

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**

*Nataša Perin*

**SINTEZA I SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA**  
**INTERAKCIJE S ct-DNA NOVIH**  
**AMINO-BENZIMIDAZO[1,2-*a*]KINOLINA**

Zagreb, travanj 2009.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije pod mentorstvom doc. dr. sc. Marijane Hranjec i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2008 / 2009.

## Popis kratica

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

RNA – ribonukleinska kiselina

UV/Vis – ultravioletna spektroskopija

CD – cirkularni dikroizam

LD – linearni dikroizam

Ct-DNA - *calf thymus* DNA, tj. DNA izolirana iz *timusa teleta*

NaCaCo - kakodilatna kiselina / HCl,  $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $I=0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

PPA – polifosforna kiselina

IR – infracrvena spektroskopija

$\lambda_{\text{em}}$  – valna duljina emisije

$\lambda_{\text{exc}}$  – valna duljina ekscitacije

## Sadržaj rada:

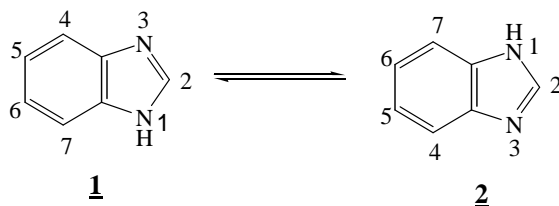
<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OPĆI DIO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Priprava cikličkih derivata benzimidazola i njihova biološka aktivnost</b> .....	<b>4</b>
2.1.1. Priprava kinolinskih derivata benzimidazola .....	4
<b>2.2. Interakcija organskih molekula s polinukleotidima</b> .....	<b>9</b>
2.2.1. Eksperimentalne metode ispitivanja nekovalentnih interakcija organskih molekula s polinukleotidima .....	9
2.2.2. Vežanje organskih molekula u mali/veliki utor DNA molekule .....	12
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1. Opće napomene</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2. Amino-cijano supstituirani benzimidazo[1,2-<i>a</i>]kinolini 5-6</b> .....	<b>15</b>
<b>3.3. Amino supstituirani benzimidazo[1,2-<i>a</i>]kinolini 11-12</b> .....	<b>16</b>
<b>3.4. Ispitivanje interakcija nekih priređenih supstancija s ct-DNA</b> .....	<b>19</b>
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>21</b>
<b>4.1. Sinteza ciljanih spojeva</b> .....	<b>23</b>
<b>4.2. Ispitivanje interakcije spojeva 5 i 12 s ct-DNA</b> .....	<b>32</b>
4.2.1. UV/Vis baždarni dijagrami .....	32
4.2.2. UV/Vis titracije spojeva 5 i 12 s ct-DNA .....	34
4.2.3. Fluorimetrijski emisijski baždarni dijagrami spojeva 5 i 12 .....	37
4.2.4. Fluorimetrijska titracija spojeva 5 i 12 s ct-DNA.....	39
<b>4.3. Kristalna struktura spoja 4</b> .....	<b>42</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>44</b>
<b>6. ZAHVALA</b> .....	<b>46</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>48</b>
<b>8. SAŽETAK</b> .....	<b>51</b>
<b>9. SUMMARY</b> .....	<b>53</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>55</b>
<b>11. PRILOZI</b> .....	<b>57</b>

## **1. UVOD**

## UVOD

Heterociklički spojevi predstavljaju danas najbrojniju skupinu organskih spojeva koji u svojoj strukturi imaju najmanje jedan atom koji nije ugljikov a to su najčešće atomi dušika ili kisika, ali isto tako mogu sadržavati i atom sumpora ili fosfora.

Benzimidazoli su heterociklički spojevi, aromatskog karaktera koji se sastoje od imidazolskog prstena kondenziranog na benzensku jezgru kao što je prikazano na Slici 1. a njihova se struktura može prikazati u obliku dviju rezonantnih struktura **1** i **2**.



Slika 1. Dvije rezonantne strukture benzimidazolske jezgre

Interes za proučavanjem benzimidazola, heterocikla koji u svojoj strukturi sadrže dva dušikova atoma, kao i njihove biološke aktivnosti, potječe još iz 40.-tih godina prošlog stoljeća kada je potvrđeno da je benzimidazolska struktura sadržana u vitaminu B<sub>12</sub> i njegovim derivatima. Iz literature je poznato da mnogi terapijski agensi sadrže u strukturi ovu kromofornu grupu, a pokazuju i vrlo široki spektar bioloških aktivnosti. U zadnjih nekoliko desetljeća intenzivno se ulaže u istraživanja na području medicinske kemije čiji je cilj pronalaženje antitumorskih agenasa. Meta većine takvih supstancija je molekula DNA, pa se tako nastoje razviti lijekovi koji su selektivni s obzirom na mjesto vezanja na dvostruku uzvojnici DNA (“*sequence-selective DNA binding compounds*”).

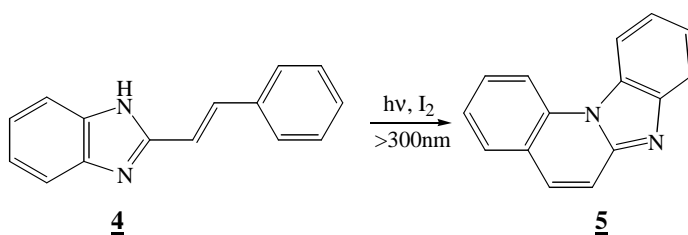
## **2. OPĆI DIO**

## 2.1. Priprava cikličkih derivata benzimidazola i njihova biološka aktivnost

Supstituirani benzimidazoli i njihovi ciklički derivati zauzimaju veliku pozornost medicinskih i organskih kemičara zbog njihovog širokog spektra bioloških aktivnosti koje posjeduju.<sup>1-7</sup> Neki od cikličkih derivata benzimidazola stupaju u interakciju s dvostrukom uzvojnicom molekule DNA u određenom i specifičnom području, imaju potencijal inhibicije aktivnosti individualnih gena, te stoga mogu biti korisni u liječenju različitih bakterijskih, viralnih<sup>8,9</sup>, a danas naročito raširenih tumorskih bolesti<sup>10,11</sup>. Razumijevanje temeljnih strukturnih, termodinamičkih, kinetičkih i fizikalno-kemijskih značajki kompleksa koji nastaju interakcijom supstancija s DNA, omogućilo je sintezu selektivnih supstancija. One se određenim mehanizmima vežu na ovu molekulu i na taj način sprječavaju replikaciju DNA i transkripciju gena, posljedica čega je usporenje ili potpuno zaustavljanje rasta tumorskih stanica bez oštećenja zdravih.

### 2.1.1. Priprava kinolinskih derivata benzimidazola

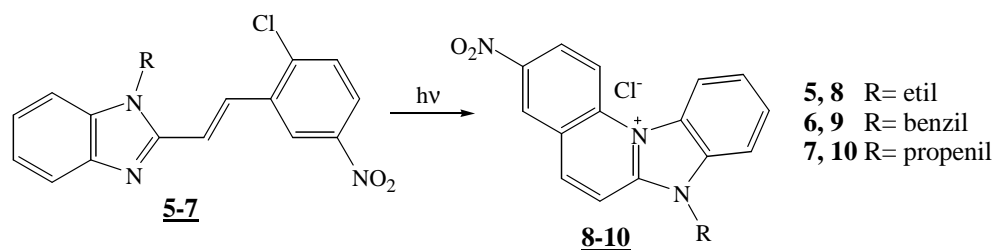
Po prvi put benzimidazo[1,2-*a*]kinolin **5** priredili su G. Cooper i W. J. Irwin<sup>12</sup> reakcijom fotokemijske dehidrociklizacije *trans*-2-stirilbenzimidazola **4**. Ovo je vrlo jednostavan i efikasni sintetski put za pripravu cikličkih molekula formiranjem C-N veze između *o*-C atoma fenilne i N atoma benzimidazolske jezgre.



Shema 1. Priprava benzimidazo[1,2-*a*]kinolina fotokemijskom dehidrociklizacijom

Grupa portorikanskih istraživača<sup>13,14,15</sup> pripremila je niz benzimidazo[3,2-*a*]kinolina u obliku hidrokloridnih soli **8-10**, kao potencijalnih interkalatora s antitumorskom aktivnošću. Fotokemijskom ciklizacijom prema Shemi 2., iz odgovarajućih 2-stirilbenzimidazola **5-7** priređeni su ciklički derivati benzimidazo[3,2-*a*]kinolina hidroklorida.

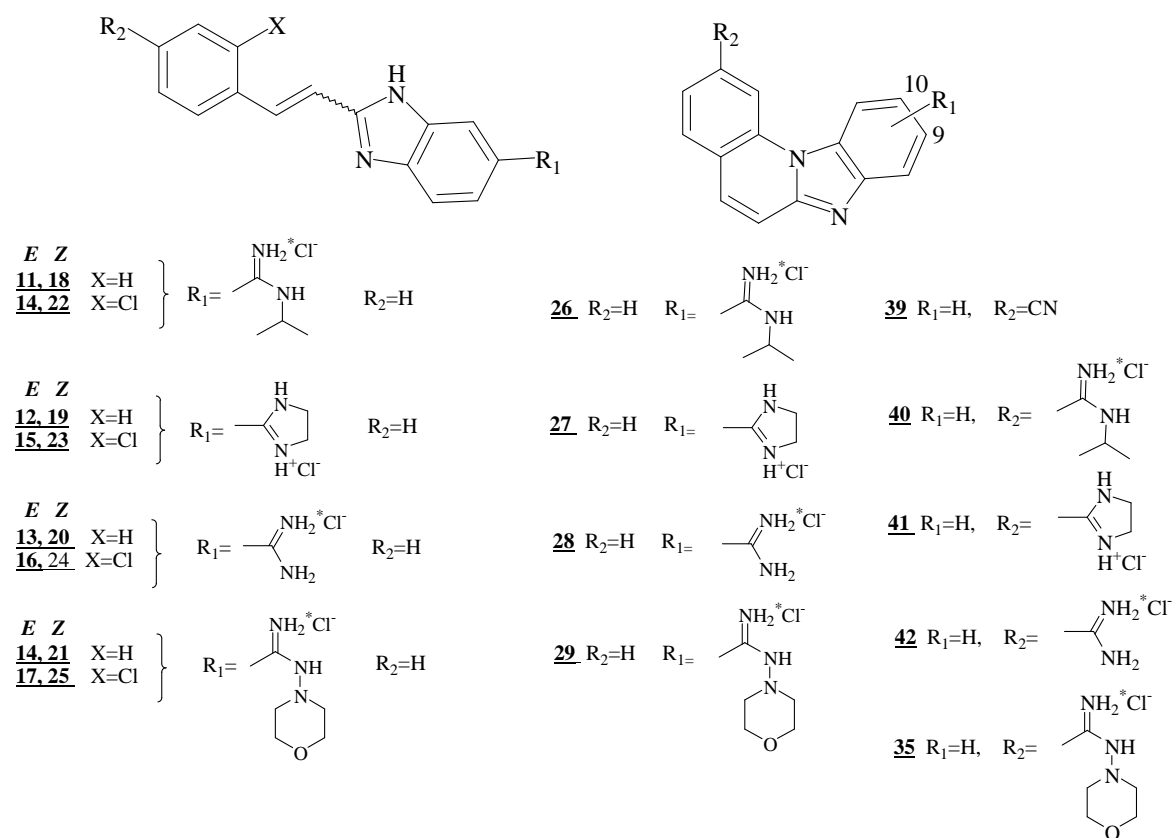




Shema 2. Priprava benzimidazo[3,2-a]kinolina 8-10

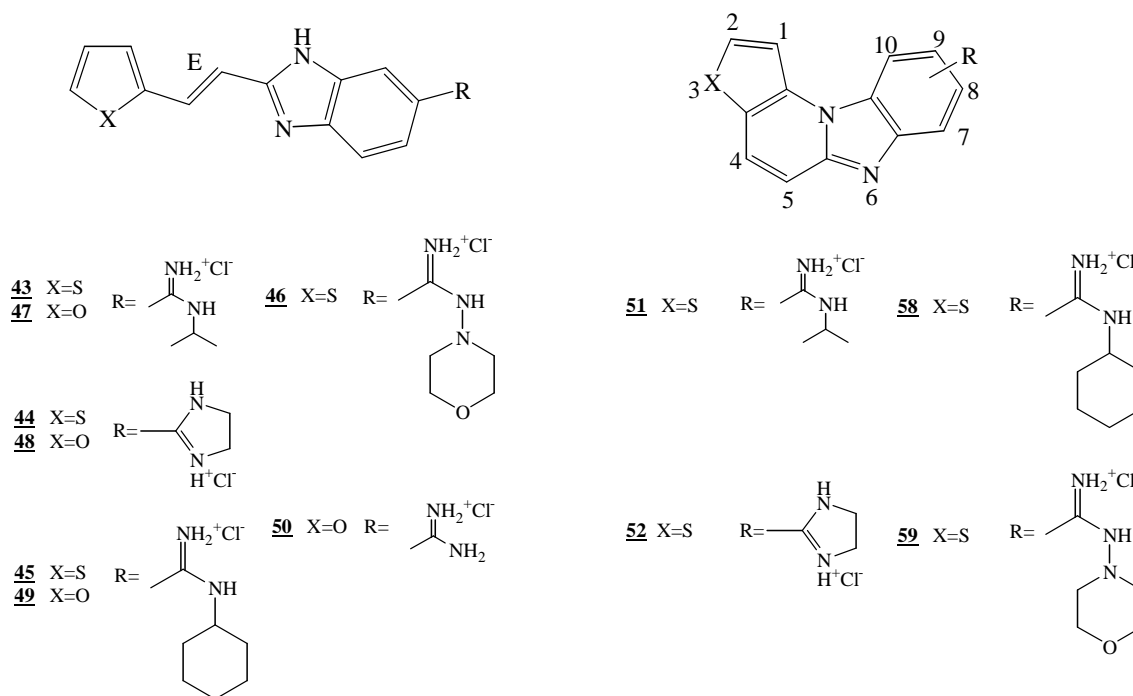
Biološka su ispitivanja pokazala da gore navedeni derivati pokazuju određenu antitumorsku aktivnost prema staničnim linijama humanog limfoma, kronične mijeloične leukemije, karcinoma debelog crijeva, karcinoma grlića maternice, te karcinoma kože.

M. Hranjec<sup>16</sup> je s grupom istraživača priredila amidino supstituirane derivate stiril-2-benzimidazola i benzimidazo[1,2-*a*]kinolina koji su pokazali izražena antitumorska djelovanja *in vitro* na neke stanične linije karcinoma dojke i karcinoma debelog crijeva, a jedan od mehanizama njihovog biološkog djelovanja je interkaliranje u dvostruku uzvojnici DNA. Rezultati su također pokazali da spoj **27** inhibira enzim topoizomerazu II.



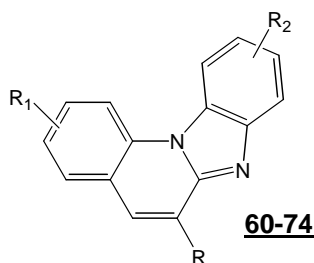
Slika 2. Struktura spojeva 11-35

Kao nastavak prethodno navedenog istraživanja, M. Hranjec<sup>17</sup> i skupina istraživača priredili su supstituirane acikličke tienil- i furil-vinilbenzimidazole te njihove cikličke derivate. Spektroskopska ispitivanja interakcije nekih priređenih spojeva s DNA/RNA pokazala su da se aciklički spojevi vežu u mali utor DNA/RNA kao „groove binders-i“, dok njihovi ciklički derivati interkaliraju u dvostruku uzvojnica DNA/RNA. Dobiveni spojevi pokazuju značajno povećanje inhibicije rasta nekih staničnih linija humanih karcinoma *in vitro*, naročito staničnih linija karcinoma grlića maternice HeLa i staničnih linija karcinoma dojke MCF-7 pri čemu su ciklički derivati aktivniji od acikličkih. Ciklički derivat supstituiran imidazolinskim amidinom **52** pokazao je najveću aktivnost a kao jedan od njegovih mehanizama biološkog djelovanje je interkaliranje u dvostruku uzvojnica DNA. Aciklički spojevi **44**, **45** i **49** kojima je ispitana interakcija s DNA/RNA pokazali su se da se vežu u mali utor kao „groove binders-i“.



Slika 3. Struktura spojeva **43-59**

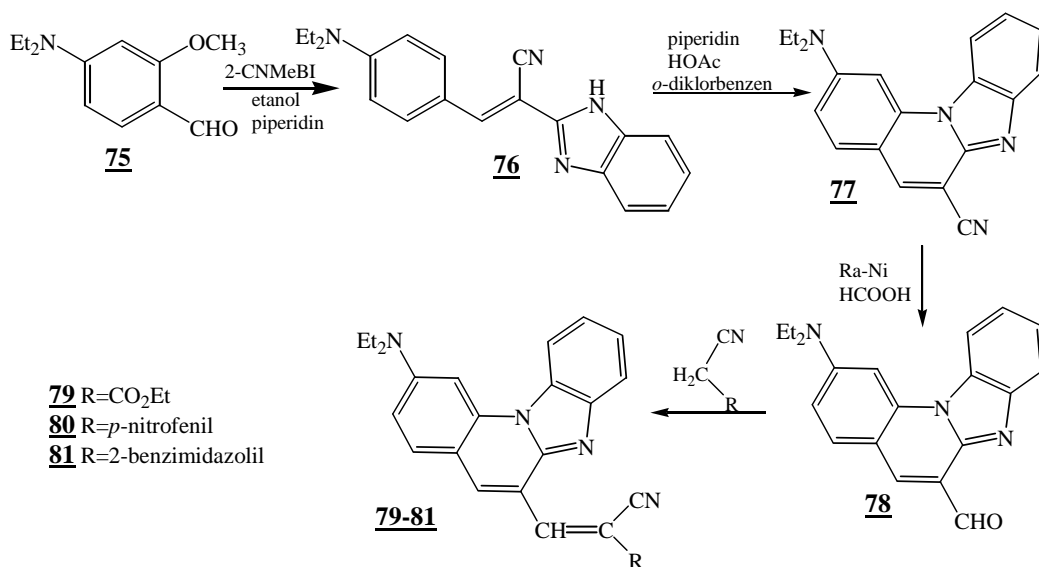
Njemački sintetičar D. Guenther<sup>18</sup> je 1978. godine razvio i patentno zaštitio sintetsku metodu za direktno dobivanje različitih supstituiranih benzimidazo[1,2-*a*]kinolina. Tako je prema Slici 4. derivate benzimidazo[1,2-*a*]kinolina priredio reakcijom 2-alkoksibenzaldehida i 2-fenilsulfonilmetilbenzimidazola uz piperidin-acetat kao bazu. U prvoj fazi reakcije, aldolnom kondenzacijom nastaje odgovarajući derivat 2-stirilbenzimidazola, koji se ne izolira već ciklizacijom u drugoj fazi reakcije, u *o*-diklorbenzenu, daje željeni benzimidazo[1,2-*a*]kinolin.



- 60** R=SO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=H  
**61** R=CN, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=H  
**62** R=COOH, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=H  
**63** R=SO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>1</sub>=4-CH<sub>3</sub>O, R<sub>2</sub>=H  
**64** R=CN, R<sub>1</sub>=4-CH<sub>3</sub>O, R<sub>2</sub>=H  
**65** R=CH<sub>3</sub>O, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=H  
**66** R=5,6-fenil, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=5,6 - fenil  
**67** R=SO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=NHCOCH<sub>3</sub>  
**68** R=SO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>  
**69** R=CN, R<sub>1</sub>=4,5-diOCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=H  
**70** R=SO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>1</sub>=4,5-diOCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=H  
**71** R=SO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=NO<sub>2</sub>  
**72** R=SO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=NH<sub>2</sub>  
**73** R=CN, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=NH<sub>2</sub>  
**74** R=SO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>1</sub>=4-NH<sub>2</sub>, R<sub>2</sub>=H

Slika 4. Struktura spojeva 60-74

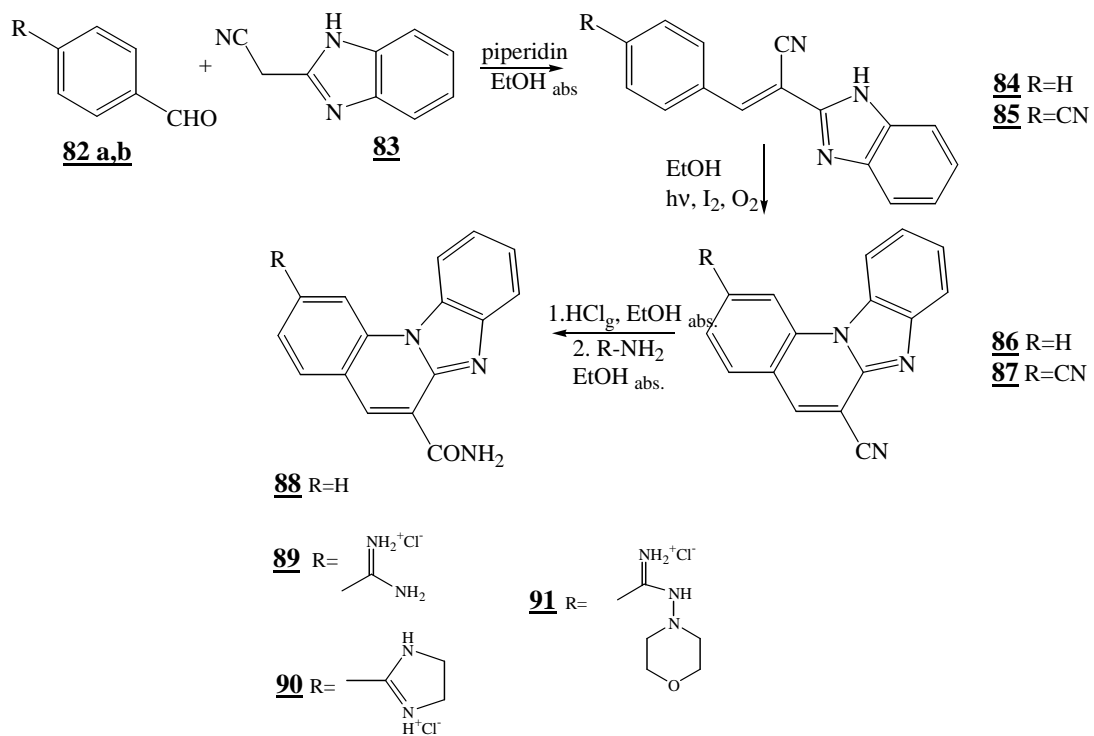
V. U. Shenoy i S. Sesardi<sup>19</sup> sintetizirali su prema Shemi 3. i prema ranije patentiranoj metodi derivate 7-dietilaminobenzimidazo[1,2-*a*]kinolina **79-81**.



Shema 3.

M. Hranjec i G. Karminski-Zamola<sup>20</sup> priredile su benzimidazolil-supstituirane akrilonitrile **84** i **85** koji reakcijom fotokemijske dehidrociklizacije daju odgovarajuće mono- i dicijano supstituirane benzimidazo[1,2-*a*]kinoline **86** i **87**. Aciklički spojevi **84** i **85**, kao i ciklički benzimidazo[1,2-*a*]kinolini **86** i **87**, pokazuju zanimljive spektroskopske karakteristike. Osim što su ovi spojevi potencijalni biološki aktivni agensi, oni su ujedno i cijaninske boje.

OPĆI DIO



Shema 4.

## 2.2. Interakcija organskih molekula s polinukleotidima

Fizikalna i kemijska svojstva nukleinskih kiselina te njihove interakcije s organskim molekulama predmet su intenzivnih znanstvenih istraživanja medicinskih kemičara u posljednjih nekoliko desetljeća. Da bi se olakšao razvoj i dizajn novih supstancija koje će imati sposobnost vezanja i modificiranja strukture DNA, potrebno je razumijevanje strukturnih, fizikalno-kemijskih, termodinamičkih i kinetičkih značajki koje se dešavaju prilikom interakcije supstancije s DNA uzvojnicom.<sup>21</sup>

Postoje tri glavna načina interakcije supstancije s DNA molekulom:<sup>22</sup>

1. Kontrola transkripcijskih faktora i polimeraza pri čemu supstancija dolazi u interakciju s proteinom koji se veže na DNA
2. Vezanje RNA na dvostruku uzvojnici DNA pri čemu se dobije struktura trostruke uzvojnice ili stvaranje hibridne RNA koja s jednostrukom uzvojnicom DNA stvara DNA-RNA hibrid pri čemu dolazi do onemogućavanja transkripcijske aktivnosti
3. Vezanje malih aromatskih planarnih molekula na dvostruku uzvojnici DNA slijedećim načinima:<sup>23</sup>
  - **interkaliranjem** između parova baza
  - **vezanjem u mali ili veliki utor DNA**
  - **kombinacija interkaliranja s vezanjem u mali utor DNA**
  - **kao alkilirajući agensi**

### 2.2.1. Eksperimentalne metode ispitivanja nekovalentnih interakcija organskih molekula s polinukleotidima

Najčešće korištene eksperimentalne metode su:

1. Eksperimenti koji prate promjene strukture i stabilnosti polinukleotida uzrokovane vezanjem ispitivanog spoja:
  - promjena viskoziteta otopine DNA / RNA
  - promjena sedimentacijskog koeficijenta ili elektroforetske pokretljivosti cirkularne DNA
  - pomaci u niže magnetsko polje signala fosfatnog dijela polinukleotida u <sup>31</sup>P NMR spektru polinukleotida
  - promjena točke “mekšanja” dvostruke uzvojnice kompleksa s ispitivanim spojem

## OPĆI DIO

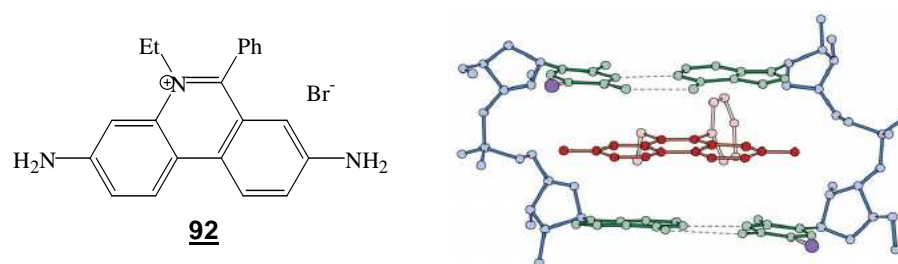
2. Metode temeljene na promjeni spektroskopskih svojstava ispitivanog spoja (UV/Vis, fluorescencijska i  $^1\text{H}$  NMR spektroskopija).
3. Metode koje upućuju na pravilnost orijentacije molekula ispitivanog spoja te dinamiku i homogenost načina vezanja na polinukleotid – CD i LD spektroskopija, polarizacija fluorescencije.

S obzirom da nije moguće jednoznačno utvrditi način vezivanja na polinukleotide samo jednom metodom, on se utvrđuje kombinacijom rezultata više metoda, koje s velikom sigurnošću upućuju na interkalativni, odnosno neinterkalativni način vezanja malih molekula na polinukleotide (Tablica 1.).<sup>24</sup>

Tablica 1. Kriteriji prema kojima se utvrđuje model vezanja

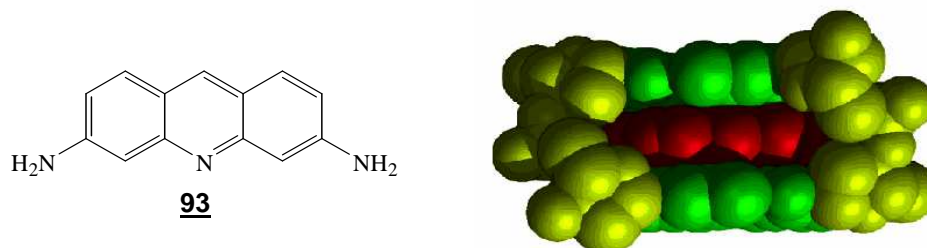
METODA	MODEL VEZIVANJA	
	Interkalativni	Neinterkalativni
<b>viskozimetrija</b>	produljenje ( $m \approx 0,9$ ) i odvijanje ( $17 - 26^0$ ) dvolančane uzvojnice za vrijednosti slične ili veće od onih za standardne interkalatore	vrlo malo ili nikakvo produljenje i odvijanje dvolančane uzvojnice (postoje iznimke)
<b>temperatura mekšanja</b>	pozitivne vrijednosti $\Delta T_m$ ; interkaliranje stabilizira dvostruke uzvojnice bez veće selektivnosti između analoga DNA i RNA (postoje iznimke)	moguće pozitivne i negativne vrijednosti $\Delta T_m$ ; većinom izrazita DNA selektivnost (postoje iznimke)
<b>UV/Vis spektar</b>	batokromni i hipokromni efekt u spektrima ispitivanog spoja	vrlo male promjene (postoje iznimke)
<b><math>^1\text{H}</math> NMR</b>	izrazito proširenje ( $>20$ Hz) te pomaci u više magnetsko polje signala ispitivanog spoja	pomaci u više ili niže magnetsko polje, nema proširenja signala
<b>afinitet po Scatchardu</b>	konstante stabilnosti $K_S$ ne ovise bitno o promjeni ionske jakosti, omjer $n < 0.25$	omjer $n > 0.25$ , spektroskopske promjene izrazito ovise o ionskoj jakosti, konstante stabilnosti $K_S$ se ne mogu direktno računati jer nije moguće definirati koncentraciju veznih mjesta

U **klasične interkalatore** spadaju etidijev bromid **92** i ostali fenantridinski analozi.<sup>25</sup> Zahvaljujući izrazitom porastu fluorescencije etidijevog bromida, 9-40 puta nakon interkaliranja u dvolančane polinukleotide, on se koristi zadnjih 30 godina kao supstancija (marker) za obilježavanje i karakterizaciju DNA.<sup>26</sup> Molekula etidijevog bromida je jednostavna, pozitivno nabijena heterociklička molekula čija se struktura sastoji od fenantridinskog prstena sa određenim supstumentima prema Slici 5.:



Slika 5. Etidijev bromid i njegov kompleks s DNA

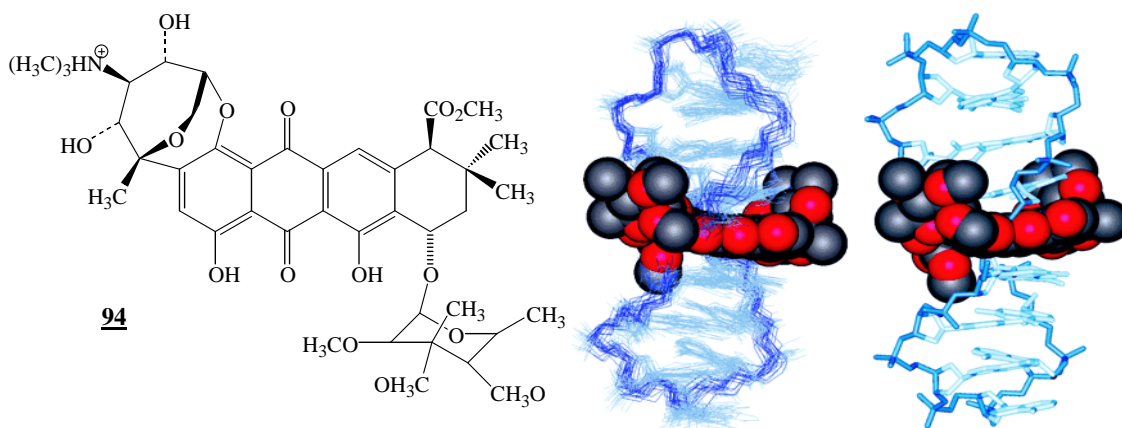
Interkalativni način vezivanja akridinijevih derivata na dvolančane polinukleotide u većini svojstava sličan je onom etidijevog bromida. Jednostavna molekula *proflavina* **93** korištena je u samim počecima studiranja mehanizama interkaliranja.<sup>27</sup>



Slika 6. Struktura proflavina i njegov kompleks s G-C parovima baza u DNA

Interkalatori s velikim supstumentima smještenim tako da uzrokuju privremeno razdvajanje dvostruke uzvojnice pri interkaliranju tvore interkalativne komplekse pri čemu je svaki od supstuentata smješten s druge strane dvostruke uzvojnice. Jedan od karakterističnih predstavnika **interkalatora s upletanjem** je *Nogalamicin* **94**, (Slika 7.) antibiotik izoliran iz prirodnog materijala.<sup>28</sup>

## OPĆI DIO



Slika 7. Struktura nogalamicina i njegov kompleks s DNA

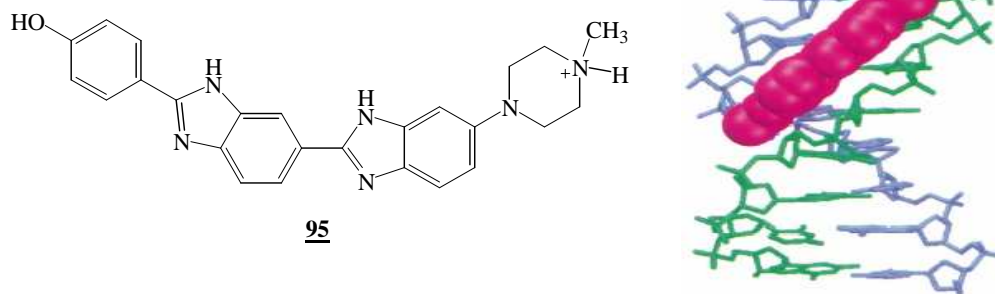
Ova je molekula interesantna zbog svog amino-ugljikohidratnog dijela za koji se pretpostavlja da je odgovoran za vezivanje u utor DNA, a iz kristalne je strukture kompleksa s DNA vidljivo da svojim planarnim heterocikličkim prstenom interkalira u C-G područje parova baza.

### 2.2.2. Vezanje organskih molekula u mali/veliki utor DNA molekule

Male molekule koje imaju izduženu strukturu i funkcionalne skupine koje mogu tvoriti vodikove veze, vezuju se u mali/veliki utor DNA.<sup>29</sup> Većina proteina koji dolaze u interakciju s DNA vezuje se u veliki utor, tako da je mali utor zapravo ranjivo mjesto za napad lijeka zbog toga jer je obično slobodan. Ligandi koji se vezuju u mali utor DNA dijele se u dva tipa:

- 1. Kationski ligandi** - analozi i konjugati poznatih „groove-binders-a“ *Netropsina*, *Distamicina*, *Hoechst-a 33258*, *Berenila*, *Pentamidina*
- 2. Neutralni ligandi** - analozi i konjugati alkilirajućih agensa

Jedan od najpoznatijih predstavnika ove skupine je *Hoechst 33258* **95**, poznata sintetička boja s jako dobrom antitumorskom aktivnošću. Kao što je vidljivo iz prikaza njegove strukture (Slika 8.), ova molekula ima polukružni oblik.<sup>30</sup>



Slika 8. Prikaz strukture Hoechst-a 33258 i njegovog kompleksa s DNA



### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. Opće napomene

Tališta priređenih spojeva određena su Kofler Mikroheiztisch aparatu i nisu korigirana.

IR spektri snimljeni su na spektrometrima Perkin-Elmer 297, FTIR-ATR Vertex 70 Bruker spektrofotometar i Nicolet Magna 760, tehnikom KBr pločice za krute uzorke ili direktnim nanošenjem uzorka na dijamantnu podlogu.

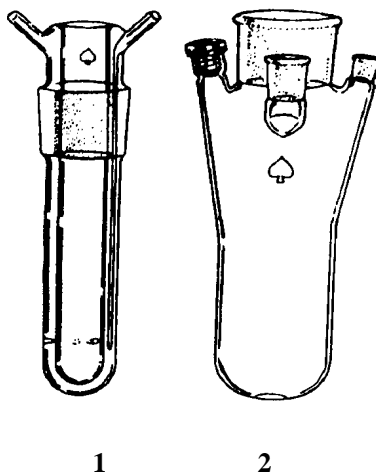
$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri snimljeni su na spektrometrima Varian Gemini 300, na 300 odnosno 75 MHz, instrumentu Bruker AV-600, na 600 odnosno 150 MHz te Bruker Avance DRX 500 na 500 MHz. Svi NMR spektri snimani su u DMSO- $d_6$  kao otapalu, koristeći tetrametilsilan kao interni standard. Kemijski pomaci ( $\delta$ ) izraženi su u ppm vrijednostima, a konstante sprege (J) u Hz.

UV spektri snimljeni su na spektrofotometru Varian Cary 50 spektrofotometru a fluorescencijski spektri snimljeni su na Cary Eclipse spektrofotometru. U oba slučaja korištene su kvarcne kivete promjera 1 cm te volumena 3 ili 1  $\text{cm}^3$ .

Kristalna struktura je snimljena na Oxford Diffraction Xcalibur2 difraktometru sa Sapphire 3 CCD detektorom.

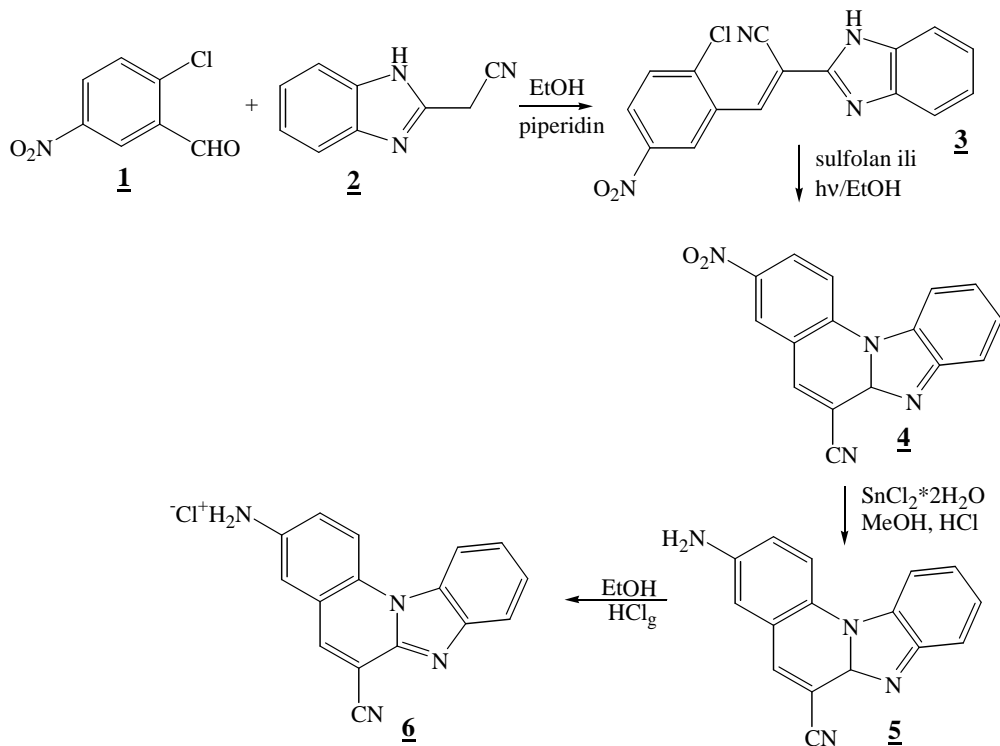
Fotokemijske reakcije provedene su u reaktoru s unutarnjim osvjetljavanjem (imerzijski reaktor) kod kojeg je izvor svjetla uronjen u reakcijsku otopinu. Imerzijski reaktor se sastoji od dva dijela: imerzijskog, koji se uranja u reakcijsku smjesu i reakcijske posude. Imerzijski dio, u kojem je smještena visokotlačna živina lampa, služi istodobno i kao filter i kao hladilo.

Izrađen je od kvarca ili pyrexa, a između njegovih dvostrukih stjenki cirkulira rashladna voda. Kao izvor svjetlosti korištena je visokotlačna živina lampa od 400 W (kućna proizvodnja).



Slika 9. Reaktor s unutarnjim osvjetljavanjem: 1-imerzijski dio, 2-reakcijska posuda

### 3.2. Amino-cijano supstituirani benzimidazo[1,2-a]kinolini 5-6



Shema 5. Priprava acikličkog derivata benzimidazola **3** i njegovih cikličkih derivata **4-6**

#### 3.2.1. Priprava 2-(2-benzimidazolil)-3-(2-kloro-5-nitrofenil)akrilonitrila **3**

U okruglu tikvicu stavi se 0,81 g (4,37 mmol) 5-amino-2-klorobenzaldehida **1**, 0,69 g (4,37 mmol) 2-cijanometilbenzaldehida **2**, 10 mL aps. etanola i 0,1 mL piperidina te se reakcijska smjesa grije na 80°C 2,5 h. Reakcijska smjesa se potom ohladi i profiltrira. Dobiveni žuto-smeđi produkt se prekrystalizira iz etanola i profiltrira. Dobiveno je 1,16 g (66,32%) smeđih kristala. T. t. = >288°C

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ /ppm): 13,41 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{benzim.}}$ ), 8,99 (d, 1H,  $J=2,67$  Hz), 8,50 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 8,38 (dd, 1H,  $J_1=2,70$  Hz,  $J_2=8,85$  Hz), 7,98 (d, 1H,  $J=8,85$  Hz,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7,76 (d, 1H,  $J=7,62$  Hz,  $\text{H}_{\text{benzim.}}$ ), 7,60 (d, 1H,  $J=7,77$  Hz,  $\text{H}_{\text{benzim.}}$ ), 7,35 – 7,27 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{benzim.}}$ );

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ /ppm): 147,20 (s), 147,17 (s), 146,93 (s), 141,15 (s), 139,59 (d), 133,25 (s), 132,33 (d, 2C), 132,17 (s), 132,09 (d), 127,37 (d, 2C), 125,12 (d, 2C), 115,68 (s), 109,72 (s); UV(EtOH)  $\lambda_{\text{max}}(\epsilon)$ : 356 (21256), 267 (17950)

**3.2.2. Priprava 3-nitro-6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina 4**

**1. način:** 0,45 g (1.39 mmol) 2-(2-benzimidazolil)-3-(2-kloro-5-nitrofenil)akrilonitrila **3** uz zagrijavanje otopi se u 400 mL etanola, doda se jedan kristalić joda, te se ulije u posudu i osvjetljava UV lampom 400 W 10 h. Otopina se zatim upari do 1-2 mL, a nastali se produkt profiltrira i ispere s malom količinom etanola. Dobiveno je 0,25 g (62%) narančastog praškastog produkta. T. t. = >288°C

**2. način:** U okruglu tikvicu stavi se 0,50 g (1.54 mmol) 2-(2-benzimidazolil)-3-(2-kloro-5-nitrofenil)akrilonitrila **3** i 2,5 mL sulfolana. Smjesa se grije u pješčanoj kupelji na temperaturi 285° 1,5 h. Smjesi se zatim doda vode, a nastali talog se profiltrira. Dobiveno je 0,43 g (96,85%) zelenog praškastog produkta.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (δ/ppm): 9,08 (d, 1H, J=2,67 Hz, H<sub>arom.</sub>), 8,98 (d, 1H, J=8,90 Hz, H<sub>arom.</sub>), 8,96 (s, 1H, H<sub>kinolinski.</sub>), 8,72 (d, 1H, J=8,95 Hz, H<sub>arom.</sub>), 8,63 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=2,70 Hz, J<sub>2</sub>=9,00 Hz, H<sub>arom.</sub>), 8,08 – 8,05 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7,67 – 7,64 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>);

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (δ/ppm): 144,52 (s), 143,79 (s), 143,23 (s), 140,04 (d), 139,09 (s), 130,41 (s), 127,12 (d), 126,47 (d), 125,90 (d), 124,48 (d), 121,34 (s), 120,69 (d), 117,23 (d), 114,85 (d), 114,82 (s), 103,42 (s); UV(EtOH) λ<sub>max</sub>(ε): 314 (27023), 270 (221126), 250 (24204)

**3.2.3. Priprava 3-amino-6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina 5**

0,20 g (0,69 mmol) 3-nitro-6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina **4** stavi se u okruglu tikvicu od 10 mL te se doda otopina 1,3 g SnCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O u smjesi 2 mL HCl<sub>konc.</sub> i 2 mL metanola. Reakcijska smjesa refluksira 1 h. Smjesa se zatim upari do suha i razmulja u 50 mL vode te se dobro zaluzi s 20% otopinom NaOH do pH 14. Produkt se profiltrira i dobro ispere vodom. Dobiveno je 0,12 g (66,67%) žutog praškastog produkta. T. t. = >288°C

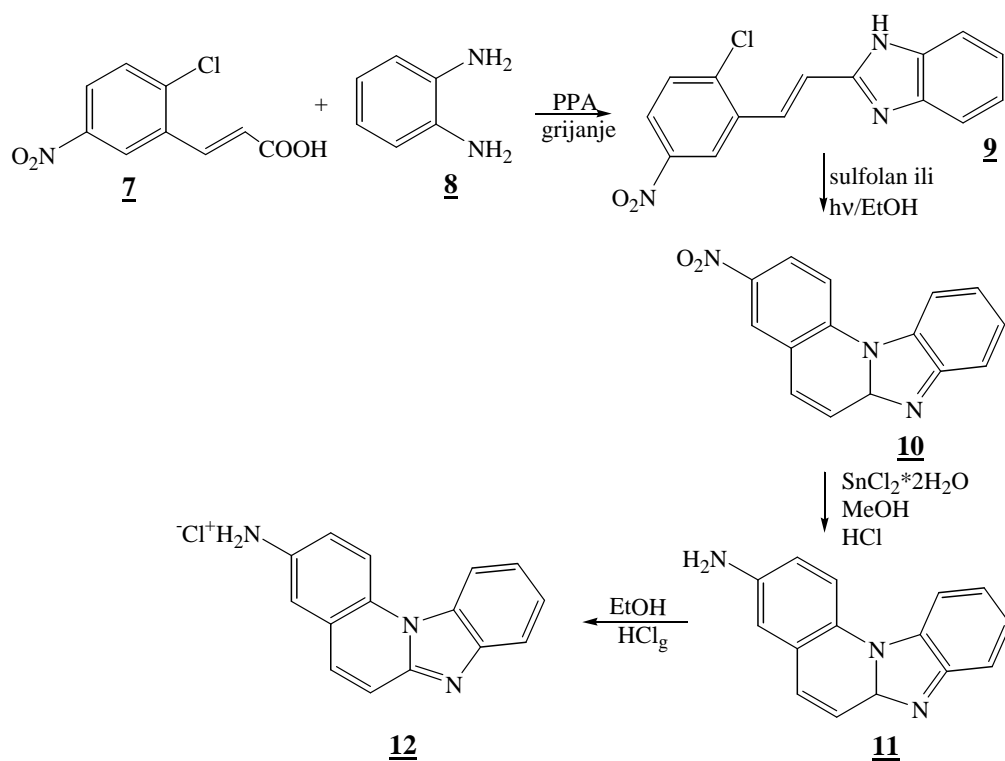
<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (δ/ppm): 8,67 (d, 1H, J=9,00 Hz, H<sub>arom.</sub>), 8,64 (s, 1H, H<sub>arom.</sub>), 8,61 (d, 1H, J=8,99 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,97 (d, 1H, J=7,53 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,59 – 7,49 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7,31 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=2,52 Hz, J<sub>2</sub>=9,00 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,16 (d, 1H, J=2,55 Hz, H<sub>arom.</sub>), 5,70 (šs, 2H, NH<sub>2</sub>);

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (δ/ppm): 146,32 (s), 143,78 (s), 143,59 (s), 140,42 (d), 130,25 (s), 127,06 (s), 124,51 (d), 122,94 (d), 122,56 (s), 121,11 (d), 120,00 (d), 116,70 (d), 115,72 (s), 114,54 (d), 100,67 (s); UV(EtOH) λ<sub>max</sub>(ε): 370 (5882), 353 (6696), 276 (23876)

### 3.2.4. Priprava 3-amino-6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina hidroklorida **6**

0,10 g (0,39 mmol) 3-amino-6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina **5** suspendira se u 5 ml apsolutnog etanola te se pola sata uvodi suhi, plinoviti HCl. Reakcijska se smjesa miješa 1 dan na sobnoj temperaturi a nastali se produkt profiltrira. Nije uspješno izoliran potpuno čisti produkt.

### 3. 3. Amino supstituirani benzimidazo[1,2-*a*]kinolini **11-12**



Shema 6. Priprava acikličkog derivata benzimidazola **9** i njegovih cikličkih derivata **10-12**

**3.3.1. Priprava *E*-{2-[2-(2-kloro-5-nitrofenil)-etenil]}benzimidazola **9****

U okruglu tikvicu stavi se 1,00 g (4,40 mmol) 3-(2-kloro-5-nitrofenil)akrilne kiseline **7**, 0,48 g (4,40 mmol) *o*-fenilendiamina **8** i 10 g PPA te se reakcijska smjesa grije na 180°C 2,5 h. Nakon hlađenja se reakcijska smjesa se prebaci u 300 mL leda te se zaluži s amonijakom do pH 9. Produkt se profiltrira i dobro ispere vodom te prekristalizira iz 200 mL etanola. Dobije se 0,67 g (50,76%) žuto-smeđeg produkta. T. t.=133-136°C

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (δ/ppm): 12,85 (šs, 1H, NH<sub>benzim.</sub>), 8,70 (d, 1H, J=2,67 Hz, H<sub>arom.</sub>), 8,18 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=2,70 Hz, J<sub>2</sub>=8,82 Hz), 7,97 (d, 1H, J=16,38 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,85 (d, 1H, J=8,76 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,66 (d, 1H, J=7,76 Hz, H<sub>benzim.</sub>), 7,55 (šs, 1H, H<sub>benzim.</sub>), 7,52 (d, 1H, J=16,32 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,22 (d, 2H, J=8,34 Hz, H<sub>benzim.</sub>)

**3.3.2. Priprava 3-nitro-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina **10****

U okruglu tikvicu stavi se 0,50 g (1.66 mmol) *E*-{2-[2-(2-kloro-5-nitrofenil)-etenil]}benzimidazola **9** i 3 mL sulfolana. Smjesa se grije u pješčanoj kupelji na temperaturi 285° 1,5 h. Smjesi se zatim doda vode, a nastali se talog profiltrira. Dobiveno je 0,42 g (94,84%) produkta. T. t.= 276-278°C

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (δ/ppm): 9,05 (d, 1H, J=2,64 Hz, H<sub>arom.</sub>), 9,01 (d, 1H, J=9,30 Hz, H<sub>arom.</sub>), 8,73 (d, 1H, J=8,64 Hz, H<sub>arom.</sub>), 8,56 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=2,70 Hz, J<sub>2</sub>=9,24 Hz, H<sub>arom.</sub>), 8,19 (d, 1H, J=9,54 Hz, H<sub>kinol.</sub>), 7,99 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=1,74 Hz, J<sub>2</sub>=7,14 Hz, H<sub>benzim.</sub>), 7,83 (d, 1H, J=9,54 Hz, H<sub>kinol.</sub>), 7,62 (dt, 1H, J<sub>1</sub>=1,80 Hz, J<sub>2</sub>=7,40 Hz, H<sub>arom.</sub>), 7,59 (dt, 1H, J<sub>1</sub>=1,50 Hz, J<sub>2</sub>=7,48 Hz, H<sub>arom.</sub>)

**3.3.3. Priprava 3-amino-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina **11****

0,40 g (1,52 mmol) 3-nitro-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina **10** stavi se u okruglu tikvicu od 10 mL te se doda otopina 2,90 g (12,62 mmol) SnCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O u smjesi 5,3 mL HCl<sub>konc.</sub> i 5,3 mL metanola. Reakcijska smjesa refluksira 1 h. Smjesa se zatim upari do suha i razmulja u 50 mL vode te se dobro zaluži s 20% otopinom NaOH do pH 14. Produkt se profiltrira i dobro ispere vodom. Dobiveno je 0,25 g (70,62%) zelenog praškastog produkta. T. t.= 240-243°C

## EKSPERIMENTALNI DIO

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ /ppm): 8,59 (d, 1H,  $J=7,47$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 8,52 (d, 1H,  $J=8,91$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,85 (d, 1H,  $J=7,41$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,73 (d, 1H,  $J=9,51$  Hz,  $H_{\text{kinol.}}$ ), 7,73 (d, 1H,  $J=9,48$  Hz,  $H_{\text{kinol.}}$ ), 7,47-7,40 (m, 2H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,13 (dd, 1H,  $J_1=2,52$  Hz,  $J_2=8,88$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,07 (d, 1H,  $J=2,52$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 5,45 (šs, 2H,  $\text{NH}_2$ )

### 3.3.4. Priprava 3-amino-benzimidazo[1,2-a]kinolina hidroklorida 12

0,12 g (0,52 mmol) 3-amino-benzimidazo[1,2-a]kinolina **11** suspendira se u 5 ml aps. etanola te se pola sata uvodi suhi, plinoviti HCl uz hlađenje. Reakcijska se smjesa miješa 1 dan na sobnoj temperaturi a nastali se produkt profiltrira i dobro ispere dietil-eterom. Dobiveno je 0,11 g (79,54%) zelenog praškastog produkta. T. t.= 285-288°C

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ /ppm): 8,97 (d, 1H,  $J=9,41$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 8,92 (d, 1H,  $J=9,84$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 8,46 (d, 1H,  $J=9,48$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 8,04 (d, 1H,  $J=7,98$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,92 (d, 1H,  $J=9,42$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,83-7,72 (m, 2H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,58 (d, 1H,  $J=9,00$  Hz,  $H_{\text{arom.}}$ ), 7,56 (šs, 1H,  $H_{\text{arom.}}$ ), 5,35 (šs, 3H,  $\text{NH}_3^+$ )

## 3.4. Ispitivanje interakcija nekih priređenih supstancija s ct-DNA

### 3.4.1. Supstrat

ct-DNA čistoće veće od 99 % kupljena je od Merck-a te korištena bez daljnjeg čišćenja na način da je otopljena u NaCaCo puferu (pH 7) u koncentraciji reda veličine  $10^{-2}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ . Koncentracija fosfata ct-DNA određena na osnovu absorbancije u puferu pH = 7; 0,01 M prema slijedećim vrijednostima:

- ct-DNA na 260 nm,  $\epsilon = 6600$ .

### 3.4.2. Spektroskopske metode

Kod UV/Vis titracija praćene su promjene spektara ispitivanih spojeva na valnim duljinama (ovisno o sistemu  $\lambda=300-400$  nm) gdje korištena ct-DNA ne apsorbira UV/Vis zračenje.

## EKSPERIMENTALNI DIO

Kod fluorescencijskih titracija praćene su promjene intenziteta fluorescencije ispitivanog spoja na valnim duljinama ( $\lambda_{em.}=380-600$  nm ) gdje niti jedan sastojak u otopini nema UV/Vis spektar te su korištene valne duljine pobude kod kojih ct-DNA nema UV/Vis spektar ( $\lambda_{eksc.}>320$  nm). Ukoliko je bilo potrebno, fluorescencijski spektri korigirani su za baznu liniju pufera.

### 3.4.3. Izvedba titracija

Promjene spektara ispitivanih spojeva po dodatku polinukleotida korigirane su za razrjeđenje. Ukupno razrjeđenje tokom titracija bilo je 3-5 %.

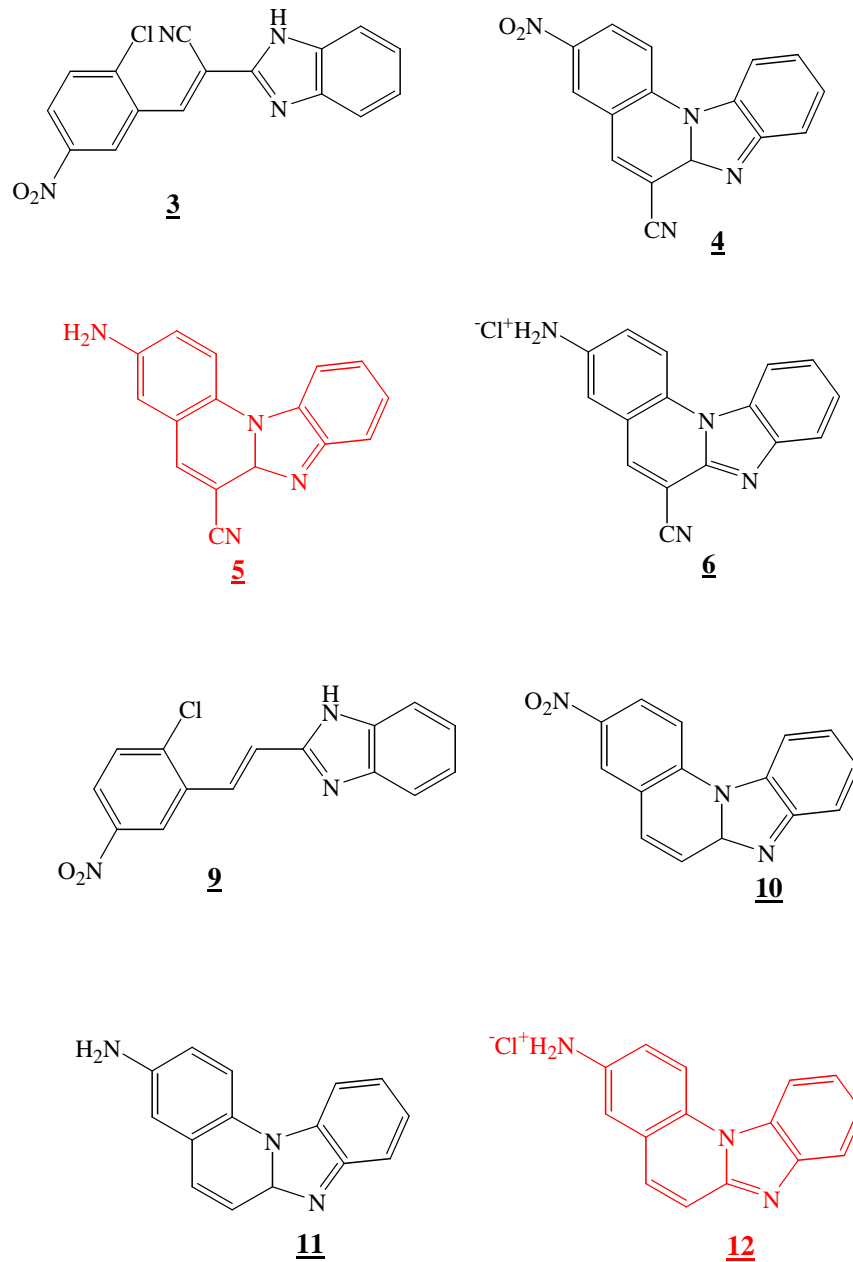
Korištena je metoda titracije pri kojoj je korišteno relativno kratko vrijeme (5-7 min) potrebno da se uspostavi ravnotežno stanje po dodatku supstrata u otopinu ispitivanog spoja. U kivetu s puferiranom vodenom otopinom ispitivanog spoja dodavani su alikvoti vodene otopine supstrata. Po svakom dodatku nakon navedenog vremena uravnoteženja uz miješanje magnetskim mješaćem snimljen je spektar ispitivanog spoja.



## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

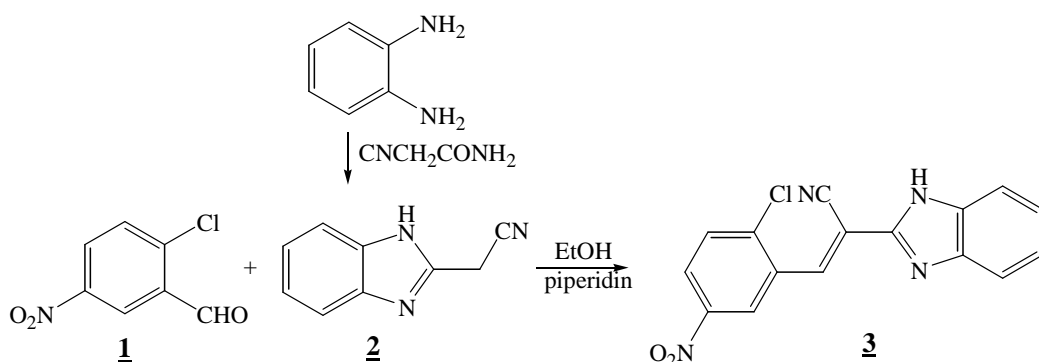
## REZULTATI I RASPRAVA

Zadatak ovog rada bio je pripremiti acikličke benzimidazolil supstituirane derivate akrilonitrila **3** i **9** i njihove cikličke derivate benzimidazo[1,2-*a*]kinoline **4-6** i **10-11** te ispitati interakciju spojeva **5** i **12** s ct-DNA.



Slika 10. Strukture priređenih spojeva

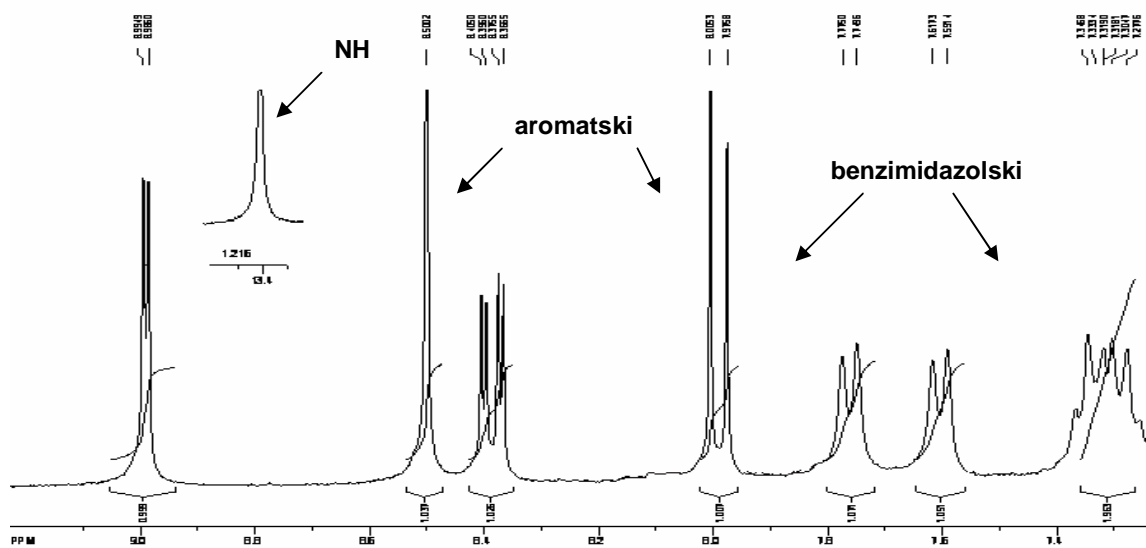
## 4.1. Sinteza ciljanih spojeva



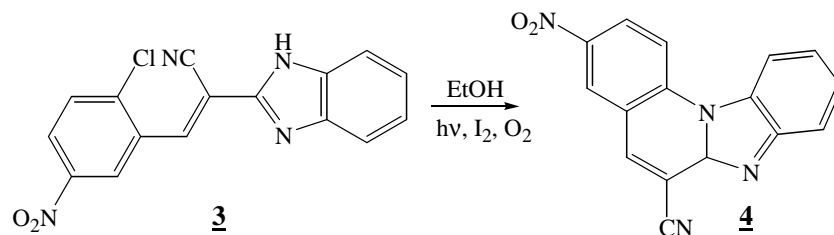
Shema 7.

2-(2-benzimidazolil)-3-(2-kloro-5-nitrofenil)akrilonitril **3** priređen je reakcijom aldolne kondenzacije iz aldehida **1** i 2-cijanometilbenzimidazola **2** koji je priređen iz *o*-fenilendiamina i 2-cijanoacetamida uz zagrijavanje.<sup>31,32</sup>

Struktura spoja **3** potvrđena je <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektrima (Prilog 1.), gdje se na <sup>1</sup>H NMR spektru može uočiti karakteristični broj odgovarajućih aromatskih signala, te na 13,2 ppm dušikov proton benzimidazolske jezgre, koji nam potvrđuju strukturu spoja.


 Slika 11. <sup>1</sup>H NMR spektar 2-(2-benzimidazolil)-3-(2-kloro-5-nitrofenil)akrilonitrila **3**

## REZULTATI I RASPRAVA



Shema 8.

3-nitro-6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolin **4** priređen je na dva načina:

1. reakcijom fotokemijske dehidrociklizacije u etanolnoj otopini uz dodatak joda i propuhivanje zrakom te osvjetljavanjem UV-Hg lampom od 400W.<sup>16,17,21</sup> Tijek reakcije fotokemijske dehidrociklizacije praćen je UV spektroskopijom.
2. grijanjem u sulfolanu na temperaturi 285° te je tim postupkom ujedno dobiveno veće iskorištenje spoja.

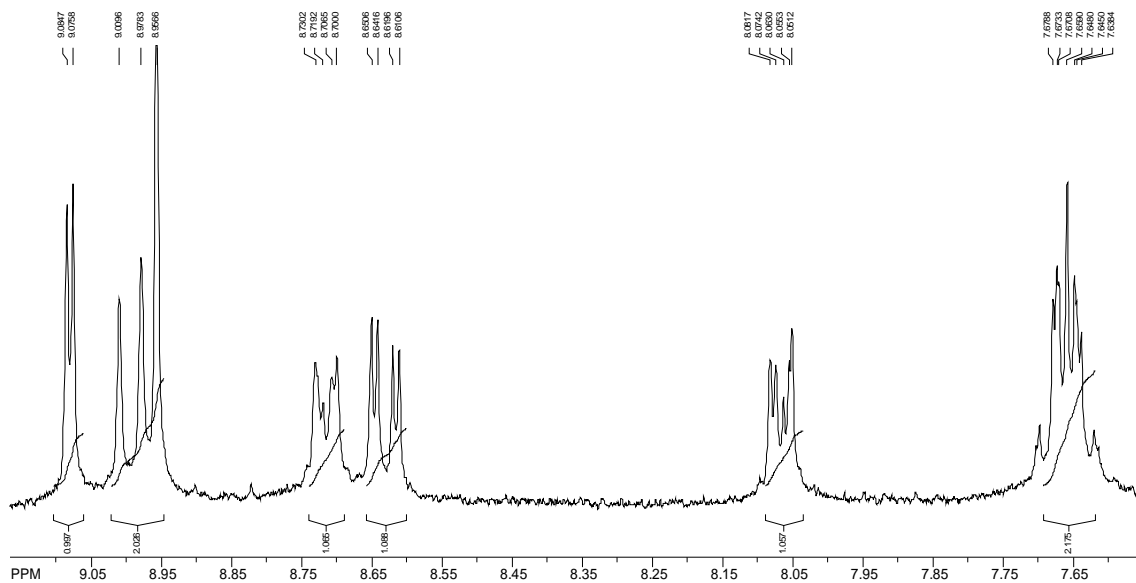
Na Slici 12. prikazana je fotokemijska reakcija dehidrohalogeniranja pri čemu se etanolna otopina spoja **3** osvjetljava UV visokotlačnom živinom lampom od 400 W uz hlađenje.



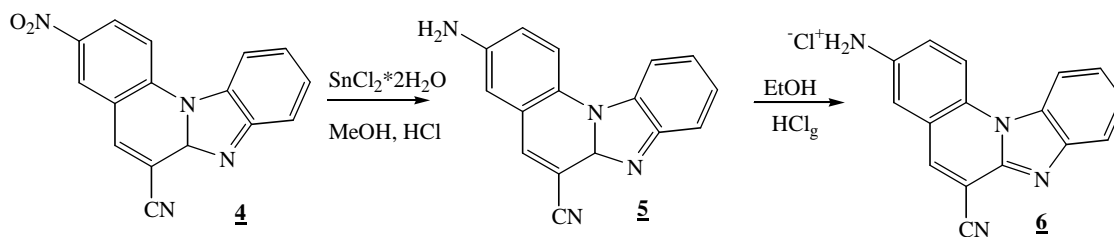
Slika 12. Fotokemijska reakcija dehidrohalogeniranja

## REZULTATI I RASPRAVA

Struktura spoja **4** potvrđena je  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima (Prilog 2.), gdje u  $^1\text{H}$  NMR spektru u odnosu na spektr spoj **3** postoji pomak prema nižim magnetskim poljima te nestanak signala dušikovog protona na 13,2 ppm.



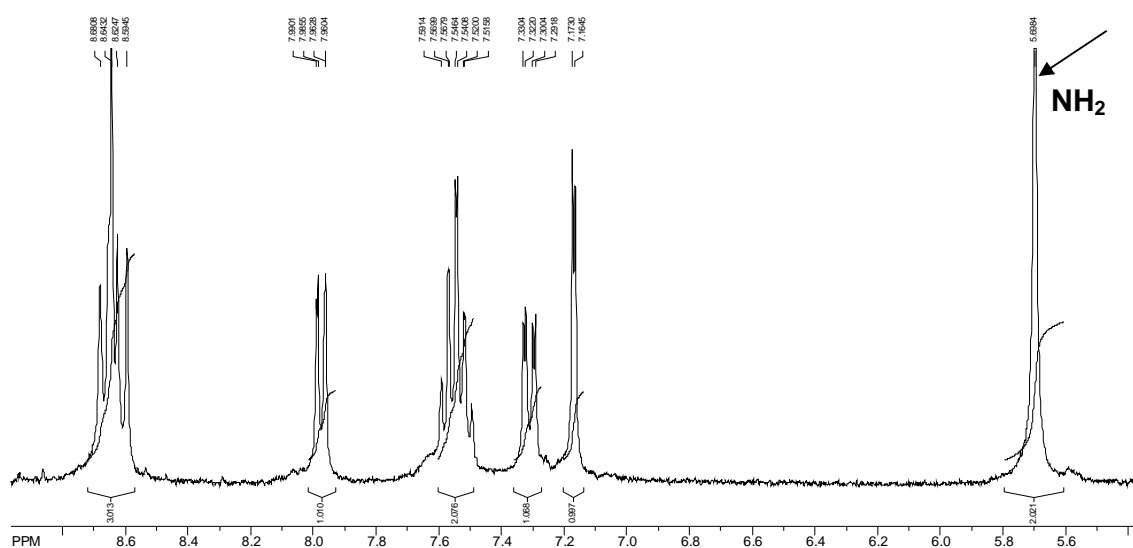
Slika 13.  $^1\text{H}$  NMR spektr spoj **4** 3-nitro-6-cijano-benzimidazo[1,2-a]kinolina



Shema 9.

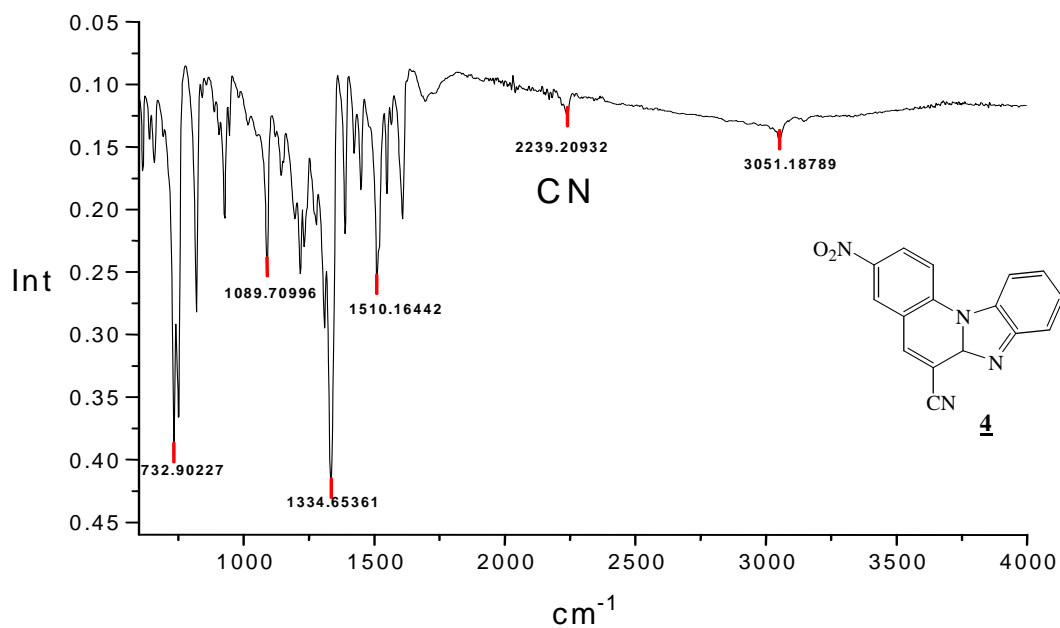
Sljedeći zadatak bio je sintetizirati 3-amino-6-cijano-benzimidazo[1,2-a]kinolin **5**. Redukcija je provedena sa kositar-kloridom dihidratom u metanolu i kiselim mediju. Struktura spoja **5** potvrđena je  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima (Prilog 3.), gdje su u  $^1\text{H}$  NMR spektru uočeni karakteristični signali amino protona na 5,7 ppm. Hidroklorid spoj **5** amino-6-cijano-benzimidazo[1,2-a]kinolin hidroklorid **6** priređen je uvođenjem plinovitog HCl u etanolnu otopinu spoja **5**.

## REZULTATI I RASPRAVA



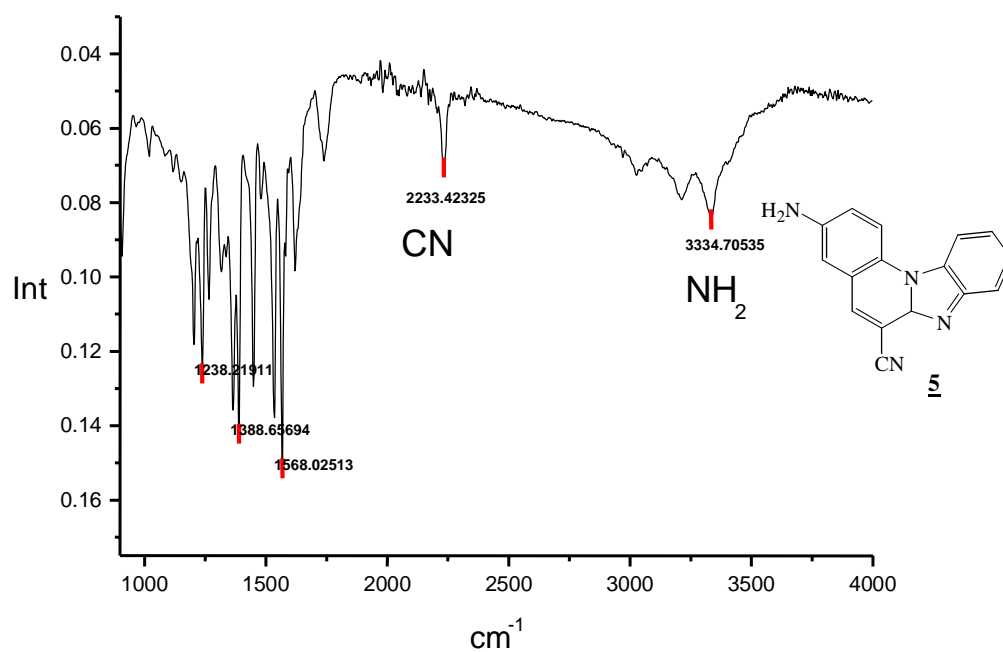
Slika 14.  $^1\text{H NMR}$  spektar 3-amino-6-cijano-benzimidazo[1,2-a]kinolina

Redukcija nitro spoja u amino praćena je i IR spektroskopijom. Na Slikama 15. i 16. prikazani su IR spektri nitro i amino spojeva na kojem su uočeni na oko 3300  $\text{cm}^{-1}$  signali koji odgovaraju amino skupini, dok na IR spektru nitro spoja takvih signala nema.



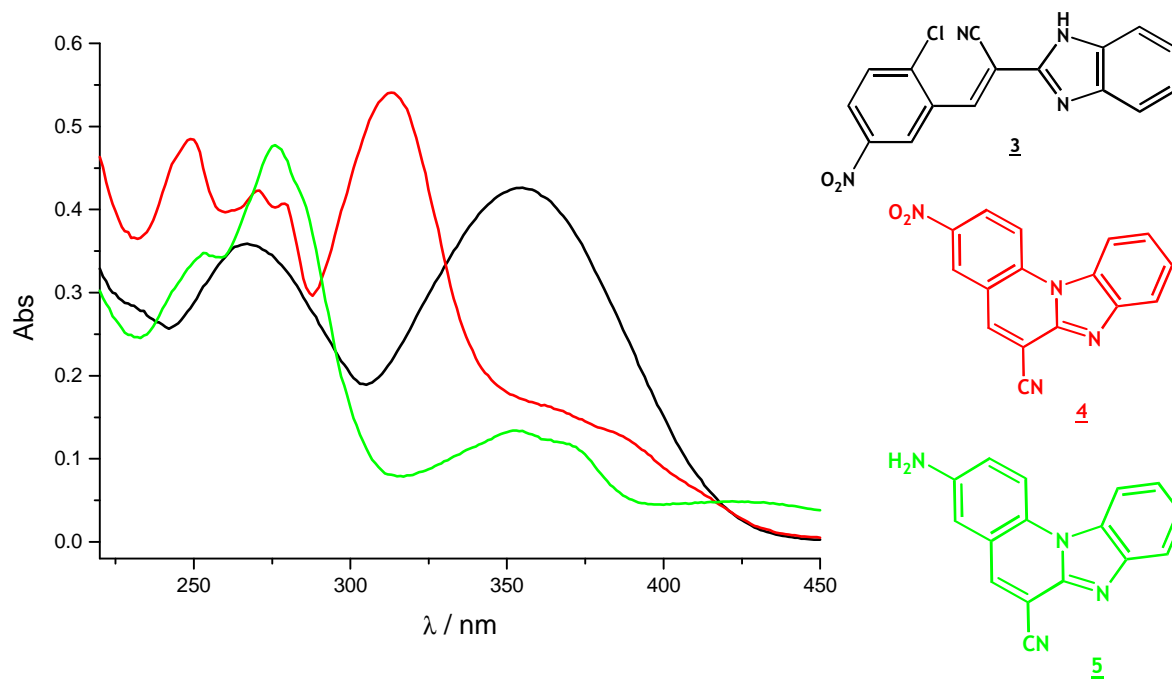
Slika 15. IR spektar nitro spoja **4**

## REZULTATI I RASPRAVA



Slika 16. IR spektar amino spoja 5

Sintetizirani spojevi **3-6** imaju zanimljiva spektroskopska svojstva. Stoga su spojevi **3-5** okarakterizirani i UV spektroskopijom.



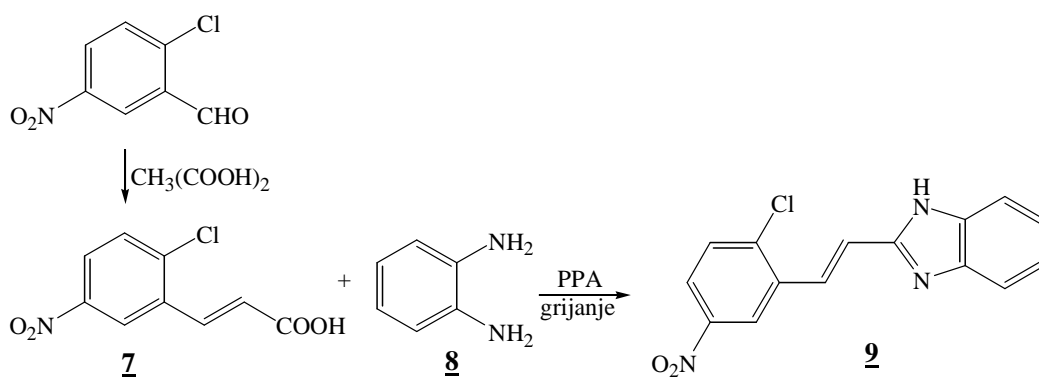
Slika 17. UV spektri spojeva 3 - 5

## REZULTATI I RASPRAVA

Spoj **3** ima jedan izraženi maksimum na 356 nm. Njegov ciklički derivat **4** pokazuje maksimum na 314 nm i više maksimuma u području od 250-270 nm, što je karakteristično za takve cikličke spojeve. Amino spoj **5** pokazuje manje izražene maksimume između 350-370 nm te jedan izraženiji maksimum na 276nm. U Tablici 2. prikazane su valne duljine maksimuma apsorbancije te ekstincijski koeficijenti za pojedine maksimume.

Tablica 2.

Spoj	$\lambda_{\max}$ / nm	$\epsilon$ / $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$
<b>3</b>	356 267	21 256 17 950
<b>4</b>	314 270 250	27 023 21 126 24 204
<b>5</b>	370 353 276	5 882 6 696 23 876

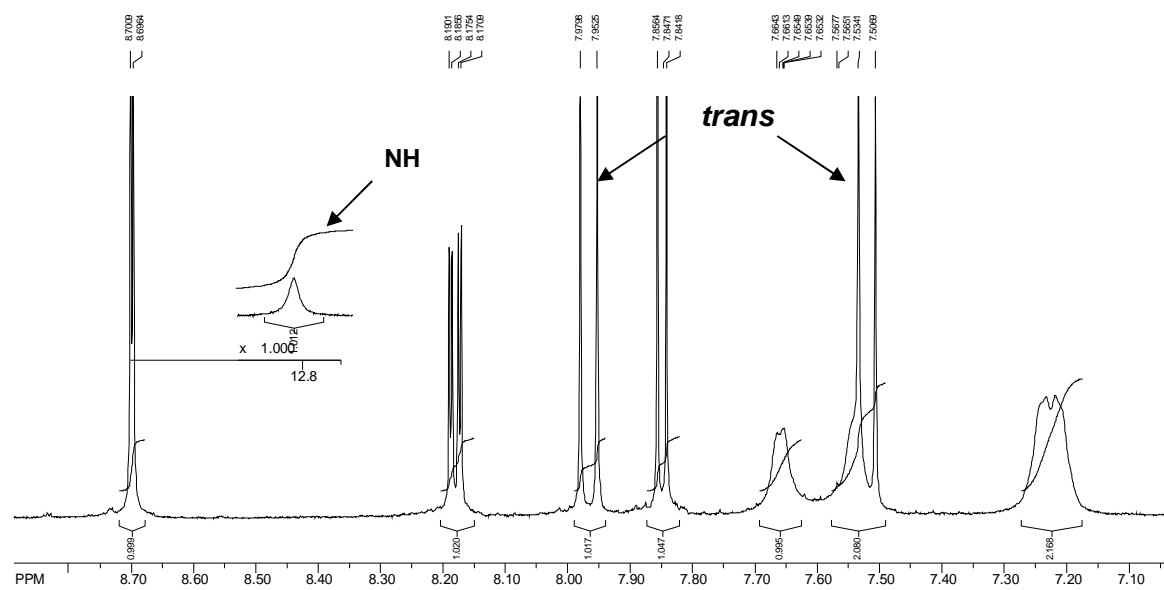


Shema 10.

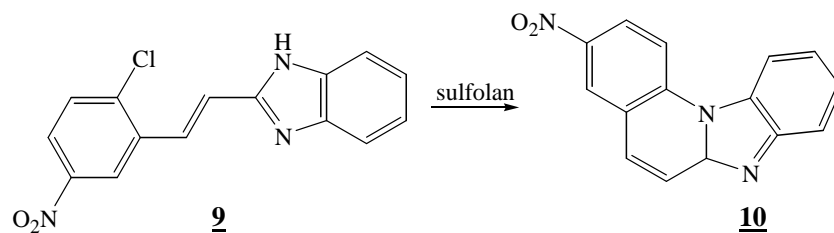
*E*-{2-[2-(2-kloro-5-nitrofenil)-etenil]}benzimidazol **9** priređen je reakcijom zagrijavanja kiseline **7** i o-fenilendiamina **8** u PPA. 3-(2-kloro-5-nitrofenil)akrilna kiselina **7** (Prilog 4.) priređena je iz 5-amino-2-klor-benzaldehida i malonske kiseline u piridinu. Struktura spoja **9** potvrđena je  $^1\text{H}$  NMR spektrom, gdje se u  $^1\text{H}$  NMR spektru može uočiti karakteristični broj odgovarajućih aromatskih signala, na 7,96 ppm i 7,52 ppm dva dubleta s konstantama sprege ~16 Hz koji odgovaraju *trans* protonima dvostruke veze te na 12,8 ppm dušikov proton benzimidazolske jezgre, koji nam potvrđuju strukturu spoja.



## REZULTATI I RASPRAVA



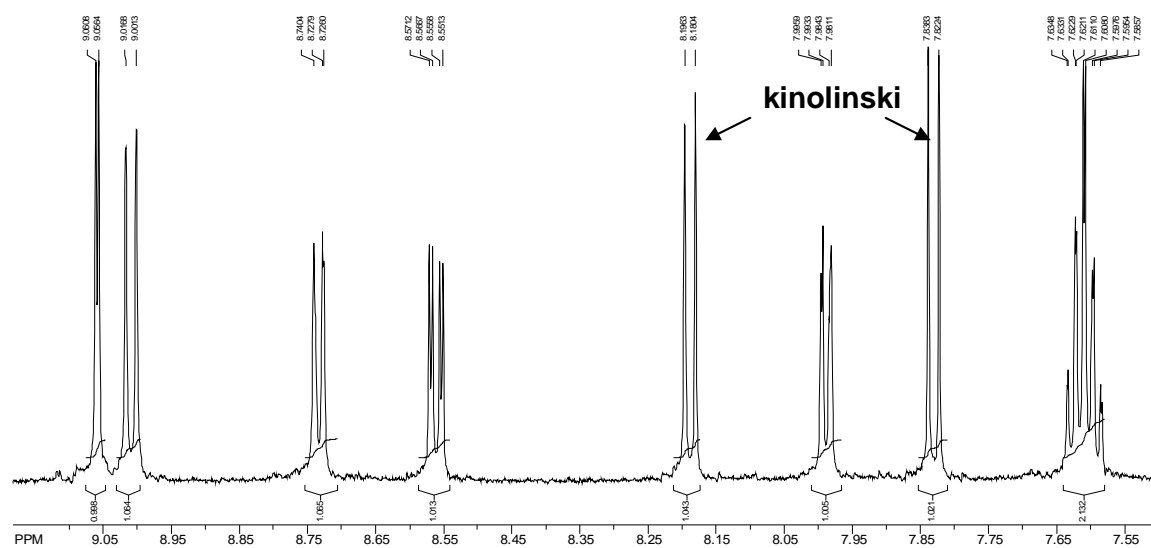
Slika 18.  $^1\text{H}$  NMR spektar *E*-{2-[2-(2-kloro-5-nitrofenil)-etenil]}benzimidazola **9**



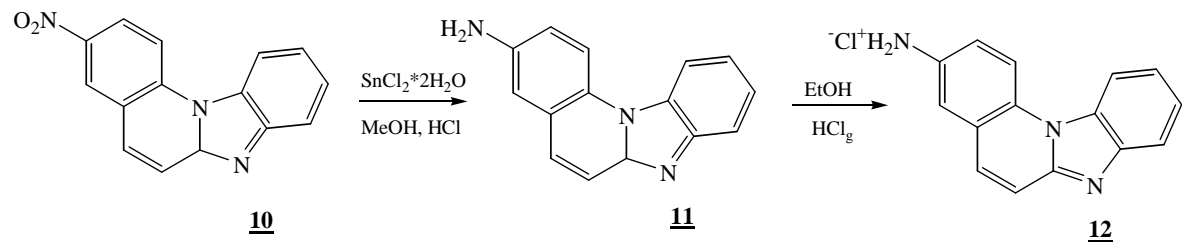
Shema 11.

3-nitro-6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolin **10** priređen je grijanjem spoja **9** u sulfolanu u pješčanoj kupelji na temperaturi 285°. Struktura spoja **10** potvrđena je  $^1\text{H}$  NMR spektrom, gdje u odnosu na spektar spoja **9** postoji pomak prema nižim magnetskim poljima te nestanak signala dušikovog protona na 12,8 ppm. Na 8,19 ppm i 7,82 ppm mogu se uočiti dva dubleta s konstantama sprege 9,54 Hz koji odgovaraju protonima kinolinske jezgre, karakterističnim za takav tip cikličkih spojeva.

## REZULTATI I RASPRAVA



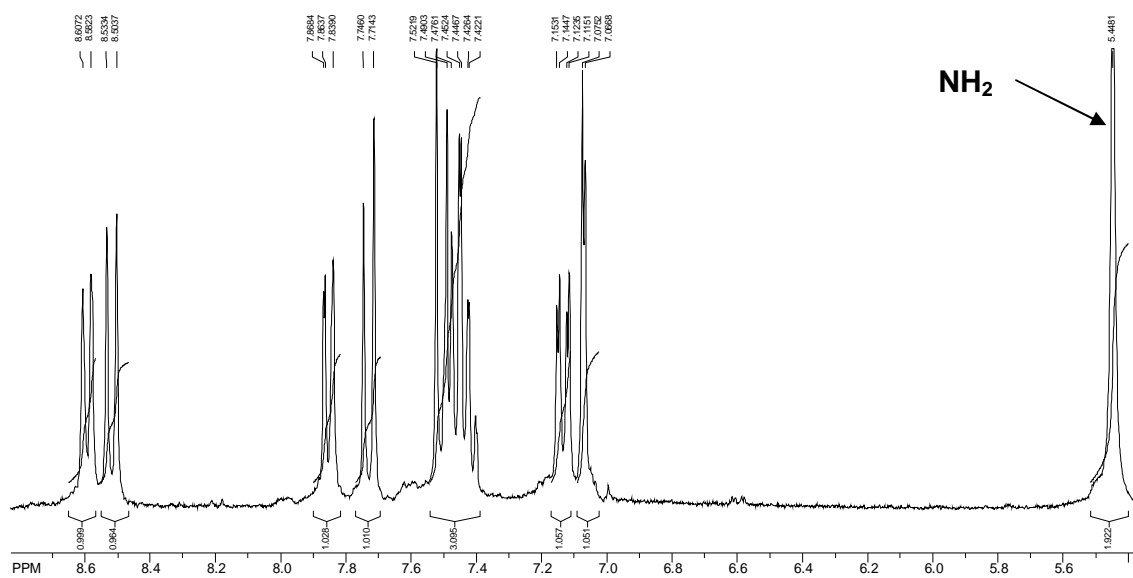
Slika 19.  $^1\text{H}$  NMR spektar 3-nitro-benzimidazo[1,2-a]kinolina **10**



Shema 12.

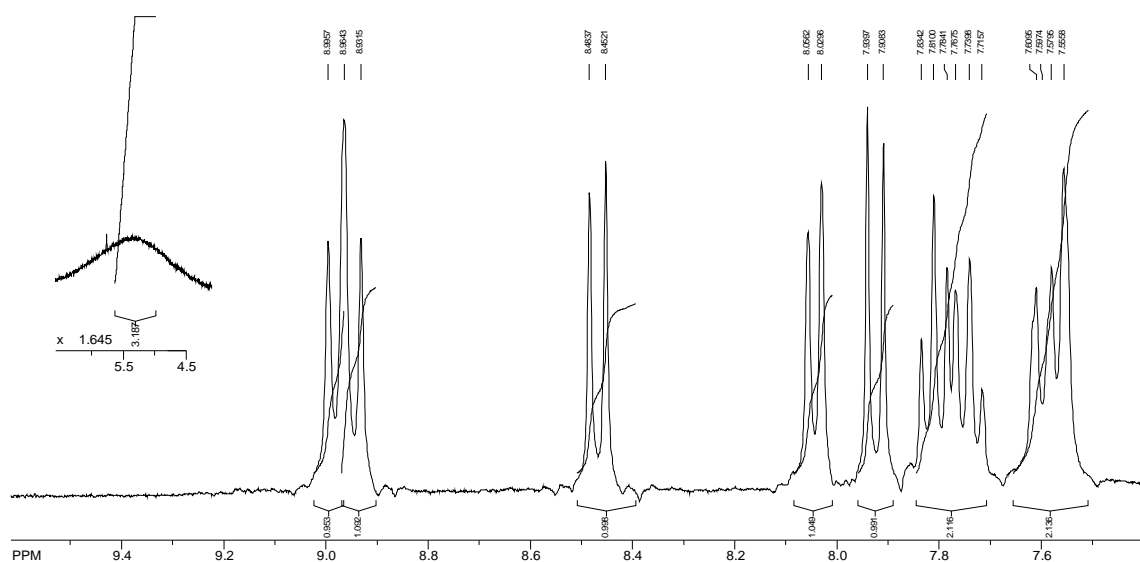
Sljedeći zadatak bio je sintetizirati 3-amino-benzimidazo[1,2-a]kinolin **11**. Redukcija je provedena s kositar-kloridom dihidratom u metanolu i kiselom mediju. Struktura spoja **11** potvrđena je  $^1\text{H}$  NMR spektrom, gdje je u  $^1\text{H}$  NMR spektru uočen karakteristični signal amino protona na 5,45 ppm, odgovarajući broj signala aromatskih protona te na 7,72 ppm i 7,52 ppm dva dubleta s konstantama sprege 9,51 Hz karakterističnim za kinolinsku jezgru..

## REZULTATI I RASPRAVA



Slika 20.  $^1\text{H}$  NMR spektar 3-amino-benzimidazo[1,2-a]kinolina **11**

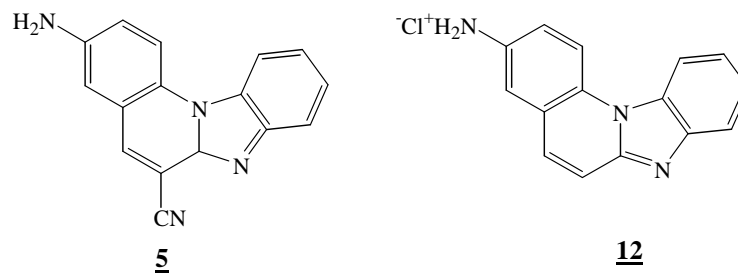
Hidroklorid spoja **11** 3-amino-benzimidazo[1,2-a]kinolin hidroklorid **12** priređen je uvođenjem plinovitog HCl u etanolnu otopinu spoja **11** a na Slici 21. prikazan je  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **11** u kojem se može uočiti na 5,45 ppm široki single koji odgovara protoniranoj amino skupini.



Slika 21.  $^1\text{H}$  NMR spektar 3-amino-benzimidazo[1,2-a]kinolina hidroklorida **12**

## 4. 2. Ispitivanje interakcije spojeva 5 i 12 s ct-DNA

Cikličkim spojevima **5** i **12** ispitana je interakcija s ct-DNA prema postupcima opisanim u poglavlju 3.3.

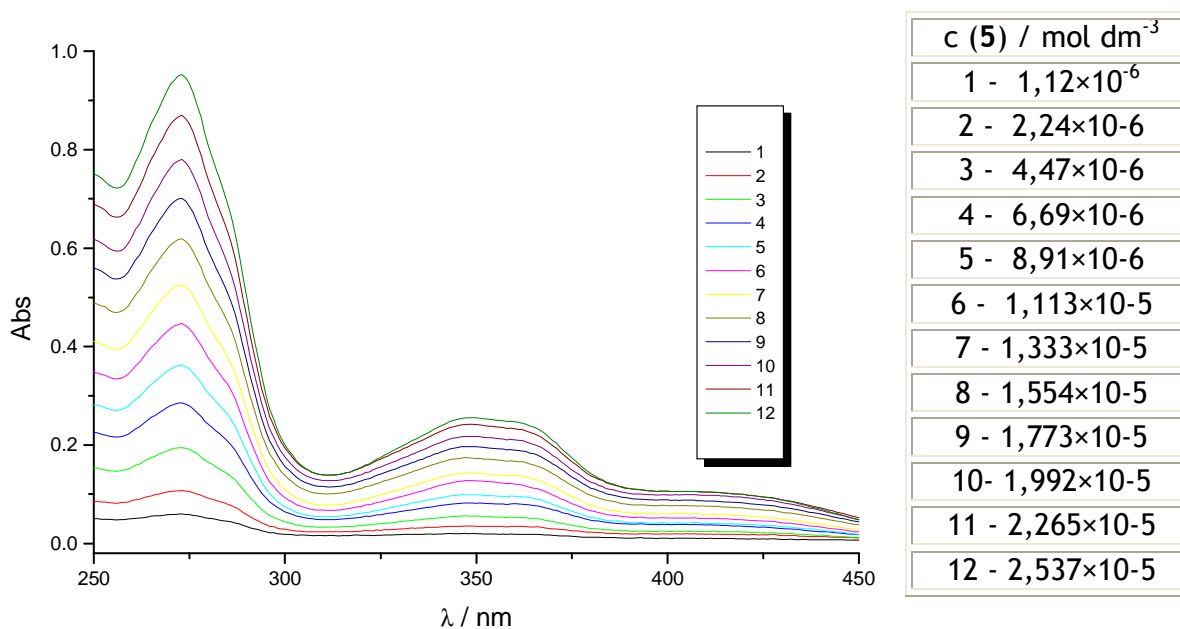


Slika 22. Struktura ispitivanih spojeva s ct-DNA

Navedeni spojevi nisu dovoljno dobro topljivi u vodi pa su njihove matične otopine priređene u DMSO-u. Njihove spektroskopske karakteristike su ispitane u puferskoj otopini NaCaCo pri pH 7. Koncentracije priređenih otopina se kreću u području koncentracija  $10^{-3}$  mol $\text{dm}^{-3}$ .

### 4.2.1. UV/Vis baždarni dijagrami

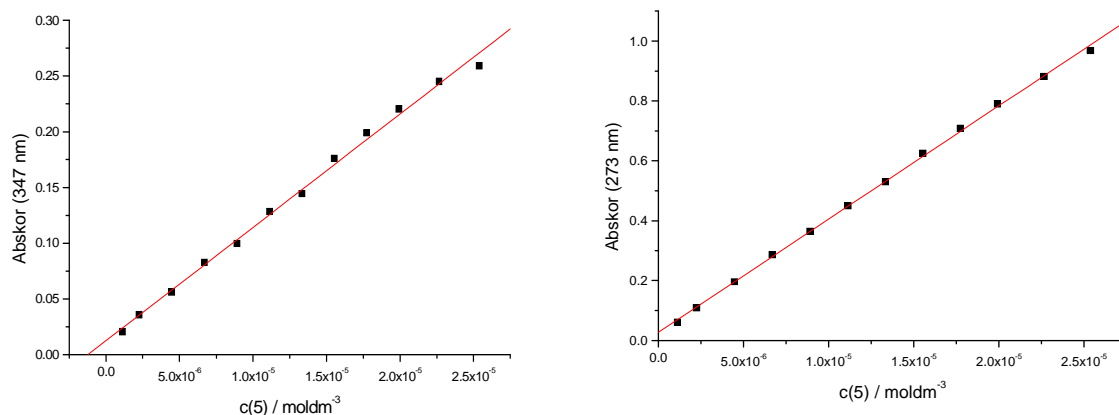
Kako bi se utvrdila stabilnost spojeva u puferskoj otopini, napravljeni su UV/Vis baždarni dijagrami. Na Slici 23. Prikazan je UV/Vis baždarni dijagram spoja **5**.



Slika 23. UV/Vis baždarni dijagram spoja 5

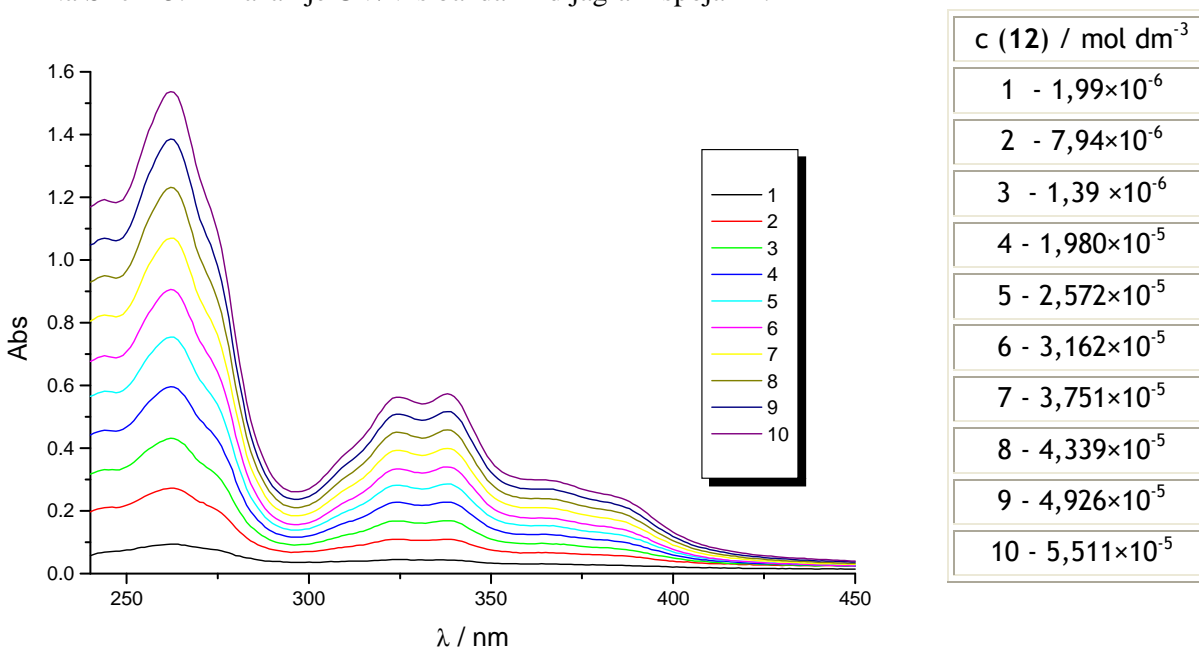
## REZULTATI I RASPRAVA

Apsorbancija je linearno ovisna o koncentraciji ispitanoj spoja **5** u području koncentracija  $10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  na oba maksimuma apsorbancije 347 nm i 273 nm što je prikazano na Slici 24.



Slika 24. Linearna ovisnost apsorbancije o koncentraciji dodanog spoja **5**

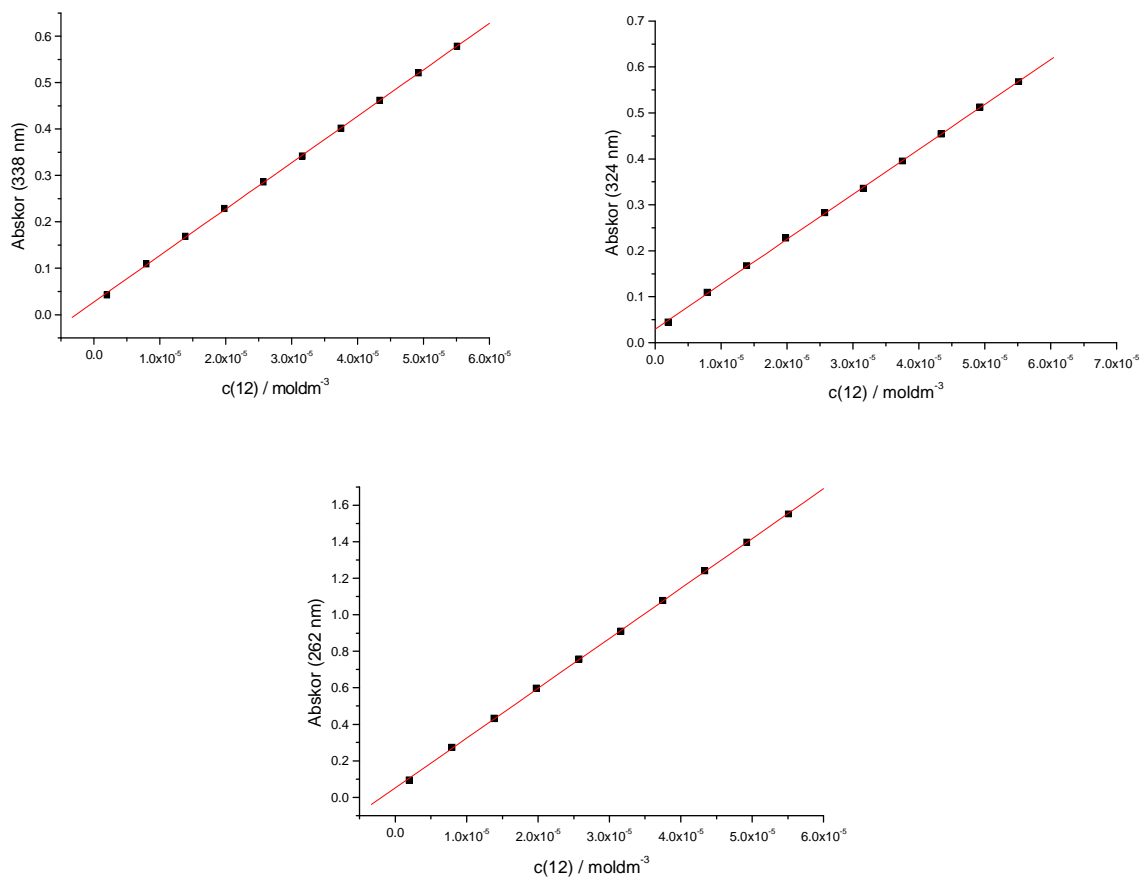
Na Slici 25. Prikazan je UV/Vis baždarni dijagram spoja **12**.



Slika 25. UV/Vis baždarni dijagram spoja **12**

Apsorbancija je linearno ovisna o koncentraciji ispitanoj spoja **12** u području koncentracija  $10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  na svim maksimumima apsorbancije 338 nm, 324 nm i 262 nm što je prikazano na Slici 26.

## REZULTATI I RASPRAVA



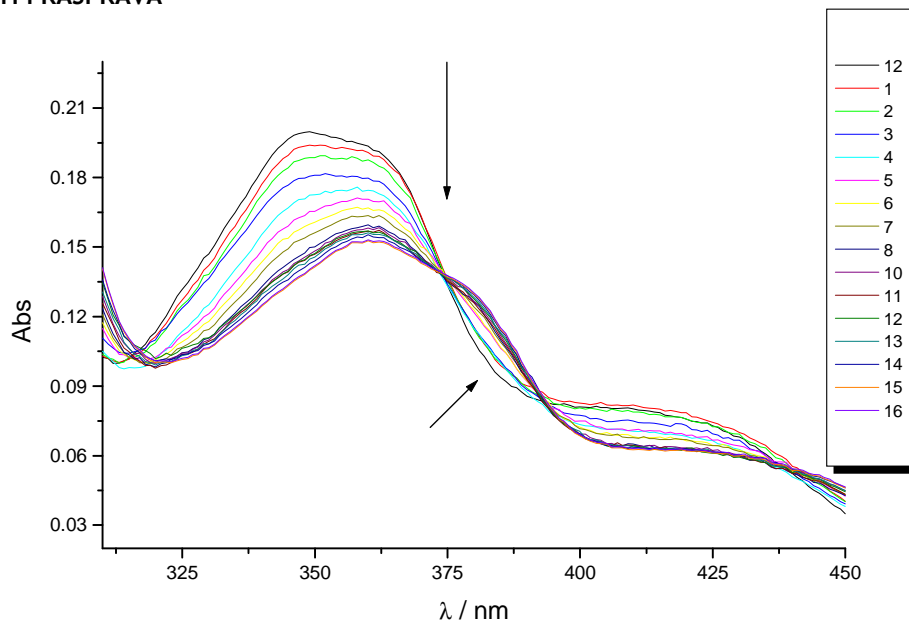
Slika 26. Linearna ovisnost apsorbancije o koncentraciji dodanog spoja 12

Linearna ovisnost pokazatelj je nepostojanja nekovalentnih intermolekulskih interakcija („samosljepljivanja“ molekula).

### 4.2.2. UV/Vis titracije spojeva 5 i 12 s ct-DNA

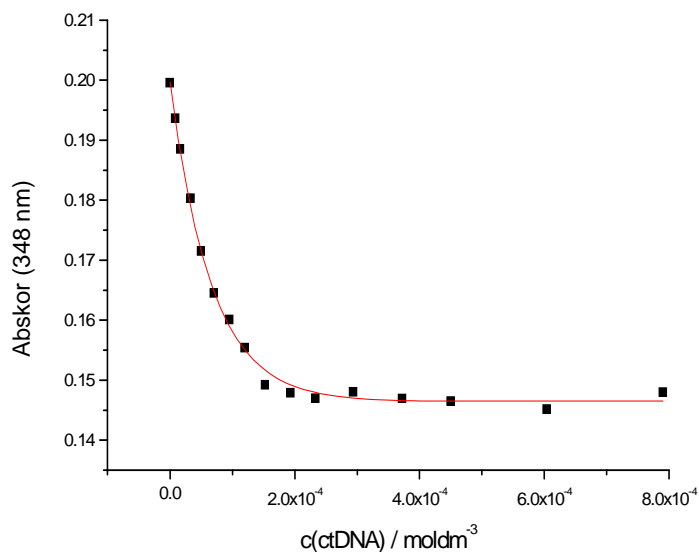
Za navedene spojeve 5 i 12 potom su izvedene UV/Vis titracije s puferском otopinom ct-DNA u NaCaCo puferu pri pH=7, prema postupku opisanom u poglavlju 3.3. Koncentracije ispitivanih spojeva kreću se u području  $10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ . Na Slici 27. prikazana je krivulja UV/Vis titracija spoja 5 s ct-DNA a na Slici 28. ovisnost apsorbancije na maksimumu 348 nm o koncentraciji dodane otopine ct-DNA.

## REZULTATI I RASPRAVA



Slika 27. UV/Vis titracija spoja **5** ( $1,85 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s ct-DNA ( $1,26 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-2}$ )

Tablica 3. Promjena apsorbancije spoja **5** na maksimumu uslijed dodavanja ct-DNA



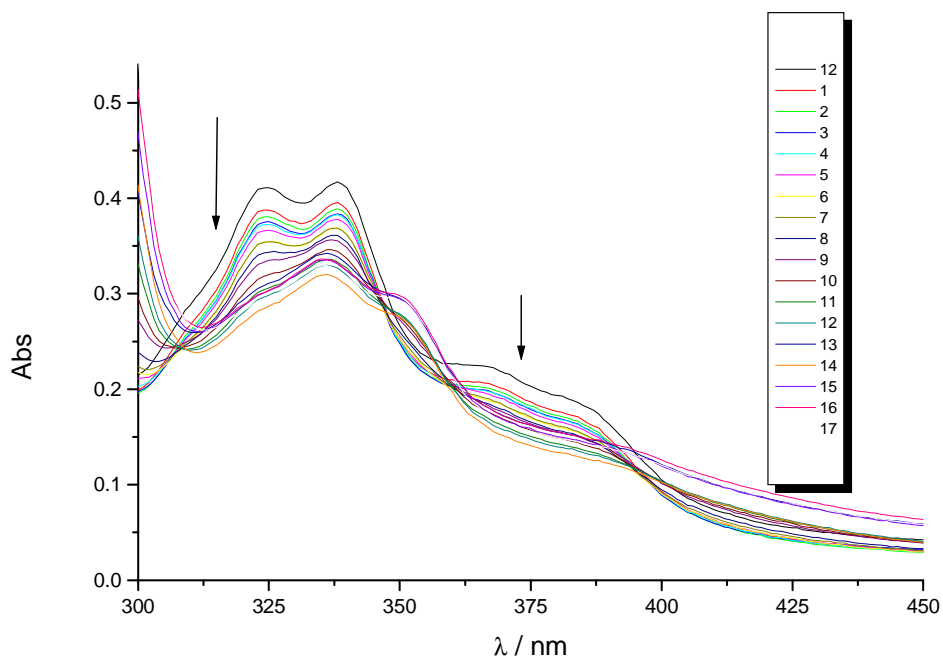
Slika 28. Ovisnost apsorbancije spoja **5** na 348 nm o koncentraciji dodane ct-DNA

Br.	Abskor (348 nm)	c (ct-DNA) mol dm <sup>-3</sup>
Spoj <b>5</b>	0,200	0
1	0,194	$8,34 \times 10^{-6}$
2	0,188	$1,67 \times 10^{-5}$
3	0,180	$3,33 \times 10^{-5}$
4	0,172	$4,99 \times 10^{-5}$
5	0,165	$7,05 \times 10^{-5}$
6	0,160	$9,52 \times 10^{-5}$
7	0,155	$1,2 \times 10^{-4}$
8	0,149	$1,53 \times 10^{-4}$
9	0,148	$1,93 \times 10^{-4}$
10	0,147	$2,33 \times 10^{-4}$
11	0,148	$2,93 \times 10^{-4}$
12	0,147	$3,72 \times 10^{-4}$
13	0,146	$4,51 \times 10^{-4}$
14	0,145	$6,04 \times 10^{-4}$
15	0,148	$7,9 \times 10^{-4}$

Iz UV/Vis titracijske krivulje spoja **5** vidljivo je da tijekom dodavanja puferske otopine ct-DNA u pufersku otopinu spoja **5** dolazi do opadanja apsorbancije, tj. izraženog hipokromnog pomaka. Od koncentracije ct-DNA od  $7,05 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  može se uočiti i batokromni pomak maksimuma apsorbancije. U Tablici 3. dani su podaci o promjeni apsorbancije spoja **5** na 348 nm uslijed dodatka ct-DNA.

## REZULTATI I RASPRAVA

Na Slici 29. prikazana je krivulja UV/Vis titracija spoja **12** s ct-DNA.



Slika 29. UV/Vis titracija spoja **12** ( $3,97 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s ct-DNA ( $1,26 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-2}$ )

Tablica 4. Promjena apsorbancije spoja **12** na maksimumu apsorbancije 338 nm uslijed dodavanja ct-DNA

br. spektra	Abskor (338 nm)	c (dodana ct-DNA) $\text{mol dm}^{-3}$
Spoj <b>12</b>	0,417	0
1	0,396	$4,17 \times 10^{-6}$
2	0,389	$8,34 \times 10^{-6}$
3	0,384	$1,67 \times 10^{-5}$
4	0,384	$2,5 \times 10^{-5}$
5	0,379	$4,16 \times 10^{-5}$
6	0,371	$6,64 \times 10^{-5}$
7	0,372	$9,93 \times 10^{-5}$
8	0,365	$1,4 \times 10^{-4}$
9	0,362	$2,21 \times 10^{-4}$
10	0,353	$3,01 \times 10^{-4}$
11	0,345	$4,19 \times 10^{-4}$
12	0,342	$5,35 \times 10^{-4}$
13	0,357	$6,49 \times 10^{-4}$
14	0,336	$7,61 \times 10^{-4}$
15	0,357	$9,06 \times 10^{-4}$
16	0,363	$1,08 \times 10^{-3}$
17	0,361	$1,25 \times 10^{-3}$



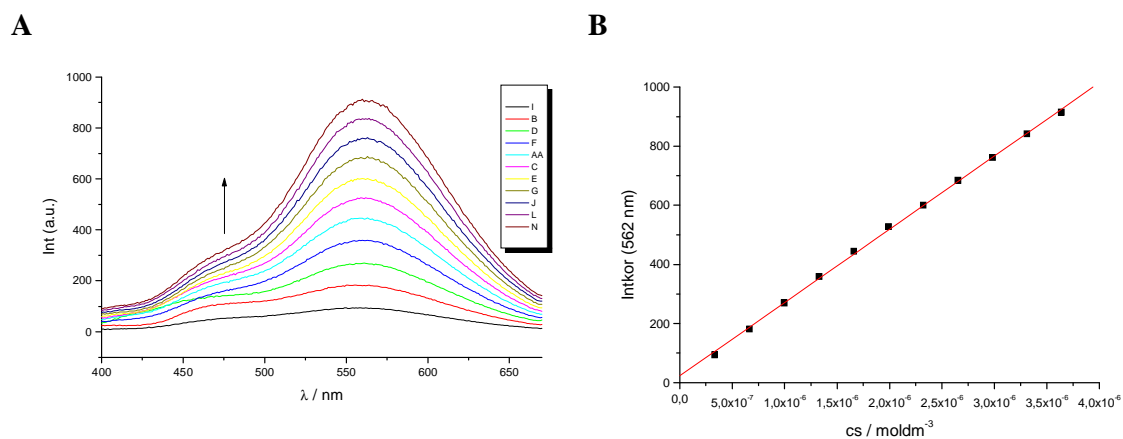
## REZULTATI I RASPRAVA

Iz UV/Vis titracijske krivulje spoja **12** vidljivo je da tijekom dodavanja puferske otopine ct-DNA u pufersku otopinu spoja **12** dolazi do opadanja apsorbancije, tj. izraženog hipokromnog pomaka. Pri velikom suvišku ct-DNA (krivulje 16-17) dolazi do laganog povećanje apsorbancije tj. hiperkromnog pomaka.

Iz prethodno navedenih rezultata ispitivanja interakcije spojeva **5** i **12** koji su s obzirom na dosadašnje iskustvo na tom području, potencijalni biološki aktivni agensi i kemoterapeutici, možemo zaključiti da postoji određena interakcija i afinitet prema ct-DNA.

### 4.2.3. Fluorimetrijski emisijski baždarni dijagrami spojeva **5** i **12**

Fluorimetrijska spektroskopska ispitivanja, moguće je zbog visoke osjetljivosti ove metode, provesti kod bitno manjih koncentracija pa su takvi uvjeti slični onima u biološkim sustavima. Prije izvedbe fluorimetrijskih titracija napravljeni su fluorimetrijski emisijski baždarni grafovi spojeva **5** i **12** kako bi se utvrdilo do kojeg je područja koncentracija intenzitet fluorescencije linearno ovisan o količini dodane supstancije. Na Slici 30. prikazan je fluorimetrijski emisijski baždarni dijagram spoja **5** (A) i linearna ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji dodanog spoja **5** (B).

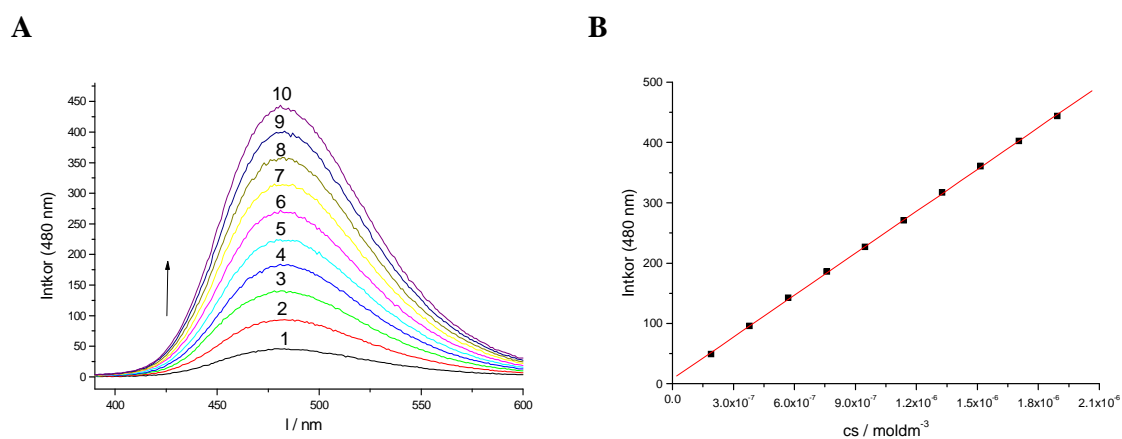


Slika 30. Fluorimetrijski emisijski baždarni dijagram spoja **5**

Iz prikaza ovisnosti intenziteta fluorescencije na maksimumu emisije 562 nm o koncentraciji dodanog spoja **5** vidi se da postoji linearna ovisnost što znači da je spoj stabilan u području koncentracija  $10^{-7}$  -  $10^{-6}$   $\text{moldm}^{-3}$ .

## REZULTATI I RASPRAVA

Na Slici 31. prikazan je fluorimetrijski emisijski baždarni dijagram spoja **12** (A) i linearna ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji dodanog spoja **12** (B).



Slika 31. Fluorimetrijski emisijski baždarni dijagram spoja **12**

Iz prikaza ovisnosti intenziteta fluorescencije na maksimumu emisije 480 nm o koncentraciji dodanog spoja **12** vidi se da postoji linearna ovisnost što znači da je spoj stabilan u području koncentracija  $10^{-7}$  -  $10^{-6}$  moldm<sup>-3</sup>.

Tablica 5. Promjena intenziteta fluorescencije spoja **5** na maksimumu 562 nm

br.	Intkor 562nm	c ( <b>5</b> ) mol dm <sup>-3</sup>
1	94,25	$3,33 \times 10^{-7}$
2	181,49	$6,66 \times 10^{-7}$
3	269,57	$9,98 \times 10^{-7}$
4	358,77	$1,330 \times 10^{-6}$
5	444,55	$1,661 \times 10^{-6}$
6	527,87	$1,992 \times 10^{-6}$
7	600,16	$2,322 \times 10^{-6}$
8	684,04	$2,653 \times 10^{-6}$
9	761,96	$2,982 \times 10^{-6}$
10	841,51	$3,311 \times 10^{-6}$
11	914,64	$3,331 \times 10^{-6}$

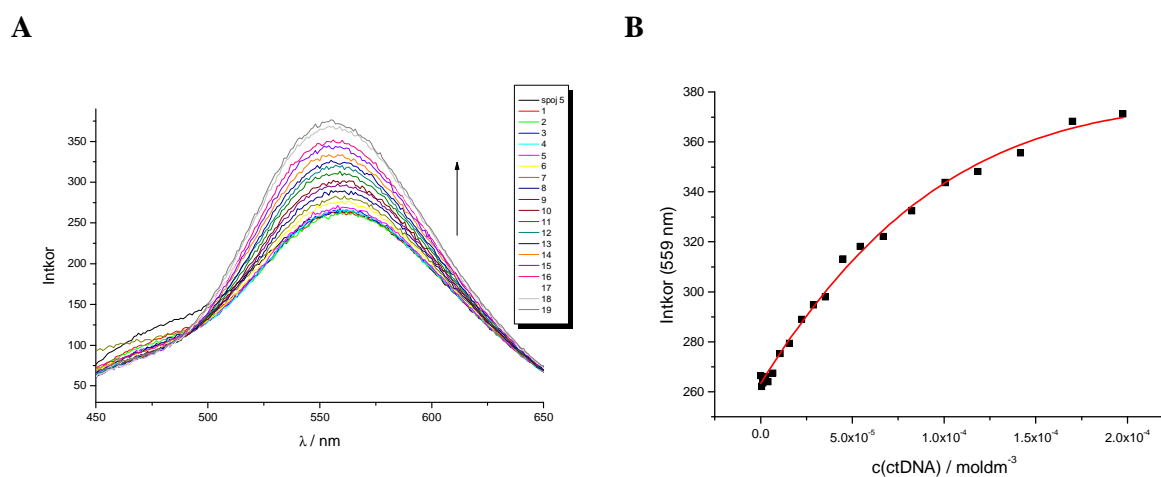
Tablica 6. Promjena intenziteta fluoresc. spoja **12** na maksimumu 480 nm

br.	Intkor 480nm	c ( <b>12</b> ) mol dm <sup>-3</sup>
1	49,05	$1,90 \times 10^{-7}$
2	95,57	$3,78 \times 10^{-7}$
3	142,36	$5,69 \times 10^{-7}$
4	185,87	$7,59 \times 10^{-7}$
5	226,57	$9,48 \times 10^{-7}$
6	270,72	$1,138 \times 10^{-6}$
7	316,76	$1,327 \times 10^{-6}$
8	360,61	$1,516 \times 10^{-6}$
9	402,37	$1,705 \times 10^{-6}$
10	443,97	$1,894 \times 10^{-6}$

U Tablicama 5. i 6. dani su podaci o promjeni intenziteta fluorescencije na maksimumima emisije spojeva **5** i **12** uslijed povećanja koncentracije spojeva .

#### 4.2.4. Fluorimetrijska titracija spojeva 5 i 12 s ct-DNA

Nakon što je u prethodnom poglavlju utvrđeno da postoji koncentracijsko područje u kojem postoji linearna ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji dodanog spoja, u tom su području provedene fluorimetrijske titracije puferskih otopina spojeva **5** i **12** s puferskom otopinom ct-DNA. Na slici 32. prikazane su fluorimetrijske titracije spoja **5** (A) s ct-DNA te ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **5** (B) o koncentraciji dodane ct-DNA na maksimumu emisije 559 nm.



Slika 32. Fluorimetrijska titracija spoja **5** ( $1,12 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s ct-DNA ( $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ )

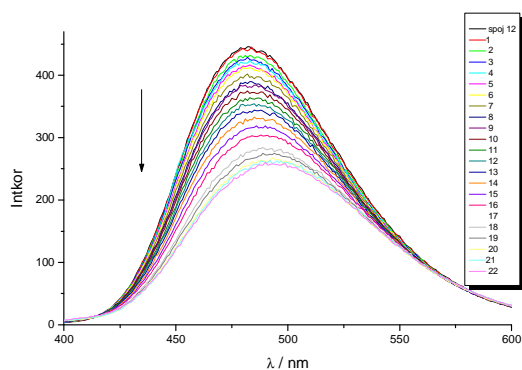
Iz dobivene krivulje fluorimetrijske titracije te prikaza ovisnosti promjene intenziteta fluorescencije, korigiranog za razrjeđenje, na 559 nm o koncentraciji dodane ct-DNA može se zaključiti da dodavanjem ct-DNA u pufersku otopinu spoja **5** dolazi do povećanja intenziteta fluorescencije tj. do hiperkromnog pomaka. U Tablici 7. dani su podaci o promjeni intenziteta fluorescencije na 559 nm.

Tablica 7. Promjena intenziteta fluorescencije spoja 5 na 559 nm uslijed dodavanja ct-DNA

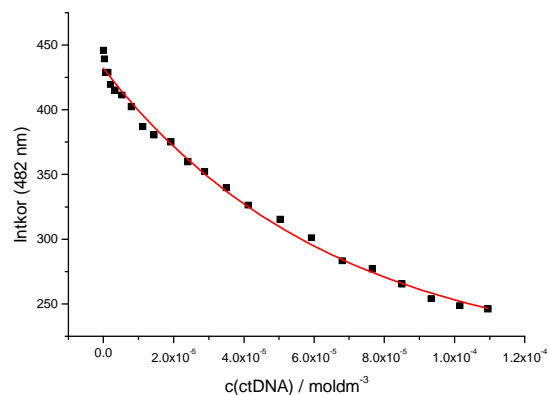
br. spektra	Intkor 559nm	c (ctDNA) mol dm <sup>-3</sup>
0	266,42	0
1	262,12	$6,66 \times 10^{-7}$
2	263,59	$1,332 \times 10^{-6}$
3	265,95	$2,66 \times 10^{-6}$
4	264,12	$3,99 \times 10^{-6}$
5	267,43	$6,64 \times 10^{-6}$
6	275,26	$1,060 \times 10^{-5}$
7	279,36	$1,586 \times 10^{-5}$
8	288,98	$2,240 \times 10^{-5}$
9	294,76	$2,889 \times 10^{-5}$
10	297,96	$3,534 \times 10^{-5}$
11	313,14	$4,494 \times 10^{-5}$
12	318,25	$5,444 \times 10^{-5}$
13	322,09	$6,697 \times 10^{-5}$
14	332,45	$8,240 \times 10^{-5}$
15	343,73	$1,006 \times 10^{-4}$
16	348,18	$1,185 \times 10^{-4}$
17	355,58	$1,418 \times 10^{-4}$
18	368,25	$1,701 \times 10^{-4}$
19	371,26	$1,975 \times 10^{-4}$

Na slici 33. prikazane su fluorimetrijske titracije spoja **12** (A) s ct-DNA te ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **12** (B) o koncentraciji dodane ct-DNA na maksimumu emisije 482 nm.

**A**



**B**



Slika 33. Fluorimetrijska titracija spoja **12** ( $1,59 \times 10^{-6} \text{ moldm}^{-3}$ ) s ct-DNA ( $1,0 \times 10^{-3} \text{ moldm}^{-3}$ )

## REZULTATI I RASPRAVA

Iz dobivene krivulje fluorimetrijske titracije te prikaza ovisnosti promjene intenziteta fluorescencije na 482 nm o koncentraciji dodane ct-DNA može se zaključiti da dodavanjem ct-DNA u pufersku otopinu spoja **12** dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije tj. do izrazitog hipokromnog pomaka. U Tablici 6. dani su podaci o promjeni intenziteta fluorescencije na 482 nm.

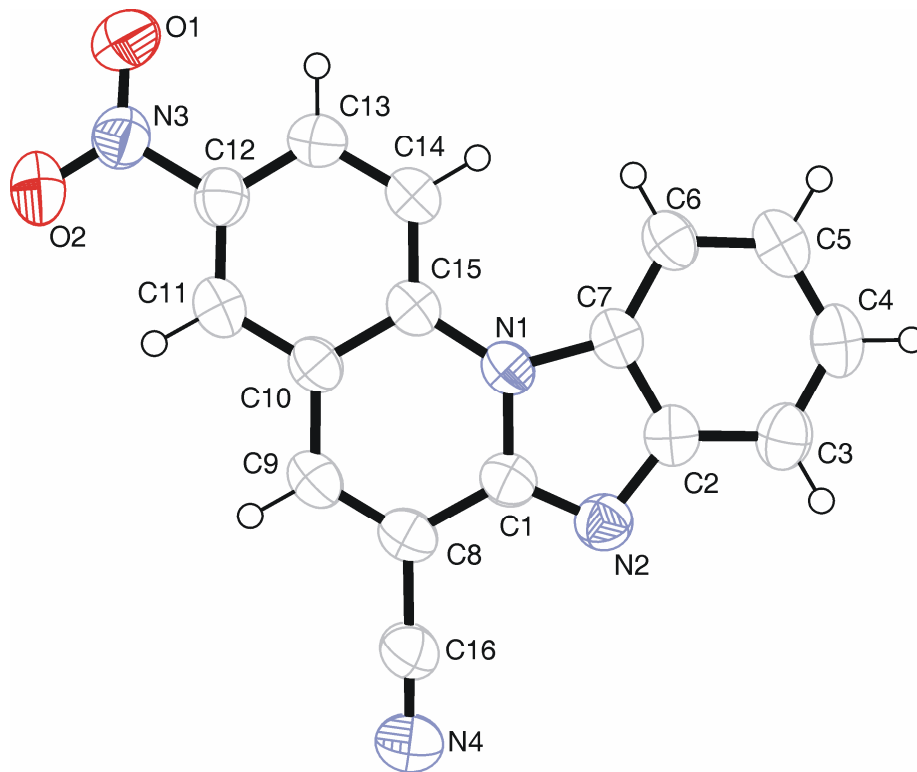
*Tablica 6. Promjena intenziteta fluorescencije spoja **12** na 482 nm uslijed dodavanja ct-DNA*

br. spektra	Intkor 482nm	c (ctDNA) mol dm <sup>-3</sup>
0	445,60	0
1	439,12	3.33×10 <sup>-7</sup>
2	428,62	6.66×10 <sup>-7</sup>
3	428,76	1.33×10 <sup>-6</sup>
4	419,42	1.99×10 <sup>-6</sup>
5	415,11	3.32×10 <sup>-6</sup>
6	411,19	5.30×10 <sup>-6</sup>
7	402,13	7.93×10 <sup>-6</sup>
8	386,84	1.120×10 <sup>-5</sup>
9	380,59	1.445×10 <sup>-5</sup>
10	375,00	1.928×10 <sup>-5</sup>
11	359,71	2.407×10 <sup>-5</sup>
12	352,22	2.880×10 <sup>-5</sup>
13	339,66	3.505×10 <sup>-5</sup>
14	326,23	4.122×10 <sup>-5</sup>
15	315,13	5.032×10 <sup>-5</sup>
16	301,11	5.925×10 <sup>-5</sup>
17	283,20	6.802×10 <sup>-5</sup>
18	276,99	7.662×10 <sup>-5</sup>
19	265,32	8.507×10 <sup>-5</sup>
20	254,16	9.336×10 <sup>-5</sup>
21	248,60	1.015×10 <sup>-4</sup>
22	246,09	1.095×10 <sup>-4</sup>

Iz prethodno navedenih rezultata ispitivanja interakcije spojeva **5** i **12** s ct-DNA fluorimetrijskom spektroskopijom, koji su potencijalni biološki aktivni agensi i kemoterapeutici, možemo zaključiti da postoji određena interakcija i afinitet prema ct-DNA. Spoj **5** pokazuje povećanje fluorescencije dodatkom ct-DNA dok spoj **12** pokazuje uslijed dodatka ct-DNA suprotan efekt, tj. gašenje fluorescencije.

### 4. 3. Kristalna struktura spoja 4

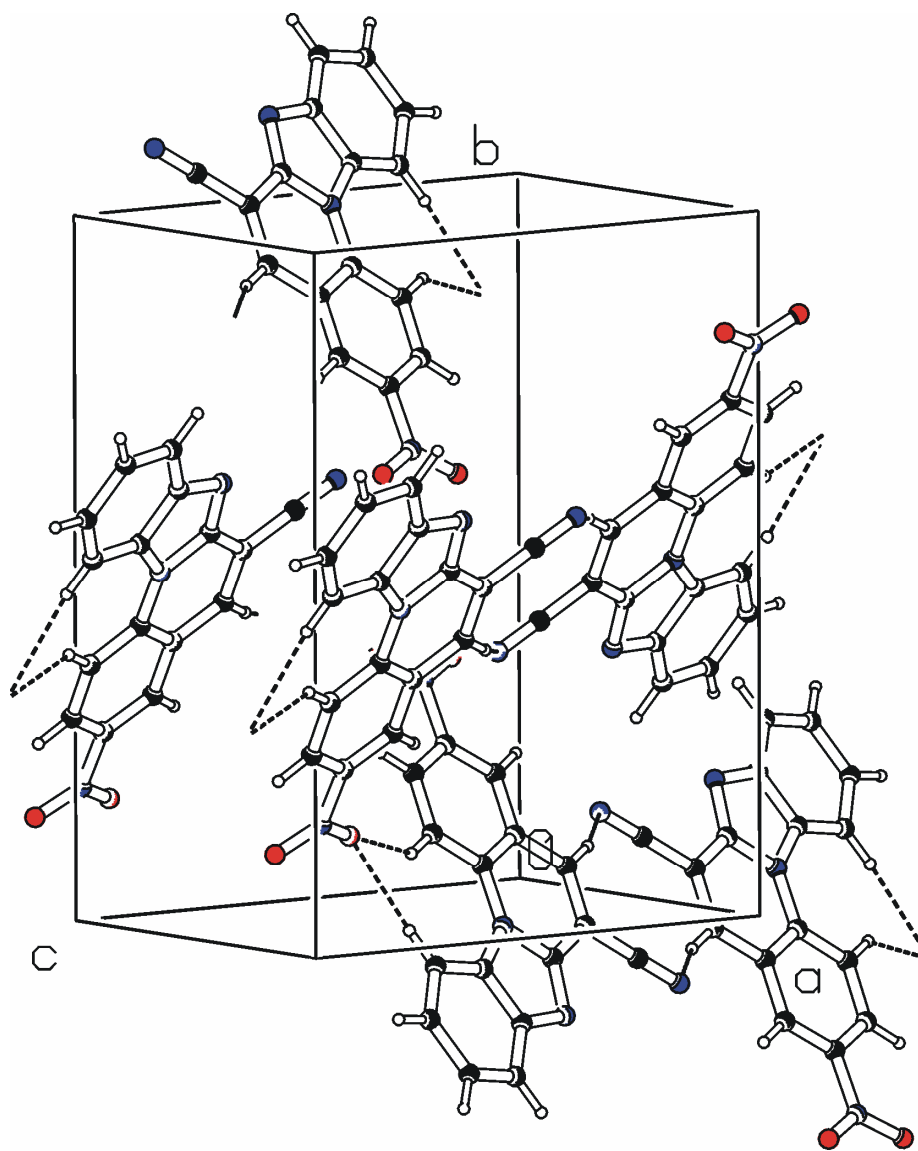
Molekule 3-nitro-6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina **4** u kristalnom stanju su planarne, što je i očekivano za cikličke benzimidazo[1,2-*a*]kinoline. Duljine veza i kuteva u suglasju su s literaturnim vrijednostima.



Slika 34. Molekulska struktura spoja **4**

Kristalna struktura karakterizirana je vodikovim vezama C-H...O i C-H...N vrste. C9-H9 grupa s cijano skupinom druge molekule tvori dimere stvarajući centrosimetrične deseteročlane prstenove (C9-H9...N4<sup>i</sup>;  $i = -x, 1-y, 1-z$ ; 3.424(2) Å;  $\angle$ C9-H9...N4<sup>i</sup> 153°). Istodobno se dimeri povezuju u cik-cak beskonačne lance C-H...O vodikovim vezama: C6-H6...O2<sup>i</sup> ( $i = 1/2+x, 1/2-y, 1/2+z$ ; 3.448(2) Å,  $\angle$ C6-H6...O2<sup>i</sup> 163°) i C14-H14...O2<sup>i</sup> ( $i = 1/2+x, 1/2-y, 1/2+z$ ; 3.295(2) Å,  $\angle$  C14-H14...O2<sup>i</sup> 145°). U tim vodikovim vezama atom O2 djeluje kao dvostruki proton-donor. Na Slici 34. prikazana je molekulska struktura spoja **4**.

Na Slici 35. prikazana je kristalna struktura spoja **4**.



Slika 35. Kristalna struktura spoja **4**. Vodikove veze prikazane su isprekidanim crtama.

## **5. ZAKLJUČCI**



## ZAKLJUČCI

- ❖ U ovom su radu priređeni sljedeći spojevi: 2-(2-benzimidazolil)-3-(2-kloro-5-nitrofenil)akrilonitril **3**, 3-nitro-6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolin **4**, 3-amino-6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolin **5**, *E*-{2-[2-(2-kloro-5-nitrofenil)-etenil]}benzimidazol **9**, 3-nitro-benzimidazo[1,2-*a*]kinolin **10**, 3-amino-benzimidazo[1,2-*a*]kinolin **11**, 3-amino-benzimidazo[1,2-*a*]kinolin hidroklorid **12**.
- ❖ Reakcijama aldolne kondenzacije 2-cijanometilbenzimidazola **2** i odgovarajućeg aromatskog aldehida te kondenzacije 3-(2-kloro-5-nitrofenil)akrilne kiseline **7** s *o*-fenilendiaminom priređeni su spojevi **3** i **9**, glavni aciklički prekursori.
- ❖ Ciklički spojevi **4** i **10** priređeni su fotokemijski, osvjetljavanjem etanolne otopine acikličkih spojeva **3** i **9** UV lampom od 400 W te termički, zagrijavanjem acikličkih spojeva **3** i **9** u sulfolanu.
- ❖ Redukcijom s kositar-kloridom dihidratom priređeni su amino supstituirani spojevi **5** i **11** koji je preveden u hidrokloridnu sol **12**.
- ❖ Svim novopriređenim spojevima struktura je potvrđena korištenjem  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR, UV/Vis spektroskopijom te IR-om.
- ❖ Spojevima **5** i **12**, kao potencijalnim biološki aktivnim spojevima, ispitana je interakcija s ct-DNA korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije te su oba spoja pokazala značajnu interakciju s ct-DNA no za utvrđivanje konkretnog načina interakcije potrebno je provesti dodatna ispitivanja.
- ❖ Spoj **5** pokazuje uslijed fluorimetrijske titracije s ct-DNA povećanje intenziteta fluorescencije, tj. hiperkromni pomak pa postoji mogućnost njegove potencijalne primjene kao biomarkera u detekciji nukleinskih kiselina u biomedicini.
- ❖ Spoju **4** struktura je potvrđena rendgenskom kristalnom analizom.

## **6. ZAHVALA**

**Zahvaljujem prof. dr. sc. Grace Karminski-Zamola, voditeljici projekta „Novi heterocikli kao antitumorski i antivirusni (pametni) lijekovi“ (broj 125-0982464-1356 financiranim od MZOŠ-a) u sklopu kojeg je napravljen ovaj rad kao i na savjetima koje mi je pružila tijekom izrade ovog rada.**

**Zahvaljujem doc. dr. sc. Marijani Hranjec, mentorici, na predloženoj temi kao i savjetima i pomoći koju mi je pružila tijekom izrade i pisanja ovog rada.**

**Hvala prof.dr. sc. Gordani Pavlović s Tekstilno-tehnološkog fakulteta na određivanju kristalne strukture spoja.**

**Zahvaljujem također i svim članovima Zavoda za organsku kemiju, Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije na ugodnom radnom okruženju.**

## **7. LITERATURA**

## LITERATURA

1. V. Martinez, V. Burgos, J. Alvarez-Builla, G. Fernandez, A. Domingo, R. Garcia-Nieto, F. Gago, I. Manzanares, C. Cuevas, J. J. Vaquero; *J. Med. Chem.* **47** (2004) 1136-1148.
2. A. R. Katritzky, D. Tymoshenko, D. Monteux, V. Vvedensky, G. Nikonov, C. B. Cooper, M. Deshpande; *J. Org. Chem.* **65** (2000) 8059-8062.
3. S. A. M. El-Hawash, E. Badawey, T. Kappe; *Pharmazie* **54** (1999) 341-346.
4. S. Demirayak, U. Abu Mohsen, A. Cagri Karaburun; *Eur. J. Med. Chem.* **37** (2002) 255-260.
5. D. Kumar, M. R. Jacob, M. B. Reynolds, S. M. Kerwin; *Bioorg. Med. Chem.* **10** (2002) 3997-4004.
6. Y. He, J. Yang, W. Baogen, L. Risen, E. E. Swayze; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14** (2004) 1217-1220.
7. M. A. Ismail, R. Brun, T. Wenzler, F. A. Tanious, W. D. Wilson, D. W. Boykin; *Bioorg. Med. Chem.* **12** (2004) 5405-5413.
8. M. L. Morningstar, T. Roth, D. W. Farnsworth, M. K. Smith, K. Watson, R. W. Buckheit, K. Das, W. Zhang, E. Arnold, J. G. Julias, S. H. Hughes, C. J. Michejda; *J. Med. Chem.* **50** (2007) 4003-4015.
9. Y. F. Li, G. F. Wang, Y. Luo, W. G. Huang, W. T. Chun-Lan Feng, L. P. Shi, Y. D. Ren, J. P. Zuo, W. Lu; *Eur. J. Med. Chem.* **42** (2007) 1358-1364.
10. K. Starčević, M. Kralj, K. Ester, I. Sabol, M. Grce, K. Pavelić, G. Karminski-Zamola; *Bioorg. Med. Chem.* **15** (2008) 4419-4426
11. H. Hoang, D. V. LaBarbera, K. A. Mohammed, C. M. Ireland, E. B. Skibo; *J. Med. Chem.* **50** (2007) 4561-4571
12. G. Cooper i W. J. Irwin, *J. Chem. Soc. Perkin I* (1975) 75-80.
13. G. Morgan i J. Stewart, *J. Chem. Soc.* (1938) 1295.
14. a) P. E. Vivas-Mejía et al, *Mol. Cell. Biochem.* **177** (1997) 69-77; b) A. A. Alegria, O. Cox, V. Santiago, M. Colon, Z. Reyes, L. Zayas, L. A. Rivera i J. A. Dumas, *Free Radical Biology & Medicine* **15** (1993) 49-56.
15. a) A. E. Alegria et al, *Toxicology* **199** (2004) 87-96; b) O. Cox i J. A. Prieto, *Magnetic Resonance in Chemistry*, **27** (1989) 1094-1097.
16. M. Hranjec, M. Kralj, I. Piantanida, M. Sedić, L. Šuman, K. Pavelić and G. Karminski-Zamola; *J. Med. Chem.* **50** (2007) 5696-5711
17. M. Hranjec, M. Kralj, I. Piantanida, L. Šuman, K. Pavelić and G. Karminski-Zamola; *J. Med. Chem.* **51** (2008) 4899-4910.

## LITERATURA

18. a) D. Guenther, US Patent, US 4,124,589 (1978); b) D. Guenther, US Patent, US 4,219,651 (1980).
19. V. U. Shenoy i S. Sesardi, *Dyes&Pigments* **11** (1989) 137-145.
20. M. Hranjec i G. Karminski-Zamola, *Molecules* **12** (2007) 1817-1828.
21. H. W. Zimmermann, *Angewandte Chemie* **25** (1986) 115-196.
22. J. B. Chaires, *Current Opinion in Structural biology* **8** (1998) 314-320.
23. L. S. Lerman, *J. Mol. Biol.* **3** (1961) 18-30.
24. a) G. Dougherty i J. R. Pilbrow, *Int. J. Biochem.* **16**(1984)1179-92; b) E. C. Long i J. K. Barton, *Acc. Chem. Res.* **23**(1990) 273-279.
25. a) W. D. Wilson, L. Ratmeyer, M. Zhao i D. W. Boykin, *Biochemistry* **32** (1993) 4098-4104; b) I. Piantanida, B. S. Palm, P. Ćudić, M. Žinić i H. J. Schneider, *Tet. Lett.* **42** (2001) 6779-6783.
26. J. B. LePecq i C. Paoletti, *J. Mol. Biol.* **27** (1967) 87-106.
27. a) E. C. Long i J. K. Barton, *Acc. Chem. Res.* **23** (1990) 273-279; b) B. Schneider, S. L. Ginell i H. M. Berman, *Biophys. J. V.* **63** (1992) 1572.
28. a) S. F. Yen, E. J. Gabbay i W. D. Wilson, *Biochemistry* **21** (1982) 2070; b) F. A. Tanious, S. F. Yen i W. D. Wilson, *Biochemistry* **30** (1991) 1813.
29. T. C. Jenkins, *Curr. Med. Chem.* **7** (2000) 99-115.
30. a) P. Karlovsky i A. W. De Cock, *Anal. Biochem.* **194** (1991) 192-197;  
b) A. Abu- Daya, P. M. Brown i K. R. Fox, *Nucleic Acid Res.* **23** (1995) 3385-3392; c) S. Murata, J. Kusba, G. Piszczek, I. Gryczynski i J. Lakowicz, *Biopolymers* **57** (2000) 306-315.
31. J. Buechi, H. Zwicky i A. Aebi, *Archiv der Pharmazie* **8** (1960) 759-767.
32. N. I. Ganushchak, A. I. Lesyuk, I. S. Fedorovich, N. D. Obushak i V. N. Andrushenko, *Russ. J. Org. Chem.* **39** (2003) 1295-1300.

## **8. SAŽETAK**

*Nataša Perin*

**SINTEZA I SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA INTERAKCIJE S ct-DNA  
NOVIH AMINO-BENZIMIDAZO[1,2-*a*]KINOLINA**

U okviru ovog rada, kao nastavka našeg kontinuiranog istraživanja na području medicinske kemije, sintetizirani su novi nitro- i amino-supstituirani derivati benzimidazola i benzimidazo[1,2-*a*]kinolina kao potencijalni biološki aktivni agensi. Za pripravu željenih spojeva korištene su klasične reakcije organske i fotokemijske sinteze. Strukture novopriređenih spojeva potvrđene su korištenjem NMR, IR, UV i fluorimetrijske spektroskopije a spoju 4 struktura je potvrđena i rendgenskom strukturnom analizom. Ispitana je interakcija cikličkih amino-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina s ct-DNA UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom te se na temelju dobivenih rezultata može zaključiti da spojevi pokazuju značajnu interakciju s DNA. Jedan od ispitanih spojeva pokazuje porast fluorescencije dodatkom otopine ct-DNA pa postoji mogućnost potencijalne primjene u biomedicini za detekciju nukleinskih kiselina. U nastavku se predviđa određivanje njihove antitumorske aktivnosti *in vitro* na seriju humanih staničnih linija karcinoma.

Ključne riječi: benzimidazoli, benzimidazo[1,2-*a*]kinolini, spektroskopija,  
interakcija s ct-DNA



## **9. SUMMARY**

*Nataša Perin*

**SYNTHESIS AND SPECTROSCOPIC CHARACTERIZATION OF INTERACTION  
WITH ct-DNA OF NOVEL AMINO-BENZIMIDAZO[1,2-*a*]QUINOLINES**

As a part of our continuing research in the field of medicinal chemistry, this work presents synthesis of novel nitro- and amino substituted benzimidazole and benzimidazo[1,2-*a*]quinoline derivatives as a potential biological active agents. For the preparation of targeted compounds, classical reactions of organic chemistry and photochemistry were used. Structures of prepared compounds were confirmed by means of NMR, IR, UV and fluorimetric spectroscopy while structure of compound 4 was confirmed also by crystal structure determination. Interaction of cyclic amino-benzimidazo[1,2-*a*]quinolines with ct-DNA was studied by UV/Vis and fluorimetric spectroscopy and from obtained results we can conclude that these compounds showed strong interaction with ct-DNA. One of the examined compounds showed an increase of fluorescence intensity during the titration with ct-DNA and thus has a possible application as a fluorescent probe for nucleic acid detection in biomedicine. The antitumor activity *in vitro* on several human carcinoma cell lines will also be examined.

Key words: benzimidazoles, benzimidazo[1,2-*a*]quinolines, spectroscopy,  
interaction with ct-DNA

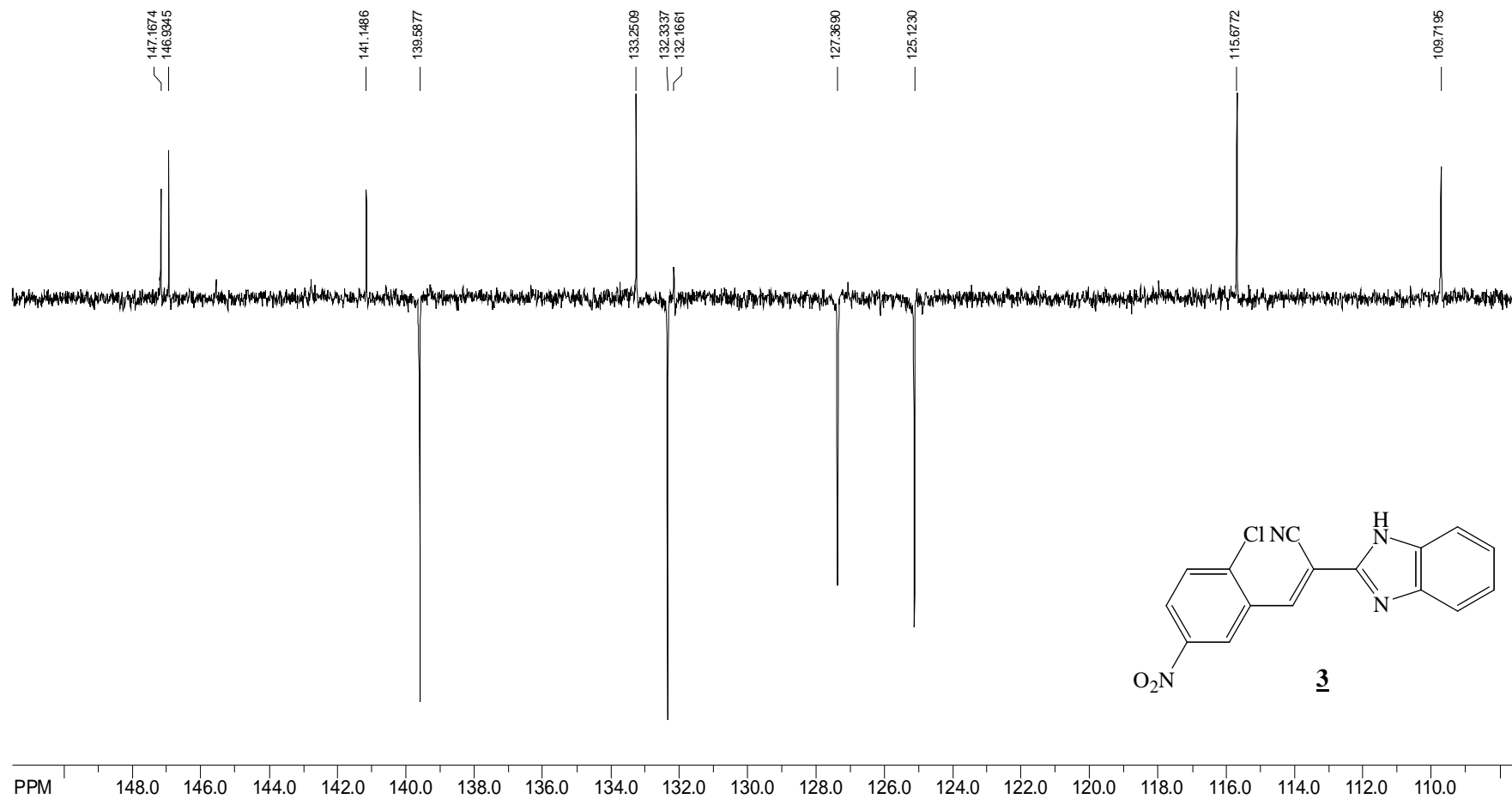
## **10. ŽIVOTOPIS**

## ŽIVOTOPIS

**Nataša Perin** rođena je 11. svibnja 1985. godine u Karlovcu. Osnovnu školu pohađala je u Krašiću, a opću gimnaziju u Srednjoj školi Jastrebarsko gdje je 2004. godine maturirala s odličnim uspjehom. Tijekom osnovne i srednje škole sudjelovala je na brojnim općinskim i županijskim natjecanjima gdje je postizala zapažene rezultate. 2004. godine upisala je Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije. Na 4. godini studija opredjelila se za smjer Procesi i proizvodi, modul Organski procesi i proizvodi, te se uključila u znanstveno-istraživački rad u Zavodu za organsku kemiju istog fakulteta na projektu „Novi heterocikli kao antitumorski i antivirusni (pametni) lijekovi“ (broj 125-0982464-1356 financiranim od MZOŠ-a) voditeljice prof. dr. sc. Grace Karminski-Zamola.. Tijekom studija je također bila demonstrator na vježbama iz Fizikalne kemije. 2006. godine je dobila „Nagradu za najboljeg studenta 2. godine studija“. Od 2008. godine prima Državnu stipendiju Republike Hrvatske. Do sada je položila sve ispite osim jednog ispita iz VII. semestra s prosjekom ocjena 4,73. Sudjelovala je na XII. Ružičkinim danima održanim u Vukovaru od 18-19. 09. 2008. s priopćenjem na posteru pod nazivom „Ciklički derivati benzimidazola i imidazo[4, 5-*b*]piridina”.

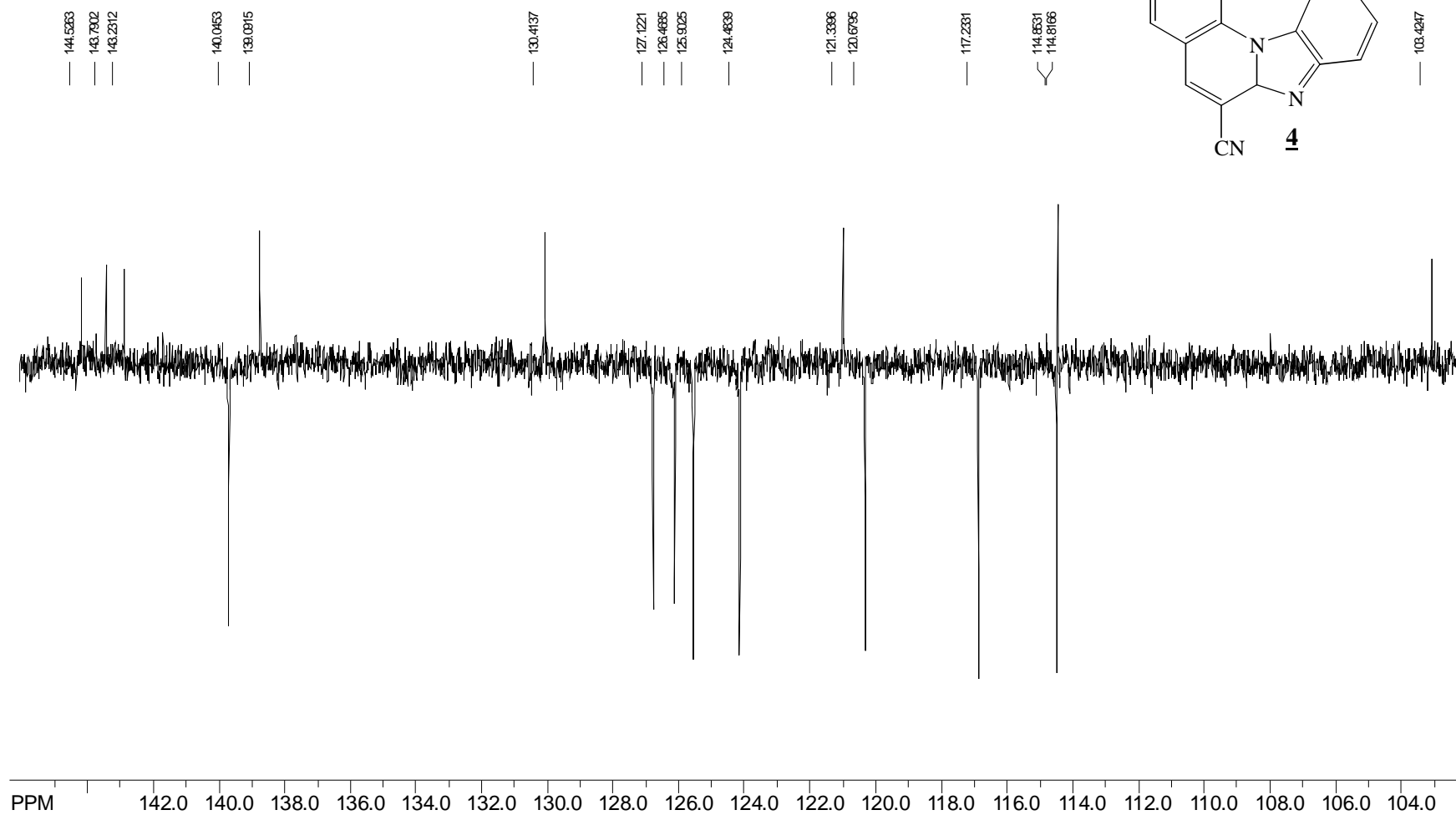
## **11. PRILOZI**

PRILOZI



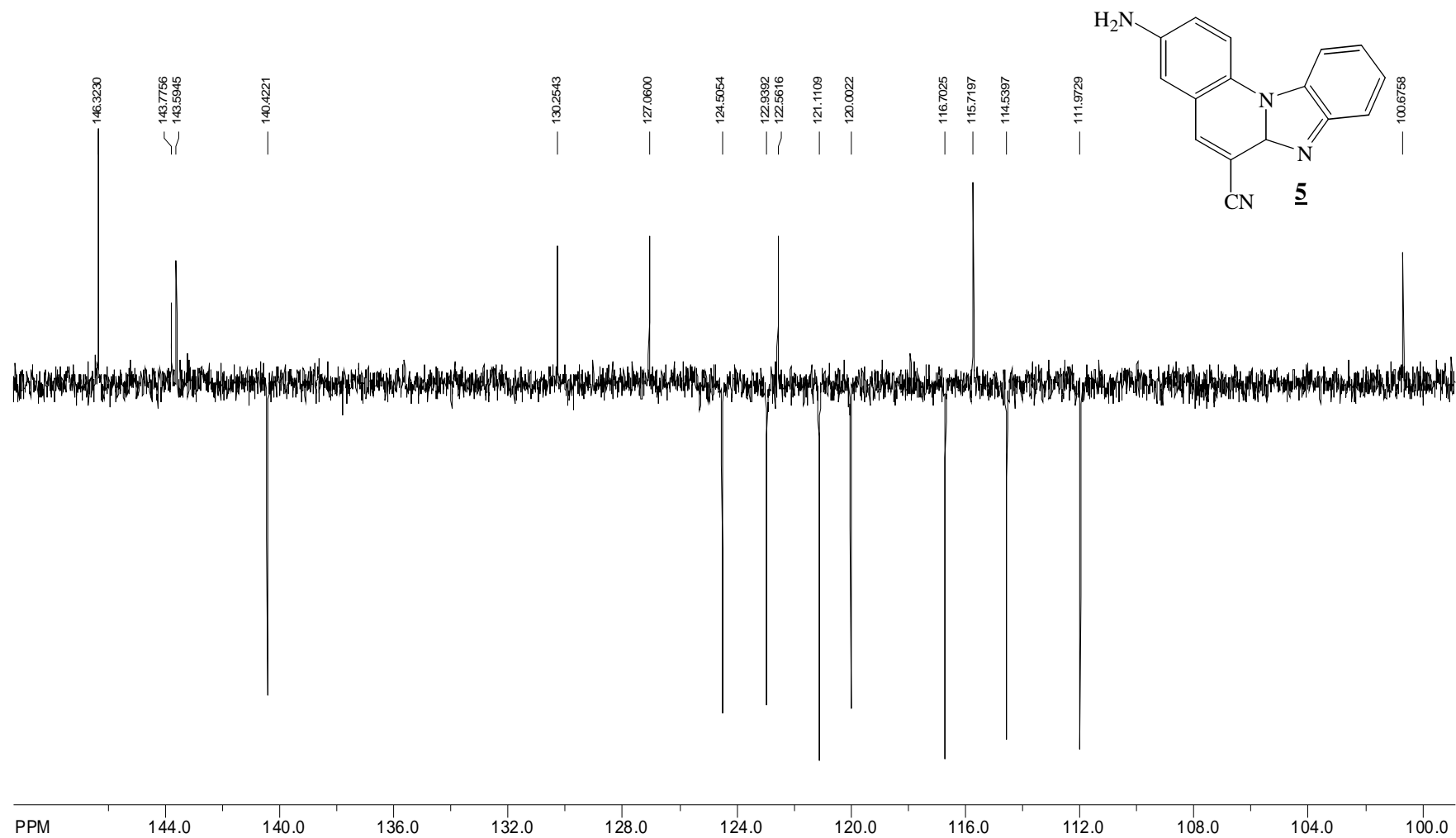
Prilog 1.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar 2-(2-benzimidazolil)-3-(2-kloro-5-nitrofenil)akrilonitrila **3**

PRILOZI



Prilog 2.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar 3-nitro-6-cijano-benzimidazo[1,2-a]kinolina **4**

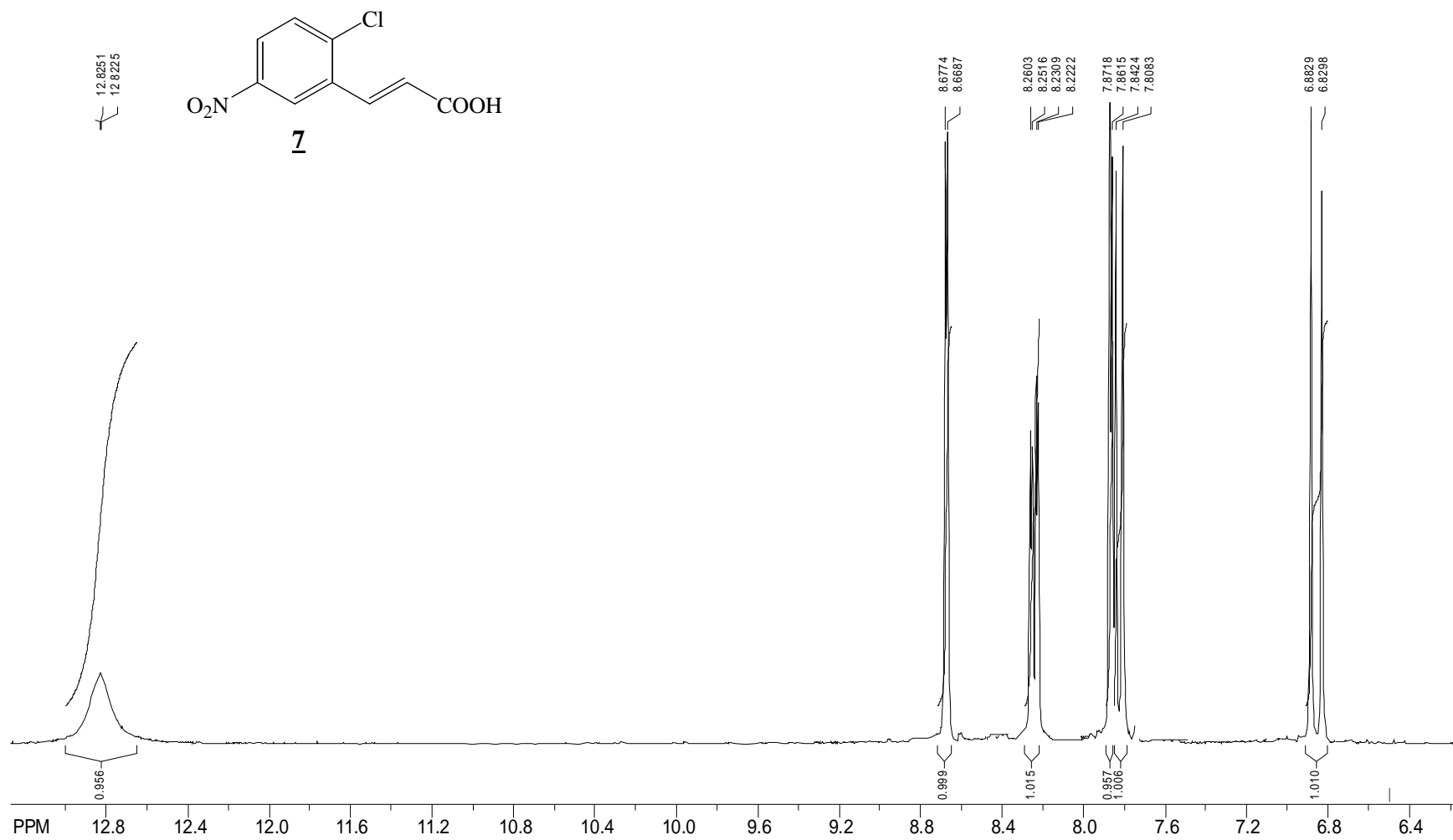
PRILOZI



Prilog 3.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar 3-amino-6-cijano-benzimidazo[1,2-a]kinolina 5



PRILOZI



Prilog 4. <sup>1</sup>H NMR spektar 3-(2-kloro-5-nitrofenil)akrilna kiseline **7**