Sinteza i kemijska modifikacija derivata 2-(3-nitrobenzilidena) amino-1H-benzimidazola i njihova antibakterijska aktivnost

Kvesić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:187450

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO–TEHNOLOŠKI FAKULTET

SINTEZA I KEMIJSKA MODIFIKACIJA DERIVATA 2-(3-NITROBENZILIDENA)AMINO-1*H*-BENZIMIDAZOLA I NJIHOVA ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST

DIPLOMSKI RAD

MARIJA KVESIĆ

Matični broj: 84

Split, listopad 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO–TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJA
ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

SINTEZA I KEMIJSKA MODIFIKACIJA DERIVATA 2-(3-NITROBENZILIDENA)AMINO-1*H*-BENZIMIDAZOLA I NJIHOVA ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST

DIPLOMSKI RAD

MARIJA KVESIĆ

Matični broj: 84

Split, listopad 2018.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

SYNTHESIS AND CHEMICAL MODIFICATION OF 2-(3-NITROBENZYLIDENE)AMINO-1*H*-BENZIMIDAZOLE DERIVATIVES AND THEIR ANTIBACTERIAL ACTIVITY

DIPLOMA THESIS

MARIJA KVESIĆ

Parent number: 84

Split, October 2018

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij Kemija, smjer Organska kemija i biokemija
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta
Mentor: Izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević
Pomoć pri izradi: Mag.chem. Azra Đulović

SINTEZA I KEMIJSKA MODIFIKACIJA DERIVATA 2-(3-NITROBENZILIDENA)AMINO-1*H*-BENZIMIDAZOLA I NJIHOVA ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST

Marija Kvesić 84

Sažetak: 2-Amino-1*H*-benzimidazol zahvaljući svom širokom spektru biološke aktivnosti prema različitim oboljenjima, dio je strukture velikog broja lijekova (Bezitramid, Dibazol, Mebendazol…). Iako je nekoliko metoda sinteze 2-amino-1*H*-benzimidazola već poznato, pronalazak novih metoda sinteze bio bi od velike važnosti za otkriće novih lijekova. Obzirom da je navedeni spoj potencijalno dobar kemoterapeutik, zanimljiv je i za organsku i medicinsku kemiju. Kondezacijom Schiffove baze s odabranim sekundarnim i primarnim aminima, nitrilima i diketonima, koji u svojoj strukturi sadrže aktivne metilenske skupine, dobiveni su različiti derivati spoja 2-(3-nitrobenziliden)amino-1*H*-benzimidazola.

U svrhu praćenja sinteze korištena je tankoslojna kromatografija (TLC). Sintetizirani spojevi potvrđeni su ^{1}H NMR i IR spektroskopijom kao i elementnom analizom. Svi dobiveni spojevi podvrgnuti su daljnjim ispitivanjima antibakterijske aktivnosti na Gram-pozitivni bakterijski soj (*Staphylococcus aureus*) i Gram-negativne bakterijske sojeve (*Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*). Dobiveni rezultati bioloških testova omogućit će određivanje odnosa između strukture i biološke aktivnosti (SAR).

Ključne riječi: 2-(3-nitrobenziliden)amino-1*H*-benzimidazol i njegovi derivati, ^{1}H NMR, IR, elementna analiza, biološka aktivnost

Rad sadrži: 60 stranica, 24 slike, 11 tablica, 20 priloga, 13 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić - predsjednica
2. Doc. dr. sc. Franko Burčul - član
3. Izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević – član-mentor

Datum obrane: 11.10.2018.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Graduate study of Chemistry
Scientific area: Natural Sciences
Scientific field: Chemistry
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 3
Mentor: Ivica Blažević, PhD, associate professor
Tehnical assistance: Mag. chem. Azra Đulović,

SYNTHESIS AND CHEMICAL MODIFICATION OF 2-(3-NITROBENZYLIDENE)AMINO-1*H*-BENZIMIDAZOLE DERIVATIVES AND THEIR ANTIBACTERIAL ACTIVITY

Marija Kvesić 84

Abstract: 2-Amino-1*H*-benzimidazole thanks to its wide range of biological activity against various illnesses is part of the structure of a large number of drugs (Bezitramid, Dibazol, Mebendazol ...). Although several methods of synthesis of 2-amino-1*H*-benzimidazole are already known, finding of new synthetic methods would be of great importance for the discovery of new drugs. Considering that mentioned compound has potentially good chemotherapeutic characteristics, it is interesting to organic and medical chemistry. By condensing the Schiff base with the selected secondary and primary amines, nitriles and diketones, which contain active methylene groups in its structure, various derivatives of 2- (3-nitrobenzylidene) amino-1*H*-benzimidazole are obtained.

Thin layer chromatography (TLC) was used to monitor the synthesis. The synthesized compounds were confirmed by ^{1}H NMR and IR spectroscopy as well as elemental analysis. All the obtained compounds are tested for the antibacterial activity on Gram positive bacterial strain (*Staphylococcus aureus*) and Gram negative bacterial strains (*Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*). The obtained biological test results will allow the determination of the relationship between structure and biological activity (SAR).

Keywords: 2- (3-nitrobenzylidene) amino-1*H*-benzimidazole and its derivatives, ^{1}H NMR, IR, elemental analysis, biological activity

Thesis contains: 60 pages, 24 figures, 11 tables, 20 supplement, 13 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ani Radonić, PhD, associate professor – chair person
2. Franko Burčul, PhD, assistant professor- member
3. Ivica Blažević, PhD, associate professor – supervisor

Defence date: 11.10.2018.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35

Diplomski rad je izrađen na Odjelu za Tehnologiju lijekova Farmaceutskog fakulteta na Medicinskom Sveučilištu u Wroclawu, Poljska, pod vodstvom dr. sc. Anne Nowicke i mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivice Blaževića u razdoblju od veljače do svibnja 2018. godine.

Zahvaljujem se dr. sc. Anni Nowickoj koja me prihvatila kao svoju studenticu i omogućila mi izvođenje eksperimentalnog dijela diplomskog rada na Odjelu za Tehnologiju lijekova Farmaceutskog fakulteta na Medicinskom Sveučilištu u Wroclawu.

Zahvaljujem se svom mentoru izv. prof. dr. sc. Ivici Blaževiću koji mi je pomogao svojim savjetima pri izradi ovog diplomskog rada i što je uvijek imao vremena i strpljenja za moje upite. Također, zahvalu dugujem i asistentici mag. chem. Azri Đulović na velikodušnoj pomoći.

Zahvaljujem se svim svojim prijateljima, koji su uvijek bili uz mene i bez kojih cijeli ovaj tijek studiranja ne bi bio tako zabavan. Tomo hvala što si bio uz mene kroz cijelo moje studiranje.

Posebnu zahvalnost iskazujem cijeloj svojoj obitelji na razumijevanju i bezuvijetnoj ljubavi pruženoj tijekom cijelog mog školovanja i života.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

1. Sintetizirati 2-(3-nitrobenziliden)amino-1*H*-benzimidazol reakcijama klasične i mikrovalne organske sinteze u etanolu
2. Sintetizirati derivate 2-(3-nitrobenziliden)amino-1*H*-benzimidazola reakcijama klasične organske sinteze
3. Potvrditi sintetizirane spojeve ^{1}H NMR, IR i elementnom analizom
4. Ispitati antibakterijsku aktivnost dobivenih spojeva

SAŽETAK

2-Amino-1*H*-benzimidazol zahvaljući svom širokom spektru biološke aktivnosti prema različitim oboljenjima, dio je strukture velikog broja lijekova (Bezitramid, Dibazol, Mebendazol…). Iako je nekoliko metoda sinteze 2-amino-1*H*-benzimidazola već poznato, pronalazak novih metoda sinteze bio bi od velike važnosti za otkriće novih lijekova. Obzirom da je navedeni spoj potencijalno dobar kemoterapeutik, zanimljiv je i za organsku i medicinsku kemiju.

Kondezacijom Schiffove baze s odabranim sekundarnim i primarnim aminima, nitrilima i diketonima, koji u svojoj strukturi sadrže aktivne metilenske skupine, dobiveni su različiti derivati spoja 2-(3-nitrobenziliden)amino-1*H*-benzimidazola.

U svrhu praćenja sinteze korištena je tankoslojna kromatografija (TLC). Sintetizirani spojevi potvrđeni su ^{1}H NMR i IR spektroskopijom kao i elementnom analizom.

Svi dobiveni spojevi podvrgnuti su daljnjim ispitivanjima antibakterijske aktivnosti na Gram-pozitivni bakterijski soj (*Staphylococcus aureus, ATCC 29213*) i Gram-negativne bakterijske sojeve (*Escherichia coli, ATCC 25922* i *Pseudomonas aeruginosa, ATCC 27852*). Dobiveni rezultati bioloških testova omogućit će određivanje odnosa između strukture i biološke aktivnosti (SAR).

Ključne riječi: 2-(3-nitrobenziliden)amino-1*H*-benzimidazol i njegovi derivati, ^{1}H NMR, IR, elementna analiza, biološka aktivnost

SUMMARY

2-Amino-1*H*-benzimidazole thanks to its wide range of biological activity against various illnesses is part of the structure of a large number of drugs (Bezitramid, Dibazol, Mebendazol ...). Although several methods of synthesis of 2-amino-1*H*-benzimidazole are already known, finding of new synthetic methods would be of great importance for the discovery of new drugs. Considering that mentioned compound has potentially good chemotherapeutic characteristics, it is interesting to organic and medical chemistry.

By condensing the Schiff base with the selected secondary and primary amines, nitriles and diketones, which contain active methylene groups in its structure, various derivatives of 2- (3-nitrobenzylidene) amino-1*H*-benzimidazole are obtained.

Thin layer chromatography (TLC) was used to monitor the synthesis. The synthesized compounds were confirmed by ^{1}H NMR and IR spectroscopy as well as elemental analysis.

All the obtained compounds are tested for the antibacterial activity on Gram positive bacterial strain (*Staphylococcus aureus, ATCC 29213*) and Gram negative bacterial strains (*Escherichia coli, ATCC 25922* i *Pseudomonas aeruginosa, ATCC 27852*). The obtained biological test results will allow the determination of the relationship between structure and biological activity (SAR).

Keywords: 2- (3-nitrobenzylidene) amino-1H-benzimidazole and its derivatives, ^{1}H NMR, IR, elemental analysis, biological activity

Sadržaj

UVOD 1

1. OPĆI DIO 2

1.1. Opće sinteze odabranih spojeva 2

1.1.1. Sinteza 2-amino-1*H*-benzimidazol-a 2

1.1.2. Sinteza Schiffove baze 2

1.1.3. Sinteza Mannichovih baza 3

1.2. Mikrovalna sinteza 3

1.3. Biološka aktivnost 4

1.4. Tehnike identifikacije 6

1.4.1. Određivanje strukture spektroskopskim metodama 7

1.4.2. Tankoslojna kromatografija 8

2. EKSPERIMENTALNI DIO 10

2.1. Korišteni tehnike i reagensi 10

2.2. Opća shema rada 11

2.3. Antibakterijska aktivnosti 31

3. RASPRAVA 33

3.1. Sinteza i spektroskopska analiza 33

3.2. Antibakterijska aktivnost sintetiziranih spojeva 49

4. ZAKLJUČAK 52

5. LITERATURA 53

6. PRILOZI 55

UVOD

Tvari s potencijalnom biološkom aktivnošću, okarakterizirane s visokom učinkovitosti i specifičnosti, te niskim udjelom nuspojava još su u razvoju. Potraga za novim terapeutskim lijekovima se temelji na modifikaciji već poznate strukture, sintezi novih spojeva i u pronalasku novih mehanizama djelovanja potencijalnih lijekova.

Postoji cca 50 derivata 2-amino-1*H*-benzimidazola registriranih u svijetu kao lijekovi s antikancerogenim, antifungalnim, antiviralnim i antihistaminskim svojstvima. Neke kemijske komponente koje u sebi sadrže 2-amino-1*H*-benzimidazol inhibiraju neurodegeneraciju i u budućnosti bi mogli pomoći u liječenju Parkinsonove i Alzheimerove bolesti. Derivati 2-amino-1*H*-benzimidazola nemaju samo medicinsko značenje, već i antikorozivno i antifungalno, a neki se učestalo koriste kao ligandi u koordinacijskoj kemiji.

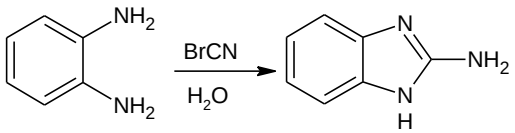
Pregledom literature uočene su različite biološke i farmakološke aktivnosti derivata 2-amino-1*H*-benzimidazola, što je bio jedan od osnovnih razloga nastavka istraživanja ove klase spojeva.

1. OPĆI DIO

1.1. Opće sinteze odabranih spojeva

1.1.1. Sinteza 2-amino-1*H*-benzimidazol-a

Prvi benzimidazol, kojeg je sintetizirao Hoecker, 2,5-dimetilbenzimidazol dobiven je redukcijom i dehidratacijom 2-nitro-4-metilacetanilida. Gotovo sve sinteze benzimidazola započinju s derivatima benzena koji u svojoj strukturi sadrže skupine s dušikom u *orto*-položaju. Najpopularnija metoda sinteze 2-amino-1*H*-benzimidazola je pomoću 2-supstituiranog anilina i različitih ciklizirajućih agensa u svrhu dobivanja produkta. Razlog je vrlo dobro iskorištenje reakcije, čak 70-80 %. *o*-Fenilendiamin reagira s bromovim cijanidom dajući 2-amino-1*H*-benzimidazol (Shema 1.).



Shema 1. Sinteza 2-amino-1H-benzimidazola

Reakcija se odvija u vodenom mediju u jednoj tikvici što je po načelima ″zelene kemije″.

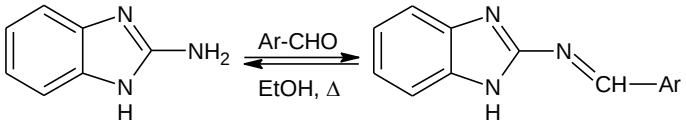
Kondezacija *o*-fenildiamina i njegovih derivata s određenim karboksilnim kiselinama, aldehidima, kiselim anhidridima, esterima i drugim različitim grupama također mogu dovesti do sinteze spoja 2-amino-1*H*-benzimidazola.

Hidrogenacija *o*-cijanaminonitrobenzena i oksidacija supstituirane tiouree još su neki od načina dobivanja 2-amino-1*H*-benzimidazola.[1]

1.1.2. Sinteza Schiffove baze

Schiffove baze u svojoj strukturi sadrže dvostruku vezu između atoma dušika i ugljika (C = N). Riječ je o kromofornoj skupini koja je odgovorna za obojenost imina: žuta, narančasta ili crvena boja te time pronalaze svoju primjenu u kolorimetrijskoj analizi. Također, pokazuju sposobnost luminiscencije te imaju bitnu ulogu u odvijanju određenih bioloških procesa u živim organizmima npr. sudjeluju u prijenosu energije u procesu glikacije proteina. Imini ili Schiffove

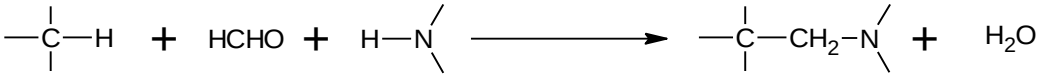
baze, nastaju reakcijom aldehida ili ketona s primarnim aminima. Mehanizam tih reakcija leži u nukleofilnom vezanju amina na karbonilnu skupinu aldehida ili ketona uz uklanjanje molekule vode (Shema 2.).[11]



Shema 2. Sinteza Schiffove baze

1.1.3. Sinteza Mannichovih baza

Mannich-ove reakcije su reakcije kondezacije triju komponenti uključujući komponentu s kiselim vodikom, formaldehid i primarni ili sekundarni amin (Shema 3.). Mannich-ove reakcije jedne su od najvažnijih reakcija organske kemije. Ovaj oblik aminoalkilacije je važan oblik reakcije za sinteze i modifikacije bioloških aktivnih komponenti. Mannich-ove baze sadrže različite heterocikličke sustave i identificirane su kao potencijalni antimikrobni agensi.[13]



Shema 3. Mannich-ova reakcija

1.2. Mikrovalna sinteza

U posljednja tri desetljeća provođenje raznih kemijskih reakcija potpomognutih mikrovalnim (MW) zračenjem vrlo je popularna metoda u kemijskoj sintezi. Danas je sinteza potpomognuta MW zračenjem postala rutinska metoda koja se koristi za provođenje različitih kemijskih reakcija u svim granama kemije. Iako je većina prvih kemijskih reakcija provedena u kućnim mikrovalnim pećnicama, današnji trend podrazumijeva korištenje modernih i sofisticiranih mikrovalnih reaktora. U početcima razvoja mikrovalne sinteze uočene su neke od važnih prednosti mikrovalne sinteze u odnosu na konvencionalnu sintezu, a podrazumijevale su značajno skraćenje vremena kemijskih reakcija (s nekoliko dana ili sati na nekoliko minuta),

veća iskorištenja reakcija, manji broj nusprodukata te veću čistoću izoliranih produkata. U elektromagnetskom spektru područje MW zračenja nalazi se između infracrvenog zračenja i radio frekventnih valova, što odgovara valnim duljinama od 1 cm do 1 m, odnosno frekvencijama između 30 GHz i 300 MHz. Većina zagrijavanja pod utjecajem mikrovalnog zračenja nastaje dipolarnom polarizacijom (rotacija dipola) ili kondukcijskim mehanizmom (ionska vodljivost). Do zagrijavanja dolazi uslijed interakcije komponenti električnog polja MW zračenja i nabijenih dijelova materije koja je podvrgnuta MW zračenju. Fotoni MW zračenja imaju jako nisku energiju koja je nedovoljna za kidanje kemijskih veza u odnosu na energije fotona drugih vrsta zračenja.[2]

1.3. Biološka aktivnost

2-Amino-l*H*-benzimidazol je vodeća struktura mnogih lijekova s različitom farmakološkom aktivnošću. Multifunkcionalnost sustava, nastala zbog prisutnosti cikličke gvanidinske skupine, čini ga kosturom za sintezu različitih derivata s obećavajućom biološkom aktivnošću. Modificiranjem kemijske strukture 2-amino-l*H*-benzimidazola dobiveni su spojevi koji pokazuju, između ostalog, i sljedeća svojstva: antibakterijska, antifungalna, antitumorska, analgetska, antivirusna, antiparazitna, antihistaminska, neuroprotektivna.

- Antibakterijska svojstva

Bakterije su najčešći mikroorganizmi koji mogu činiti dio fiziološke flore. Patogene bakterije, tijekom procesa infekcije, pod utjecajem prisutnosti drugih mikroorganizama ili djelovanja antibakterijskih sredstava često stječu otpornost na upotrijebljene pripravke. Klinički važni sojevi koji ne pokazuju osjetljivost na širok spektar antibiotika su meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus (*MRSA) i vankomicin rezistetni *Enterococcus* (VRE). Otpornost bakterija jedan je od ključnih razloga za traženje novih antibiotika.[3]

Najveću antibakterijsku aktivnost protiv sojeva *Staphylococcus aureus* (*BAA-44*) i *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606) pokazuje 2-amino-5-[(4-pentilfenil)karbamoil]-1*H*-benzimidazol (Slika 1**a**). Ovaj spoj djeluje sinergički s antibiotikom Vankomicinom, povećavajući njegovu aktivnost.[3]

- Antifungalna svojstva

Antibiotici širokog spektra, imunosupresivni lijekovi i lijekovi protiv raka široko su korišteni posljednjih godina. Rezultat je smanjena otpornost pacijenata i povećanje gljivičnih infekcija čija je terapija teška i dugotrajna.[3]

Određeni derivati 2-aminobenzimidazola su testirani na antifungalno djelovanje protiv sojeva *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 24860). Svi spojevi inhibirali su rast kvasaca *in vitro*, a 1-benzil-2-amino-benzimidazol i 1-benzoil-2-aminobenzimidazol pokazali su antifungalnu aktivnost usporedivu s antimikotikom Ketokonazolom i antibiotikom amfotericinom B.[4]

- Antitumorska svojstva

Karakteristične značajke kancerogenog tkiva su njegov invazivni i nekontrolirani rast te mogućnost stvaranja metastaznih žarišta. Većina lijekova protiv raka djeluje na nespecifični način, oštećujući normalno tkivo organizma. Unatoč značajnom napretku u liječenju malignih oboljenja, to je i dalje jedan od glavnih uzroka smrti pacijenata.

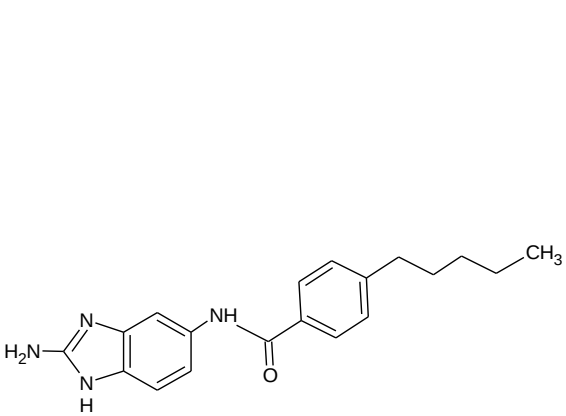
Aurora-kinaze pripadaju obitelji serin-treonin-kinaza. U sisavaca postoje tri oblika: Aurora A odgovorna za kontrolu formiranja vretena i funkcije centrosoma, Aurora B kontrolira segregaciju kromosoma i Aurora C koja je pronađena u stanicama u kojima se događa mejoza te čija funkcija nije razjašnjena. Njihova ekspresija je povećana u mnogim vrstama raka. Korištenje inhibitora Aurora-kinaza dovodi do zaustavljanja podjele stanica karcinoma u G2 fazi, te posljedično uzrokuje staničnu smrt.[5]

Istraživači u San Franciscu pokazali su da spojevi **d-1-d-3** (Slika 1), koji imaju u svojoj strukturi 2-aminobenzimidazol i tieno [3,2-*d*] pirimidinski sustav, snažno inhibiraju aktivnost Aurora kinaze.[6]

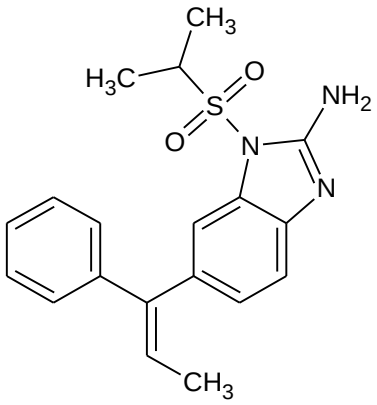
- Antivirusna svojstva

Virusi, nakon infekcije stanica tijela, koriste metaboličke procese domaćina za vlastitu replikaciju. Antivirusni lijekovi, koji utječu na proces razmnožavanja virusa, u određenoj mjeri utječu na stanične procese organizma. Stoga je važno da lijekovi ove skupine imaju selektivni učinak i nisku toksičnost.[3]

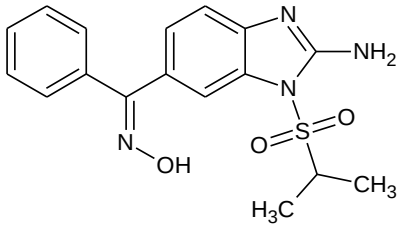
Enviraden (Slika 1**b**) i Zinviroxim (Slika 1**c**) su trenutno korišteni antivirusni lijekovi koji sadrže 2-aminobenzimidazol u svojoj strukturi. Kao antimetaboliti, purinske baze su fosforilirane u inficiranim stanicama i zatim kompetitivno zamjenjuju točne nukleozide u virusnoj DNA. To dovodi do poremećaja replikacije virusnog genetskog materijala.[7]



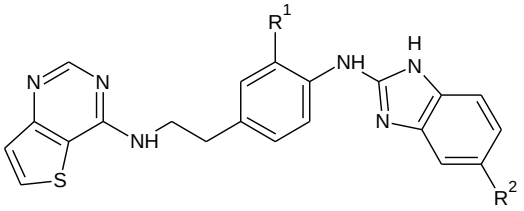
a



b



c



d

	R^1	R^2
d-1	H	H
d-2	H	CF_3
d-3	H	Cl

*Slika 1. Različiti derivati 2-amino-1H-benzimidazola: a) 2-amino-5-[(4-pentilfenil)karbamoil]-1*H*-benzimidazol, b) Enviraden, c) Zinviroxim, d) derivati s tieno [3,2-*d*] pirimidinski sustav*

1.4. Tehnike identifikacije

1.4.1. Određivanje strukture spektroskopskim metodama

Mnoge današnje instrumentne tehnike omogućuju brzu i točnu analizu strukture kemijskih spojeva. Spektroskopija se koristi u mnogim granama prirodnih znanosti jer daje informacije o građi i sastavu tvari. Kao rezultat spektroskopskog istraživanja dobije se spektar.

1.4.1.1. Infracrvena spektroskopija

Infracrvena (IR) spektroskopija instrumentalna je metoda za identifikaciju funkcijskih skupina prisutnih u molekuli. Kada govorimo o IR spektroskopiji, podrazumijevamo područje spektra elektromagnetskog zračenja u rasponu od 2,5-15,0 mm. IR spektar je snimka apsorbiranog svjetla kao funkcija valne duljine. Apsorbira se samo svjetlo čija se frekvencija podudara s frekvencijom vibracija veze u molekuli. Postoje različite vrste vibracija rastezanja i svijanja uzrokovanih apsorpcijom energije infracrvenog spektra.

Spektroskopija, tehnika infracrvenog zračenja, koristi instrument nazvan infracrveni spektrometar radi dobivanja infracrvenog spektra. Koriste se uzorci koji mogu biti u krutom, tekućem ili plinovitom stanju. Infracrveni spektar prikazuje karakteristične vrpce funkcionalnih skupina u točno unaprijed definiranim područjima valnih brojeva, prilikom čega je na apscisi uvijek valni broj (cm^{-1}), a na ordinati transmitancija (%). Iz podataka o valnom broju, na kojem se pojavljuje određena vrpca pri definiranim područjima IR spektra, definira se tip molekule i vrsta veze koja u promatranoj molekuli postoji. Na taj se način, nepoznata molekula, može svrstati u određenu skupinu molekula prema posjedovanju karakterističnih veza/skupina.[8]

1.4.1.2. Nuklearna magnetska rezonancija

Nuklearna magnetska rezonancija (NMR) temelji se na apsorpciji energije jezgre u području radio-valova (10^2-10^5 m). Tipovi jezgara su ^1H i ^{13}C, dakle protoni i jezgre ugljika. ^1H i ^{13}C NMR spektre mjerimo u otapalima bez vodika ili u takvom otapalu gdje je vodik u obliku koji se ne registrira (CCl_4, $CDCl_3$, D_2O, C_6D_6, DMSO-d6). Otapala imaju frekvenciju rezonancije u sasvim drugom području od onog gdje snimamo pikove analita.

Kako bi mogli koristiti iste raspone za instrumente različitih jačina magnetskog polja, kemijski pomak izražava se u ppm jedinicama (to je broj koji ne ovisi o polju). Na taj način, kemijski pomak koji mjeri poziciju signala, bit će isti bez obzira na instrument, što je onda olakšavajuća okolnost kod uspoređivanja spektara. Preračunato, u području od 0-12 ppm registriramo sve vodike, a u intervalu od 0-220 ppm sve ugljike (za iste molekule razmaci su puno veći za ^{13}C nego za ^{1}H jezgru). Zapravo, kemijski pomak jezgre odražava njenu elektronsku okolinu, on je, dakle, funkcija elektronske gustoće oko jezgre.[8]

1.4.1.3. Elementna analiza

Za dokazivanje elemenata koji ulaze u sastav organskog spoja koriste se uobičajene analitičke reakcije, ali je potrebno elemente iz kovalentno građenog organskog spoja prevesti u ionski oblik. Kisik se ne dokazuje direktno u organskim spojevima. Za elementnu analizu danas se koriste elementni analizatori ili CHN analizatori, za brzo određivanje C, H, N, S i O u organskim spojevima. Uzorci se sagorijevaju u struji čistoga kisika uz automatsko mjerenje nastalih plinova sagorijevanja.[9]

1.4.2. Tankoslojna kromatografija

Osnovni princip kromatografskih metoda je razdvajanje sastojaka smjese koja je otopljena u odgovarajućem otapalu, što čini mobilnu fazu. Pokretna faza prelazi preko nepokretne faze te se komponente iz pokretne faze različitio zadržavaju na nepokretnoj fazi (ovisno o karakteristikama komponenata i nepokretne faze). Zbog toga komponente putuju kroz tanki sloj brže ili sporije što u konačnici rezultira odjeljivanjem sastojaka.

Nepokretna (stacionarna) faza tankoslojne kromatografije (TLC) nalazi se u obliku tankog sloja nanesenog na ravnu podlogu od aluminija, stakla ili plastike. Vrsta nepokretne faze ovisi o karakteristikama tvari koja se odjeljuje. Važno je da se otapalo (pokretna ili mobilna faza) slabo veže za nepokretnu fazu. Zato se u slučaju polarne nepokretne faze bira nepolarno otapalo i obrnuto.

Pločica na kojoj je točkasto (ili linijski) nanesen uzorak postavi se u zatvorenu posudu zasićenu parama mobilne faze koja se kroz pločicu diže kapilarnim silama. Dolazi do raspodjele

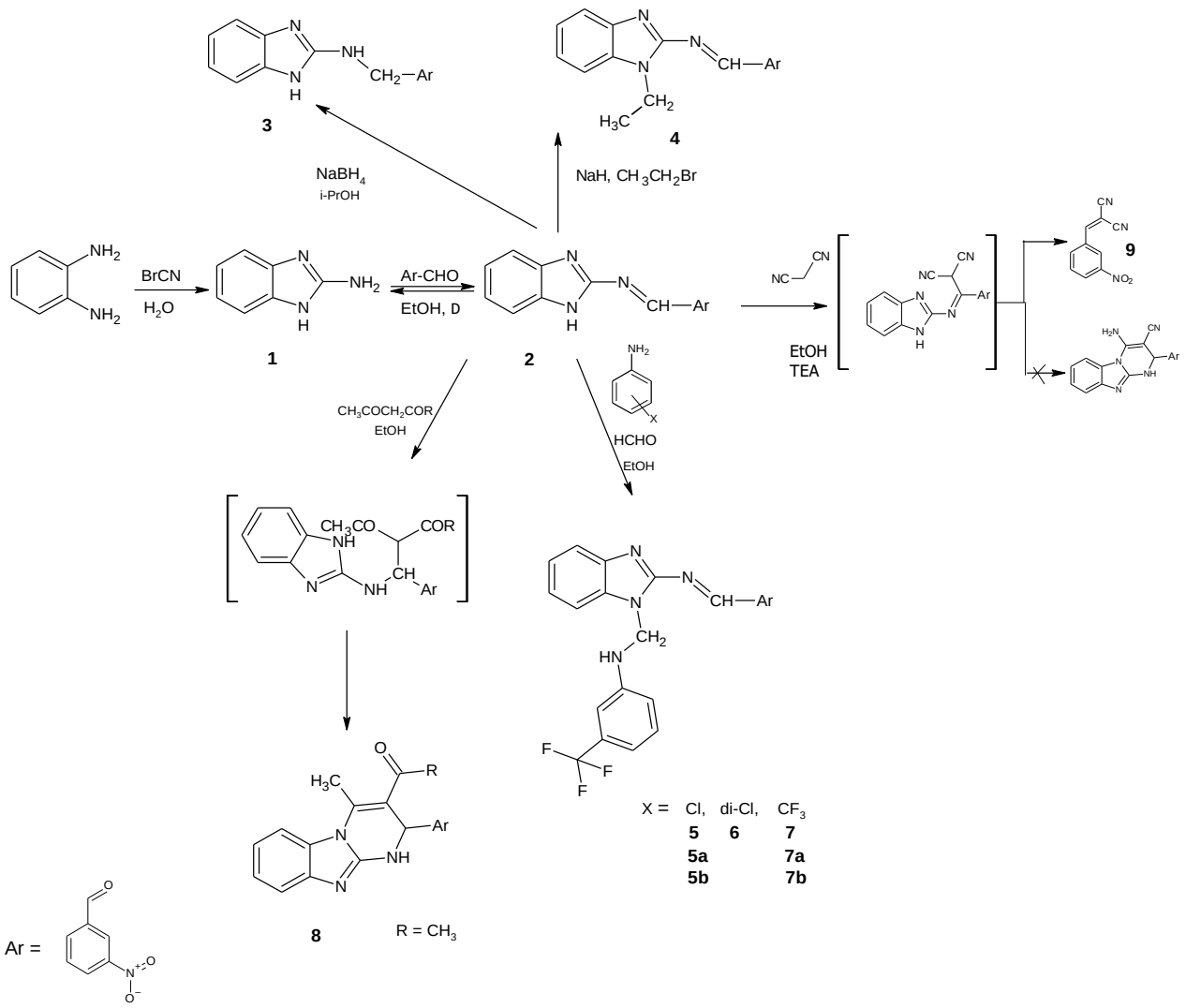
komponenati iz nanesenog uzorka između nepokretne i pokretne faze i zbog čega komponente putuju različitim brzinama što rezultira odjeljivanjem sastojaka. Nakon odjeljivanja provodi se vizualizacija i detekcija odijeljenih sastojaka bojenjem reagensom, UV svjetlom, grijanjem itd. Odijeljeni spojevi mogu se identificirati pomoću faktora zaostajanja (R_F).[10]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Korišteni tehnike i reagensi

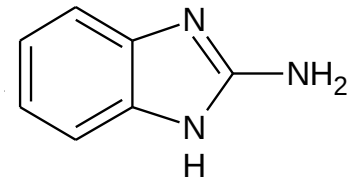
Točke taljenja dobivenih derivata 2-amino-l*H*-benzimidazola određene su primjenom Boetius aparata. Elementne analize su provedene u Perkin Elmer 2400 analizatoru. ^{1}H-NMR spektri dobiveni su pomoću Bruker AVANCE DRX 300 (300 MHz) spektrometra u deuteriranom dimetil-sulfoksidu (DMSO-d6), kao otapalu. IR spektri snimljeni su u laboratoriju analize elemenata i strukturnih istraživanja pomoću infracrvenog spektrofotometra s Fourierovom transformacijom (FT-IR) i ATR adaptera tvrtke Thermo Scientific USA model Nicolet iS50. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u dijelovima na milijun (ppm), a konstante sprege (J) izražene su u hercima (Hz). Multiplicitet signala označen je slovima *s* (singlet), *d* (dublet), *t* (triplet), *q* (kvartet), i *m* (multiplet). Tijek provedenih reakcija i čistoća dobivenih spojeva prate se pomoću TLC-a (Kiesselgel G - Merck). Etanol:dietil-eter u omjeru 10:2 je korišten kao pokretna faza, a kao detektor je korištena UV lampa (254 nm). Reagensi korišteni za sintezu su kupljeni od Sigma Aldrich, Fluka, ChemPur.

2.2. Opća shema rada



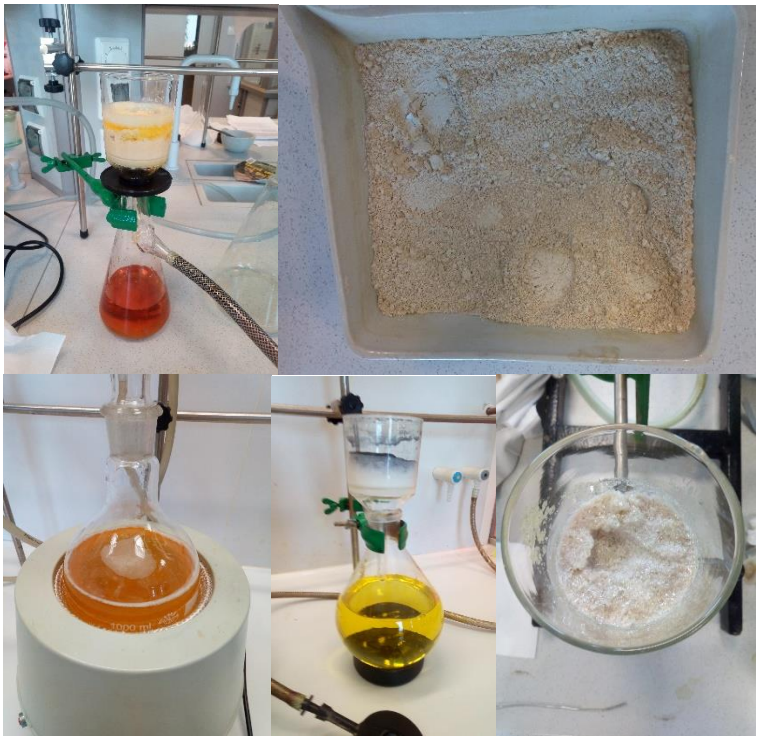
Slika 2. Opća shema rada

- **2-Amino-1*H*-benzimidazol**



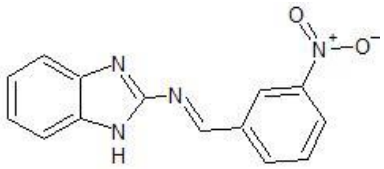
(**1**)

o-Fenilendiamin (10,8 g) je otopljen u 200 mL destilirane vode, nakon čega je dodan cijanogen-bromid (10,5 g). Smjesa je ostavljena oko 72 sata na sobnoj temperaturi. Nakon završetka reakcije, otopina se obezboji aktivnim ugljenom u svrhu pročišćavanja smjese i neutralizira s otopinom natrijevog hidroksida (4 mg NaOH u 30 mL destilirane vode, i tako 10 porcija). Dobiveni talog je filtriran, osušen, ispran dietil-eterom i prekristaliziran iz vode. Reakcija je provedena deset puta. Dobiveno je 104,6 g (78 %) bijelog taloga 2-amino-1*H*-benzimidazola čija je temperatura taljenja iznosila 226-228 °C.



*Slika 3. Prikaz postupka sinteze spoja **1***

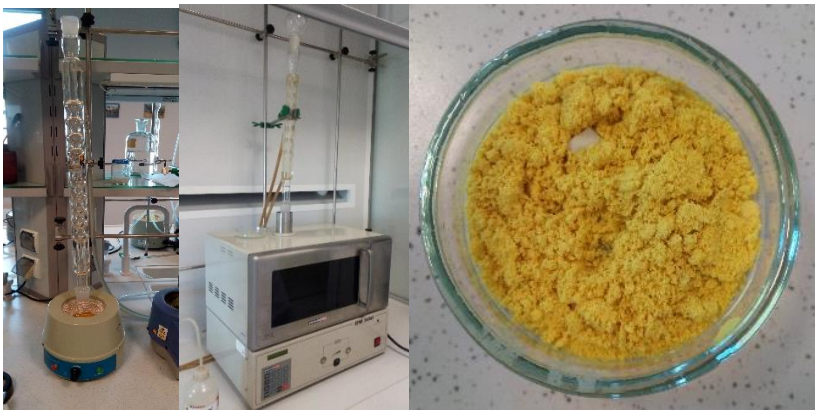
- **2-(3-Nitrobenziliden)amino-1*H*-benzimidazol**



(**2**)

2-Amino-1*H*-benzimidazol (1,33 g) otopljen je u etanolu (30 mL). U reakcijsku smjesu dodan je 3-nitrobenzaldehid (1,51 g) uz trifluormetansulfonat (triflat) kao katalizator koji povećava iskoristivost za čak 8 puta. Nakon refluksa u trajanju od oko 8-10 h i provjere na TLC-u, rezultirajući žuti talog je filtriran, ispran dietil-eterom, osušen i prekristaliziran iz toluena. Prinos reakcije bio je 67,29 %. Dobiveno je 1,79 g čistog produkta, T_t = 190-193 °C.

Sinteza 2-amino-1*H*-benzimidazola (Schiffova baza, **2**) provedena je osim konvencionalnim putem i pomoću mikrovalne sinteze. Reakcija se, koristeći iste kvantitativne vrijednosti kao u konvencionalnoj metodi, odvijala se na temperaturi od 75-85 °C u trajanju od 60 min (6 x 10 minuta, uz 3 minute pauze između svakog ciklusa), jakosti 30 W. Prinos reakcije bio je 65,28 %. Dobiveno je 1,75 g čistog produkta, Tt = 189-202 °C.



a) *b)*

*Slika 4. Prikaz postupka sinteze spoja **2**; a) klasična sinteza uz refluks, b) sinteza mikrovalovima*

Spektralna analiza

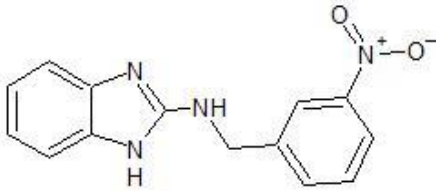
IR v [cm^{-1}] = 3084 (NH II°), 1602 (N=CH lanac), 1476 (C=N prsten), 1030, 746 (CH aromat.), 1527, 1351 (NO_2), 1602-1424 (C=C aromat.), 2746,49 (CH lanac)

^{1}H NMR (300MHz, DMSO) δ [ppm] = 7,195 (q, 2H, aromat), 7,458 (s, 1H, aromat), 7,603 (br, 1H, aromat), 7,846 (t, 1H, aromat), 8,432 (q, 2 H, aromat), 8,861 (s, 1H, aromat), 9,595 (s, 1H, N=C**H**), 12,826 (s, 1H, N**H**- imidazol)

Tablica 1. **Elementna analiza** spoja **$C_{14}H_{10}N_4O_2$ (Mr = 266,25)**

	C %	**H %**	**N %**
Teorijski	63,15 %	3,79 %	21,04 %
Eksperimentalno	63,37 %	3,52 %	20,95 %

- **2-(3-Nitrobenzil)amino-1*H*-benzimidazol**



(**3**)

Spoj (**2**) (2,66 g, 0,01 mol) otopljen je u propan-2-olu (1,50 mL). U svrhu redukcije dvostruke veze u spoju **(2)** doda se $NaBH_4$, pri čemu se otopina obezboji. Nakon uparivanja, hlađenja, filtracije te ispiranja dietil-eterom, talog je bio narančaste boje, tj. nije došlo do obezbojenja. Točka tališta (165-167 °C) i TLC dali su potvrdu da je riječ o tvari koja je drugačija od Schiffove baze. Prekristalizacijom iz dioksana dobiveno je 2,05 g (76,49 %) svijetlo-žutog taloga za kojeg je analizom potvrđeno da je riječ o reduciranom spoju **3**.



*Slika 5. Prikaz postupka sinteze spoja **3***

Spektralna analiza

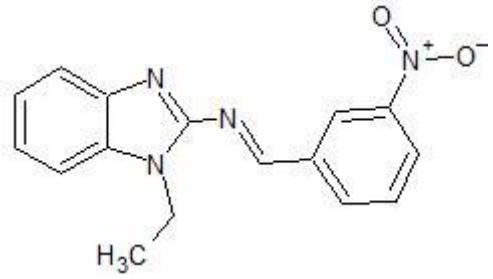
IR v [cm^{-1}] = 3417 (NH II°), 2851 (CH_2), 1460 (C=N prsten), 1255, 759 (CH aromat.), 1569, 1348 (NO_2), 1629, 1420 (C=C aromat.), 3055 (CH, aromat)

^{1}H NMR (300MHz, DMSO) δ [ppm] = 4.605 (dd, 2H, J= 6,3 Hz, -NH-C**H**$_2$-), 6,850 (s, 2H, aromat), 7,110 (t, 2H, aromat), 7,278 (t, 1H, -N**H**-CH_2), 7461 (s, 1H, aromat), 7,657 (m 1H, aromat), 8,017 (s, 1H, aromat), 8,252 (s, 1H, aromat), 10,876 (s, 1H, N**H**-imidazol)

Tablica 2. **Elementna analiza** spoja **$C_{14}H_{12}N_4O_2$ (Mr = 268,27)**

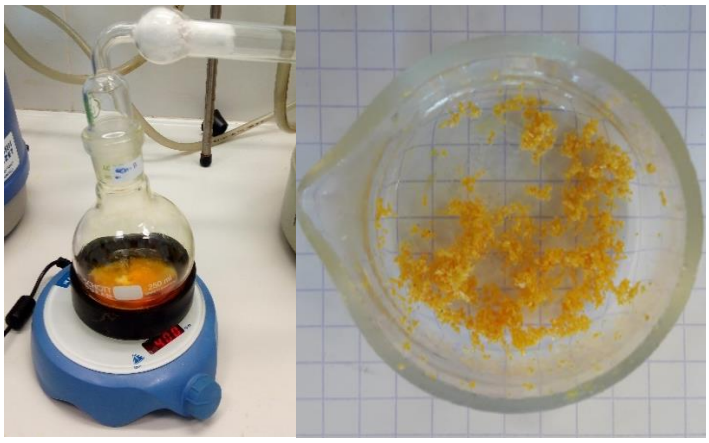
	C %	**H %**	**N %**
Teorijski	62,68 %	4,51 %	20,88 %
Eksperimentalno	62,35 %	4,28 %	21,00 %

- **1-Etil-2-(3-nitrobenziliden)amino-1*H*-benzimidazol**



(**4**)

Spoj **(2)** (1,33 g), N, N-Dimetilformamid DMF (30 mL) i NaH (0,33 g) pomiješaju se u tikvici na koju se postavi $CaCl_2$ cijev i ostavi miješati 40 min. Zatim se doda C_2H_5Br (1 mL) u tikvicu i ostavi se miješati 2-3 h. TLC i točka tališta potvrdili su da je riječ o spoju koji ne odgovara Schiffovoj bazi. Nakon filtracije, ispiranja dietil-eterom i sušenja taloga, u reakciji s vodom, nastane crveni talog koji se filtrira i prekristalizira iz odgovarajućeg otapala. Dobiveno je 0,05 g
(3,40 %) svijetlo žute krutine, poslije prekristalizacije iz etanola. Temperatura taljenja iznosi 223-225 °C.



*Slika 6. Prikaz postupka sinteze spoja **4***

Spektralna analiza

IR v [cm^{-1}] = 3063 (CH_3), 2931 (CH_2), 1610 (N=CH lanac), 1469 (N=C prsten), 1181, 727 (CH aromat.), 1527, 1351 (NO_2), 1610, 1406 (C=C aromat.)

^{1}H NMR (300MHz, DMSO) δ [ppm] = 0.852 (t, 3H, J=7,2 Hz, -C**H**$_3$-), 1.804 (q, 2H, -C**H**$_2$-), 6.330 (s, 2H, aromat.), 6,701 (t, 2H aromat), 7.146 (m, 2H, aromat.), 7.524 (m, 2H, aromat.), 9.653 (s, 1H, -N=C**H**-)

Tablica 3. ***Elementna analiza*** *spoja* ***$C_{16}H_{14}N_4O_2$*** *(***Mr** *= **294,30**)*

	C %	**H %**	**N %**
Teorijski	65,30 %	4,79 %	19,04 %
Eksperimentalno	65,42 %	4,45 %	19,38 %

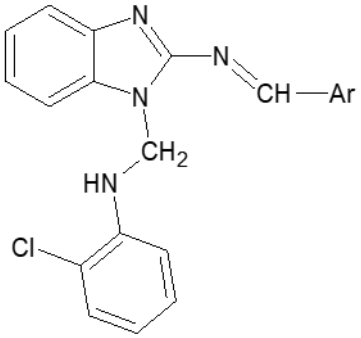
Mannichove baze

Mannich-ove baze sintetiziraju se reakcijama 2-(3-nitrobenziliden)amino-1*H*-benzimidazola s formaldehidom i odabranim aromatskim aminima: fenilpiperazin, morfolin, 2-kloranilin, 3-kloranilin, 4-kloranilin, 3,45-dikloranilin, 3,5-dikloranilin, 2-(trifluormetil)-anilin, 3-(trifluormetil)anilin, 4-(trifluormetil)anilin.

Postupak rada:

Schiffova baza (1,33 g) otopljena je u etilnom alkoholu (25 mL). U smjesu se doda odgovarajući primarni/sekundarni amin (0,01 mol): fenilpiperazin, morfolin, 2-klor-, 4-kloro-, 3-kloro-, 3,5-diklor-, 3,4-diklor, 2-(trifluorometil)-anilin, 3-(trifluorometil)-anilin i 4-(trifluorometil)-anilin i 2,4 mL (0,03 mola) formaldehida. Smjesa se miješa na sobnoj temperaturi oko 6 sati. Dobiveni talog je filtriran pod sniženim tlakom, ispran dietil-eterom, sušen i kristaliziran iz odgovarajućeg otapala.

- **1-{[(2-Klorfenil)amino]metil}-2-(3-nitrobenzilidenamino)-benzimidazol**



(**5a**)

Dobiveno je 0,47 g (23,27 %) žute krutine, točke taljenja 164-166 °C poslije kristalizacije iz etanola.



*Slika 7. Prikaz sinteze spoja **5a***

Spektralna analiza

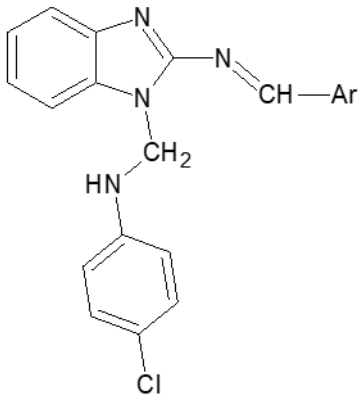
IR ν [cm^{-1}] = 3083 (NH II°), 2821 (CH lanac), 1526 (C=N lanac), 1470 (C=N prsten), 1053; 730 (CH aromat.), 1610, 1450 (C=C aromat.), 1526, 1342 (NO_2), 785-540 (CCl)

^{1}H NMR (300MHz, DMSO) δ [ppm] = 5,824 (d, 2H, -CH_2-, J=6,3Hz), 6,701 (t, 1H, -N**H**-), 7,281 (m, 3H, aromat), 7,653 (m, 3H, aromat), 7,876 (s, 1H, aromat), 8,459 (m, 3H, aromat), 8,937 (d, 1H, aromat), 9,649 (s, 1H, C**H**=N)

Tablica 4. **Elementna analiza** spoja **$C_{21}H_{16}ClN_5O_2$ (Mr = 405,83)**

	C %	**H %**	**N %**
Teorijski	62,15 %	3,97 %	17,26 %
Eksperimentalno	62,09 %	4,15 %	16,90 %

- **1-{[(4-Klorfenil)amino]metil}-2-(3-nitrobenzilidenamino)-benzimidazol**



(**5b**)

Dobiveno je 0,06 g (2,97 %) žute krutine, točke tališta 213-216 °C, poslije kristalizacije iz dioksana.



*Slika 8. Prikaz sinteze spoja **5b***

Spektralna analiza

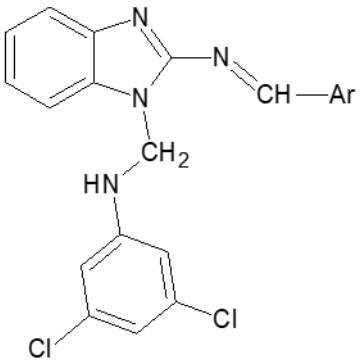
IR ν [cm^{-1}] = 3420 (NH II°), 3062 (CH), 1623 (C=N lanac), 1490 (C=N prsten), 1267, 744 (CH aromat.), 1490, 1309 (NO_2), 2953 (CH_2), 1598, 1415 (C=C aromat.), 785-540(CCl)

^{1}H NMR (300MHz, DMSO): δ [ppm] = 5,861 (d, 2H, J=3,6Hz, -CH_2-), 6,926 (s, 1H, -NH-), 7,017 (s, 2H, aromat.) 7,255 (m, 3H, aromat.), 7,608 (d, 1H, J=7,2Hz, aromat.), 7,914 (m, 2H, aromat.), 8,475 (d, 1H, J=8,4Hz, aromat.), 8,655 (d, 1H, J=7,8Hz, aromat.), 9,009 (s, 1H, aromat), 9,675 (s, 1H, -N=C**H**-)

Tablica 5. **Elementna analiza** spoja **$C_{21}H_{16}ClN_5O_2$ (Mr = 405,83)**

	C %	**H %**	**N %**
Teorijski	62,15 %	3,97 %	17,26 %
Eksperimentalno	62,24 %	3,85 %	17,48 %

- **1-{[(3,5-Diklorfenil)amino]metil}-2-(3-nitrobenzilidenamino)-benzimidazol**



(**6**)

Dobiveno je 0,65 g (29,54 %) žute krutine, točke tališta 133-135 °C, poslije kristalizacije iz THF-a.



*Slika 9. Prikaz sinteze spoja **6***

Spektralna analiza

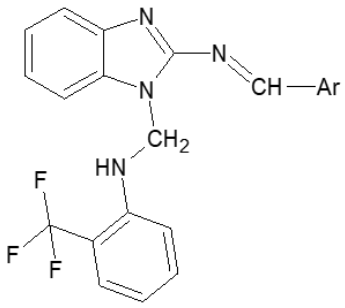
IR ν [cm^{-1}] = 3070 (NH II°), 1610 (C=NH lanac), 1525 (C=N prsten), 1074, 761 (CH aromat.), 785-540(CCl), 1610, 1439 (C=C aromat.), 1525, 1343(NO_2)

^{1}H NMR (300MHz, DMSO): δ [ppm] = 5,818 (d, 2H, J=6,6 Hz, -C**H**$_2$-NH-), 6,707 (It, 1H, -N**H**-), 6,830 (s, 1H, aromat), 7,000 (m, 2H, aromat), 7,210 (m, 2H, aromat), 7,542 (t, 1H, aromat), 7,664 (t, 1H, aromat), 7,757 (m, 1H, aromat), 7,872 (s, 1H, aromat), 10,133 (s, 1H, N=C**H**)

Tablica 6. **Elementna analiza** spoja **$C_{21}H_{15}Cl_2N_5O_2$** (**Mr = 440.28)**

	C %	**H %**	**N %**
Teorijski	57,29 %	3,43 %	15,91 %
Eksperimentalno	57,45 %	3,70 %	15,59 %

- **1-{[(2-(Trifluormetil)fenil)amino]metil}-2-(3-nitrobenzilidenamino)-benzimidazol**



(7a)

Dobiveno je 0,56 g (25,57 %) žute krutine, točka tališta iznosi 152-155 °C, poslije kristalizacije iz THF-a.



*Slika 10. Prikaz sinteze spoja **7a***

Spektralna analiza

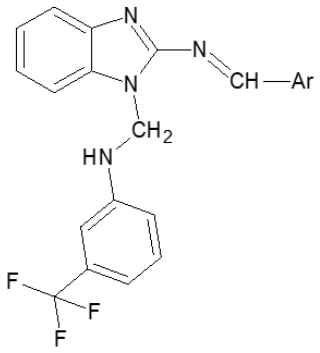
IR ν [cm^{-1}] = 3084 (NH II°), 2822 (-CH_2-), 1612 (N=C lanac), 1451 (C=N prsten), 1095, 730 (CH aromat.), 1524, 1291 (NO_2), 1612, 1451 (C=C aromat.), 1291, 1156 (Ar-CF_3)

^{1}H NMR (300MHz, DMSO) δ [ppm] = 5,820 (d, J=6,9Hz, 2H, -CH_2-), 6,704 (t, 1H, -NH-), 7,267 (m, 3H, aromat.) 7,648 (m, 2H, aromat.), 7,869 (m, 2H, aromat.), 8,453 (m, 3H, aromat.), 8,928 (s, 1H, aromat.), 9,643 (s, 1H, -N=CH-)

Tablica 7. **Elementna analiza** spoja **$C_{22}H_{16}F_3N_5O_2$ (Mr = 439.38)**

	C %	**H %**	**N %**
Teorijski	60,14 %	3,67 %	15,94 %
Eksperimentalno	59,94 %	3,35 %	16,29 %

- **1-{[(3-(Trifluormetil)fenil)amino]metil}-2-(3-nitrobenzilidenamino)-benzimidazol**



(**7b**)

Dobiveno je 0,31 g (14,16 %) žute krutine, talište 190-193 °C, poslije kristalizacije iz THF-a.



*Slika 11. Prikaz sinteze spoja **7b***

Spektralna analiza

IR v [cm^{-1}] = 3084(NH II°), 2800 (-CH_2-), 1610 (C=N), 1471 (C=N prsten), 1341, 1117 (CF_3-Ar), 1052, 762 (CH aromat.), 1610-1423 (C=C aromat.), 1484, 1291 (NO_2)

^{1}H NMR (300MHz, DMSO) δ [ppm] = 5,818 (d, J=6,9Hz, 2H, -CH_2-), 6,678 (t, 1H, -NH-), 7,252 (m, 4H, aromat.) 7,628 (m, 3H, aromat.), 7,862 (t, 1H, aromat.), 8,446 (d, J=7,8Hz, 1H, aromat.), 8,565 ((d, J=7,5Hz, 1H, aromat), 9,634 (s, 1H, -N=CH-)

Tablica 8. **Elementna analiza** spoja **$C_{22}H_{16}F_3N_5O_2$** (**Mr = 439.38)**

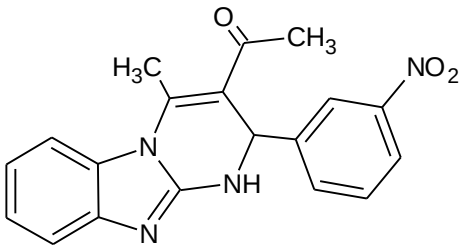
	C %	**H %**	**N %**
Teorijski	60,14 %	3,67 %	15,94 %
Eksperimentalno	60,25 %	3,95 %	15,68 %

Reakcije Schiffove baze s odabranim spojevima koji sadrže aktivnu metilnu skupinu

2-Amino-1*H*-benzimidazoli, zbog prisutnosti gvanidinske skupine u svojoj strukturi, su univerzalni supstrati za sintezu biološki aktivnih supstituiranih ili policikličkih derivata. [11]

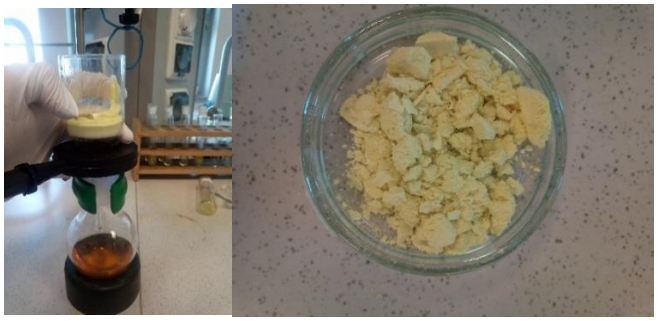
U otopinu Schiffove baze **(2)** (0,005 mol) u etanolu (30 mL) dodan je trietilamin (0,3 mL) i odabrani nitril (malononitril) ili 1,3-diketon (acetilaceton). Otopina je ostavljena na refluksu oko 8-16h. Nakon hlađenja talog je filtriran, ispran s dietil-eterom i kristaliziran iz odgovarajućeg otapala.

- **3-Acetil-2-(3-nitrofenil)-4-metil-1,2-dihidropirimido[1,2-a]-benzimidazol**



(**8**)

Dobiveno je 1,1 g (63,22 %) bijelog taloga, prekristaliziranog iz etanola, s točkom tališta 138-140 °C.



*Slika 12. Prikaz sinteze spoja **8***

Spektralna analiza

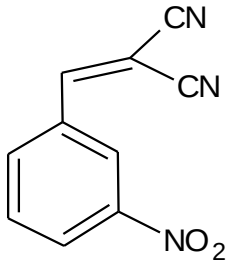
IR ν [cm^{-1}] = 3417 (NH II°), 2941 (CH_3), 1696 (C=O), 1466 (CH=N ring), 1219, 790 (CH aromat.)

^{1}H NMR (300MHz, DMSO) δ [ppm] = 1,567 (s, 3H, -CH_3), 2,123 (s, 3H, -CH_3), 6,224 (s, 1H, -C**H**-NH-), 6,340 (s, 2H, aromat), 7, 115 (m 2H, aromat), 7,346 (m, 2H, aromat), 7,525 (m, 2H, aromat), 9,616 (s, 1H, -N**H**-)

Tablica 9. **Elementnta analiza** spoja **$C_{19}H_{16}N_4O_3$** (**Mr = 348.35**)

	C %	**H %**	**N %**
Teorijski	65,51 %	4,63 %	16,08 %
Eksperimentalno	65,80 %	4,67 %	16,40 %

- ***α*-Cijano-3-nitrocinaminski nitril**



(**9**)

Dobiveno je 0,65 g (65,65 %) željenog produkta, prekristaliziranog iz toluena s točkom tališta: 162-164 °C.



*Slika 13. Prikaz sinteze spoja **9***

Spektralna analiza

IR ν [cm^{-1}] = 2209 (CN), 1601 (HC=C), 1208, 820 (CH aromat.), 3101 (CH aromat.), 3012 (CH), 1601, 1419 (C=C aromat.), 1492, 1320 (NO_2)

^{1}H NMR (300MHz, DMSO) δ [ppm] = 6.314 (s, 1H, aromat.), 6,894 (m, 3H, aromat), 7.934 (s, 1H, -C=C**H**),

Tablica 10. **Elementna analiza** spoja **$C_{10}H_5N_3O_2$ (Mr = 199.16**)

	C %	**H %**	**N %**
Teorijski	60,31 %	2,53 %	21,10 %
Eksperimentalno	60,62 %	2,73 %	20,95 %

2.3. Antibakterijska aktivnost

Metoda bojanja po Gramu je empirijska metoda razlikovanja dviju skupina bakterija (Gram-pozitivnih i Gram-negativnih) koja se zasniva na kemijskim i fizičkim svojstvima stanične stijenke. Važna karakteristika Gram-negativnih bakterija je prisutnost dvostruke membrane koja okružuje svaku bakterijsku stanicu. Za razliku od Gram-pozitivnih bakterija, Gram-negativne bakterije imaju vanjsku opnu koja im služi kao dodatna zaštita. Upravo ta vanjska opna onemogućuje nekim lijekovima i antibioticima prodiranje u stanicu, što je jedan od razloga zašto su Gram-negativne bakterije općenito otpornije na antibiotike nego Gram-pozitivne bakterije.[12]

Glavni mehanizam rezistencije Gram-negativnih bakterija na *β*-laktamske antimikrobne agense jeste sinteza *β*-laktamskih enzima. *β*-Laktamaze mogu se podijeliti u 4 skupine (A, B, C i D), a svaka *β*-laktamaza inaktivira *β*-laktamski antimikrobni antibiotik u različitim omjerima.

Često je potrebno poznavati specifične koncentracije na kojima antibiotik uspješno inhibira rast bakterije. Ta koncentracija zove se minimalna inhibicijska koncentracija, MIK. Najčešće, MIK se određuje iz rasta bakterije na bujonu (tekuća hranjiva podloga) s različitim koncentracijama ispitivanih uzoraka (npr. antibiotik). Poznavanje minimalne inhibicijske koncentracije bitna je informacija prilikom određivanja učinkovite doze antibiotika.

Minimalna inhibicijska koncentracija spojeva **2-9** određena je na sojevima *Staphylococcus auerus* (ATCC 29213), *Escherichia. coli* (ATCC 25922) i *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27852).

U Tablici 11. dane su minimalne inhibicijske koncentracije spojeva **2-9** na gram-pozitivne (*S. aureus*) i gram-negativne (*E. coli i P. aeruginosa*) bakterije.

Tablica 11. Minimalne inhibicijske koncentracije spojeva 2-9 na gram-pozitivne (S. aureus) i gram-negativne (E. coli i P. aeruginosa) bakterije

Oznaka spoja	**Koncentra-cija uzorka**	**MIK (*Minimalna inhibicijska koncentracija)* [mg/mL]**								
		S. aureus* *ATCC29213			***E. coli* ATCC 25922**			***P. aeruginosa* *ATCC 27852***		
		I	II	**Srednja**	I	II	**Srednja**	I	II	**Srednja**
2	10 mg/mL	0,3125 mg/mL (3,125%)	0,3125 mg/mL (3,125%)	**0,3125 mg/mL (3,125%)**	0,3125 mg/mL (3,125%)	0,3125 mg/mL (3,125%)	**0,3125 mg/mL (3,125%)**	0,625 mg/mL (6,25%)	0,625 mg/mL (6,25%)	**0,625 mg/mL (6,25%)**
3	10 mg/mL	0,3125 mg/mL (3,125%)	0,3125 mg/mL (3,125%)	**0,3125 mg/mL (3,125%)**	2,5 mg/mL (25,00%)	1,25 mg/mL (12,50%)	**1,25 mg/mL (12,50%)**	1,25 mg/mL (12,50%)	1,25 mg/mL (12,50%)	**1,25 mg/mL (12,50%)**
4	10 mg/mL	2,5 mg/mL (25,00%)	1,25 mg/mL (12,50%)	**1,875 mg/mL (18,75 mg/ml)**	1,25 mg/mL (12,50%)	1,25 mg/mL (12,50%)	**1,25 mg/mL (12,50%)**	1,25 mg/mL (12,50%)	1,25 mg/mL (12,50%)	**1,25 mg/mL (12,50%)**
5a	10 mg/mL	0,3125 mg/mL (3,125%)	0,3125 mg/mL (3,125%)	**0,3125 mg/mL (3,125%)**	0,3125 mg/mL (3,125%)	0,3125 mg/mL (3,125%)	**0,3125 mg/mL (3,125%)**	0,625 mg/mL (6,25%)	0,625 mg/mL (6,25%)	**0,625 mg/mL (6,25%)**
5b	10 mg/mL	1,25 mg/mL (12,50%)	1,25 mg/mL (12,50%)	**1,25 mg/mL (12,50%)**	1,25 mg/mL (12,50%)	0,625 mg/mL (6,25%)	**0,9375 mg/mL (9,375%)**	1,25 mg/mL (12,50%)	1,25 mg/mL (12,50%)	**1,25 mg/mL (12,50%)**
6	10 mg/mL	0,156 mg/mL (1,56%)	0,156 mg/mL (1,56%)	**0,156 mg/mL (1,56%)**	0,3125 mg/mL (3,125%)	0,3125 mg/mL (3,125%)	**0,3125 mg/mL (3,125%)**	0,625 mg/mL (6,25%)	0,625 mg/mL (6,25%)	**0,625 mg/mL (6,25%)**
7a	10 mg/mL	0,3125 mg/mL (3,125%)	0,3125 mg/mL (3,125%)	**0,3125 mg/mL (3,125%)**	0,3125 mg/mL (3,125%)	0,625 mg/mL (6,25%)	**0,4688 mg/mL (4,688%)**	0,625 mg/mL (6,25%)	0,625 mg/mL (6,25%)	**0,625 mg/mL (6,25%)**
7b	10 mg/mL	0,156 mg/mL (1,56%)	0,078 mg/mL (0,78%)	**0,117 mg/mL (1,17%)**	0,625 mg/mL (6,25%)	0,625 mg/mL (6,25%)	**0,625 mg/mL (6,25%)**	0,625 mg/mL (6,25%)	0,625 mg/mL (6,25%)	**0,625 mg/mL (6,25%)**
8	10 mg/mL	2,5 mg/mL (25,00%)	2,5 mg/mL (25,00%)	**2,5 mg/mL (25,00%)**	2,5 mg/mL (25,00%)	2,5 mg/mL (25,00%)	**2,5 mg/mL (25,00%)**	1,25 mg/mL (12,50%)	2,5 mg/mL (25,00%)	**1,875 mg/mL (18,75%)**
9	10 mg/mL	1,25 mg/mL (12,50%)	2,5 mg/mL (25,00%)	**1,875 mg/mL (18,75%)**	0,625 mg/mL (6,25%)	1,25 mg/mL (12,50%)	**0,9375 mg/mL (9,375%)**	0,625 mg/mL (6,25%)	2,5 mg/mL (25,00%)	**1,5625 mg/mL (15,625%)**
Kontrola rasta		ispravno (razvoj)	ispravno (razvoj)	-	ispravno (razvoj)	ispravno (razvoj)	-	ispravno (razvoj))	ispravno (razvoj)	-
Kontrola medija		ispravno (bez razvoja)	ispravno (bez razvoja)	-	ispravno (bez razvoja)	ispravno (bez razvoja)	-	ispravno (bez razvoja)	ispravno (bez razvoja)	-

3. RASPRAVA

2-Amino-1*H*-benzimidazol, zbog svoje potencijalno široke primjene u medicini, sve se više proučava. U ovom diplomskom radu opisana je sinteza 9 derivata navedenog spoja. Upravo zbog svog potencijalno širokog spektra biološkog djelovanja provode se razna istraživanja u svrhu sintetiziranja ovog spoja i njegovih derivata. Cilj rada je bio sinteza derivata 2-amino-1*H*-benzimidazola i to 2-(3-nitrobenziliden)amino-1*H*-benzimidazola reakcijama klasične i mikrovalne organske sinteze te sintetiza derivata 2-(3-nitrobenziliden)amino-1*H*-benzimidazola reakcijama klasične organske sinteze. Sinteze su prikazane na Slici 2.

3.1. Sinteza i spektroskopska analiza

Sve sinteze provedene su pri sobnim temperaturama. Reakcije su katalizirane triflat katalizatorom u svrhu ubrzavanja reakcije i do 8 puta. Nakon filtracije, svi spojevi su isprani dietil-eterom, osušeni te prekristalizirani iz odgovarajućeg otapala. Prilikom prekristalizacije u svrhu dobivanja što čišćeg produkta korišten je filter papir, celit te aktivni ugljen. Nakon prekristalizacije izmjerena je temperatura taljenja spoja te prinos reakcije.

Kondezacija *o*-fenilendiamina s bromovim cijanidom u vodi rezultirala je sintezom 2-amino-1*H*-benzimidazola (**1**). Najpopularnija metoda sinteze 2-amino-1*H*-benzimidazola je pomoću 2-supstituiranog anilina i različitih ciklizirajućih agensa, a razlog je vrlo dobro iskorištenje reakcije, čak 70-80 %. Potvrda dobrog iskorištenja ove reakcije može se uočiti u prinosu reakcije rađene u ovom diplomskom radu. Prinos reakcije bio je 78 % čime je potvrđeno da je ova metoda sinteze dosta dobra. Tijekom sinteze dobiven je talog crvene boje koji je prekristaliziran iz etanola. Točka taljenja spoja iznosila je 205-231 °C što prema literaturi ukazuje na dobiveni spoj **1**, koji je onečišćen pa je pristupljeno daljnoj prekristalizaciji uz korištenje celita i aktivnog ugljena sve do nestanka obojenih nečistoća i odgovarajuće temperature taljenja. Pročišćeni spoj **1** s točkom taljenja 226-228 °C korišten je za daljnje sinteze derivata br. **2-9**.

- **2-(3-nitrobenzoliden)amino-1*H*-benzimidazol** (**2**)

Sintezi spoja **2** pristupljeno je na dva načina: klasičnom sintezom uz refluks i mikrovalnom sintezom (30 W). Reakcijom spoja **1** uz etanol i 3-nitrobenzaldehid dobiven je 2-(3-nitrobenziliden)amino-1*H*-benzimidazol (**2**, Schiffova baza). Oba načina priprave rezultirala su željenim spojem, a razlika u prinosima bila je jako mala. Iskorištenje reakcije provedene klasičnom metodom (67,29 %) nešto je veće od iskorištenja reakcije provedene mikrovalnom sintezom (65,28 %). Odlučujuća razlika između ova dva puta jeste u duljini trajanja kemijske reakcije, tj. klasična sinteza je trajala 8-10 sati dok je u mikrovalnoj bila znatno kraća, oko 1 sat. Obzirom da je reakcija približno jednako učinkovita kao i konvencionalnim putem, kraće vrijeme trajanje reakcije predstavlja veliku prednost sinteze mikrovalovima. Interval točke taljenja spoja **2** sintetiziranog u mikrovalnoj bio je 189-202 °C dok je klasičnom sintezom bio 190-193 °C. Širina točke tališta spoja **2** sintetiziranog mikrovalnom sintezom ukazuje na postojanje nečistoća zbog čega bi se trebalo pristupiti daljnjem pročišćavanju spoja. Spoj je okarakteriziran infracrvenom i ^{1}H NMR analizom kao i elementnom analizom.

- Na eksperimentalnom infracrvenom spektru spoja **2** (poglavlje 6, prilog 1) u području iznad 3000 cm^{-1} vidljiv je maksimum pri valnom broju 3084 cm^{-1} koji odgovara sekundarnom aminu (-C-N**H**-). U području 1650-1566 cm^{-1} gdje se očekuje apsorpcija C=C veze iz benzenovih prstenova te u području 1690-1640 cm^{-1} gdje se očekuju pikovi C=N veze uočljivi su izraženi pikovi na valnom broju 1602, 1574 i 1527 cm^{-1}. Pik na valnom broju 1602 cm^{-1} trebao bi odgovarati dvostrukoj -C=N- vezi tj. Schiffovoj bazi unutar dobivenog spoja **2**. Maksimum na 1476 cm^{-1} odgovara C=N vezi unutar imidazolnog prstena.[13] Područje od 1550-1500 cm^{-1} te 1372-1290 cm^{-1} odgovara asimetričnom i simetričnom rastezanju unutar NO_2 skupine. Dvije vrpce kao moguću potvrdu N=O asimetričnih i simetričnih rastezanja možemo uočiti na 1574 te 1527 cm^{-1} i 1351 te 1310 cm^{-1}. Jednostruke -C-C- i -C-N- veze nalaze se ispod 1000 cm^{-1} (područje otistka prsta; engl. fingerprint). -C-H savijanja (Ar-H oop) možemo uočiti pri valnim brojevima 1030 cm^{-1} i 746 cm^{-1}. Pikovi na infracrvenom spektru koji su karakteristični za ovaj spoj, ukazuju da se radi o navedenom spoju i da se reakcija odvila u željenom smjeru.

- Teorijska simulacija ^{1}H NMR spektra spoja **2** prikazuje signal na 9,356 ppm koji odgovara ugljikovom protonu iz -N=CH- veze. Signali 8,713 ppm – 7,223 ppm te

njegova integrirana površina odgovaraju kemijskom pomaku 8 atoma vodika koji se nalaze na benzenskim prstenovima.[14]

Na eksperimentalnom ^{1}H NMR spektru spoja **2** (poglavlje 6, prilog 2), možemo uočiti signal singleta na 12,826 ppm. Integrirana površina ovog maksimuma odgovara jednom atomu vodika, koja odgovara dušikovom protonu unutar imidazolnog prstena (-C-N**H**-). Kemijski pomak pokazuje veliko odsjenjenje koje je posljedica blizine elektronegativnog dušika i vodikovih veza. Signal singleta koji odgovara ugljikovom protonu Schiffove baze -N=C**H**- uočava se na 9,595 ppm i nalazi se dosta blizu teoretskog signala za ovaj atom vodika. Na području 7,181-8,861 ppm mogu se uočiti odgovarajući signali s integriranom površinom koja odgovara 8 atoma vodika. Može se pretpostaviti da signali odgovaraju atomatskim protonima molekule. Odsjenjenost benzenskog prstena posljedica je dijamagnetske anizotropije. Mali signal na 2,276 ppm potječe od toluena, koji se koristio kao otapalo pri prekristalizaciji, dok signal na 2,491 ppm odgovara DMSO koji se koristio kao otapalo prilikom ^{1}H NMR analize. Eksperimentalni spektar potvrđuje strukturu spoja **2** te možemo zaključiti da se reakcija odvila očekivanim putem.

- Teorijski izračun postotnog udjela C, H i N atoma za spoj **2** molekulske formule $C_{14}H_{10}N_4O_2$ iznosi C (63,15%), H (3,79 %), N (21,04 %). Rezultati elementne analize odstupaju od teorijskih te iznose C (63,37 %), H (3,52 %), N (20,95 %). Odstupanja su posljedica nečistoća, nusprodukata ili neizreagiranih reaktanata.

- **2-(3-nitrobenzil)amino-1*H*-benzimidazol** (**3**)

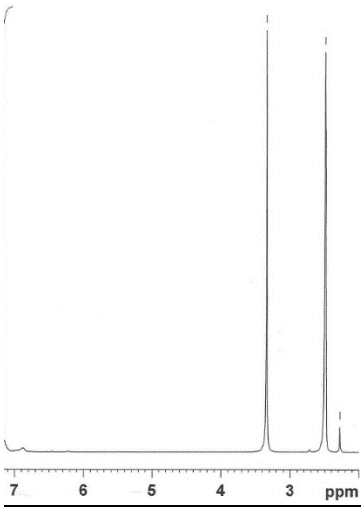
Reakcijom s $NaBH_4$, u spoju **2** reducirana je Schiffova baza i dobiven je spoj **3**. $NaBH_4$ osim imina (Schiffove baze) kao reducens uspješno reducira acil-kloride, anhidride, α-hidroksilaktone, tioestere, pri sobnim ili nižim temperaturama. Potvrdu ovog spoja vidimo najbolje iz razlike NMR i IR spektara spojeva **2** i **3**. Razlika se ponajprije odnosi na postojanje tj. nepostojanje dvostruke veze usljed redukcije dvostruke veze te na promjenu broja atoma vodika.

- Na infracrvenom spektru za spoj **3** (poglavlje 6, prilog 3) na području ispod 3000 cm^{-1} vidljiv je maksimum pri 2851 cm^{-1} koji odgovara -CH_2 skupini u kojoj je ugljik sp^3 hibridiziran. Ovaj pik je potvrda redukcije dvostruke veze unutar spoja **2** zbog

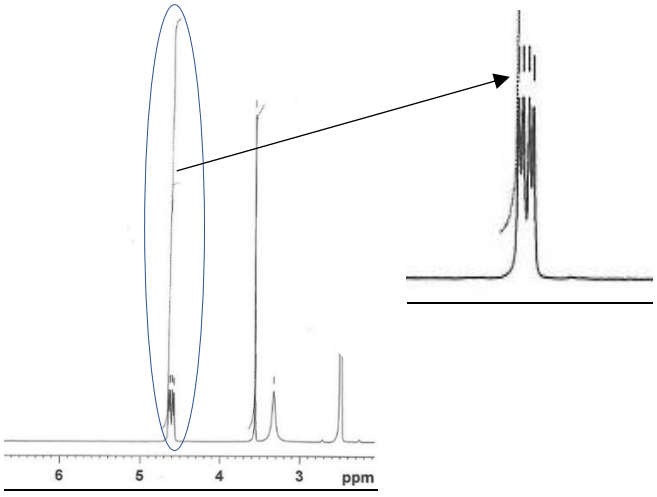
čega se umjesto -CH skupine (spoj 2) u spoju **3** nalazi -CH_2 skupina. Na području iznad 3000 cm^{-1} može se uočiti maksimum na 3417 cm^{-1} koji odgovara sekundarnom aminu. Iz razlike unutar strukture spojeva **2** i **3**, može se uočiti da je ovaj sekundarni amin zapravo posljedica redukcije dvostruke veze Schiffove baze. Maksimum na 3304 cm^{-1} odgovara sekundarnom aminu unutar imidazolnog prstena. Maksimum na 1460 cm^{-1}odgovara -C=N- vezi unutar imidazolnog prstena . Na spektru se mogu uočiti dvije vrpce N=O asimetričnih i simetričnih rastezanja na 1569 cm^{-1} i 1348 cm^{-1}. -C=C- (aromat.) veze nalaze se na području od 1420 cm^{-1} do 1629 cm^{-1}. -C-H savijanja (Ar-H oop) vidimo na valnim brojevima 1255 cm^{-1} i 759 cm^{-1}. Jednostruke C-C i C-N veze nalaze se ispod 1000 cm^{-1}. Obzirom da je infracrveni spektar ukazao na prisutnost pikova karakterističnih za strukturu spoja **3** možemo pretpostaviti da se reakcija odvila u željenom smjeru.

- Prikaz teoretskog ^{1}H NMR spektar spoja **3** pokazuje maksimum na 5,035 ppm integrirane površine koji odgovaraju dva atoma vodika koji potječu iz novonastale -CH_2 skupine usljed redukcije dvostruke veze unutar spoja **2**. Kemijski pomak 7,02 ppm – 8,203 ppm integrirane površine koja odgovara 8 vodikovih atoma potječe iz aromatskih benzenovih protona.

  Eksperimentalni prikaz ^{1}H NMR spektra spoja 3 (poglavlje 6, prilog 4), pokazuje signal (dublet dubleta) na 4,605 ppm koji odgovara ugljikovim protonima iz reducirane -NH-C**H$_2$** veze u spoju **3** (slika 15). U odnosu na teoretski prikaz ^{1}H NMR spektra za ovaj spoj, eksperimentalni kemijski pomak se nalazi nešto niže, a razlog su moguća onečišćenja. Magnetski moment protona -NH-C**H$_2$** cijepa signal protona -N**H**-CH_2 pa dolazi do stvaranja dublet dubleta (dd). Kod spoja **2** u tome području nema signala što je potvrda uspješnosti redukcije veze (slika 14). Pri 10,876 ppm može se uočiti signal koji odgovara protonu sekundarnog amina unutar imidazolnog prstena -N**H**, dok dušikov proton iz N**H**-CH_2 veze daje signal na 7,278 ppm. Blizina elektronegativnog dušika i vodikove veze odgovorne su za odsjenjenje. Odgovarajući broj signala na području 6,850-8,252 ppm integrirane površine 8 vodikovih atoma odgovara aromatskim protonima čija je odsjenjenost posljedica dijamagnetske anizotropije. Signal na 2,490 ppm odgovara DMSO koji se koristio kao otapalo prilikom ^{1}H NMR analize. Eksperimentalni spektar potvrđuje teoretski pa možemo reći da se reakcija odvila očekivanim putem.



Slika 14. Dio NMR spektra spoja 2



Slika 15. Dio NMR spektra spoja 3

- Teorijski izračun postotnog udjela C, H i N atoma za spoj **3** molekulske formule $C_{14}H_{12}N_4O_2$ iznosi C (62,68 %), H (4,51 %), N (20,88 %). Rezultati elementne analize odstupaju od teorijskih te iznose C (62,35 %), H (4,28 %), N (21,00 %). Odstupanja su posljedica nečistoća, nusprodukata ili neizreagiranih reaktanata.

- **1-Etil-2-(3-nitrobenziliden)amino-1*H*-benzimidazol** (**4**)

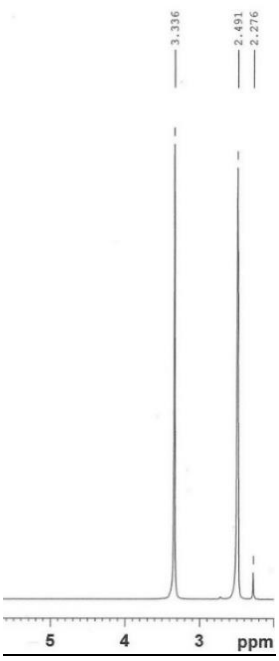
Reakcijom spoja **2** s NaH i etil-bromidom dobiven je spoj **4**. NaH, kao jaka baza, u reakciji s kiselim vodikom na dušiku imidazolnog prstena daje negativno nabijeni dušik koji u S_N2 reakciji s elektrofilnim ugljikom etil-bromida daje navedeni spoj.

- Na eksperimentalnom infracrvenom spektru (poglavlje 6, prilog 5) vidljivi su pikovi na 3063 cm^{-1} (-CH_3 skupina) i 2931 cm^{-1} (-CH_2 skupina). Usporedimo li infracrveni spektar spoja **4** s infracrvenim spektrom spoja **2** možemo uočiti da nema pikova za navedene metilne skupine te možemo pretpostaviti da spomenuti pikovi odgovaraju etilnoj skupini koja se ugradila u spoj **2** dajući novi, željeni spoj **4**. Ugradnjom etilne skupine sekundarni amin iz spoja **2** prelazi u tercijarni amin (spoj **4**) koji ne daje pik na infracrvenom spektru obzirom da nema atoma vodika. -C=N- vezi unutar imidazolnog prstena odgovara pik na 1469 cm^{-1}. -C=C- (aromat.) veze nalaze se na području od 1406 cm^{-1} do 1610 cm^{-1}. Na spektru možemo uočiti dvije vrpce N=O asimetričnih i simetričnih rastezanja na 1559 cm^{-1} i 1351 cm^{-1}. -C-H (Ar-H oop) savijanja vidimo na

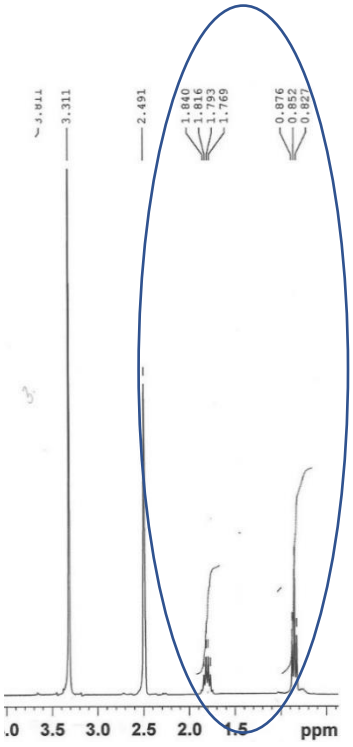
valnim brojevima 1181 cm^{-1} i 727 cm^{-1}. Jednostruke C-C i C-N veze nalaze se ispod 1000 cm^{-1}. Eksperimentalni infracrveni spektar potvrđuje prisutnost pikova karakterističnih za strukturu spoja **4** te možemo pretpostaviti da se reakcija odvila u željenom smjeru.

- Na teorijskom prikazu ^{1}H NMR spektra za spoj **4** možemo uočiti signal tripleta na 1,42 ppm s površinom integracije koja odgovara tri vodikova atoma, a objašnjava -CH_3 skupinu. Signal kvarteta integracijske površine koja odgovara dva atoma vodika ima kemijski pomak 4,342 ppm, a odgovara -CH_2 skupini. -CH_2 skupina je odsjenjenija jer se nalazi bliže elektronegativnijem atomu dušika. Kemijski pomak 7,218-8,716 ppm s površinom integracije koja odgovara 8 protona opisuje aromatske protone molekule. Najodsjenjeniji atom vodika, zbog elektronegativnog atoma dušika te mogućih vodikovih veza, pripada ugljikovom protonu iz -N=CH- veze unutar molekule.

  Na dolje prikazanim slikama (slika 16 i slika 17) koje su dio eksperimentalnog prikaza ^{1}H NMR spektra (poglavlje 6, prilog 6) možemo vidjeti ključnu razliku između spojeva **2** i **4**. Kao potvrdu ugrađene etilne skupine, na ^{1}H NMR spektru za spoj **4**, mogu se uočiti signali kvarteta i tripleta na 1,804 ppm i 0,852 ppm koji odgovaraju alifatskim protonima skupina -CH_2 i -CH_3. Signal na 1,804 ppm odgovara -CH_2 skupini koja je odsjenjenija od -CH_3 skupine radi blizine elektronegativnog atoma dušika. U odnosu na teoretsku pretpostavku kemijskog pomaka, u eksperimentalnom spektru, kemijski pomak -CH_3 i -CH_2 skupina je nešto niži. Signal na 9,653 ppm odgovara protonu -N=C**H**- veze unutar spoja **4** i nalazi se nešto niže u odnosu na teoretski prikaz ^{1}H NMR spektra za ovaj spoj. Odgovarajući broj signala na području 6,330-7,524 ppm odgovara aromatskim protonima čija je odsjenjenost posljedica dijamagnetske anizotropije. Kemijski pomak za aromatske vodike je također nešto niži u odnosu na teoretske pretpostavke. Obzirom da je ^{1}H NMR spektar potvrdio sve bitne strukturne karakteristike spoja **4**, uz postojanje određenih razlika, možemo pretpostaviti da se reakcija odvila željenim tokom i da je novosintetizirani spoj željeni spoj **4**.



Slika 16. Dio NMR spektra za spoj 2



Slika 17. Dio NMR spektra za spoj 4

- Teorijski izračun udjela C, H i N atoma za spoj **4** molekulske formule $C_{16}H_{14}N_4O_2$ iznosi: C (65,30 %), H (4,79 %) i N (19,04 %). Rezultati elementne analize odstupaju od predviđenih vrijednosti, a iznose: C (65,42 %), H (4,45 %) i N (19,38 %). Odstupanja su posljedica nečistoća, nusprodukata ili neizreagiranih reaktanata.

Schiffova baza **(2)** u etanolu (25 mL), 37 % formaldehid (0,03 mol) te odabrani sekundarni (fenilpiperazin i morfolin) i primarni amini (2-klor-, 4-klor-, 3,5-diklor-, 2-trifluormetil-, 3-trifluormetilanilin) reaktanti su u reakciji Mannich-ove kondezacije. Reakcije su se provodile na sobnoj temperaturi 4-6 sati. Talog je filtriran, ispran s dietil eterom, osušen i prekristaliziran iz odgovarajućeg otapala. Reakcije sa sekundarnim aminima (morfolin, fenilpiperazin) nisu bile uspješne zbog čega u ovom diplomskom radu rezultati tih reakcija nisu prikazani. Reakcije su provedene na isti način kao i reakcije s primarnim aminima, međutim kristalizacija željenog spoja, nakon filtracije, nije se dogodila. Uspješno je sintetizirano pet Mannich-ovih baza (Slika 2, spojevi **5a** - **7b**) s različitim funkcijskim skupinama (-Cl, -diCl, $-CF_3$). Spojevi su okarakterizirani IR i NMR spektroskopijom te elementnom analizom.

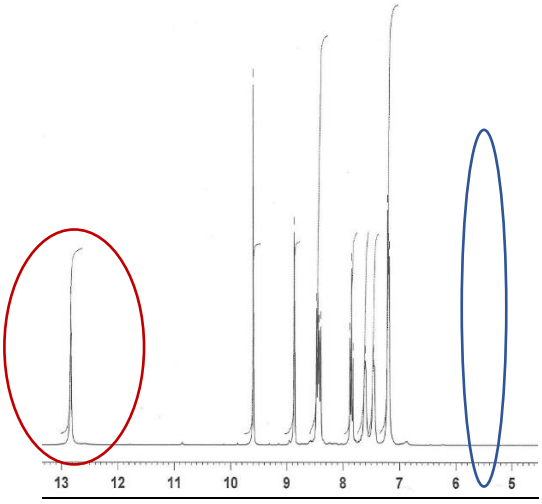
- **1-{[(2-Klorfenil)amino]metil}-2-(3-nitrobenzilidenamino)-benzimidazol (5a)**

- Ekperimentalna infracrvena spektroskopija spoja **5a** (poglavlje 6, prilog 7) pokazuje pik na 2821 cm^{-1} koji odgovara -CH_2 skupini vezanoj za imidazolni dušik. Vezanjem metilne skupine, koja potječe iz dodanog 2-kloranilina, na sekundarni imidazolni amin spoja **2**, on postaje tercijarni. Tercijarni amini ne daju pikove na infracrvenom spektru jer nemaju vezan atom vodika, dok sekundarni amini (-N-H veza) daju jedan pik i to na području višem od 3000 cm^{-1}. Na eksperimentalnom infracrvenom spektru spoja **5a** pik na 3083 cm^{-1} odgovara sekundarnom aminu iz veze -CH_2-NH-. -C=N- veza unutar imidazolnog prstena daje pik na 1470 cm^{-1}. -C=C- (aromat) veze nalaze se na području od 1450 cm^{-1} do 1610 cm^{-1}. Na spektru vidimo dvije vrpce -N=O asimetričnih i simetričnih i rastezanja na 1526 i 1340 cm^{-1} . -C-H (Ar-H oop) savijanja vidimo na valnim brojevima 730 cm^{-1} i 1053 cm^{-1}. Jednostruke -C-C- i -C-N- veze nalaze se ispod 1000 cm^{-1}. -C-Cl veza nalazi se na području između 540 cm^{-1} i 785 cm^{-1}. Infracrveni spektar ukazuje na prisutnost pikova karakterističnih za strukturu spoja **5a** te možemo pretpostaviti da se reakcija odvila u željenom smjeru.

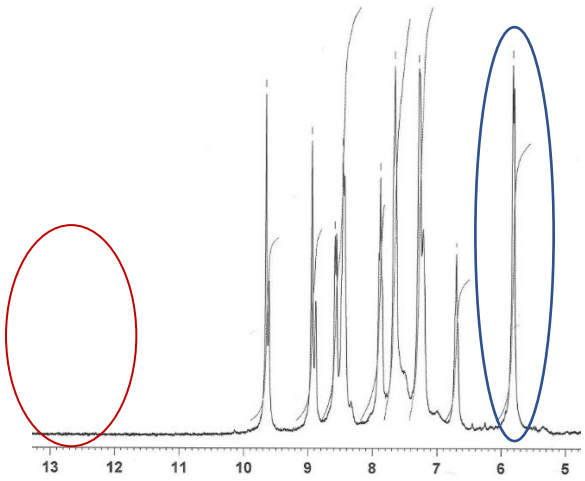
- Teoretski prikaz ^{1}H NMR spektra spoja **5a** prikazuje signal na 5,35 ppm s površinom integracije koja odgovara dva ugljikova atoma, a odgovara -CH_2 skupini koja potječe iz ugrađenog 2-kloranilina u molekulu spoja **2**. Aromatski protoni imaju signal na području 6,483-8,721 ppm s površinom integracije koja odgovara 12 atoma vodika. Ugljikov proton iz dvostruke -N=CH- veze ima kemijski pomak 9,385 ppm.

  Uspoređujući eksperimentalne ^{1}H NMR spektre (poglavlje 6, prilozi 2 i 8) spojeva **2** i **5a** vidimo da u spoju **5a** nema signala u području 12,826 ppm (crvena linija-slika 19). Taj signal odgovara dušikovom protonu unutar imidazolnog prstena spoja **2** (2° amin). Razlog odsustva toga signala jeste vezanje 2-kloranilina na mjestu atoma vodika sekundarnog amina, čime sekundarni amin postaje tercijarni. Tercijarni amini ne pokazuju signale u ^{1}H NMR spektrima radi odsustva atoma vodika. Signal ugljikovog protona iz -N=CH- veze spoja **4** odgovara kemijskom pomaku od 9,649 ppm. Na području 8,937-7,281 ppm s integracijom površine koja odgovara 11 atoma vodika, javljaju se signali koji odgovaraju protonima benzena. Odsjenjenost je posljedica dijamagnetne anizotropije benzenskog prstena, a jedan atom vodika manja možemo pripisati određenim nečistoćama ili mogućem preklapanju pikova. Signal tripleta na

6,701 ppm odgovara sekundarnom aminu adiranog 2-kloranilina. Signal dubleta koji se može uočiti na 5,824 ppm (plava linija-slika 19) odgovara -CH_2 skupini vezane za atom dušika iz imidazolnog prstena. Ova -CH_2 skupina je dosta odsjenjena, a razlog su dva elektronegativna dušika između kojih se ova skupina nalazi. Uspoređujući eksperimentalni i teoretski kemijski pomak određenih strukturnih elemenata spoja **4** možemo vidjeti velike sličnosti. Iz toga, možemo pretpostaviti da se reakcija odvila u željenom smjeru i da je ^{1}H NMR spektar potvrdio sintezu spoja **4**.



Slika 18. Dio NMR spektra spoja 2



Slika 19. Dio NMR spektra spoja 5a

- Teorijski izračun udjela C, H i N atoma za spoj **5a** molekulske formule $C_{21}H_{16}ClN_5O_2$ iznosi: C (62,15 %), H (3,97 %) i N (17,26 %). Rezultati elementne analize odstupaju od predviđenih vrijednosti, a iznose: C (62,09 %), H (4,15 %) i N (16,90 %). Odstupanja su posljedica nečistoća, nusprodukata ili neizreagiranih reaktanata.

    - **1-{[(4-Klorfenil)amino]metil}-2-(3-nitrobenzilidenamino)-benzimidazol (5b)**

- Na infracrvenom spektru -C-H veze u kojima je veći udio *s* karaktera su kraće, jače i pokazuju vibracije pri višim frekvencijama. Potvrdu toga vidimo na eksperimentalnom infracrvenom spektru spoja **5b** (poglavlje 6, prilog 9). Pik na 3062 cm^{-1} odgovara sp^2 hibridiziranom ugljiku (-C-H) iz dvostruke -N=CH veze. Pik na 2953 cm^{-1} odgovara sp^3 hibridiziranom ugljiku iz 4-kloranilina koji se vezao na sekundarni amin u spoju **2**. Može se uočiti pik na 3420 cm^{-1} koji odgovara sekundarnom aminu iz supstituirane

skupine. -C=N veza unutar imidazolnog prstena daje pik na 1490 cm^{-1}. -C=C- (aromat.) veze nalaze se na području 1623cm^{-1}-1523 cm^{-1}. Područja između 1550-1500 cm^{-1} i 1372-1290 cm^{-1} odgovaraju asimetričnom i simetričnom rastezanju unutar NO_2 skupine. Dvije vrpce kao moguću potvrdu N=O asimetričnih i simetričnih rastezanja možemo uočiti na 1523 cm^{-1} i 1327 cm^{-1}. -C-H (Ar-H oop) savijanja vidimo na valnim brojevima 744 cm^{-1} i 1267 cm^{-1}. Jednostruke -C-C- i -C-N veze nalaze se ispod 1000 cm^{-1}. -C-Cl veza nalazi se na području između 540 cm^{-1} i 785 cm^{-1}. Eksperimentalni infracrveni spektar ukazuje na prisutnost pikova karakterističnih za strukturu spoja **5b** čime možemo pretpostaviti da se reakcija odvila u željenom smjeru.

- Na teoretskom ^{1}H NMR spektru spoja **5b** signal na 5,334 ppm s površinom integracije koja odgovara dva ugljikova atoma odgovara -CH_2 skupini koja potječe iz ugrađenog 4-kloroanilina u molekulu spoja **2**. Aromatski protoni imaju signal na području 6,716-8,721 ppm s površinom integracije koja odgovara 12 atoma vodika. Ugljikov proton iz dvostruke -N=CH- veze ima kemijski pomak 9,385 ppm.

  Na eksperimentalnom spektru ^{1}H NMR analize spoja **5b** (poglavlje 6, prilog 10) signal dubleta na 5,861 ppm odgovara -CH_2 skupini iz adiranog 4-kloranilina. Vezanjem 4-kloranilina sekundarni amin iz spoja **2** postaje tercijarni. Tercijarni amini nemaju vezan atom vodika radi čega ne daju pikove na ^{1}H NMR spektru. Može se uočiti signal singleta na 9,675 ppm koji odgovara protonu Schiffove baze (N=C**H** veze). Signal na 6,926 ppm odgovara odgovara protonu sekundarnog amina. Iako je kemijski pomak aromatskih vodika u odnosu na teoretski spektar nešto drugačiji, signali na području od 7,017-,009 ppm odgovaraju aromatskim protonima, bez obzira što integracijska površina odgovara 11 atoma vodika, a ne 12. Odsjenjenost benzenovih protona posljedica je dijamagnetne anizotropije. Uspoređujući teoretske i eksperimentalne ^{1}H NMR spektre spoja **5b** može se pretpostaviti da su potvrđene sve važne strukturne karakteristike željenog spoja i da se reakcija odvila željenim putem.

- Teorijski izračun udjela C, H i N atoma za spoj **5b** molekulske formule $C_{21}H_{16}ClN_5O_2$ iznosi: C (62,15 %), H (3,97 %) i N (17,26 %). Rezultati elementne analize odstupaju od predviđenih vrijednosti, a iznose: C (62,24 %), H (3,85 %) i N (17,48 %). Odstupanja su posljedica nečistoća, nusprodukata ili neizreagiranih reaktanata.

Spojevi **5a** i **5b** sintetizirani su s vrlo malim prinosom reakcije. Spoj **5a** s temperaturom taljenja 164-166 °C ima prinos 23,27 % nakon prekristalizacije iz etanola. Spoj **5b**, iako strukturno vrlo sličan spoju **5a**, nakon prekristalizacije iz dioksana, dao je prinos od samo 2,97 %. Sam odabir otapala za prekristalizaciju iziskivao je puno vremena, zbog slabe kristalizacije ovih spojeva.

- **1-{[(3,5-Diklorfenil)amino]metil}-2-(3-nitrobenzilidenamino)-benzimidazole** (**6**)

Prinos sličan prinosu spoja **5a** ima spoj **6** s 3,5-dikloranilin skupinom kao supstituentom. Nakon prekristalizacije iz THF-a prinos ove reakcije bio je 29,54 %, a točka tališta spoja **6** iznosila je 133-135 °C.

- Infracrvena spektroskopija daje spektre na kojima se maksimumi sekundarnih i primarnih amina nalaze iznad 3000 cm^{-1}. Na eksperimentalnom infracrvenom spektru spoja **6** (poglavlje 6, prilog 11) maksimum na 3070 cm^{-1} odgovara sekundarnom aminu iz supstituirane skupine (3,5-dikloroanilin). Kemijski pomak od 1525 cm^{-1} odgovara -C=N- vezi unutar imidazolnog prstena. Maksimumi za -C=C- (aromat.) veze nalaze se na području od 1610 cm^{-1} do 1439 cm^{-1}. Na spektru vidimo dvije vrpce -N=O asimetričnih i simetričnih rastezanja na 1525 cm^{-1} i 1343 cm^{-1} . -C-H (Ar-H oop) savijanja vidimo na valnim brojevima 761 cm^{-1} i 1074 cm^{-1}. Jednostruke -C-C- i -C-N veze nalaze se ispod 1000 cm^{-1}. -C-Cl veza nalazi se na području između 540 cm^{-1} i 785 cm^{-1}. Infracrveni spektar ukazuje na prisutnost pikova karakterističnih za strukturu spoja **6** te možemo pretpostaviti da se reakcija zaista odvila u željenom smjeru.

- Teoretski ^{1}H NMR spektar spoja **6** ima signal na 5,354 ppm, s površinom integracije koja odgovara dva ugljikova atoma, a opisuje -CH_2 skupinu koja potječe iz ugrađenog 3,5-dikloranilina u molekulu spoja **2**. Aromatski protoni imaju signal na području 7,086-8,721 ppm s površinom integracije koja odgovara 11 atoma vodika. Ugljikov proton iz dvostruke -N=CH- veze ima kemijski pomak 9,385 ppm.

  Na eksperimentalnom ^{1}H NMR spektru spoja **6** (poglavlje 6, prilog 12) signal dubleta s kemijskim pomakom 5,818 ppm odgovara ugljikovim protonima iz C**H**$_2$-NH veze, iako se nalazi na nešto višem kemijskom pomaku u odnosu na teoretsku pretpostavku. Obzirom da je metilna skupina vezana na dva elektronegativna atoma dušika kemijski pomak ovih protona pokazuje odsjenjenost. Signal na 10,133 ppm

odgovara protonu iz dvostruke -N=C**H** veze, iako teoretski spektar pretpostavlja signal na nešto nižem kemijskom pomku. Signal na 6,707 ppm odgovara protonu sekundarnog amina. Mogu se uočiti signali na području od 6,830-7,872 ppm u obliku singleta, tripleta i multipleta uz integriranu površinu koja odgovara 9 atoma vodika. Obzirom da je integrirana površina trebala biti 11, pitanje je da li je dobiven željeni spoj. Moguće da je riječ o nečistoćama, nusproduktu ili da je reakcija krenula nekim drugim smjerom.

- Teorijski izračun udjela C, H i N atoma za spoj **6** molekulske formule $C_{21}H_{15}Cl_2N_5O_2$ iznosi: C (57,29 %), H (3,43 %) i N (15,91 %). Rezultati elementne analize odstupaju od predviđenih vrijednosti, a iznose: C (57,45 %), H (3,70 %) i N (15,59 %). Odstupanja su posljedica nečistoća, nusprodukata ili neizreagiranih reaktanata.

  - **1-{[(2-(Trifluormetil)fenil)amino]metil}-2-(3-nitrobenzilidenamino)-benzimidazol** (**7a**)

- Infracrvenom spektroskopijom dobiven je eksperimentalni spektar spoja **7a** (poglavlje 6, prilog 13). U području iznad 3000 cm^{-1} točnije na 3084 cm^{-1} nalazi se pik koji odgovara sekundarnom aminu. Ugradnjom 2-trifluormetilanilina sekundarni imidazolni amin u spoju **2** prelazi u tercijarni koji zbog nedostatka atoma vodika ne pokazuje pik na infracrvenom spektru. -CH_2 skupina u kojoj je ugljik sp^3 hibridiziran pokazuje pik pri 2822 cm^{-1}. -C=N dvostruka veza unutar imidazolnog prstena pokazuje pik na 1451 cm^{-1} dok N=CH veza Schiffove baze pokazuje pik pri 1612 cm^{-1}. Na spektru vidimo dvije vrpce -N=O asimetričnih i simetričnih rastezanja na 1524 cm^{-1} i 1291 cm^{-1}. -C=C- (aromat.) veze pokazuju pik na području 1612-1573 cm^{-1}. Jednostruke -C-C- i -C-N veze nalaze se ispod 1000 cm^{-1} . Ar-CF_3 veza nalazi se na području oko 1156 cm^{-1}. Infracrveni spektar ukazuje na prisutnost pikova karakterističnih za strukturu spoja **7a** po čemu bi mogli pretpostaviti da je reakcija krenula u željenom smjeru.

- Teoretski ^1H NMR spektar spoja **7a** ima signal na 5,393 ppm, s površinom integracije koja odgovara dva ugljikova atoma, opisuje -CH_2 skupinu koja potječe iz ugrađenog 2-trifluormetilanilina u molekulu spoja **2**. Aromatski protoni imaju signal na području 6,906-8,721 ppm s površinom integracije koja odgovara 12 atoma vodika. Ugljikov proton iz dvostruke -N=CH- veze ima kemijski pomak 9,385 ppm.

Eksperimentalni ^{1}H NMR spektar spoja **7a** (poglavlje 6, prilog 14) pokazuje signal dubleta na 5,820 ppm koji odgovara protonima -CH_2 skupine iako teoretski spektar predviđa signal na nešto nižem kemijskom pomaku. Kemijski pomak skupine ukazuje na odsjenjenje kao posljedica dva elektronegativna dušikova atoma za koje je ova skupina vezana. Signal tripleta na 6,704 ppm odgovara protonu sekundarnog amina, dok se na 9,643 ppm uočava signal koji odgovara protonu iz -N=CH veze sp^2 hibridiziranog ugljika. Ostali signali na području između 7,267-8,928 ppm odgovaraju aromatskim protonima bez obzira što integrirana površina odgovara 11 atoma vodika, a ne 12. Određene nečistoće ili preklapanje pikova možda mogu biti razlog ove pojave. Ipak, uspoređujući teoretski i eksperimentalni spektar, uz određene razlike, možemo reći da su signali svih bitnih skupina spoja **7a** potvrđeni i da se reakcija odvila u željenom smjeru.

- Teorijski izračun postotka udjela C, H i N atoma za spoj **7a** molekulske formule $C_{22}H_{16}F_3N_5O_2$ iznosi: C (60,14 %), H (3,67 %) i N (15,94 %). Rezultati elementne analize odstupaju od predviđenih vrijednosti, a iznose: C (59,94 %), H (3,35 %) i N (16,29 %). Odstupanja su posljedica nečistoća, nusprodukata ili neizreagiranih reaktanata.

  - **1-{[(3-(trifluormetil)fenil)amino]metil}-2-(3-nitrobenzilidenamino)-benzimidazol** (**7b**)

- Na eksperimentalnom infracrvenom spektru spoja **7b** (poglavlje 6, prilog 15) u području iznad 3000 cm^{-1} tj pri 3084 cm^{-1} nalazi se pik koji odgovara sekundarnom aminu. Vezanjem 3-trifluormetilanilina sekundarni imidazolni amin u spoju **2** prelazi u tercijarni amin koji ne pokazuje pik na infracrvenom spektru obzirom da nema atoma vodika. -CH_2 skupina u kojoj je ugljik sp^3 hibridiziran ima pik pri 2800 cm^{-1}. -C=N- dvostruka veza unutar imidazolnog prstena pokazuje pik na 1471 cm^{-1} dok -N=CH veza Schiffove baze pokazuje pik pri 1610 cm^{-1}. -C=C- (aromat.) veze pokazuju pik na području između 1610-1423 cm^{-1}. Na spektru vidimo dvije vrpce -N=O asimetričnih i simetričnih rastezanja na 1484 cm^{-1} i 1291 cm^{-1} . Jednostruke -C-C- i -C-N- veze nalaze se ispod 1000 cm^{-1} . Ar-CF_3 veza nalazi se na području oko 1117 cm^{-1}. Infracrveni spektar ukazuje na prisutnost pikova karakterističnih za strukturu spoja **7b** pa možemo pretpostaviti da se reakcija odvila u željenom smjeru.

- Teoretski ^{1}H NMR spektar spoja **7b** prikazuje signal na 5,348 ppm, s površinom integracije koja odgovara dva ugljikova atoma, a opisuje -CH_2 skupinu koja potječe iz ugrađenog 3-trifluormetilanilina u molekulu spoja **2**. Aromatski protoni imaju signal na području između 7,14-8,72 ppm s površinom integracije koja odgovara 12 atoma vodika. Ugljikov proton iz dvostruke -N=CH- veze ima kemijski pomak 9,385 ppm.

  Eksperimentalni ^{1}H NMR spektar spoja **7b** pokazuje signal dubleta na 5,818 ppm koji odgovara atomima vodika -CH_2 skupine bez obzira što teoretski spektar pretpostavlja niži kemijski pomak. Kemijski pomak -CH_2 skupine ukazuje na odsjenjenje kao posljedica dva elektronegativna dušikova atoma za koje je ova skupina vezana. Signal tripleta na 6,678 ppm odgovara atomu vodika iz sekundarnog amina, dok se na 9,634 ppm nalazi signal singleta koji odgovara protonu -N=CH veze sp^2 hibridiziranog ugljika. Ostali pikovi na području između 7,252-8,565 ppm, s površinom integracije 11 atoma vodika, odgovaraju aromatskim protonima bez obzira što bi površine integracije trebala biti 12. Ovu pojavu možemo pripisati nečistoćama ili preklapanju pikova. Ipak, uspoređujući teoretski i eksperimentalni spektar, uz određene razlike, možemo reći da su signali svih bitnih skupina spoja **7b** potvrđeni i da se reakcija odvila u željenom smjeru

- Teorijski izračun postotka udjela C, H i N atoma za spoj **7b** molekulske formule $C_{22}H_{16}F_3N_5O_2$ iznosi: C (60,14 %), H (3,67 %) i N (15,94 %). Rezultati elementne analize odstupaju od predviđenih vrijednosti, a iznose: C (60,25 %), H (3,95 %) i N (15,68 %). Odstupanja su posljedica nečistoća, nusprodukata ili neizreagiranih reaktanata.

Spojevi **7a** i **7b** sa supstituentima 2-trifluormetilanilin i 3-trifluormetilanilin sintetizirani su nakon prekristalizacije iz THF-a. Spoj **7a** ima točku tališta 152-155 °C, dok spoj **7b** ima nešto višu, 190-193 °C. Spojevi su sintetizirani s vrlo malim prinosom od 25,57 % (spoj **7a**) i 14,16 % (spoj **7b**).

Reakcije spoja **2** sa spojevima koji sadrže aktivnu metilensku skupinu (nitrili i 1,3-diketoni) rezultirala su spojevima **8** i **9**. U otopinu spoja **2** (0,005 mol) u etanolu (30 mL) dodali smo trietilamin (0,3 mL) te 1,3-diketon (acetilaceton, 0,01 mol) i nitril (malononitril,

0,01 mol). Reakcije su se odvijale pri sobnoj temperaturi, 8-16 h. Nakon filtracije te ispiranja dietil-eterom spojevi su prekristalizirani iz odgovarajućeg otapala.

Dvije vrste reakcija, adicijsko-eliminacijska i adicijsko-ciklizacijska, predstavljaju moguća dva puta sinteze ove klase spojeva. Obje reakcije se odvijaju preko međuprodukta koji daje jedan od moguća dva produkta: derivat cinaminske kiseline i derivat pirimido-benzimidazola.

- **3-Acetil-2-(3-nitrofenil)-4-metil-1,2-dihidropirimido[1,2-a]-benzimidazol (8)**

- Infracrvenom spektroskopijom dobiven je eksperimentalni spektar spoja **8** (poglavlje 6, prilog 17). U području iznad 3000 cm^{-1} može se uočiti maksimum na 3417 cm^{-1} koji odgovara sekundarnom aminu molekule. Osnovna vrijednost karbonilne skupine (keton) u infracrvenom spektru je 1715 cm^{-1}. U spektru spoja **8** pik koji odgovara karbonilnoj skupini ketona je na 1696 cm^{-1}, a razlog je konjugacija unutar spoja koja snižava vrijednost za 25-30 cm^{-1}. -CH_3 skupina u kojoj je ugljik sp^3 hibridiziran pokazuje maksimum na 2941 cm^{-1}. Na 1466 cm^{-1} može se uočiti pik koji odgovara dvostrukoj -N=CH vezi unutar imidazolnog prstena. -C=C- (aromat.) veze pokazuju pik na području 1570-1405 cm^{-1}. Na spektru vidimo dvije vrpce -N=O asimetričnih i simetričnih rastezanja na 1511 cm^{-1} i 1308 cm^{-1} . Jednostruke -C-C- i -C-N- veze nalaze se ispod 1000 cm^{-1}. Infracrveni spektar ukazuje na prisutnost pikova karakterističnih za strukturu spoja **8** pa možemo pretpostaviti da je reakcija išla u očekivanom smjeru.

- Teoretski ^{1}H NMR spektar spoja **8** pokazuje signal singleta kemijskog pomaka 2,419 ppm koji odgovara -CH_3 skupini vezanoj za karbonilnu skupinu. Signal singleta s integracijskom površinom 3 atoma vodika i kemijskog pomaka 2,77 ppm odgovara -CH_3 skupini koja je vezana za 6-člani prsten. Signal singleta koji odgovara jednom atomu vodika nalazi se na 5,795 ppm a odgovara ugljikovim protonima -C**H**-NH veze. Signali na području 7,022-8,207 ppm s integracijskom površinom 8 odgovaraju aromatskim protonima.

  Eksperimentalni ^{1}H NMR spektar spoja **8** (poglavlje 6, prilog 18) pokazuje signale singleta na 1,567 ppm (C-C**H**$_3$) i 2,123 ppm (CO-C**H**$_3$) koji odgovaraju 6 vodikovih atoma. U odnosu na početni spoj **2**, spoj **8** pokazuje određene razlike kao

potvrdu sinteze željenog spoja. Spoj **8** ima dvije metilne skupine, a gledajući spektar spoja **2** vidimo da pikova na tom području nema. Usljed konjugacije, blizine elektronegativnog kisika i vodikovih veza -CH_3 skupina vezana na karbonilnu skupinu je odsjenjenija u odnosu na drugu -CH_3 skupinu. Kemijski pomak je nešto niži u odnosu na teoretske pretpostavke. Signal singleta na 6,224 ppm odgovara ugljikovom protonu iz -C**H**-NH- veze, iako se nalazi na nešto nižem kemijskom pomaku od teoretskog. Pik na 9,616 ppm odgovara atomu vodika sekundarnog amina. Kemijski pomak od 6,340-7,525 ppm integrirane površine 8 vodikovih atoma odgovara atomima vodika aromatskog prstena. Odgovarajući broj vodika te svih ostalih signala potvrda je da je reakcija sinteze željenog spoja **8** išla u dobrom smjeru.

- Teorijski izračun postotka udjela C, H i N atoma za spoj **8** molekulske formule $C_{19}H_{16}N_4O_3$ iznosi: C (65,51 %), H (4,63 %) i N (16,08 %). Rezultati elementne analize odstupaju od predviđenih vrijednosti, a iznose: C (65,80 %), H (4,67 %) i N (16,40 %). Odstupanja su posljedica nečistoća, nusprodukata ili neizreagiranih reaktanata.

o **α-Cijano-3-nitrocinaminski nitril** (**9**)

- Maksimum na 2209 cm^{-1} kojeg vidimo na eksperimentalnom infracrvenom spektru spoja **9** (poglavlje 6, prilog 19) odgovara -C≡N- vezama unutar molekule. Dvostruka -C=CH veza ima maksimum na 1601 cm^{-1}. -C-H veza sp^2 hibridiziranog ugljika potvrđena je pikom na 3101 cm^{-1}, dok su pikovi C-H veze aromatskog prstena vidljivi pri 3012 cm^{-1}. NO_2 skupina pokazuje dvije vrpce: na 1492 cm^{-1} i 1320 cm^{-1}. C-H savijanja (Ar-H oop) vidljiva su pri 820 cm^{-1} i 1208 cm^{-1}. Signali infracrvenog spektra odgovaraju strukturnim skupinama spoja **9** pa možemo pretpostaviti da je reakcija išla u željenom smjeru.

- Teoretski prikaz ^{1}H NMR spektra spoja **9** pokazuje signal singleta na 8,931 ppm s integracijom površine koja odgovara jednom atomu vodika. Signal odgovara ugljikovom protonu iz -C**H**=C- veze, a veliko odsjenjenje je posljedica blizine aromatskog benzena te nitrilnih skupina. Kemijski pomak od 7,648 ppm do 8,844 ppm s integracijom površine koja odgovara 4 atoma vodika opisuje aromatske protone molekule.

Na eksperimentalnom ^{1}H NMR spektru spoja **9** (poglavlje 6, prilog 20) može se uočiti signal singleta na 7,934 ppm koji odgovara protonu -C=C**H**- veze bez obzira što se nalazi na nižem kemijskom pomaku od očekivanog. Odsjenjenje je posljedica konjugacija unutar molekule. Mogu se uočiti signali singleta na 6,314 ppm i multipleta na 6,894 ppm s integracijom površina koja odgovara 4 atoma vodika. Odgovarajući broj signala odgovara aromatskim protonima iako se nalaze dosta niže od očekivanog. Odgovarajući signali za sve karakteristične skupine spoja **9** potvrdio je da je sinteza željenog spoja išla u pravom smjeru.

- Teorijski izračun udjela C, H i N atoma za spoj **9** molekulske formule $C_{10}H_{15}N_3O_2$ iznosi: C (60,31 %), H (2,53 %) i N (21,10 %). Rezultati elementne analize odstupaju od predviđenih vrijednosti, a iznose: C (60,62 %), H (2,73 %) i N (20,95 %). Odstupanja su posljedica nečistoća, nusprodukata ili neizreagiranih reaktanata.

3.2. Antibakterijska aktivnost sintetiziranih spojeva

Metoda kojom je određena antimikrobna aktivnost zove se mikrodilucijska metoda. Podrazumijeva male volumene bujona podijeljene u sterilne, plastične mikrodilucijske lađice. Metoda rasta može se koristiti alternativno i ponekad je poželjna npr. kada je rast kolonije težak da se suspendira izravno te se ne može napraviti glatka suspenzija.

U tablici 1 (poglavlje 2) prikazana je antibakterijska aktivnost 10 sintetiziranih spojeva (**2**-**9**). Sintetizirani spojevi testirani su na Gram-pozitivne (*S. aureus*) i Gram-negativne (*E. coli* i *P. aeruginosa*) bakterijske sojeve.

Nakon dvije probe, uzeta je srednja vrijednost koja predstavlja minimalnu inihibicijsku koncentraciju, MIK, tj. minimalnu koncentraciju potrebnu za inhibiranje rasta bakterije.

Iz rezultata pokušalo se uvidjeti postoji li određena veza između funkcijske skupine i biološke aktivnosti.

Iz priloženih podataka u prikazanih u Tablici 1. ustanovljeno je sljedeće:

Gram-negativne su bakterije radi svoje dodatne ovojnice otpornije na lijekove. To se može potvrditi i iz priloženih rezultata (Tablica 1.). Minimalna inhibicijska koncentracija spoja koji

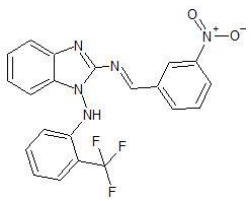
se pokazao najaktivniji protiv Gram-pozitivnih bakterija iznosi 0,117 mg/mL, dok kod Gram-negativnih bakterija iznosi 0,3125 mg/mL odnosno 0,625 mg/mL. Povećanje koncentracije ukazuje na težu inhibiciju rasta Gram-negativnih bakterija u odnosu na Gram-pozitivne bakterije.

Rezultati prema određenoj vrsti bakterijskog soja:

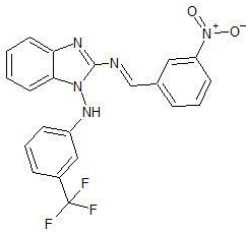
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213)

Spoj 1-{[(3-(trifluormetil)fenil)amino]metil}-2-(3-nitrobenzilidenamino)-benzimidazol (**7b**) pokazao je najbolju inhibicijsku aktivnost prema bakteriji *S. aureus.* Minimalna inhibicijska koncentracija spoja **7b** je 0,117 mg/mL. Sljedeći iza njega je spoj 1-{[(3,5-diklorfenil)amino]metil}-2-(3-nitrobenzilidenamino)-benzimidazol (**6**) s minimalnom inhibicijskom koncentracijom 0,156 mg/mL.

Obzirom na činjenicu da spoj **7b** ima najveću aktivnost protiv bakterijskog soja *S. aureus* možda se može pretpostaviti da su tri atoma flora odgovorna za tu pojačanu aktivnost. Spoj **7a** koji se razlikuje samo u položaju adirane skupine ima nešto manju aktivnost.



*Slika 20. Spoj **7a***



*Slika 21. Spoj **7b***

Zanimljivo je da je minimalna inhibicijska koncentracija za spojeve **2**,**3**,**5a** i **7a** jednaka i iznosi 0,3125 mg/mL, dok je za spoj **5b** ona 1,25 mg/mL. Spojevi **5a** i **5b** se razlikuju samo u položaju adirane skupine.

Razlike između spojeva **2** i **3** nema iz čega možemo zaključiti da redukcija veze u spoju **2** nije doprinijela boljoj inhibicijskoj moći spoja te da Schiffova baza unutar molekule možda nije odgovorna za inihibicijsku aktivnost prema ovoj bakteriji.

Spojevi s aktivnim metilenskim skupinama imaju vrijednost MIK-a 2,5 mg/mL (spoj **8**) i 1,875 mg/mL (spoj **9**) što je više od početnog spoja **2**, ali i svih ostalih sintetiziranih spojeva.

- *Escherichia coli (*ATCC 25922*)*

Spojevi **2**,**5a** i **6** imaju najbolju inhibicijsku aktivnost prema Gram-negativnoj bakteriji *E. coli.* Njihova vrijednost MIK-a je jednaka i iznosi 0,3125 mg/mL.

Razlika između spojeva **5a** (MIK: 0,3125 mg/mL) i **5b** (MIK: 0,625 mg/mL) je opet vidljiva, te i ovaj put spoj **5b** ima veću minimalnu inhibicijsku koncentraciju od spoja **5a**.

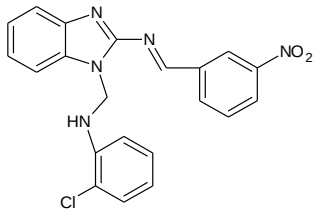
Razlika između spojeva **2** (MIK: 0,3125 mg/mL) i **3** (MIK: 1,25 mg/mL) je kod ove bakterije vidljivija nego u prošlom primjeru, ali potvrđuje činjenicu da redukcija veze nije poboljšala antibakterijsku aktivnost spoja **3**, štoviše, u ovom slučaju je smanjila.

- *Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27852)*

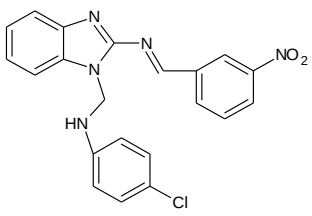
Kod ove vrste bakterije, najmanja vrijednost MIK-a iznosi 0,625 mg/mL, a potvrđen je u spojevima **2**,**5a**,**6**,**7a** i **7b**. Spoj **5b** ima vrijednost MIK-a 1,25 mg/mL. Možemo uvidjeti i u ovom primjeru da je MIK spoja **5b** veći u odnosu na spoj **5a**.

Najveće vrijednosti MIK-a imaju spojevi s aktivnim metilenskim skupinama (spoj **8**: 1,875 mg/mL i spoj **9**: 1,5625 mg/mL).

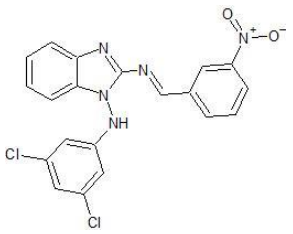
Kod sve tri bakterije spoj **6** ima jednaku ili nižu minimalnu inhibicijsku koncentraciju u odnosu na spoj **5a.** Spoj **5b** u sva tri slučaja ima najveću minimalnu inhibicijsku aktivnost. Postoji vjerojatnost da je u spoju **6** vrijednost MIK-a manja ili jednaka radi postojanja jednog atoma klora više.



*Slika 22. Spoj **5a***



*Slika 23. Spoj **5b***



*Slika 24. Spoj **6***

4. ZAKLJUČAK

- U ovom radu sintetizirano je ukupno 9 novih spojeva (**spojevi 1-9**) različite kemijske strukture.
- Sintetiziran je 2-(3-nitrobenziliden)amino-1*H*-benzimidazol reakcijama klasične i mikrovalne organske sinteze. Veliko iskorištenje (67 %) reakcije čini je pogodnom.
- Sintetizirano je ukupno 9 derivata 2-(3-nitrobenziliden)amino-1*H*-benzimidazola reakcijama klasične organske sinteze. Prinosi reakcija bili su različiti, od jako velikih (76 %) do jako malih (2,97 %).
- Jako mala iskorištenja su posljedica nečistoća, a možda i neočekivanih nusprodukata.
- Strukture sintetiziranih spojeva potvrđene su tehnikama: ^{1}H NMR, IR te elementna analiza.
- Dobiveni spojeni testirani su na antibakterijsku aktivnost protiv Gram-pozitivnog bakterijskog soja (*S. aureus*) i Gram-negativnih bakterijskih sojeva (*E. coli* i *P. aeruginosa*).
- Iz rezultata antimikrobne aktivnosti moglo se zaključiti da su gram-negativne bakterije otpornije na djelovanje ovih spojeva. Ta pretpostavka proizlazi iz vrijednosti minimalne inhibicijske koncentracije koja je kod Gram-pozitivnog bakterijskog soja (MIK:0,117 mg/mL) niža u odnosu na minimalne inhibicijske koncentracije Gram-negativnih bakterijskih sojeva (MIK:0,3125 mg/mL i MIK:0,625 mg/mL). Pretpostavlja se da je razlog dodatni vanjski omotač u odnosu na gram-pozitivne bakterije. Rezultati spojeva **5a**,**5b** i **6** za sva tri soja bakterija pokazali su da spoj **6** ima jednaku ili nižu vrijednost minimalne inhibicijske koncentracije u odnosu na spojeve **5a** i **5b**. Pretpostavlja se da je to posljedica jednog atoma klora više u odnosu na spojeve **5a** i **5b**.
- Svi dobiveni derivati, farmakološki aktivne komponente, mogu se kasnije koristiti za sintezu određenih novih komponenti te za nove modifikacije kemijske strukture.

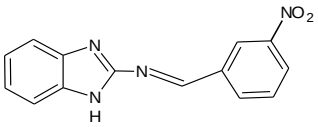
5. LITERATURA

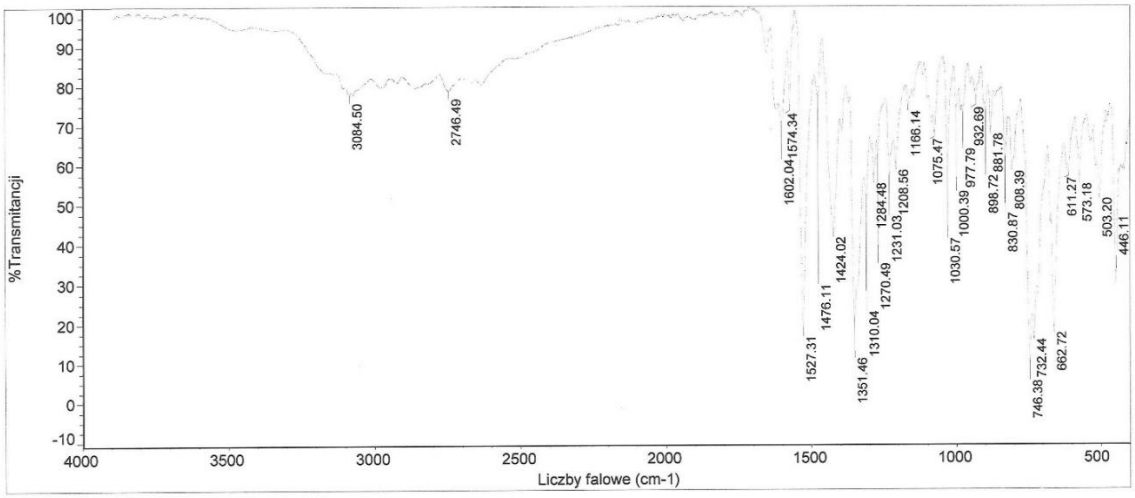
1. W. P. Nawrocka, A. Nowicka, Selected Methods of the Synthesis of 2-amino-1H-benzimidazoles, Wiad. Chem. 67, 7-8 (2013) str. 715-732.
2. M. Hranjec, Sinteze potpomognute mikrovalovima, nastavni tekst, Zagreb: Fakultet kemijskog inžinjerstva i tehnologije 2017.
3. R.W. III. Huigens, S. Reyes, C.S. Reed, C. Bunders, S.A. Rogers, A.T. Steinhauer, Ch. Melander, The chemical synthesis and antibiotic activity of a diverse library of 2-aminobenzimidazole small molecules against MRSA and multidrug-resistant A. baumannii. Bioorg. Med. Chem. 18 (2010) 663-674.
4. S. O. Podunavac-Kuzmanović, D. D. Cvetković, Lipophilicity and antifungal activity of some 2-substituted benzimidazole derivatives, Chem. Ind. Chem. Eng. Q. 17 (2011) 9-15.
5. B. Bukowska, A. Marczak, Aurora a kinase inhibitors as a new approach of ovarian cancer treatment, PBK. 4 (2015) 633-644.
6. M. Zhong, M. Bui, W. Shen, S. Baskaran, D. A. Allen, R. A. Elling, W. M. Flanagan, A. D. Fung, E. J. Hanan, S. O. Harris, S. A. Heumann, U. Hoch, S. N. Ivy, J. W. Jacobs, S. Lam, H. Lee, R. S. McDowell, J. D. Oslob, H. E. Purkey, M. J. Romanowski, J. A. Silverman, B. T. Tangonan, P. Taverna, W. Yang, J. C. Yoburn, C. H. You, K. M. Zimmerman, T. O'Brien, W. Lew, 2-Aminobenzimidazoles as potent Aurora kinase inhibitors, Bioorg. Med. Chem. Lett. 19 (2009) 5158-5161.
7. W. P. Nawrocka, A. Nowicka, H. Liszkiewicz: Biological activity of 2-amino-1H-benzimidazole derivatives. Part I., Wiad. Chem. 66 (2012) 811-838.
8. Škorić I., Molekulska spektroskopija, nastavni tekst, Zagreb: Fakultet kemijskog inžinjerstva I tehnologije,
9. I. Rak, Michael-ove kondezacije acetofenona I dietil-maleata, Diplomski rad, Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku 2012.
10. I. Jerković, A. Radonić, Praktikum iz organske kemije, Kemijsko-tehnološki fakultet – Split, 2007
11. A. Nowicka, H. Liszkiewicz, W. P. Nawrocka, J. Wietrzyk, K. Kempińska, A. Dryś, Synthesis and antiproliferative activity vitro of new 2-aminobenzimidazole derivatives. Reaction of 2-arylideneamizobenzimidazole with selected nitriles containing active methylene group. Cent. Eur. J. Chem. 12 (2014).

12. URL: http://www.vasdoktor.com/medicina-od-a-do-z/infektivne-i-parazitarne-bolesti/456-infekcije-gram-negativnim-bacilima (26.09.2018)
13. A. Nowicka, W.P. Nawrocka, H. Liszkiewicz, J. Wietrzyk, A. Anisiewicz, W. Kolodziejczyk: Synthesis and in vitro antiproliferative activity of novel mannich bases-2-arylideneaminobenzimidazoles derivatives. Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research. 75 (2018) 397-405.
14. URL: http://www.nmrdb.org/new_predictor/index.shtml?v=v2.95.0 (22.09.2018.)

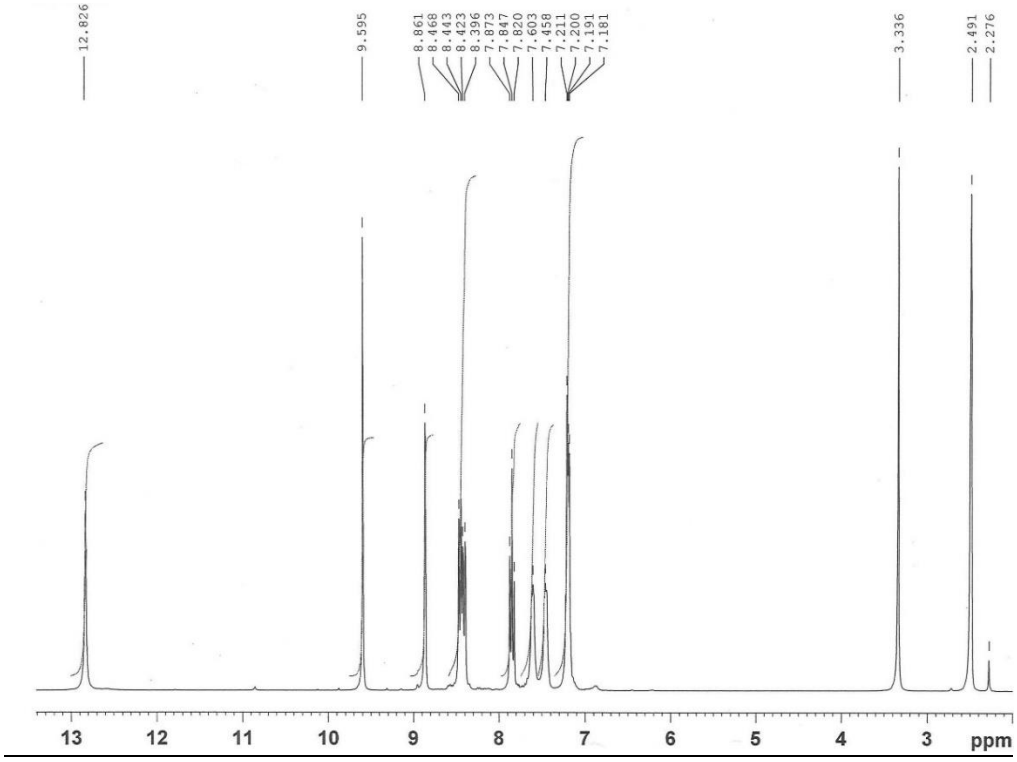
6. PRILOZI

2-(3-nitrobenzoliden)amino-1*H*-benzimidazol (2)



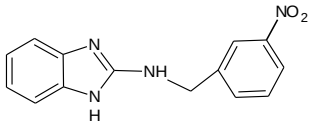


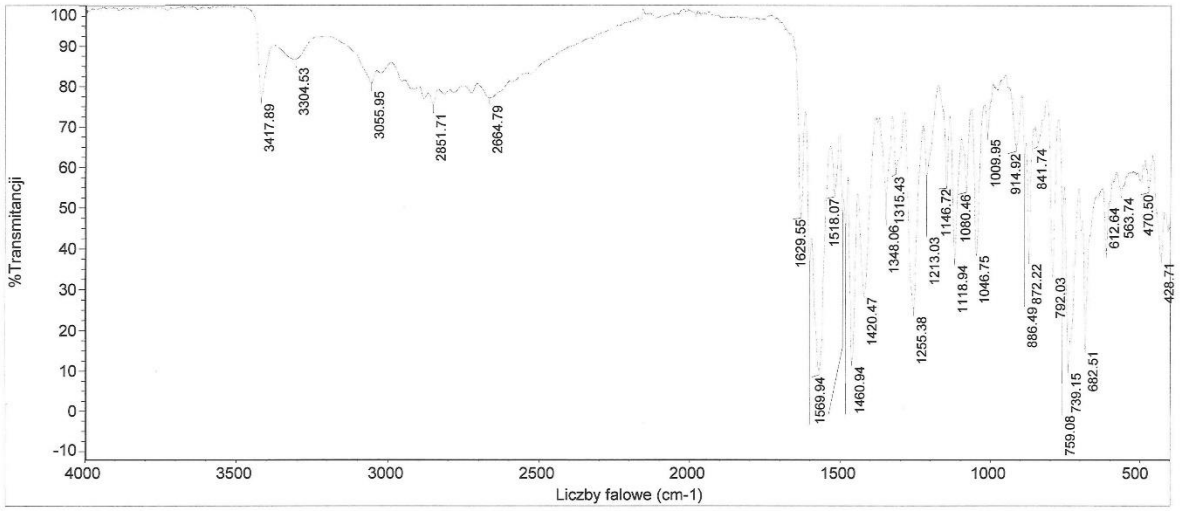
Prilog 1. IR spektar spoja 2



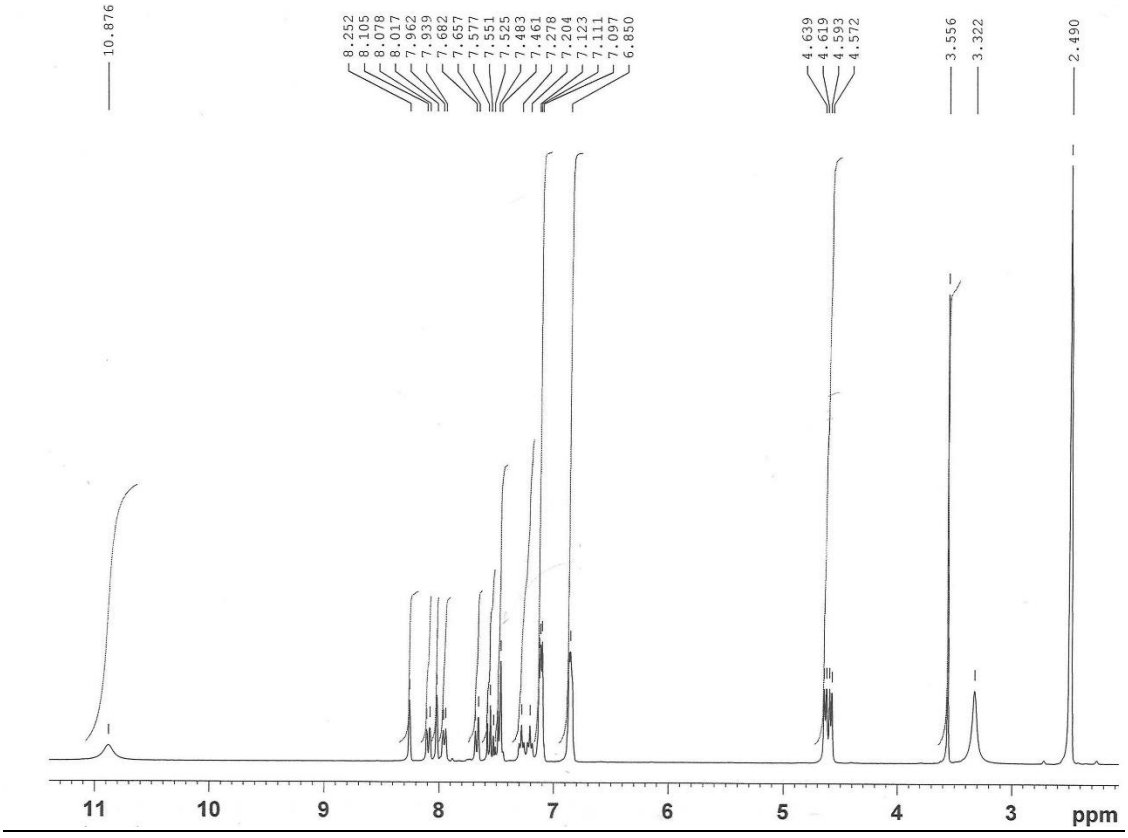
Prilog 2. ^{1}H NMR spektar spoja 2

2-(3-nitrobenzil)amino-1H-benzimidazol (3)



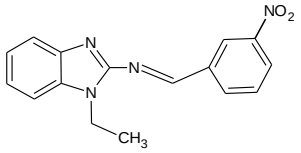


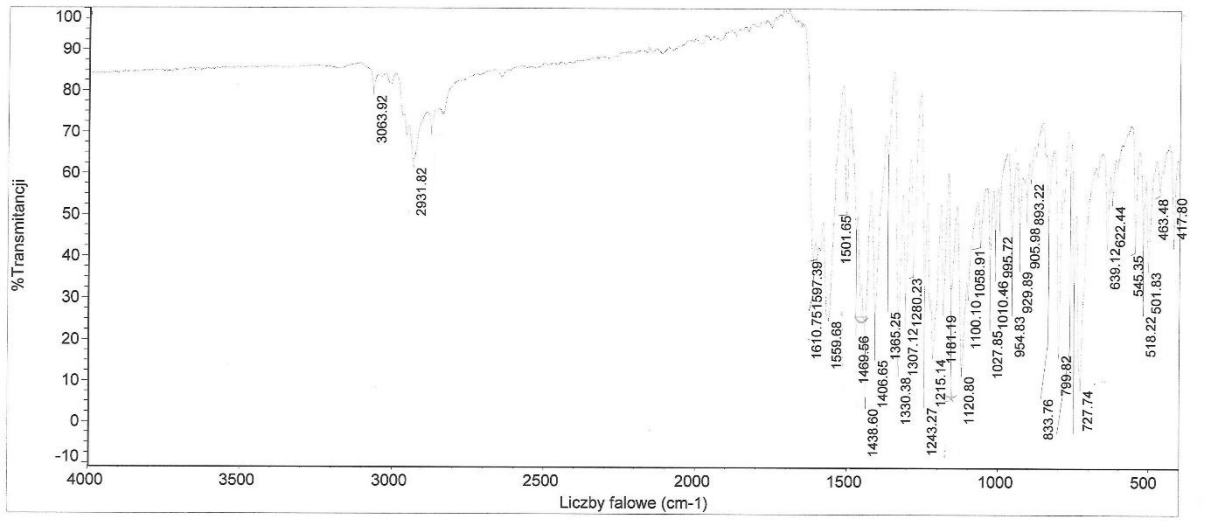
Prilog 3. IR spektar spoja 3



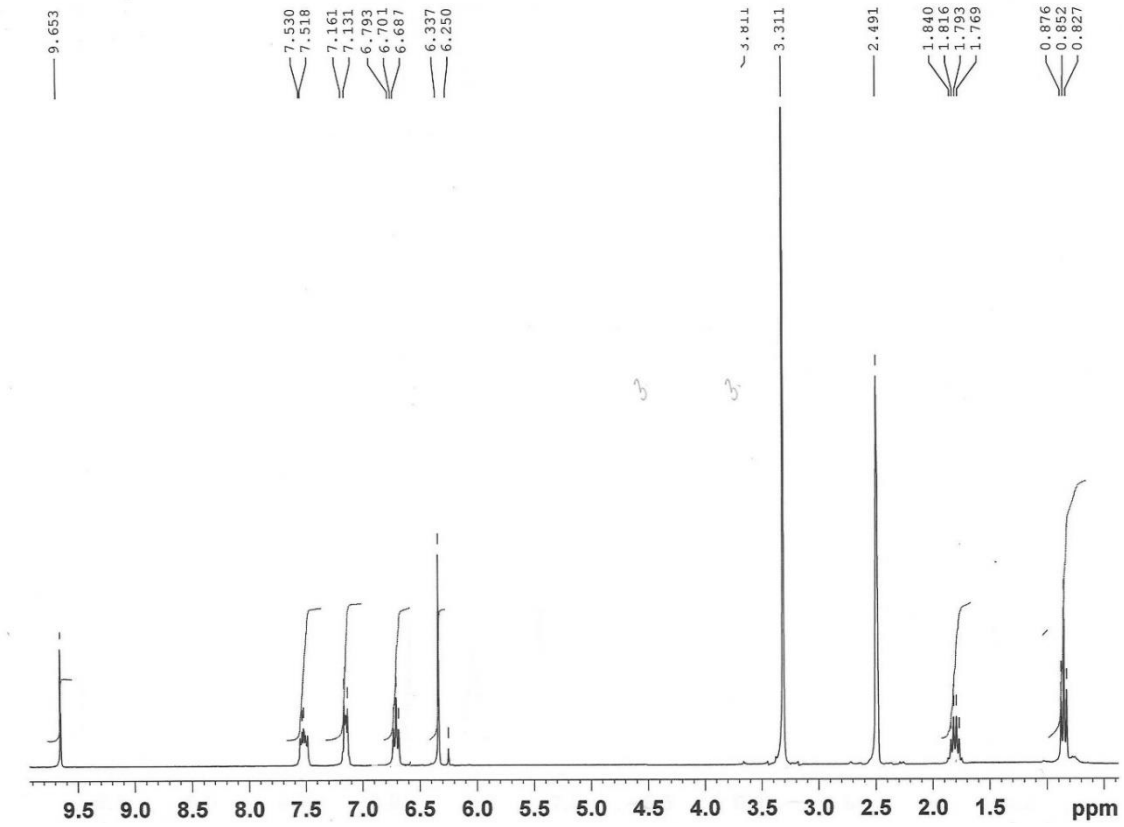
Prilog 4. ^{1}H NMR spektar spoja 3

1-Etil-2-(3-nitrobenziliden)amino-1H-benzimidazol (4)



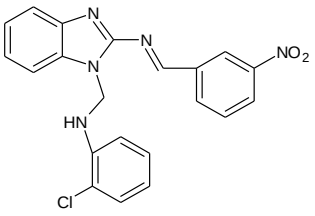


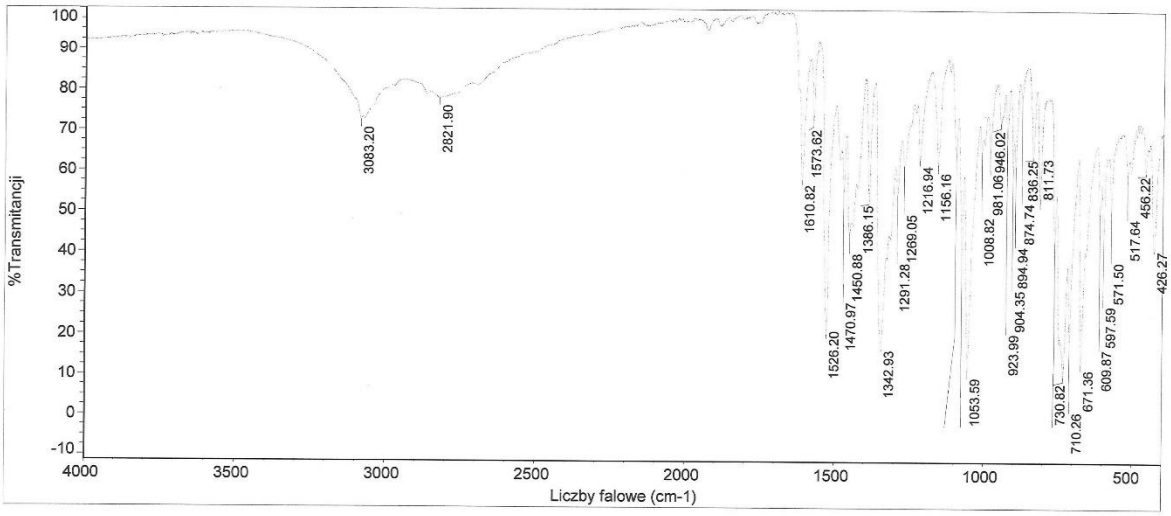
Prilog 5. IR spektar spoja 4



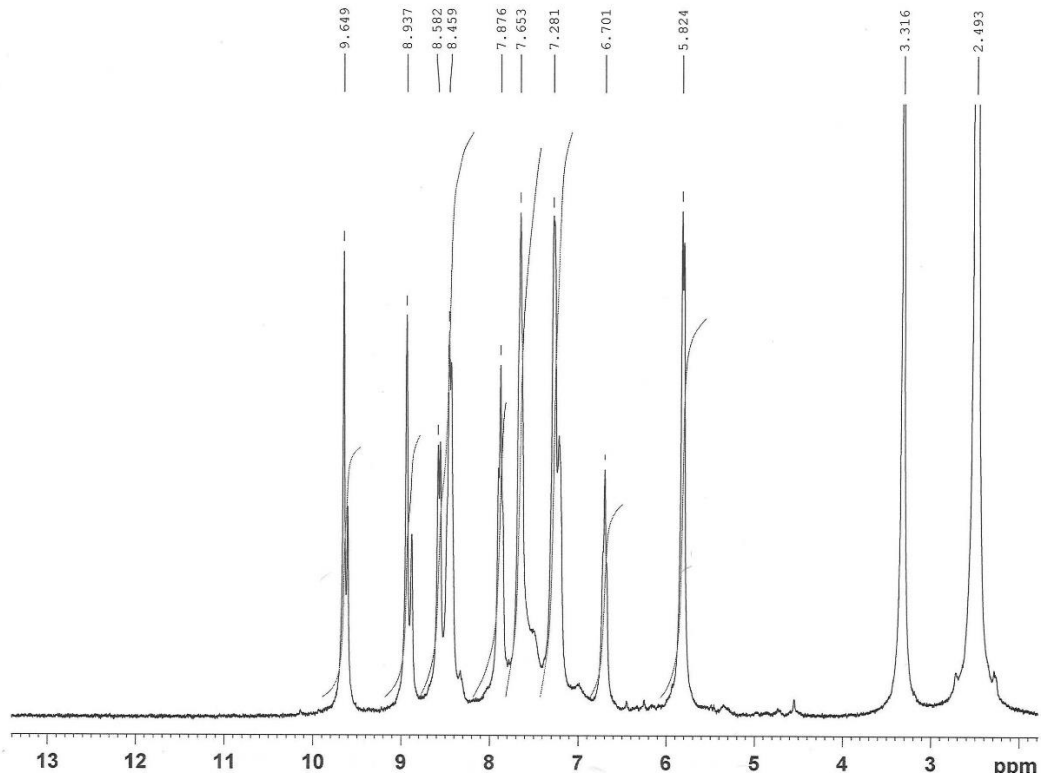
Prilog 6. ^{1}H NMR spektar spoja 4

1-{[(2-Klorfenil)amino]metil}-2-(3-nitrobenzilidenamino)-benzimidazol (5a)



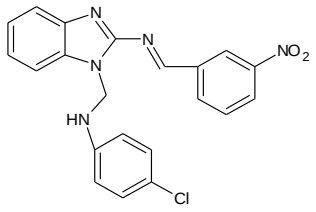


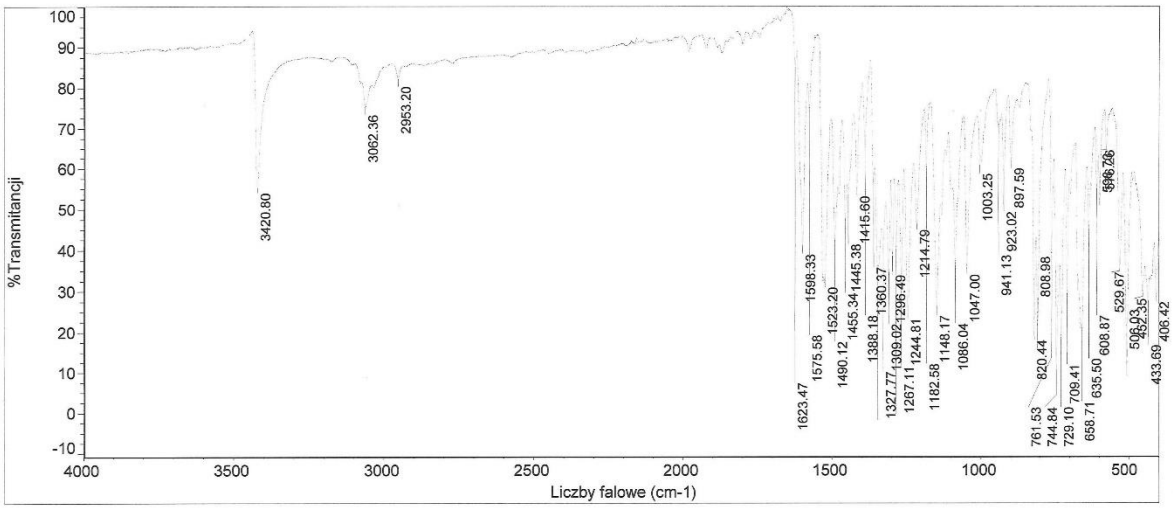
Prilog 7. IR spektar spoja 5a



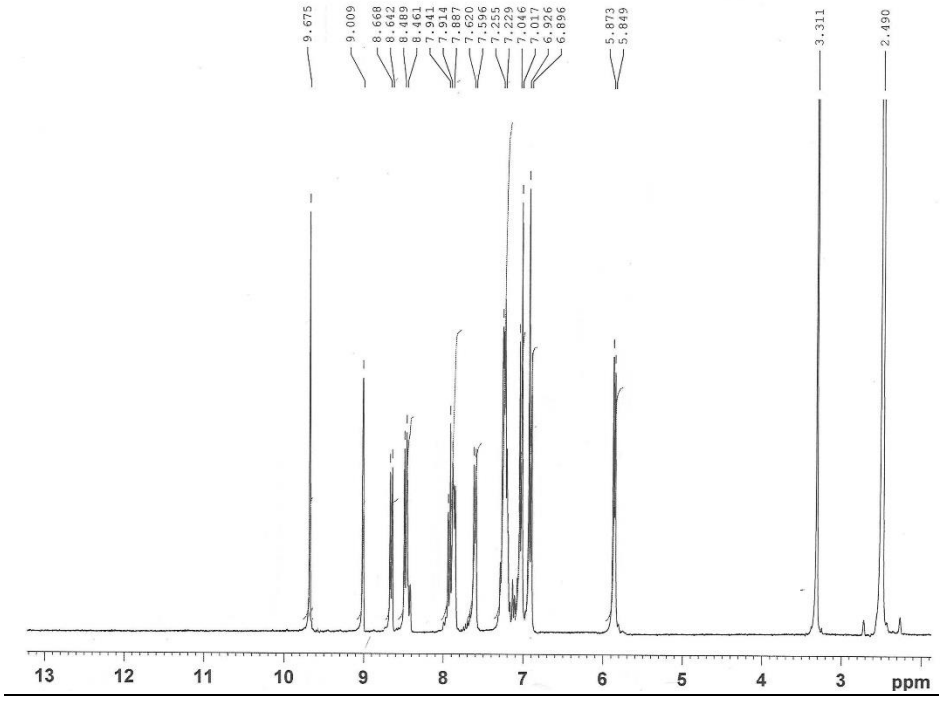
Prilog 8. ^{1}H NMR spektar spoja 5a

1-{[(4-Klorfenil)amino]metil}-2-(3-nitrobenzilidenamino)-benzimidazol (5b)



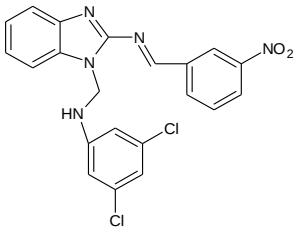


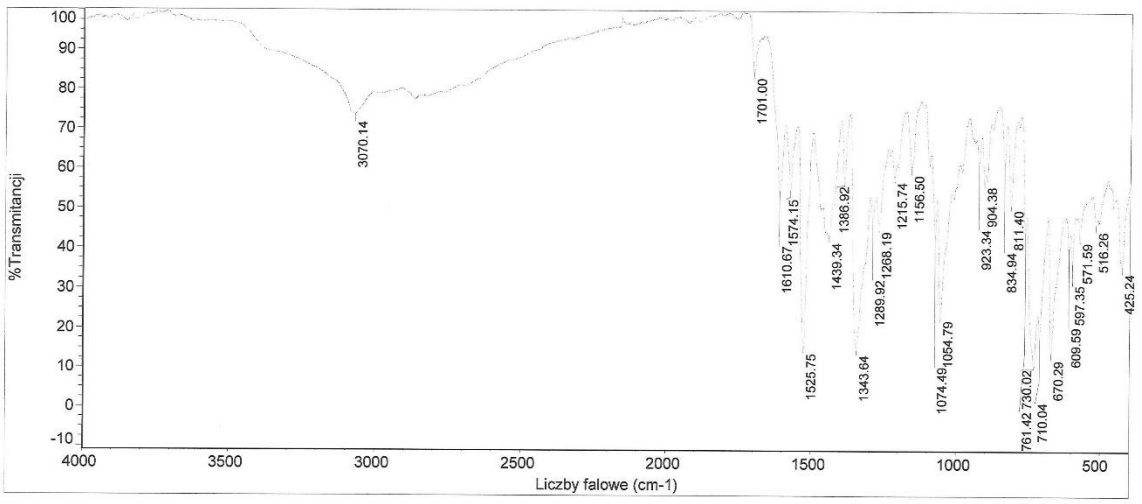
Prilog 9. IR spektar spoja 5b



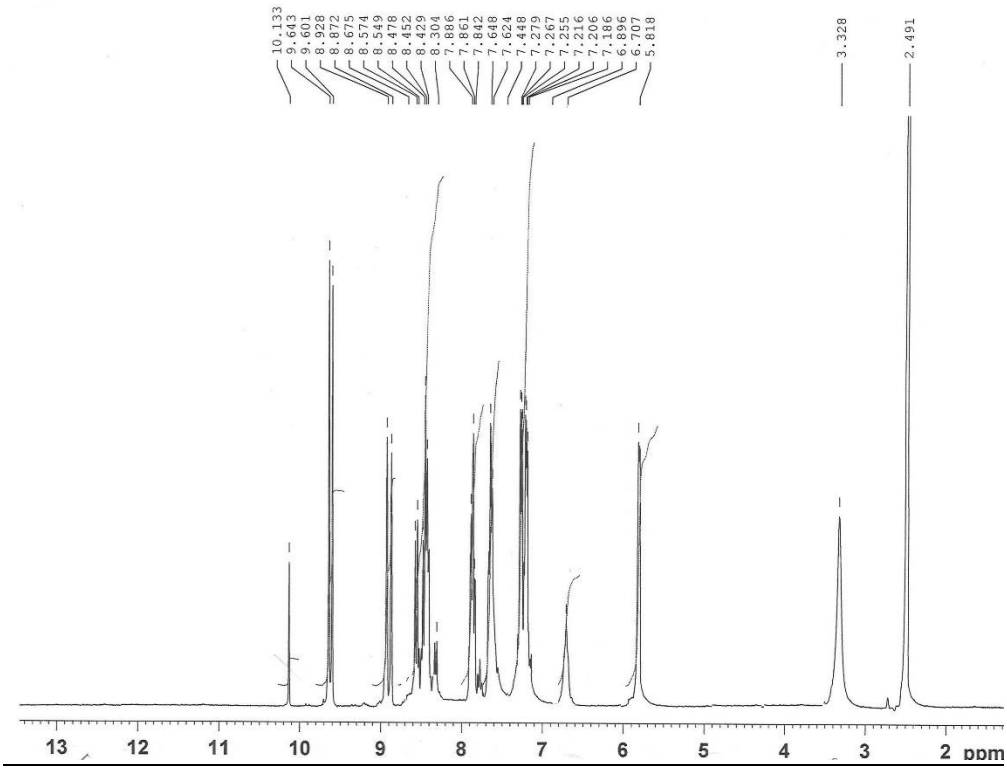
Prilog 10. ^{1}H NMR spektar spoja 5b

1-{[(3,5-Diklorfenil)amino]metil}-2-(3-nitrobenzilidenamino)-benzimidazole (6a)



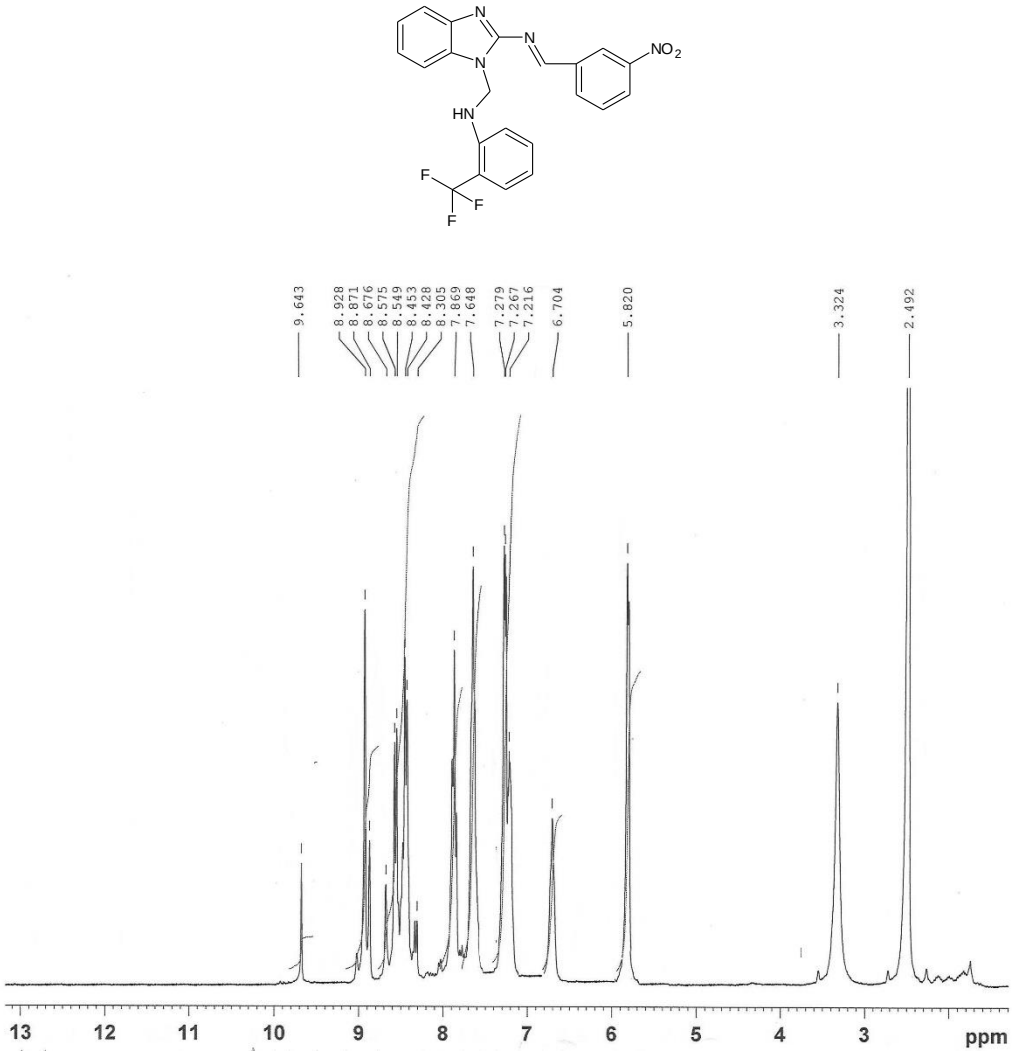


Prilog 11. IR spektar spoja 6a

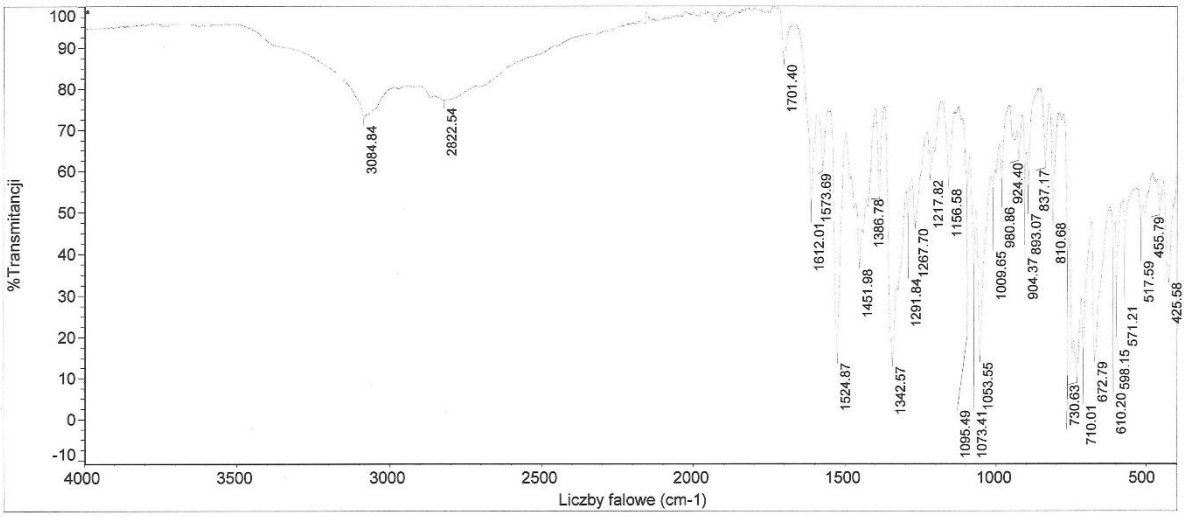


Prilog 12. ^{1}H NMR spektar spoja 6a

1-{[(2-(Trifluormetil)fenil)amino]metil}-2-(3-nitrobenzilidenamino)-benzimidazol (7a)

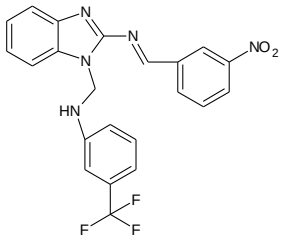


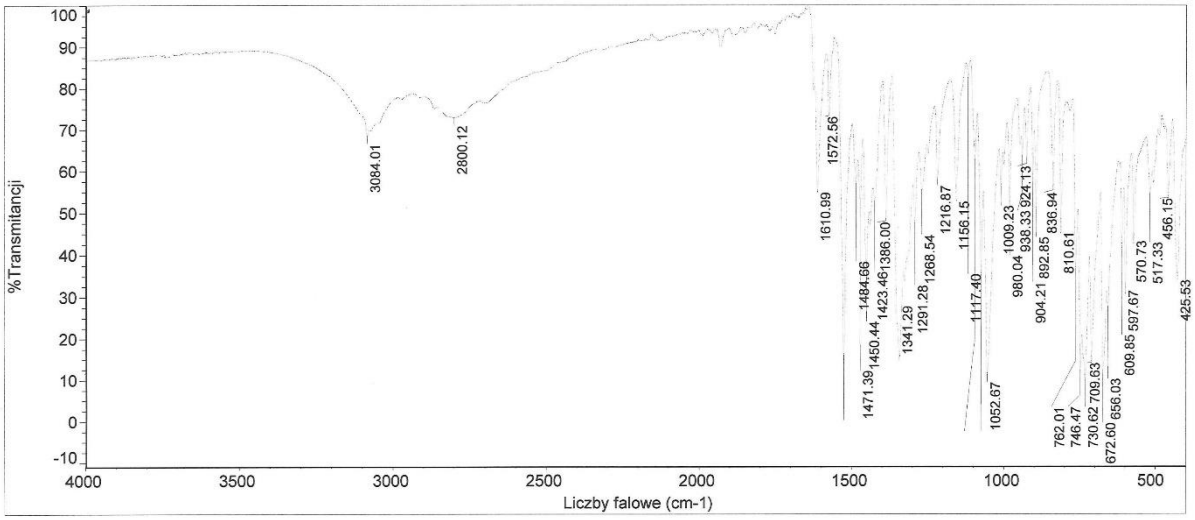
Prilog 13. IR spektar spoja 7a



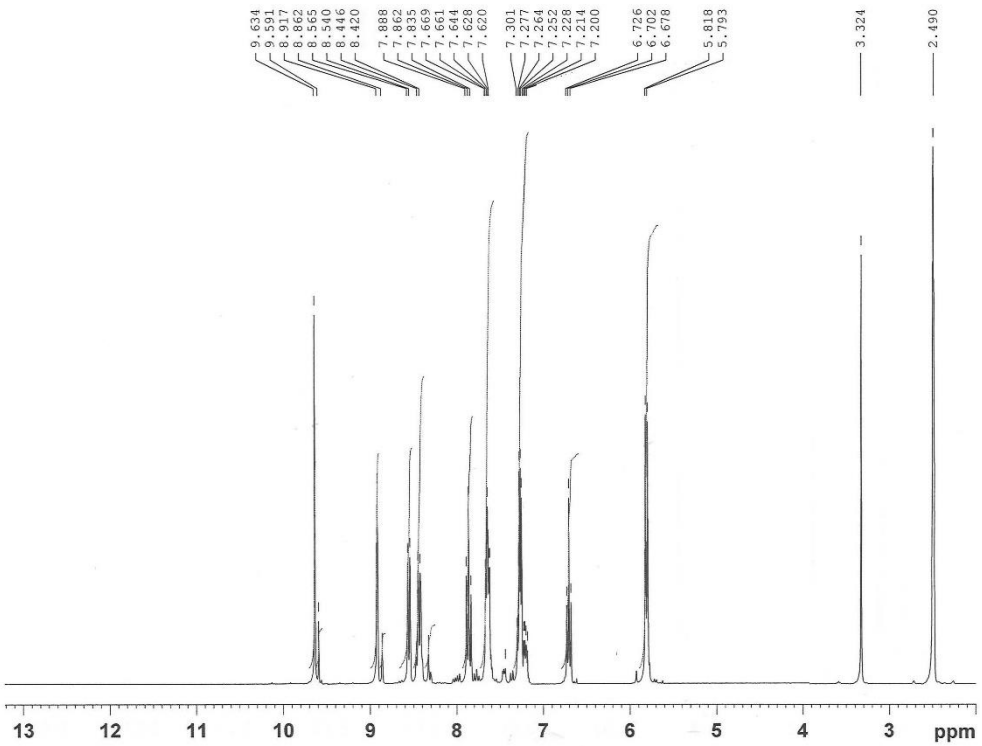
Prilog 14. ^{1}H NMR spektar spoja 7a

1-{[(3-(Trifluormetil)fenil)amino]metil}-2-(3-nitrobenzilidenamino)-benzimidazol (7b)



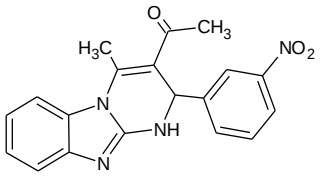


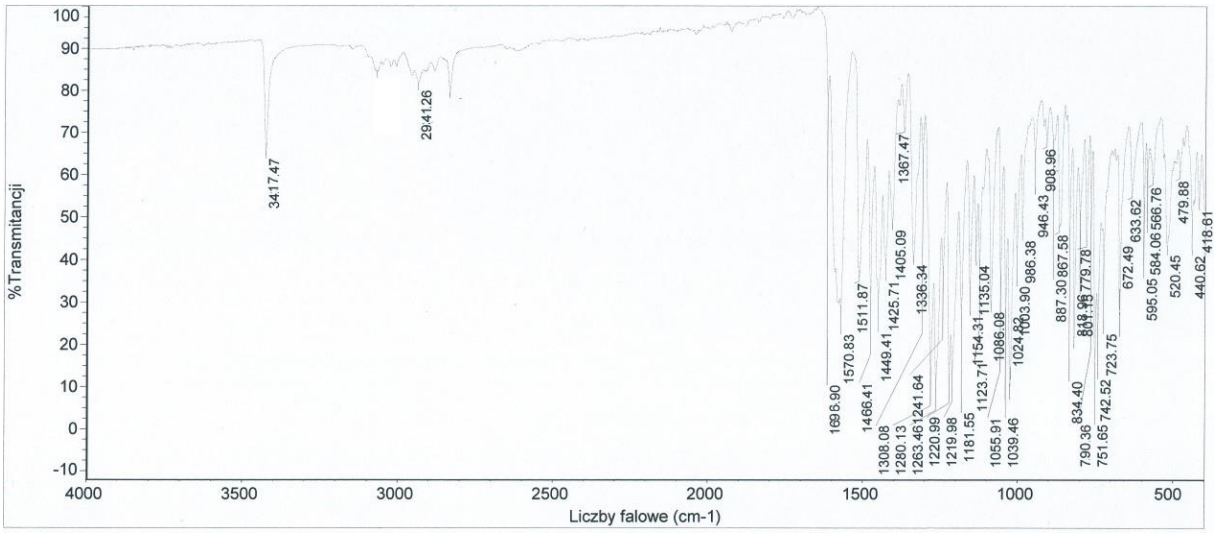
Prilog 15. IR spektar spoja 7b



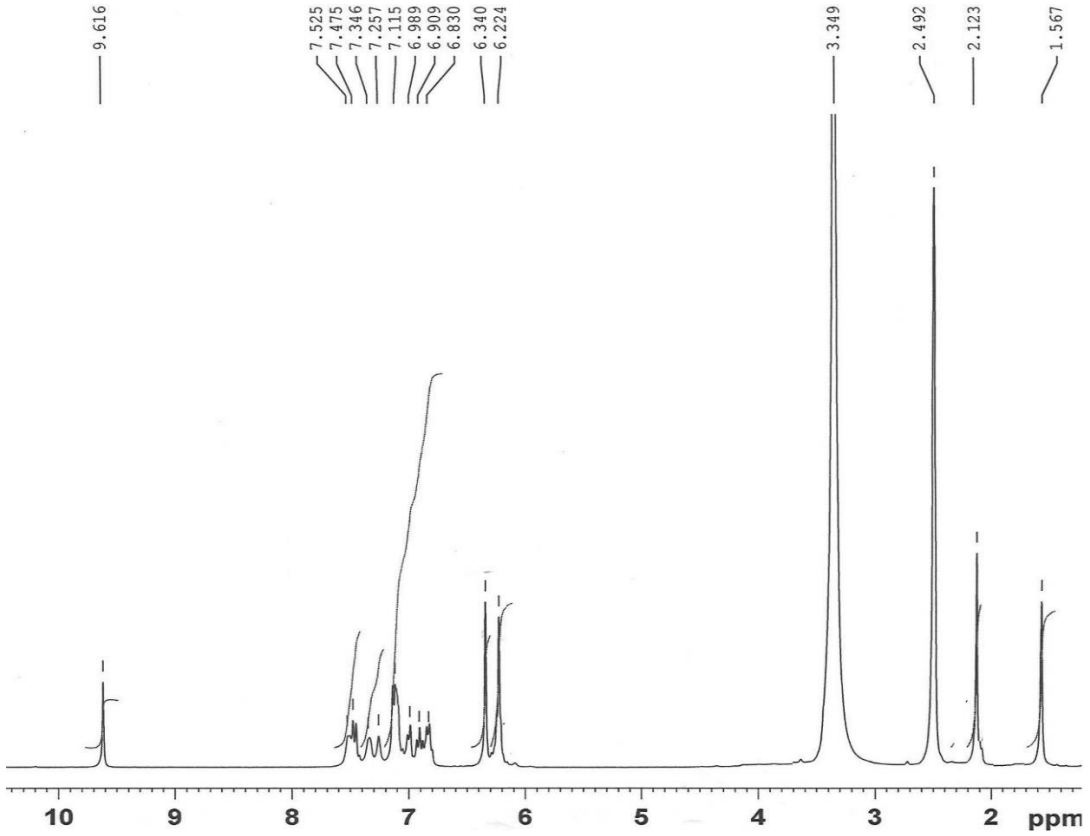
Prilog 16. ^{1}H NMR spektar spoja 7b

3-Acetil-2-(3-nitrofenil)-4-metil-1,2-dihidropirimido[1,2-a]-benzimidazol (8)



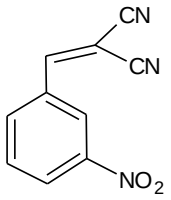


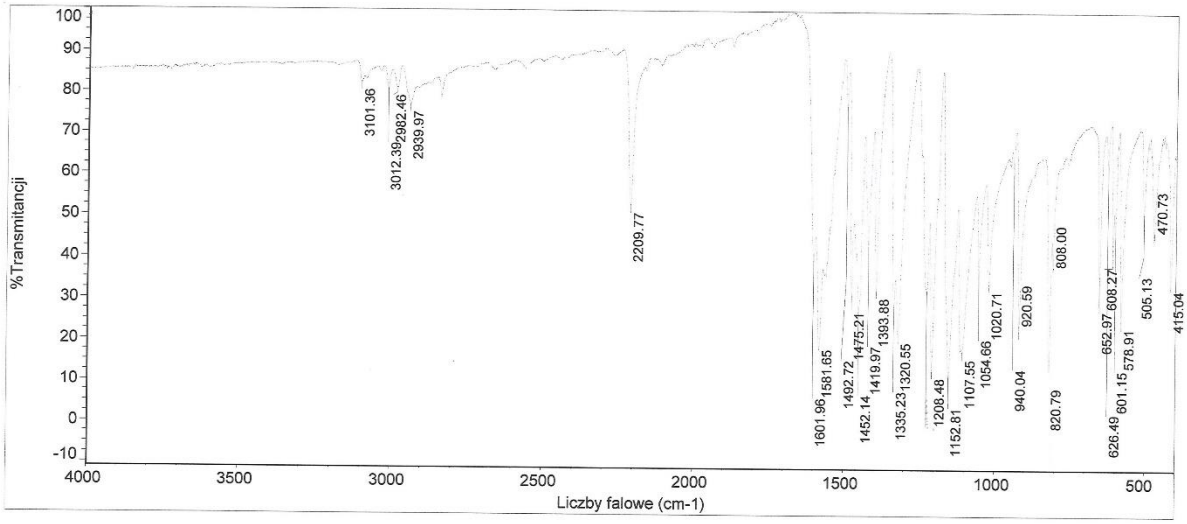
Prilog 17. IR spektar spoja 8



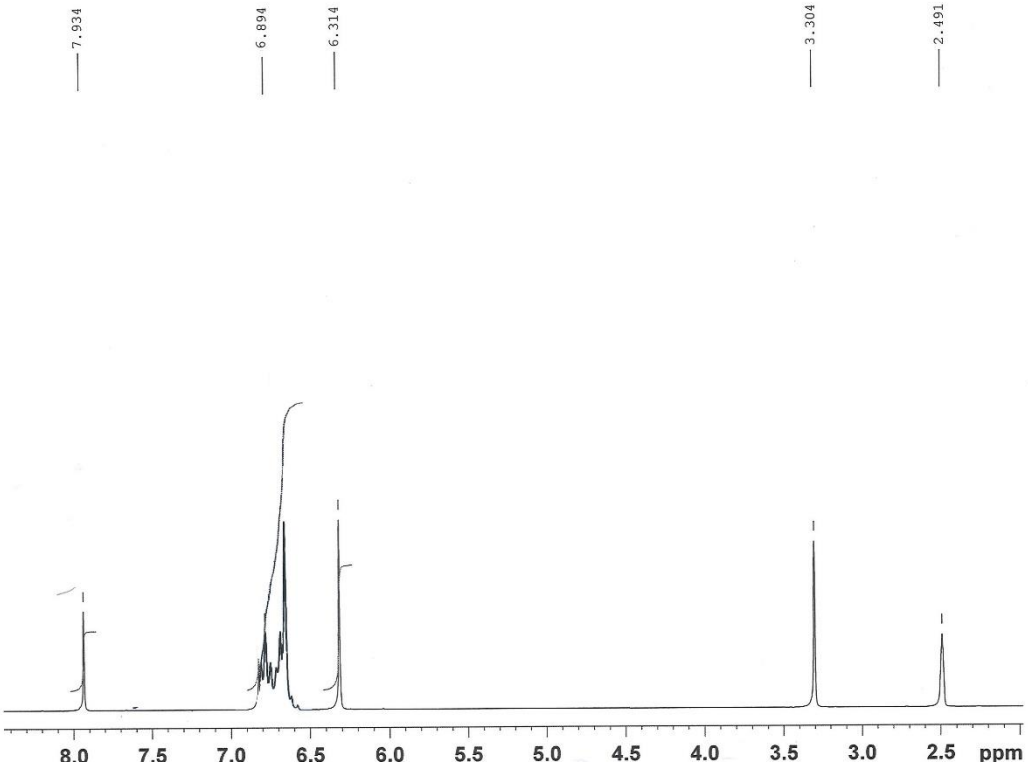
Prilog 18. ^{1}H NMR spektar spoja 8

α-Cijano-3-nitrocinaminski nitril (9)





Prilog 19. IR spektar spoja 9



Prilog 20. ^{1}H NMR spektar spoja 9