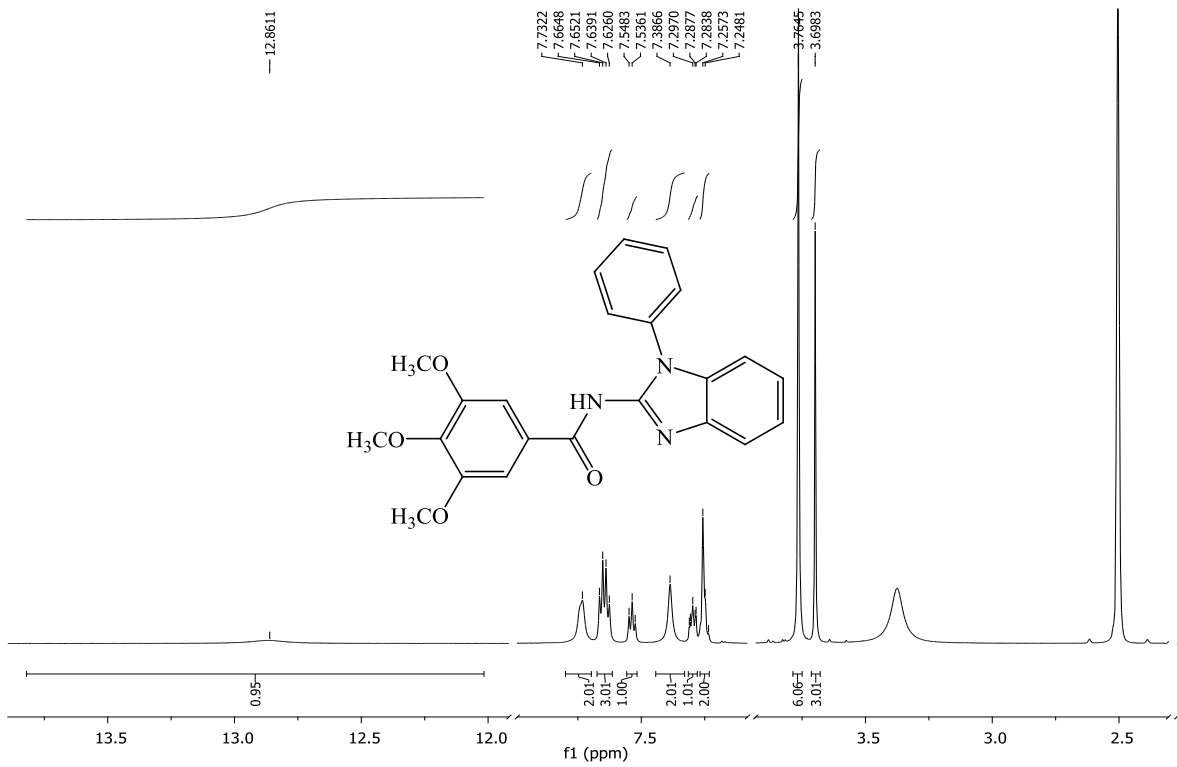


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **49**

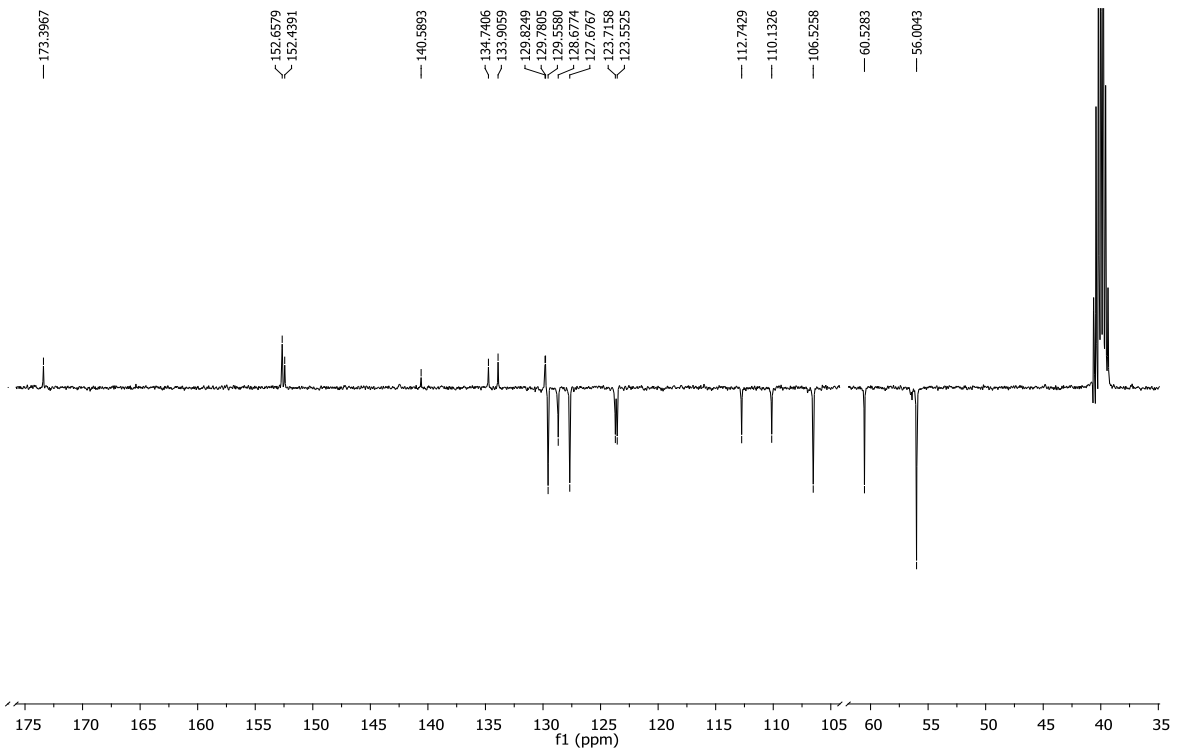


Prilog 38.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **50**

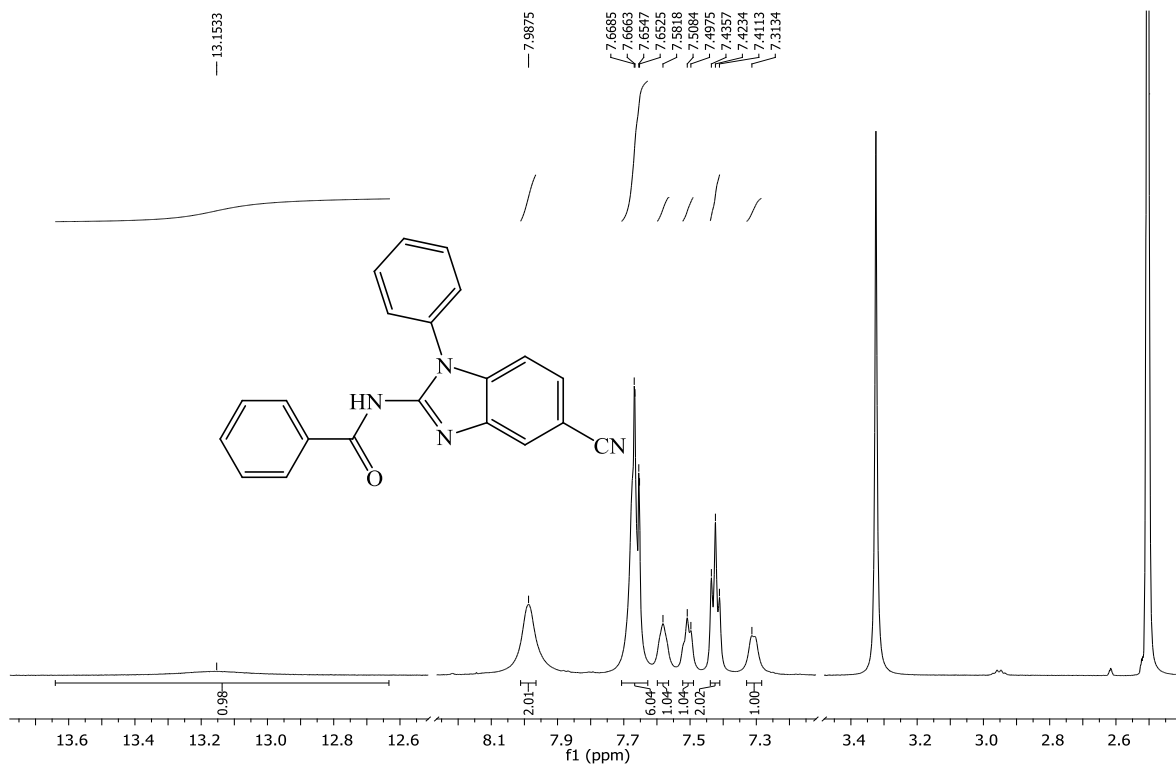


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **50**



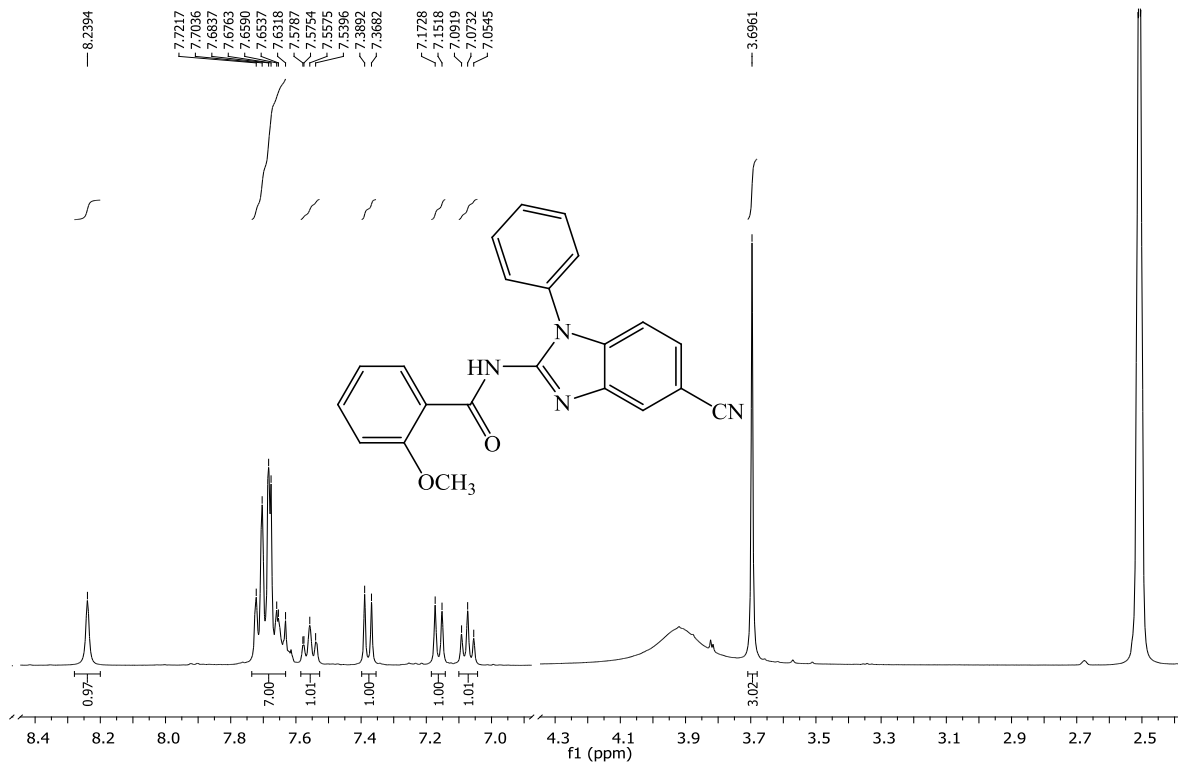
**Prilog 39.**

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **51**

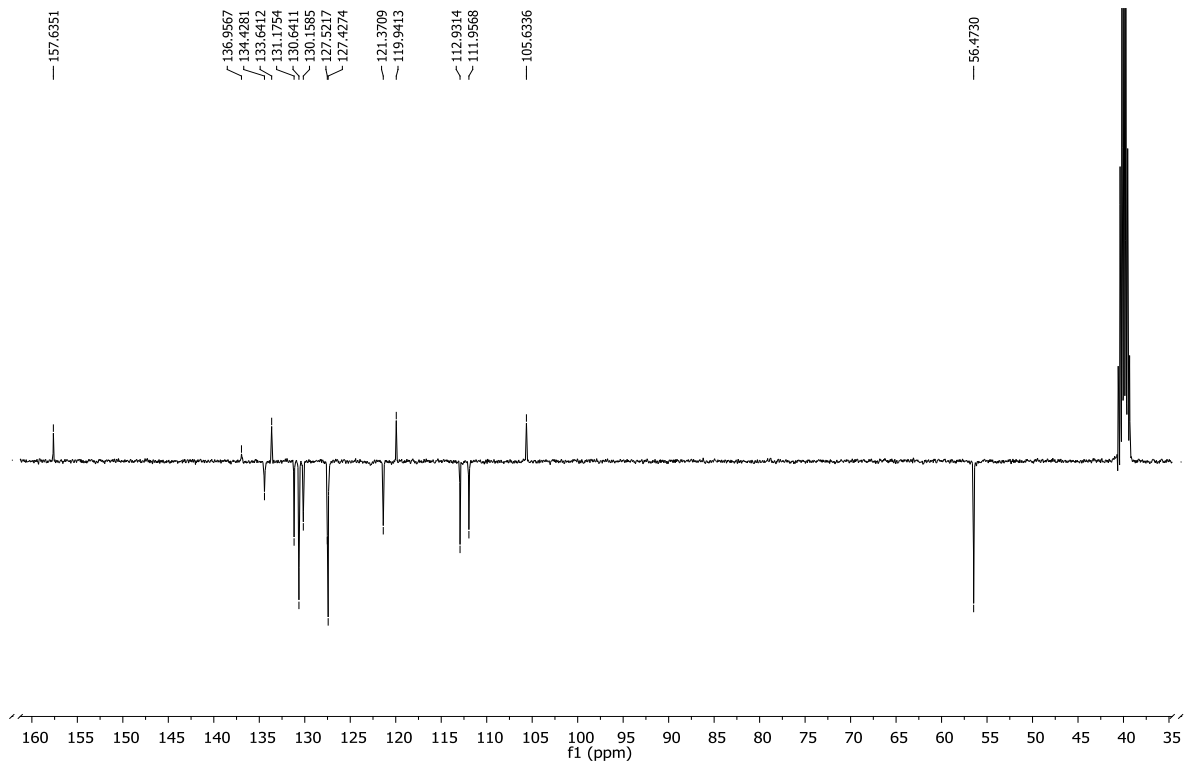


**Prilog 40.**

**a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 52**



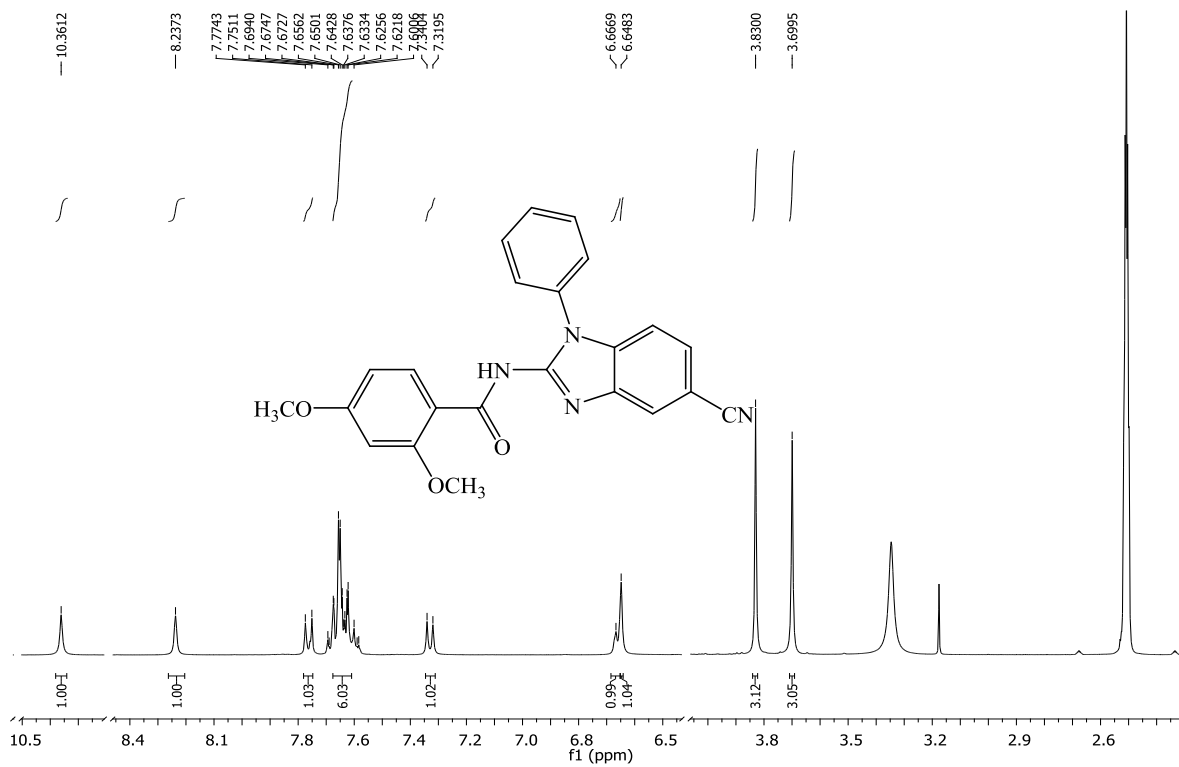
**b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 52**



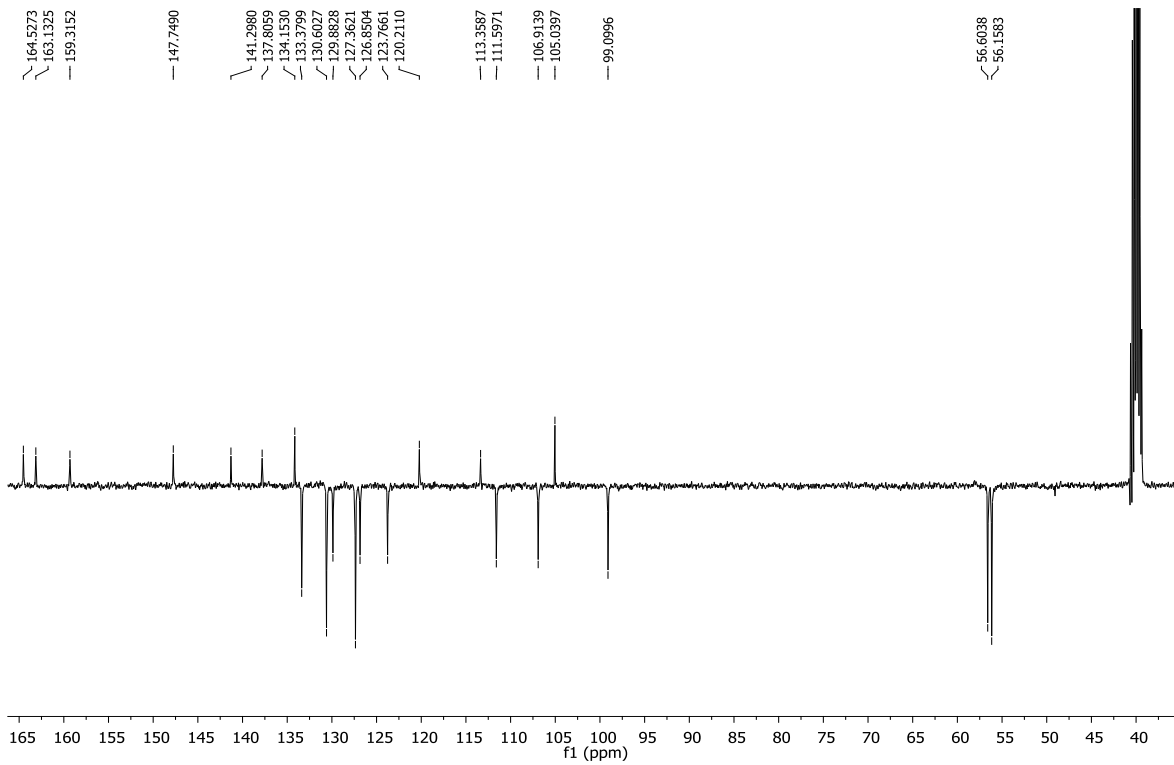


Prilog 41.

a)  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **53**

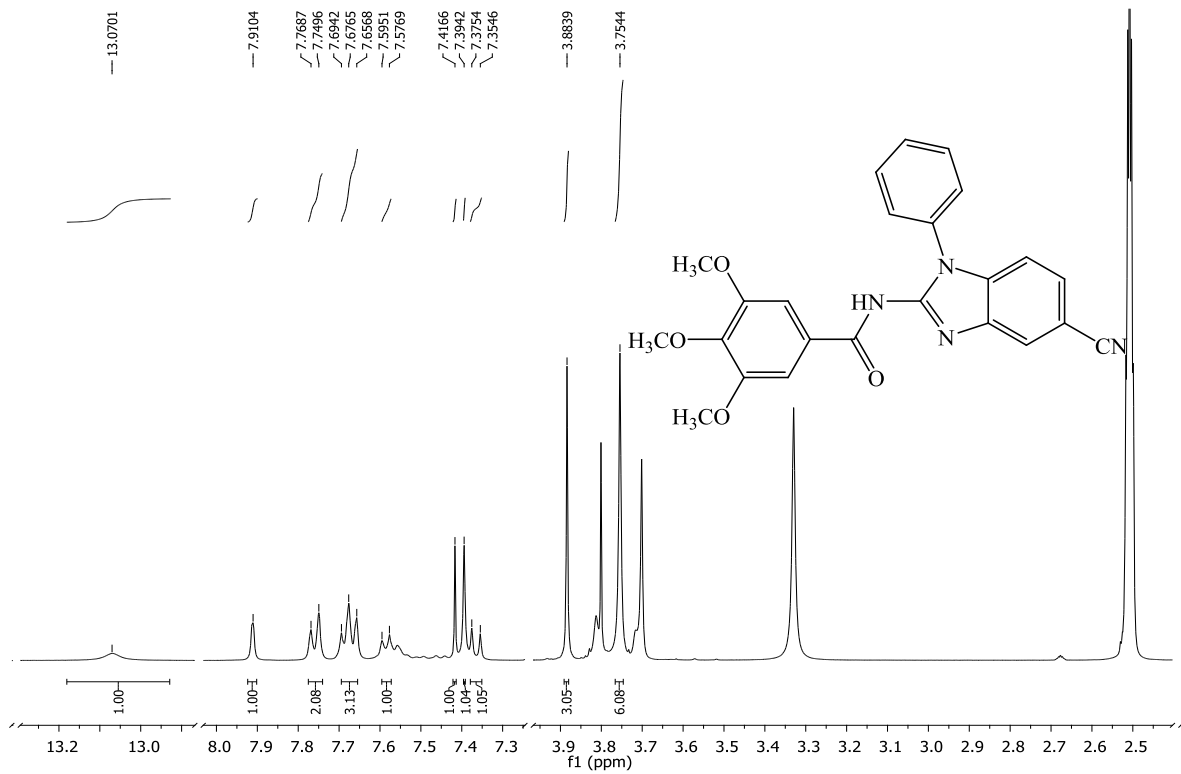


b)  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **53**



Prilog 42.

a) <sup>1</sup>H NMR spektar spoja 54



b) <sup>13</sup>C NMR spektar spoja 54

