



Univerzitet u Novom Sadu  
Prirodno-matematički fakultet  
Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu  
životne sredine



Ms Bojana Vasiljević

**MIKROTALASNO STIMULISANA SINTEZA ODABRANIH DERIVATA  
NAFTENSKIH I ŽUČNIH KISELINA, ISPITIVANJE NJIHOVE  
BIOLOŠKE AKTIVNOSTI KAO I TERMIČKE I HEMIJSKE  
STABILNOSTI ODABRANIH LEKOVA**

**-doktorska disertacija-**

Novi Sad, 2014.

## PREDGOVOR

Ova doktorska disertacija je urađena na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, pod mentorstvom prof. dr Vere Ćirin-Novta, redovnog profesora PMF-a u Novom Sadu, a u okviru projekta "Sinteza i biološka ispitivanja novih mimetika ili derivata odabranih citotoksičnih laktona, antitumorskog agensa tijazofurina i prirodnih naftnih kiselina", finansiranog od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.

Najiskrenije se zahvaljujem svom mentoru, **prof. dr Veri Ćirin-Novta**, redovnom profesoru PMF-a u Novom Sadu u penziji, na svestranoj i nesebičnoj pomoći prilikom planiranja, izrade i pisanja ovog rada. **Mnogo hvala prof. dr Velimir Popsavinu**, redovnom profesoru PMF-a u Novom Sadu, na pomoći i podršci tokom izrade ove doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem **prof. dr Mirjani Popsavin**, redovnom profesoru PMF-a u Novom Sadu, na stručnoj pomoći prilikom snimanja i tumačenja NMR spektara, kao i na podršci i dragocanim savetima prilikom izrade i pisanja ove doktorske disertacije.

**Mnogo hvala prof. dr Slavku Kevrešanu**, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu u penziji, na velikoj pomoći prilikom planiranja i izvođenja eksperimenata u okviru bioloških istraživanja.

Zahvaljujem se **prof. dr Janošu Čanadiju**, redovnom profesoru PMF-a u Novom Sadu, na snimanju i tumačenju NMR spektara, kao i na rezultatima koji su ostvareni u okviru međunarodnog IPA projekta.

Veliko hvala, **prof. dr Kseniji Kuhajdi**, redovnom profesoru PMF-a u Novom Sadu u penziji, **prof. dr Evgeniji Đurendić**, redovnom profesoru PMF-a u Novom Sadu, **prof. dr Katarini Penov Gaši**, redovnom profesoru PMF-a u Novom Sadu, i **prof. dr Mariji Sakač**, redovnom profesoru PMF-a u Novom Sadu, na pomoći, stručnim savetima i posvećenom vremenu tokom pisanja i izrade ovog rada.

Veliko hvala **dr Ljubici Grbović**, docentu PMF-a u Novom Sadu, na prenešenom znanju i ljubavi prema organskoj hemiji, kao i na pomoći i podršci tokom izrade i pisanja ove doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem **prof. dr Valeriji Gužvanji**, vanrednom profesoru PMF-a u Novom Sadu, na pomoći da budem deo CEEPUS projekta međunarodne razmene studenata.

**Mnogo hvala prof. dr Christian Oliver Kappe-u**, profesoru Univerziteta u Gracu, kao i kolegama iz Christian Doppler Laboratory for Microwaves u Gracu na prenesenoj ljubavi prema mikrotalasnoj tehnologiji i njenom razumevanju.

Takođe bih se zahvalila **dr Simonidi Đurić**, docentu Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, **dr Timei Hajnal-Jafari** i **dr Dragani Stamenov** na realizaciji i tumačenju mikrobioloških testova. Zahvaljujem se i

*dr Gordani Bogdanović i dr Vesni Kojić* specijalistima toksikološke hemije (Institut za onkologiju Vojvodine, Sremska Kamenica) na urađenim testovima citotoksičnosti.

Veliku zahvalnost dugujem i **dr Branislavu Joviću**, docent PMF-a u Novom Sadu, i **ms Branku Kordiću**, istraživaču-saradniku PMF-a u Novom Sadu, na snimanju i pomoći u tumačenju IR spektara.

Najtoplije se zahvaljujem **dr Dejanu Orčiću**, docentu PMF-a u Novom Sadu i **ms Kristini Bekvalac**, stručnom saradniku za hromatografske tehnike, na snimljenim HPLC.

Veliko hvala **mr Kseniji Pavlović**, asistentu PMF-a u Novom Sadu, na podršci, druženju i svim onim zajedničkim trenucima koje smo provele u našoj maloj laboratoriji u radu sa crnim zlatom.

Veliku zahvalnost dugujem i mojoj kolegini **Sanji Vlasisavljević**, istraživaču-saradniku PMF-a u Novom Sadu, na velikom prijateljstvu, energiji i osmehu kojim je ispunjavala moju laboratoriju.

Zahvalnost za odličnu saradnju i druženje dugujem i mojim kolegama **dr Andrei Nikolić**, **dr Marini Savić**, **dr Jovani Ajduković**, **dr Bojani Srećo-Zelenović**, **dr Goranu Benedekoviću**, **ms Jovani Francuz**, **ms Jeleni Marković**, **ms Dušanu Škoriću**, **ms Ivani Kovačević** **ms Ivani Kuzminac Aleksandru Oklješi**, **Srđanu Bjedovu**, **Nemanji Nikolić**, **Ester Foro**, **Otu Arčonu** i **Silviji Kantardžić**.

*Od sveg srca se zahvaljujem mojoj porodici, majci, sestri i suprugu na ogromnoj i bezuslovnoj ljubavi, pažnji i toplini.*

*Nemerljivu zahvalnost dugujem neponovljivoj snazi volje...  
dunuvši u moja krila pustila me je da letim kroz snove,*

*Mom ocu,  
Autor*

# SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	3
2.1. Mikrotalasna sinteza	3
2.2. Priroda mikrotalasnog zračenja	5
2.2.1. Mikrotalasno dielektrično zagrevanje	6
2.2.2. Dielektrične karakteristike medijuma	8
2.2.3. Mikrotalasi nasuprot konvencionalnog zagrevanja	11
2.2.4. Mikrotalasni efekti	12
2.3. Kontrola i praćenje temperature u mikrotalasnom reaktoru	17
2.4. Mikrotalasni reaktori za organsku sintezu	20
2.5. Značaj i primena silicijum-karbida u oblasti mikrotalasno-stimuliranih reakcija	23
2.5.1. Fizičko-hemijske silicijum-karbida	23
2.5.2. Mikrotalasna sinteza u silicijum-karbidnim reakcionim sudovima	23
2.6. Mikrotalasno-stimulirana degradacija aktivnih supstanci lekova	29
2.6.1. Studije stabilnosti aktivnih farmaceutskih ingredijenata	29
2.6.2. Mikrotalasno-stimulirana degradacija lekova	31
2.7. Nafta-energent i izvor organskih jedinjenja	32
2.7.1. Naftenske kiseline	32
2.7.2. Fizičko-hemijske osobine naftnih kiselina	35
2.7.3. Derivatizacija naftenskih kiselina	35
2.7.3.1. Amidacija karboksilnih kiselina	36
2.7.3.2. Sintaza estara karboksilnih kiselina	40
2.8. Biološka aktivnost naftenskih kiselina	43
3. NAŠI RADOVI	46
3.1. Fizičko-hemijska stabilnost silicijum-karbidnih reakcionih sudova	48
3.2. Mikrotalasno-stimulirana degradacija aktivnih farmaceutskih komponenata	53
3.2.1. Ispitivanje stepena stabilnosti indometacina pri konvencionalnim reakcionim uslovima	55
3.2.2. Mikrotalasno-stimulirana degradacija indometacina	56
3.2.3. Mikrotalasno-stimulirana degradacija Pyr3 i omeprazola	58
3.2.4. Paralelna mikrotalasno-stimulirana degradacija indometacina u silicijum-karbidnim pločama	60
3.3. Ispitivanje postojanja netermičkih mikrotalasnih efekata	66
3.4. Mikrotalasno-stimulirane <i>neat</i> sinteze derivata naftenskih kiselina	68

3.4.1. Sinteza sekundarnih amida individualnih naftenskih kiselina	68
3.4.2. Sinteza sekundarnih amida naftenskih kiselina <i>Velebit</i> i <i>Aldrich</i>	74
3.4.3. Sinteza tercijskih amida individualnih naftenskih kiselina	76
3.4.4. Sinteza tercijskih amida naftenskih kiselina <i>Velebit</i> i <i>Aldrich</i>	79
3.4.5. Esterifikacija i aminoliza sintetizovanih estara individualnih i smeše naftenskih kiselina	80
3.4.6. Sinteza holin-estara naftenskih kiselina <i>Aldrich</i>	83
3.4.7. Sinteza i derivatizacija 5 $\beta$ -holanske kiseline	85
3.5. Biološka aktivnost naftenskih kiselina i njihovih derivata	93
3.5.1. Auksinska aktivnost naftenskih kiselina i njihovih derivata	93
3.5.2. Ožiljavanje reznica biljaka	97
3.5.3. Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti	100
3.5.4. Uticaj slobodnih i derivatizovanih naftenskih kiselina <i>Velebit</i> na brojnost ispitivanih sojeva <i>Pseudomonas sp</i>	102
4. EKSPERIMENTALNI DEO	105
4.1. Poređenje stabilnosti SiC i <i>Pyrex</i> reakcionih sudova u uslovima bazne hidrolize nitrila	107
4.2. Ispitivanje fizičko-hemijske stabilnosti <i>Pyrex</i> i SiC viala	107
4.3. Hemijska degradacija indometacina do 5-metoksi-2-metil-3-indolsirćetne kiseline ( <b>4</b> ) i 4-hlorobenzojeve kiseline ( <b>5</b> )	109
4.4. Oksidativna degradacija indometacina do 4-hlor- <i>N</i> -[4-metoksi-2-(1-metilen-2-oksopropil)fenil]-benzamid ( <b>7</b> ) i 8-(4-hlorbenzoil)-3a-hidroksi-5-metoksi-8a-metil-3,3a,8,8a-tetrahidro-2 <i>H</i> -furo[2,3- <i>b</i> ]indol-2-ona ( <b>8</b> )	110
4.5. Hemijska degradacija Pyr3 do 1-(4-aminofenil)-5-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -pirazol-4-karboksilne kiseline ( <b>11</b> ) i 2,3,3-trihloro-2-propenske kiseline ( <b>12</b> )	111
4.6. Hemijska degradacija omeprazola do 5-metoksi-1,3-dihidro-2 <i>H</i> -benzimidazol-2-on ( <b>14</b> ) i 6-metoksi-2-[[4-metoksi-3,5-dimetil-2-piridinil]metil]sulfanil}-1 <i>H</i> -benzimidazola( <b>15</b> )	112
4.7. Hemijska degradacija indometacina do amonijumove soli indometacina ( <b>16</b> )	112
4.8. <i>N</i> -Fenilbenzamid ( <b>17</b> )	112
4.9. <i>N</i> -Fenilcikloheksankarboksamid ( <b>18</b> ) i <i>N</i> -fenildekanamid ( <b>19</b> )	113
4.10. <i>N</i> -Fenil-1-adamantankarboksamid ( <b>20</b> )	114
4.11. <i>N</i> -Benzilbenzamid ( <b>21</b> ), <i>N</i> -benzilcikloheksankarboksamid ( <b>22</b> ), <i>N</i> -cikloheksilbenzamid ( <b>23</b> ) i <i>N</i> -cikloheksilcikloheksankarboksamid ( <b>24</b> )	115
4.12. <i>N</i> -Fenil-, <i>N</i> -benzil- i <i>N</i> -cikloheksilamidi naftenskih kiselina <i>Velebit</i> ( <b>27, 28, 29</b> ) i <i>Aldrich</i> ( <b>30,31,32</b> )	116
4.13. 4-Benzoilmorfolin ( <b>33</b> )	118
4.14. 4-(Cikloheksilkarbonil)morfolin ( <b>34</b> ) i 4-dekanoilmorfolin ( <b>35</b> )	119
4.15. Amidi morfolina naftenskih kiselina <i>Velebit</i> ( <b>36</b> ) i <i>Aldrich</i> ( <b>37</b> )	119
4.16. Benzil-benzoat ( <b>38</b> )	120
4.17. Benzil-cikloheksilkarboksilat ( <b>39</b> ) i benzil-dekanoat ( <b>40</b> )	121

4.18. Benzil-estri naftenskih kiselina <i>Velebit</i> (41) i <i>Aldrich</i> (42)	121
4.19. Holin-hlorid (43)	122
4.20. Holin-estri naftenskih kiselina <i>Aldrich</i> (44)	123
4.21. 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Diformiloksi-5 $\beta$ -holanska kiselina (45)	123
4.22. 12 $\alpha$ -Formiloksi-3 $\alpha$ -hidroksi-5 $\beta$ -holanska kiselina (46)	124
4.23. 12 $\alpha$ -Formiloksi-3-okso-5 $\beta$ -holanska kiselina (47)	124
4.24. 12 $\alpha$ -Hidroksi-3-okso-5 $\beta$ -holanska kiselina (48)	125
4.25. 3,12-Diokso-5 $\beta$ -holanska kiselina (49)	125
4. 26. Metil 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\beta$ -holanoat (50)	126
4.27. Metil 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diacetoksi-5 $\beta$ -holanoat (51)	127
4.28. Metil 7 $\alpha$ -acetoksi-3 $\alpha$ -hidroksi-5 $\beta$ -holanoat (52)	127
4.29. Metil 7 $\alpha$ -acetoksi-3-okso-5 $\beta$ -holanoat (53)	128
4.30. 3,7-Diokso-5 $\beta$ -holanska kiselina (54)	128
4.31. 3,7,12-Triokso-5 $\beta$ -holanska kiselina (55)	129
4.32. 3-Okso-5 $\beta$ -holanska kiselina (56)	129
4.33. 5 $\beta$ -Holanska kiselina (57)	130
4.34. <i>N</i> -Fenil-5 $\beta$ -holan-24-amid (58) i <i>N</i> -morfolil-5 $\beta$ -holan-24-amid (59)	131
4.35. 3 $\beta$ -Fenilamino-5 $\beta$ -holanska kiselina (60)	131
4.36. Metil 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\beta$ -holanoat (61)	132
4.37. <i>N</i> -Fenil-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\beta$ -holan-24-amid (62)	132
4.38. <i>N</i> -Propil-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\beta$ -holan-24-amid (63)	133
4.39. Test inhibicije kljanja	133
4.40. Ožiljavanje reznica suncokreta	134
5. ZAKLJUČAK	135
6. SKRAĆENICE	141
7. LITERATURA	143
8. BIOGRAFIJA	153

## 1. UVOD

Sa početkom XXI veka eksplozija tehnološkog napretka napravila je veliki korak u svim oblastima ljudskog života pa tako i u nauci sa akcentom na očuvanju životne sredine. Posledično, brzina kojom se publikuju i razmenjuju informacije i naučna otkrića neprekidno pomera postojeće granice inovativnosti čineći vreme modernog čoveka dragocenim. U oblasti organske sinteze razvoj mikrotalasne tehnologije je značajno doprineo efikasnosti izvođenja najrazličitijih hemijskih transformacija. Sa aspekta *zelene hemije* veoma su značajne mikrotalasno-stimulisane metode sinteze organskih jedinjenja u odsustvu rastvarača (*solvent-free* ili *dry-media*) i katalizatora. Brzina i lakoća kojom se dolazi do novih naučnih saznanja, razvojem sintetskih postupaka koji su ekonomski i ekološki opravdani, od velikog je značaja za iznalaženje novih, efikasnih biološki aktivnih supstanci koje se mogu dobiti iz prirodnih, lako dostupnih materijala.

Nafta, poznata kao *crno zlato*, jeste jedna od najtraženijih i najdragocenijih sirovina na svetskom tržištu. Veliki značaj kao gorivo dobila je krajem XIX veka nakon pronalaska motora s unutrašnjim sagorevanjem. Od tada je počela njena masovna prerada u benzin, petrolej, ulje za loženje, mazivo i druge proizvode široke primene. Međutim, praktično svi energetske izvori i postrojenja imaju veći ili manji štetan uticaj na životnu sredinu.

Široko rasprostranjeno mišljenje koje prevladava kao trend u nauci poslednjih desetak godina jeste da su naftenske kiseline, prirodni konstituenti nafte, ozbiljni zagađivači životne sredine koji negativno utiču na floru i faunu ekosistema ukoliko se ne eliminišu iz otpadnih voda naftne industrije. S druge strane one spadaju u fiziološki najaktivnije konstituente nafte, koje u malim koncentracijama pokazuju aktivnost analognu nekim biljnim hormonima.

Cilj ovog rada jeste iznalaženje novih, efikasnijih i bržih mikrotalasno-stimuliranih metoda hemijskih transformacija koje ne uključuju prisustvo katalizatora i organskih rastvarača (*neat* reakcije). Primenom specijalnih silicijum-karbidnih reakcionih sudova, brzina i preciznost izvođenja mikrotalasno-stimuliranih transformacija biće prikazane kroz stresne studije aktivnih farmaceutskih ingredijenata u SiC ploči, odnosno HPLC/GC vialima kao reakcionim sudovima eliminišući na taj način uticaj greške manualnog transfera uzorka uz istovremeno povećanje stepena produkcije, a sve u cilju određivanja veka trajanja lekovite supstance.

U drugom delu ove doktorske disertacije planiran je razvoj novih sintetskih metoda i modifikacija postojećih konvencionalnih metoda sinteze potencijalno biološki aktivnih supstanci iz prirodnih materijala kao što su naftenske kiseline.

Cilj je takođe utvrditi da li novosintetizovani derivati individualnih naftenskih kiselina pokazuju veću biološku aktivnost od odgovarajućih proizvoda dobijenih derivatizacijom kompleksne smeše prirodnih naftenskih kiselina *Velebit* ističući vezu između dominantnih struktura kiselina i biološke aktivnosti.



## 2. OPŠTI DEO

### 2.1. Mikrotalasna sinteza

Od najranijih dana istraživanja hemijskih transformacija uočeno je da je zagrevanje neophodno za odvijanje hemijskih reakcija i da ima važan uticaj na brzinu i način odigravanja najrazličitijih procesa. Plamenik kojeg je 1855. godine konstruisao Bunsen bio je revolucionarno otkriće, kasnije je zamenjen uljanim i vodenim kupatilima ili grejnom oblogom kao izvorom toplote. Međutim, poslednjih godina mikrotalasna energija postaje sve popularniji način zagrevanja i vođenja različitih hemijskih procesa. Razvoj mikrotalasne tehnologije započet je za vreme Drugog svetskog rata kada je ispitivan magnetron kao izvor radarskog zračenja konstantne frekvencije. Percy Spencer je, radeći na radarskim postrojenjima, slučajno otkrio da su mikrotalasi istopili čokoladu u njegovom džepu što mu je dalo ideju da bi se mikrotalasno zračenje moglo iskoristiti za pripremu hrane. Relativno brzo, 1954. godine, napravljena je prva mikrotalasna pećnica za kućnu upotrebu. Masovna proizvodnja mikrotalasnih uređaja je pojeftinila izradu magnetrona, a prve publikacije o primeni mikrotalasnog zračenja u organskoj sintezi, od strane Gedye-a i Giguere-a 1986. godine<sup>1,2</sup> predstavljaju početak nove ere u organskoj sintezi. Od tada se broj radova u kojima je primenjen ovakav način vođenja reakcije uvećava geometrijskom progresijom i danas su poznate kao mikrotalasno-stimulisane organske sinteze (*microwave-assisted organic synthesis*, MAOS)<sup>3-5</sup>. Mikrotalasna energija pokazala se kao veoma efikasna u pogledu skraćivanja vremena trajanja reakcija, višeg prinosa proizvoda kao i njegove čistoće, što je posledica smanjenog stepena odigravanja neželjenih, sporednih reakcija u poređenju sa metodama konvencionalnog zagrevanja. Zahvaljujući prednostima ove nove tehnologije došlo je do njene eksploatacije u medicinskoj hemiji i farmaceutskoj industriji<sup>6-9</sup>, sintezi polimera<sup>10,11</sup>, hemiji materijala<sup>12-14</sup>, nanotehnologiji<sup>15</sup> i biohemiji<sup>16,17</sup>.

Prvi korak ka uvođenju MAOS-a u laboratorije napravila je farmaceutska industrija oko 2000. godine. Mikrotalasna sinteza postala je idealna za brzu optimizaciju reakcionih uslova omogućavajući veoma efikasan napredak kroz "hipotezu-eksperiment-rezultat" interakciju, što je rezultovalo većim brojem odluka i zaključaka u jedinici vremena. Brzina kojom se mogu izvesti višestruke varijacije reakcionih uslova, slikovito se može opisati jutarnjom diskusijom "Šta možemo probati?" i poslepodnevnim zaključkom "Koji su rezultati?". Pored obimne biblioteke jedinjenja, dobijene paralelnom ili serijskom

sintezom, mikrotalasna sinteza otvara i nove puteve hemijskih reakcija generalno šireći postojeće granice hemije<sup>18</sup>.

U samom početku eksperimenti su izvođeni u teflonskim ili staklenim sudovima u kućnim mikrotalasnim pećnicama bez odgovarajućih merenja temperature i pritiska<sup>1,2</sup>. Pošto one nisu dizajnirane za rigorozne reakcione uslove često je dolazilo do eksplozija, usled brzog i nekontrolisanog zagrevanja reakcione smeše. Devedesetih godina prošlog veka nekoliko istraživačkih grupa je započelo eksperimente u odsustvu rastvarača (*solvent-free* ili *dry-media*) eliminišući na taj način opasnost od eksplozije<sup>19-21</sup>. U okviru ovih eksperimenata reagensi su prethodno nanošeni na manje ili više mikrotalasnno-transparentne neorganske podloge (SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ili glinu) ili snažno-apsorbujuće nosače, kao što je grafit. Odsustvo rastvarača, a često i katalizatora kao novi pristup u sintezi bio je veoma popularan, naročito u početku MAOS-a, s obzirom na to da omogućava bezbednu upotrebu mikrotalasnih peći. Međutim, mnogobrojne interesantne publikacije vezane za transformacije u odsustvu rastvarača<sup>18-22</sup> ukazuje na tehničke poteškoće vezane za neravnomerno zagrevanje, mešanje i precizno određivanje reakcione temperature. Alternativno, mikrotalasnno-stimulisana sinteza sa standardnim organskim rastvaračima, u otvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora, postavlja granice maksimalne vrednosti temperature zagrevanja reakcione smeše temperaturom ključanja samog rastvarača pod atmosferskim pritiskom. Ovaj problem se može prevazići primenom rastvarača visoke temperature ključanja kao i rastvarača sa visokom moći apsorpcije mikrotalasnog zračenja. Međutim, primena istih predstavlja ozbiljan izazov tokom obrade reakcione smeše i reciklovanja samog rastvarača. Pored toga, rizik od zapaljivosti organskih rastvarača u mikrotalasnopolju, kao i nedostatak adekvatnih mikrotalasnih reaktora koji omogućavaju preciznu kontrolu temperature i pritiska ostali su glavna briga.

Ipak, relativno spor prodor mikrotalasne tehnologije devedesetih godina prošlog veka pripisivan je nepotpunom razumevanju mikrotalasnog dielektričnog zagrevanja kao i nedostatku kontrole i reprodukcije reakcionih uslova. Pogrešnom tumačenju mikrotalasne hemije posebno je doprinela upotreba kućnih mikrotalasnih pećnica čiji je najveći nedostatak nepouzdan temperaturni monitoring što je ostavilo MAOS-u lošu reputaciju. U to vreme veliki deo organskih sintetičara nije uzimao za ozbiljno mikrotalasnju hemiju, što je dovelo do diskusije o eventualnom uticaju *specifičnih mikrotalasnih efekata* na ubrzanje hemijskih reakcija<sup>23,24</sup>.

Istorijski gledano, još od samih početaka mikrotalasne sinteze, postojale su spekulacije o postojanju tkz. *specifičnih i netermičkih mikrotalasnih efekata* usled visokog stepena ubrzanja hemijskih reakcija i prinosa proizvoda u poređenju sa eksperimentima pri konvencionalnom zagrevanju<sup>25</sup>. Tvrdnje o postojanju ovih efekata iznošene su u slučajevima gde je ishod odgovarajuće sinteze pri mikrotalasnopolju

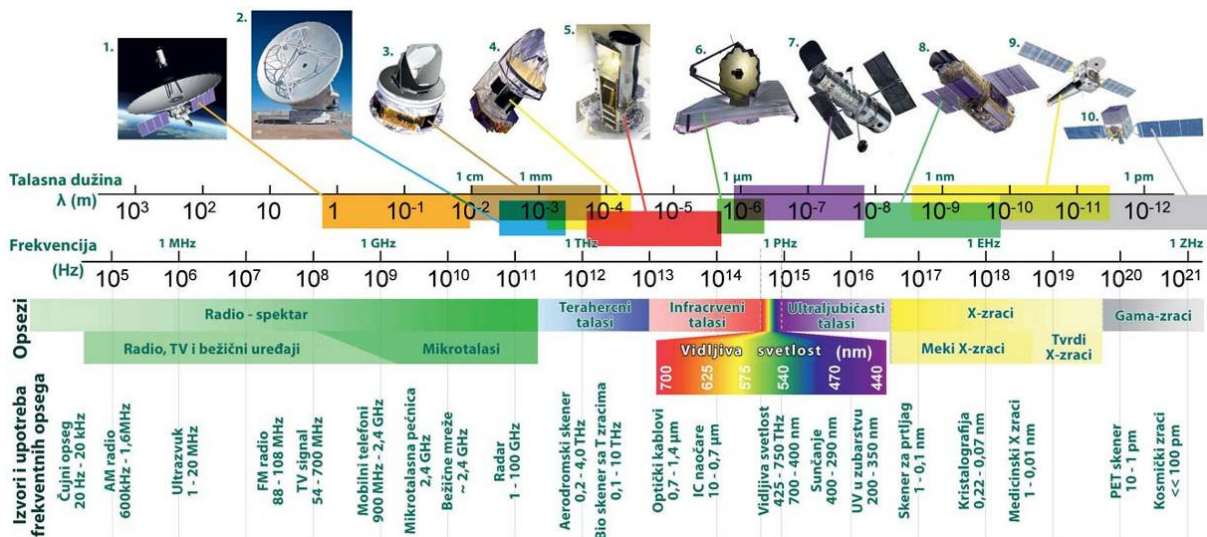
zračenju bio različit u odnosu na konvencionalno izvođen eksperiment, pri istoj reakcionoj temperaturi. Vremenom, jedan deo naučnika uvideo je da je razlog visokog stepena ubrzanja upravo *termiči/kinetički* kao posledica ubrzanog dostizanja visokih vrednosti temperatura. Zahvaljujući odnedavno dostupnim modernim mikrotalasnim reaktorima sa mogućnostima *online* praćenja tačne vrednosti temperature i pritiska u toku reakcije, neke od polaznih konfuzija i zabluda o mikrotalasnim efektima su nestale.

MAOS u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora uz upotrebu organskih rastvarača, pionirska tehnika Strauss-a sredinom 1990-ih, proslavila je svoj uspešni povratak<sup>26,27</sup>. Zahvaljujući postojanju velikog broja radova<sup>28-31</sup>, nekoliko knjiga<sup>3,4,18</sup>, specijalnih izdanja časopisa<sup>32,33</sup>, *online* baza podataka<sup>34,35</sup>, informacija na svetskim internet stranicama<sup>36</sup> i edukacionih publikacija<sup>18,37</sup> obezbeđena je opšta pokrivenost MAOS-a. Značajno je napomenuti da je detaljnom analizom naučnih publikacija utvrđeno da je u čak 90 % zastupljen metod zatvorenog sistema mono-modnog mikrotalasnog reaktora. S druge strane, veliki broj publikacija (~ 30 %) i dalje koristi kućnu mikrotalasnu pećnicu<sup>38,39</sup> koja nije prihvaćena kao instrument za mikrotalasne sinteze od strane velikog broja cenjenih naučnih časopisa današnjice (*American Chemical Society, Organic Chemistry Journals*)<sup>40</sup>.

Danas na tržištu, postoje četiri glavna proizvođača mikrotalasnih instrumenata za organsku sintezu (*Anton Paar, Biotage, Milstone* i *CEM*). Njihovi instrumenti su opremljeni sensorima za temperaturu i pritisak, magnetnim mešanjem, uređajima za kontrolu snage, softver, a usavršen je i bezbedan rad na ovim aparatima. Broj korisnika je stoga u konstantnom porastu te se samo postavlja pitanje vremena kada će većina laboratorija biti opremljena odgovarajućim mikrotalasnim reaktorom.

## 2.2. Priroda mikrotalasnog zračenja

U elektromagnetnom spektru oblast mikrotalasnog zračenja se nalazi između infracrvenog i radio talasa (*Slika 2.1.*). Ovo elektromagnetno zračenje pripada oblasti talasnih dužina od 1 mm do 1 m, što odgovara frekvenciji između 0.3 i 300 GHz. Mikrotalasna oblast, talasnih dužina od 1 do 25 cm, koristi se za radarsku emisiju dok se oblast od 25 cm do 1 m koristi u telekomunikacijama. Kućne mikrotalasne pećnice kao i mikrotalasni uređaji namenjeni za rad u laboratorijama rade na frekvenciji od 2.45 GHz, odnosno talasnoj duži od 12.25 cm, da ne bi došlo do interferencije sa telekomunikacionim uređajima i mobilnom telefonijom.



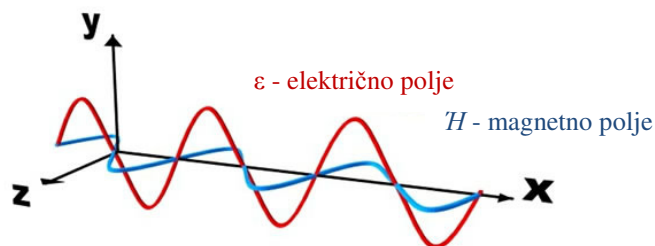
Slika 2.1. Elektromagnetni spektar.

Interesantno je napomenuti da je energija mikrotalasnog fotona (0.0016 eV) suviše niska da bi dovela do raskidanja veza u molekulu, čak i vodoničnih. Stoga je jasno da hemijske reakcije ne mogu biti indukovane direktnom apsorpcijom mikrotalasnog fotona za razliku od fotohemijских reakcija koje se odigravaju pod dejstvom ultraljubičastog i vidljivog zračenja.

### 2.2.1. Mikrotalasno dielektrično zagrevanje

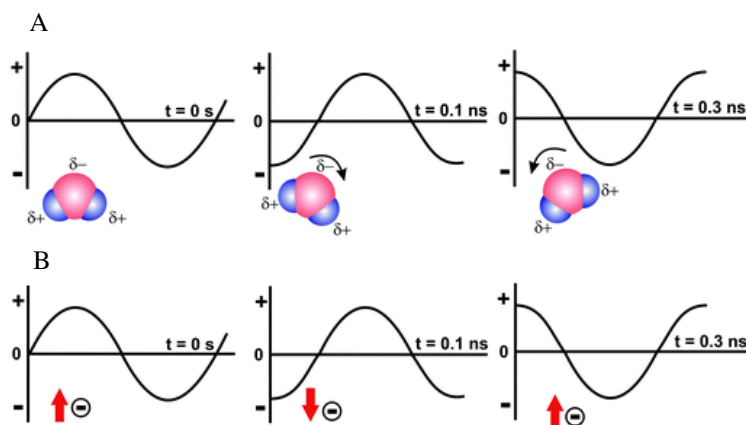
Hemija mikrotalasa se zasniva na zagrevanju materije efektom mikrotalasnog dielektričnog zagrevanja, koje zavisi od sposobnosti specifičnog materijala (npr. rastvarača ili reagensa) da apsorbuje mikrotalasnog fotona i prevede je u toplotu<sup>41,42</sup>.

Mikrotalasi se kao i svi elektromagnetni talasi sastoje od dve komponente, odnosno električnog i magnetnog polja (Slika 2.2.). Električna komponenta je odgovorna za interakcije između talasa i materije, mada je u nekim slučajevima, kao što su interakcije sa oksidima prelaznih metala<sup>43,44</sup>, značajna i komponentna magnetnog polja.



Slika 2.2. Komponente električnog i magnetnog polja u mikrotalasima.

Električna komponenta elektromagnetnog polja prouzrokuje zagrevanje preko dva osnovna mehanizma: dipolarna polarizacija i jonska kondukcija<sup>41,42,45</sup>. Interakcija komponente električnog polja sa matriksom naziva se dipolarni polarizacioni mehanizam (Slika 2.3.).



Slika 2.3. Dipolarni polarizacioni mehanizam (A) i mehanizam jonske kondukcije (B).

Osnovni princip mehanizma mikrotalasnog zagrevanja zasniva se na oscilovanju polarnih molekula ili jona pod dejstvom oscilatornog električnog polja. Pomenutom mehanizmu zagrevanja podležu samo supstance koje poseduju dipolni momenat ili naelektrisanje. Prilikom izlaganja frekvenciji mikrotalasa dipoli nastoje da prate primenjeno električno polje, koje usled oscilovanja dovodi do promene orijentacije dipola. Tokom praćenja spoljašnjeg naizmeničnog polja od strane dipola, dovedena mikrotalaska (*microwave*, MW) energija se pretvara u toplotnu energiju zahvaljujući molekulskom trenju. Količina toplote koja se oslobodi tokom ovog procesa direktno je povezana sa mogućnošću matriksa da prati frekvencije primenjenog polja. Ukoliko dipoli nemaju dovoljno vremena da se poravnaju sa spoljašnjim poljem (visokofrekventno zračenje) ili se ono odvija suviše brzo (niskofrekventno zračenje) ne dolazi do zagrevanja. Frekvencija mikrotalasnog zračenja nalazi se upravo između prethodno pomenutih ekstrema te stoga daje molekulskom dipolu vreme neophodno za praćenje naizmeničnog polja ali ne i poravnavanje sa istim. Orijetacijom molekula u pravcu

električnog polja javlja se razlika faza između orijentacije dipola i primenjenog polja što dovodi do oslobađanja energije molekulskim trenjem i kolizijom. Prema tome, energija polja se prenosi do medijuma, konvertuje u kinetičku i na kraju u toplotnu energiju. Gasovi se ne mogu zagrevati pod dejstvom mikrotalasnog zračenja s obzirom na to da je udaljenost između rotirajućih molekula suviše velika. Slično tome, led je skoro mikrotalaso-transparentan pošto se dipoli vode ne mogu pomerati kao u tečnoj fazi.

Drugi mehanizam zagrevanja jeste jonski kondukcioni mehanizam. Solvatisani joni koji prate oscilacije polja pomeraju se napred i nazad sudarajući se sa susednim molekulima i atomima. Pomenute kolizije dovode do trenja, stvarajući toplotu. U pogledu količine oslobođene toplote kondukcioni mehanizam je daleko efektivniji u poređenju sa mehanizmom dipolarne polarizacije.

Sličan mehanizam zagrevanja javlja se kod provodnika ili poluprovodnih materijala kod kojih mikrotalaso zračenje indukuje struju elektrona na površini materijala i na taj način dovodi do zagrevanja (omski otpor)<sup>46</sup>. U organskoj sintezi ovaj mehanizam je od velikog značaja za zagrevanje snažno mikrotalaso-apsorbirajućih materijala, kao što su tanki filmovi metala (Pd, Au), grafitnih podloga ili tzv. pasivnih elemenata zagrevanja izgrađenih od silicijum-karbida.

### 2.2.2. Dielektrične karakteristike medijuma

Mogućnost zagrevanja određenog materijala (npr. rastvarača ili supstance) pod dejstvom mikrotalasnog zračenja zavisi od dielektričnih osobina samog materijala. Stepenn prevođenja elektromagnetne energije u toplotnu, pri zadatoj frekvenciji i temperaturi, izražen je tzv. *tangensom gubitka* ( $\tan \delta$ ) specifične supstance. *Tangens gubitka* je izražen kao količnik:

$$\tan \delta = \varepsilon'' / \varepsilon'$$

$\varepsilon''$  - dielektrični gubitak; predstavlja efikasnost kojom se elektromagnetno zračenje prevodi u toplotu,  
 $\varepsilon'$  - dielektrična konstanta; predstavlja polarizovanost molekula u električnom polju.

Reakcioni medijum sa višim vrednostima *tangensa gubitka* ima veću moć apsorpcije mikrotalasa i dovodi do bržeg zagrevanja celokupnog sistema. Ipak, neki materijali visoke dielektrične konstante, kao što je voda ( $\varepsilon'$  na 25 °C = 80.4) ne moraju da imaju i visok  $\tan \delta$ . Tako npr. etanol ima daleko nižu vrednost dielektrične konstante ( $\varepsilon'$  na 25 °C = 24.3) ali se zagreva daleko brže u mikrotalasnom polju u odnosu na vodu usled višeg  $\tan \delta$  (*Tabela 2.1.*). Generalno, rastvarači se mogu klasifikovati kao visoko

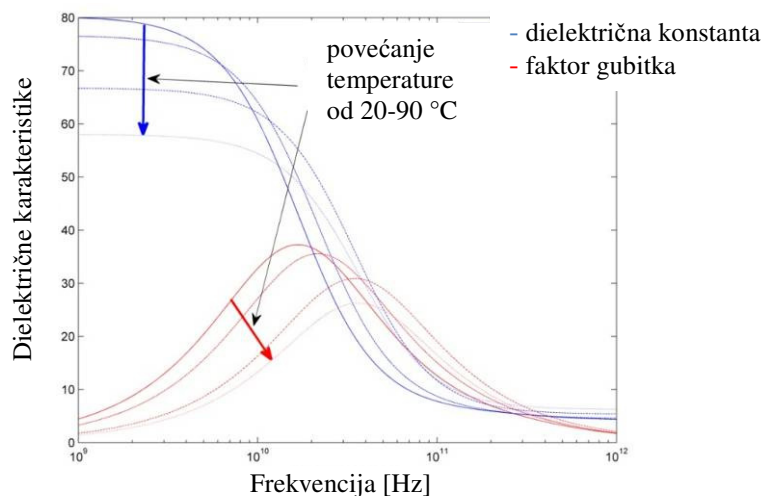
( $\tan \delta > 0.5$ ), srednje ( $\tan \delta = 0.1 - 0.5$ ) i nisko mikrotalasno-apsorbujuće ( $\tan \delta < 0.1$ ), (Tabela 2.1.). S druge strane organski rastvarači kao što su ugljentetrahlorid, benzen ili dioksan su manje ili više mikrotalasno-transparentni.

Tabela 2.1. Tangens gubitka različitih rastvarača (2.45 GHz, 20 °C).

Rastvarač	$\tan \delta$	Rastvarač	$\tan \delta$
Etilen-glikol	1.350	<i>N,N</i> -Dimetilformamid	0.161
Etanol	0.941	1,2-Dihloretan	0.127
Dimetilsulfoksid	0.825	Voda	0.123
2-Propanol	0.799	Hlorbenzen	0.101
Metanska kiselina	0.722	Hloroform	0.091
Metanol	0.659	Acetonitril	0.062
Nitrobenzen	0.589	Etil-acetat	0.059
1-Butanol	0.571	Aceton	0.054
2-Butanol	0.447	Tetrahidrofuran	0.047

Niske vrednosti  $\tan \delta$  ne isključuju primenu odgovarajućih rastvarača u mikrotalasnoj hemiji. Polarni supstrati ili neki drugi reagensi (katalizatori) mogu da doprinesu višim vrednostima dielektričnih karakteristika medijuma i time dovedu do efikasnog zagrevanja i apsorpcije mikrotalasa od strane reakcione smeše. Pored toga, polarni aditivi kao što su alkoholi, jonske tečnosti ili pasivni elementi zagrevanja takođe mogu doprineti boljoj apsorpciji mikrotalasnog zračenja.

Vrednosti  $\tan \delta$  zavise od temperature i frekvencije zračenja. Tako u slučaju destilovane vode (Slika 2.4.) dielektrični gubitak prolazi kroz svoj maksimum sa padom vrednosti dielektrične konstante, pri frekvenciji od oko 18 GHz. Međutim, sve kućne mikrotalasne pećnice kao i laboratorijski mikrotalasni reaktori rade na daleko nižoj frekvenciji od 2.4 GHz koja omogućava veću prodornost mikrotalasa i ravnomernije zagrevanje uzoraka po celokupnoj zapremini. U suprotnom, pri višoj frekvenciji, od 18 GHz, zračenje bi se apsorbovalo izuzetno jako već u površinskim slojevima vode i ne bi prodiralo u dublje slojeve<sup>41,42</sup>.



Slika 2.4. Dielektrične karakteristike vode u zavisnosti od temperature i frekvencije.

Dielektrični gubitak i  $\tan \delta$  čiste vode, kao i većine organskih rastvarača, opada sa povećanjem temperature u mikrotalnom reaktoru (Slika 2.4.). Tako je npr. veoma lako zagrejati vodu do 100 °C na 2.45 GHz dok je veoma teško dostići temperature iznad 200 °C, u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora. Superkritična voda ( $T > 374$  °C) je transparentna prema mikrotalasnom zračenju. Slično vodi, dielektrični gubitak većeg broja organskih rastvarača ponaša se identično<sup>47</sup>. Nasuprot tome, materijali veće moći apsorpcije mikrotalasa (neorganski materijali, polimeri) mogu da dovedu do veoma opasnih temperaturnih skokova<sup>41,42</sup>.

Dubina penetracije, odnosno stepen prodornosti mikrotalasa, prema definiciji predstavlja tačku u kojoj je prisutno 37 % inicijalne mikrotalasnog snage<sup>48</sup>. Njene vrednosti su obrnuto proporcionalne  $\tan \delta$  i zavise od temperature i frekvencije zračenja. Za materijale sa relativno visokim vrednostima  $\tan \delta$  stepen prodornosti mikrotalasa je nizak te se stoga mikrotalasno zračenje apsorbuje samo u površinskim slojevima materije. Na primeru vode kao rastvarača (Tabela 2.1.) stepen prodornosti mikrotalasa na sobnoj temperaturi je svega nekoliko centimetara (Tabela 2.2.) te stoga ne dolazi do zagrevanja njene celokupne zapremine.



Tabela 2.2. Stepen prodornosti mikrotalasa za različite materijale.

Materijal	Temperatura [°C]	Stepen prodornosti [cm]
Voda	25	1.4
Voda	95	5.7
Led	-12	1100
Staklo	25	35
PTFE ( <i>Teflon</i> )	25	9200
Kvarcno staklo	25	16000

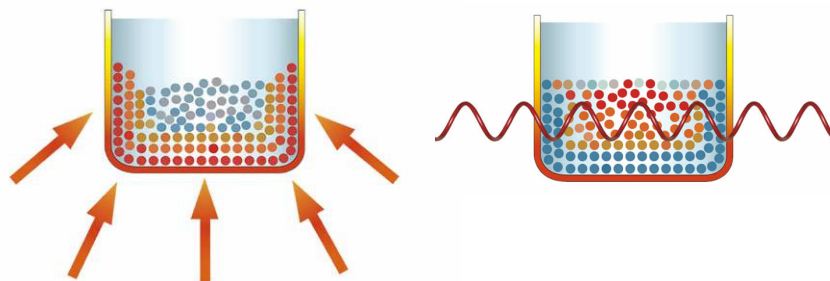
Interakcije između mikrotalasnog zračenja i materije okarakterisane su sa tri različita procesa: apsorpcijom, transparentijom i refleksijom. Materijali visoke vrednosti  $\tan \delta$ , kao što su polarni organski rastvarači, snažno apsorbuju mikrotalase i omogućavaju brzo zagrevanje reakcionog medijuma ( $\tan \delta = 0.05 - 1$ ). Za razliku od njih, mikrotalaso-transparentni materijali dovode do veoma slabih interakcija sa mikrotalasima ( $\tan \delta < 0.01$ ) te se stoga koriste kao konstrukcioni materijali (izolatori) za reaktore (Tabela 2.3.).

Tabela 2.3. Tangens gubitka nisko-apsorbirajućih materijala (2.45 GHz, 25 °C).

Materijal	$\tan \delta (x 10^{-4})$	Materijal	$\tan \delta (x 10^{-4})$
Kvarc	0.6	Porcelan	11
PTFE ( <i>Teflon</i> )	1.5	Poliestar	28
Polistiren	3.3	Polietilen	31
Keramika	5.5	Fosfatno staklo	46
Borsilikatno staklo ( <i>Pyrex</i> )	10	Pleksiglas	57

### 2.2.3. Mikrotalasi nasuprot konvencionalnog zagrevanja

Tradicionalno, organska sinteza izvodi se zagrevanjem reakcione smeše pomoću spoljnog izvora zagrevanja (npr. uljano kupatilo ili grejna obloga). Pomenuti način zagrevanja je relativno spor i neefikasan usled sporog transfera energije unutar reakcionog sistema, s obzirom na to da zavisi od konvekcije toplote, kao i toplotne konduktivnosti materijala reaktora, a zbog viših vrednosti temperatura zidova reakcionog suda u odnosu na reakcionu smešu često dolazi do lokalnog pregrevanja, što može da dovede do razlaganja reagenasa i nastajanja nusproizvoda. Nasuprot konvencionalnom zagrevanju, mikrotalaso zračenje dovodi do efikasnog zagrevanja direktnom interakcijom MW energije sa molekulima rastvarača, reagenasa ili katalizatora prisutnim u reakcionoj smeši<sup>18</sup> (Slika 2.5.).



Slika 2.5. Poređenje konvencionalnog i mikrotalasnog zagrevanja reakcione smeše.

Mikrotalasni reakcioni sudovi napravljeni su od mikrotalasno-transparentnog materijala, kao što je borsilikatno staklo (*Pyrex*), kvarc ili PTFE (*Teflon*), čime je omogućen nesmetan prolaz mikrotalasa kroz zid suda. Veoma efikasan transfer toplote unutar reakcione smeše dovodi i do eliminacije *efekta zida* (vrole površine reakcionog suda). Na osnovu ovoga može se zaključiti da mikrotalasno dielektrično zagrevanje i konvencionalno zagrevanje predstavljaju dva potpuno drugačija procesa zagrevanja reakcione smeše, te da je stoga bilo kakvo njihovo međusobno poređenje veoma teško, praktično nemoguće<sup>18</sup>.

#### 2.2.4. Mikrotalasni efekti

Uprkos velikom broju radova u oblasti mikrotalasno-stimulisane hemije, osnovnog znanja i razumevanja visoko-frekventnog elektromagnetnog zagrevanja tačno objašnjenje kako i zašto mikrotalasi ubrzavaju hemijske procese još uvek nije u potpunosti definisano. Sa pojavom prvih mikrotalasno-stimuliranih reakcija pojavile su se i spekulacije o postojanju tkz. *specifičnih* i *netermičkih mikrotalasnih efekata*. Tvrdnje o njihovom postojanju javljale su se u slučajevima gde je krajnji rezultat sinteze, pod dejstvom mikrotalasnog zračenja, bio drugačiji u odnosu na konvencionalno vođene eksperimente, pri istim vrednostima reakcione temperature. Danas se smatra da su u većini slučajeva posmatrana ubrzanja mikrotalasno-stimuliranih reakcija u suštini rezultat čistih *termičkih/kinetičkih efekata*. Drugim rečima, pomenuta ubrzanja hemijskih reakcija posledica su visokih vrednosti temperatura koje se mogu dostići u veoma kratkom vremenskom periodu, zagrevanjem polarnih materijala ili reakcionih smeša, u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora. Istovremeno, neosporno je postojanje tzv. *specifičnih mikrotalasnih efekata*, koji se ne mogu postići konvencionalnim zagrevanjem i kao takvi rezultat su jedinstvenog fenomena mikrotalasnog dielektričnog zagrevanja<sup>3,49,50</sup>. U njih se ubrajaju *efekti pregrevanja* rastvarača pri atmosferskom pritisku, selektivno zagrevanje snažno

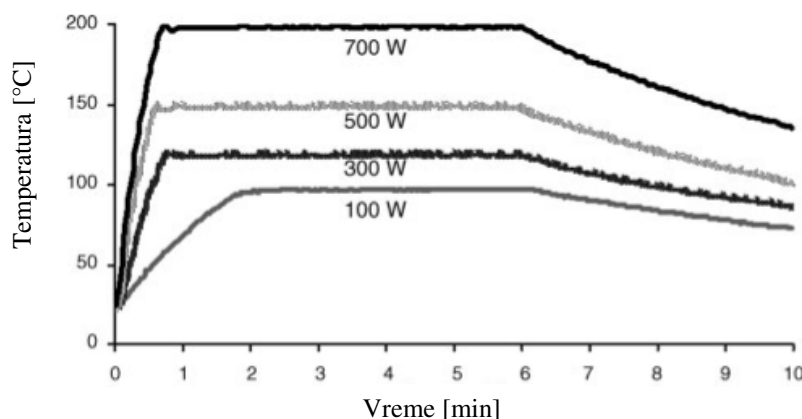
mikrotalasno-apsorbujućeg heterogenog katalizatora ili reagenasa u manje polarnom reakcionom medijumu i eliminacija *efekta zida*.

Rezultati brojnih istraživača, među kojima i Bougrin-a i saradnika<sup>51</sup> smatrani su dokazom postojanja *specifičnih mikrotalasnih efekata* (koji ne moraju biti uvek *termički*). S druge strane, postoje publikacije u kojima je njihovo postojanje opovrgnuto i pripisano nepreciznom merenju temperature, posebno prilikom izvođenja reakcija u kućnoj mikrotalasnoj peći bez mogućnosti kontrole i praćenja reakcionih uslova<sup>52,53</sup>.

U cilju dobijanja ponovljivih i pouzdanih rezultata mikrotalasno-stimulisanih reakcija neophodno je precizno merenje temperature reakcione smeše tokom mikrotalasnog ozračivanja. Tačne vrednosti temperature su od posebnog značaja ako se radi poređenje sa eksperimentima uz konvencionalno zagrevanje.

#### *Termički efekti (kinetički)*

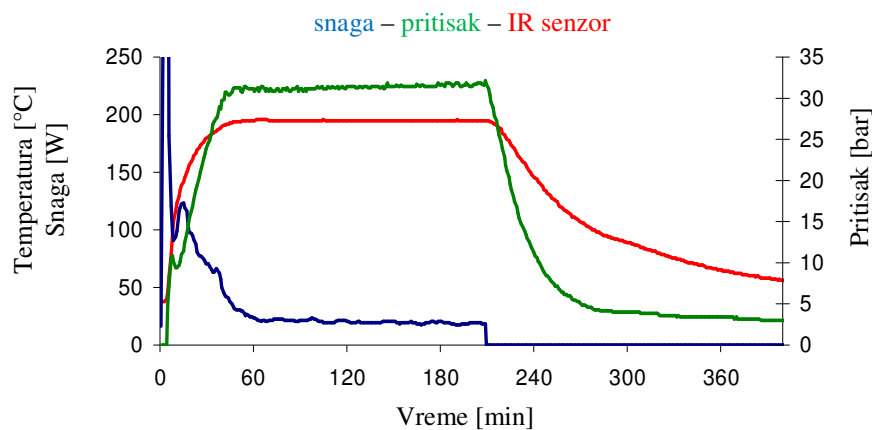
Iz literature je poznato da je razlog postojećeg ubrzanja hemijskih reakcija u mikrotalasnoj hemiji čisto *termičkelkinetičke* prirode, kao posledica ubrzanog dostizanja visokih vrednosti temperatura ozračivanjem polarnih materijala u mikrotalasnom polju. Čak i srednje mikrotalasno-apsorbujući rastvarač, kao što je 1-metil-2-pirolidon (NMP,  $t_k = 202 - 204$  °C,  $\tan \delta = 0.275$ ) može se veoma brzo zagrejati u mikrotalasnom reaktoru (200 °C u toku 40 sekundi), u zavisnosti od maksimalne početne snage magnetrona<sup>54</sup> (*Slika 2.6.*):



*Slika 2.6.* Mikrotalasno-stimulisano zagrevanje NMP pri različitim vrednostima snage magnetrona.

Većina mikrotalasno-stimulisanih reakcija izvodi se u zatvorenom sistemu mono-modnih mikrotalasnih reaktora, sa visokom gustinom mikrotalasa, tako da se i rastvarači niske temperature ključanja, kao što

je metanol ( $t_k = 65 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\tan \delta = 0.659$ ), mogu relativno brzo zagrejati do temperatura koje su za čak 100  $^\circ\text{C}$  više u odnosu na njihove temperature ključanja (Slika 2.7.). Nagli skok temperature daleko je izražajniiji u slučaju jonskih tečnosti, gde su zabeleženi skokovi od 200  $^\circ\text{C}$  u svega nekoliko sekundi. Pomenute temperaturne profile je veoma teško, praktično nemoguće reprodukovati pri standardnom konvencionalnom zagrevanju stoga je i samo poređenje sa konvencionalnim eksperimentima nemoguće.



Slika 2.7. Profil temperature, pritiska i snage mikrotalasno-stimulisano zagrevanja metanola u Anton Paar Monowave 300.

Temperaturni profil, kao i profil snage i pritiska prikazanih na Slici 2.7. jasno ilustruju principe funkcionisanja modernih mikrotalasnih reaktora. U temperaturno-kontrolnom modu reakciona smeša se zagreva pri maksimalnoj vrednosti snage, u prvih nekoliko sekundi ili minuta, u cilju dostizanja željene temperature u što kraćem vremenskom periodu. Postizanjem zadate temperature mikrotalasni magnetron reguliše snagu MW zračenja odnosno održava je na oko svega 30 W, koliko je potrebno da se održava zadata temperatura.

Brzina hemijskih reakcija u pregrejanom metanolu ili nekom drugom rastvaraču, daleko je viša u odnosu na reakcije koje se izvode na temperaturi ključanja pri atmosferskom pritisku. Mingos i Baghurst<sup>55</sup> istakli su da je primenom Arrhenius-ovog zakona moguće predvideti vreme trajanja reakcije uz mikrotalasno zračenje. Tako hemijske transformacije koje zahtevaju 68 dana za postizanje prinosa od 90 % na 27  $^\circ\text{C}$ , pokazuju isti stepen konverzije za samo 1.61 sekundu zagrevanjem na temperaturi od 227  $^\circ\text{C}$  (Tabela 2.4.). Bitno je istaći da se za striktno termičke efekte, predeksponencijalni faktor A i energija aktivacije ( $E_a$ ) u Arrhenius-ovog jednačini ne menjaju, odnosno da se menja samo temperatura.

Tabela 2.4. Zavisnost temperature i vremena trajanja reakcije kinetike prvog reda ( $A = 4 \times 10^{10} \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $E_a = 100 \text{ kJ/mol}$ )

$k = Ae^{-E_a/RT}$		
Temperatura [°C]	Konstanta brzine, $k$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	Vreme [stepen konverzije 90 %]
27	$1.55 \times 10^{-7}$	68 d
77	$4.76 \times 10^{-5}$	13.4 h
127	$3.49 \times 10^{-3}$	11.4 min
177	$9.86 \times 10^{-2}$	23.4 s
227	1.43	1.61 s

Kao što se može očekivati, različiti temperaturni profili između mikrotalasnog i konvencionalnog zagrevanja dovode i do različitih ishoda hemijskih reakcija<sup>47</sup>. To je samo jedan od razloga zbog čega su u većini slučajeva mikrotalasno-stimulisane reakcije čistije i sa manje nusproizvoda u poređenju sa konvencionalnim.

#### *Specifični mikrotalasni efekti*

Pored prethodno opisanih *termičkih/kinetičkih efekata*, mikrotalasni efekti prouzrokovani jedinstvenim mehanizmom mikrotalasnog dielektričnog zagrevanja takođe se moraju uzeti u obzir. Oni su poznati kao *specifični mikrotalasni efekti* i definišu se kao ubrzanja hemijskih transformacija u mikrotalasnom polju koja se ne mogu postići konvencionalnim zagrevanjem, međutim u osnovi oni su i dalje *termički efekti*. U ovu kategoriju spadaju, na primer, *efekat zida* i *efekti pregrevanja* rastvarača pri atmosferskom pritisku<sup>56</sup>.

Pitanje temperature ključanja, pod dejstvom mikrotalasnog zračenja, jeste jedan od osnovnih problema hemije mikrotalasa. Mikrotalasnim ozračivanjem tečnosti mogu biti zagrejane do temperatura koje su iznad njihovih temperatura ključanja pri atmosferskom pritisku. Za neke rastvarače, temperature pregrevanja mogu biti i do 40 °C iznad temperatura ključanja pri normalnim uslovima<sup>57,58</sup>. Razlog pomenutog fenomena nalazi se u disperziji mikrotalasne snage po čitavoj zapremini rastvarača. S obzirom na to da većina reaktora nudi mogućnost mešanja reakcione smeše tokom celokupnog procesa zagrevanja i da se većina sinteza izvodi u zatvorenom sistemu pod pritiskom, efekat mikrotalasnog pregrevanja pri atmosferskom pritisku je od malog praktičnog značaja.

U bliskoj vezi sa *efektom pregrevanja* pri atmosferskom pritisku jeste *efekat zida* prouzrokovan obrnutim temperaturnim gradijentima. U skladu s tim, temperatura unutrašnje strane zida reakcinog suda je niža u odnosu na temperaturu unutar tečnosti zahvaljujući drugoj karakteristici mikrotalasnog dielektričnog zagrevanja odnosno, *volumetrijskim zagrevanjem* kojim se postiže brzo i efikasno zagrevanje celokupne zapremine reakcione smeše.

Jedan od najznačajnijih *specifičnih mikrotalasnih efekata* je selektivno zagrevanje snažno mikrotalasno-apsorbirajućih heterogenih katalizatora ili reagenasa u manje polarnom reakcionom medijumu<sup>3</sup>. Selektivno zagrevanje generalno podrazumeva da će u uzorku koji sadrži više od jedne komponente biti selektivno zagrevana samo ona komponenta koja je u mogućnosti da stupi u interakciju sa mikrotalasima. Tako se mikrotalasno-transparentne ili slabo-apsorbirajuće supstance zagrevaju indirektno, transferom toplote. Merenja i procene raspodele toplote pod dejstvom mikrotalasnog zračenja u čvrstoj fazi su veoma teška, pa su lokalne temperaturne varijacije daleko brojnije u odnosu na izmerene vrednosti temperature dovodeći do pojave lokalnih temperaturnih gradijenata. U slučaju homogenih smeša, na primer polarnih molekula u mikrotalasno-transparentnim rastvaračima, takođe dolazi do selektivnog zagrevanja. Međutim, postojanje tzv. *molekulskih radijatora*<sup>59</sup> teško je eksperimentalno dokazati te se stoga pretpostavlja da je energija ovih *toplih* molekula dispergovana prema *hladnim* molekulima rastvarača<sup>3,47</sup>. Značajno je napomenuti da je teško selektivno aktivirati polarne funkcionalne grupe, poznatije kao *antena grupe*<sup>60</sup>, koje su deo složenijih molekula, mikrotalasnim zračenjem. Evidentna je težnja hemičara da daju hemijski aspekt pretpostavci da su lokalizovane rotacije pomenutih *antena grupa* zaista moguće<sup>41,42</sup>, kao i spekulacijama o ubrzanju hemijskih reakcija posebno na datim grupama. Ipak, proces dielektričnog zagrevanja uključuje brz transfer energije od *antena grupa* prema susednim molekulima te je stoga nemoguće akumulirati energiju u specifičnom delu molekula<sup>18,61</sup>.

#### *Netermički mikrotalasni efekti*

Pod *netermičkim mikrotalasnim efektima (athermal effects)* podrazumevaju se ubrzanja hemijskih transformacija u mikrotalasnom polju koja se ne mogu racionalizovati ni sa čisto *termičkim/kinetičkim* ni sa *specifičnim mikrotalasnim efektima*<sup>28</sup>. Za *netermičke mikrotalasne efekte* smatra se da su rezultat direktne interakcije električnog polja sa molekulima u reakcionom medijumu, koji pri tome nisu u vezi sa makroskopskim temperaturnim efektom, odnosno da orijentacijom dipolarnih molekula ili intermedijera pod dejstvom spoljašnjeg električnog polja dolazi do promene predeksponencijalnog faktora  $A^{62-64}$  ili  $E_a$  u Arrhenius-ovoj jednačini ( $k = A \exp(-E_a/RT)$ ). Neki autori koriste *netermičke mikrotalasne efekte* kao objašnjenje ishoda hemijske reakcije u mikrotalasnom polju, odnosno ovi efekti predloženi su za polarne reakcione mehanizme, tokom kojih se polarnost povećava polazeći od osnovnog prema prelaznom stanju, rezultujući višom reaktivnošću kao posledicom sniženja energije aktivacije<sup>23-25,65,66</sup>.

Novija istraživanja su demantovala ovaj način interpretiranja efekata mikrotalasnog zračenja<sup>50,67</sup>. Neprecizna merenja temperature su osnovni razlog zbog čega je u većini publikovanih radova razlika između mikrotalasnog i konvencionalnog zagrevanja pripisivana postojanju *netermičkih efekata*<sup>48,68</sup>.

U vezi sa *netermičkim* ili *specifičnim mikrotalasnim efektima* jeste skorašnji koncept po kojem simultano hlađenje reakcione smeše tokom mikrotalasnog zagrevanja dovodi do ubrzanja sveukupnog procesa<sup>4,69</sup>. Na taj način omogućen je viši stepen mikrotalasnog zagrevanja i eliminisan efekat pregrevanja usled kontinualnog uklanjanja latentne toplote. Međutim, pri datim reakcionim uslovima nemoguće je očitati stvarnu vrednost temperature reakcije<sup>70-72</sup> sa infracrvenim (*infrared*, IR) temperaturnim senzorom. Logična ekstenzija ideje simultanog hlađenja jeste u primeni mikrotalasnih reaktora za reakcije na niskim temperaturama. U tu svrhu, na tržištu postoji *CEM Discover Coolmate* sa mogućnošću izvođenja hemijskih transformacija na temperaturama od - 80 do + 65 °C.

Pitanje postojanja *netermičkih mikrotalasnih efekata* od posebnog je značaja za dalji razvoj i primenu mikrotalasnog zagrevanja, kako u istraživačkim tako i u studentskim laboratorijama, posebno sa aspekta bezbednosti.

### 2.3. Kontrola i praćenje temperature u mikrotalasnom reaktoru

Mikrotaladni reaktori namenjeni za rad u organskoj sintezi funkcionišu uz temperaturno-kontrolni mod, a temperatura reakcije programira se u skladu sa zahtevima sinteze. Na početku zagrevanja magnetron oslobađa maksimalnu količinu snage u cilju što bržeg dostizanja željene temperature, nakon čega snaga MW pada na vrednost koja omogućava održavanje zadate temperature tokom vremena.

Precizna kontrola temperature tokom mikrotalasnog zračenja predstavlja velik problem jer su klasični temperaturni senzori, kao što su termometri, nepouzdana usled kuplovanja sa elektromagnetnim poljem<sup>68</sup>. U slučaju najpopularnijeg mono-modnog mikrotalasnog reaktora (*Biotage Initiator*, *CEM Discover*) temperatura se prati spoljnim IR senzorom, integrisanim u mikrotalasnju pećnicu, kojim se detektuje temperatura na površini reakcionog suda (temp. opseg - 40 °C do 400 °C). Zid reaktora je u suštini najhladniji deo kompletnog reakcionog sistema, usled obrnutog smera kretanja toplote u poređenju sa konvencionalnim zagrevanjem, stoga izmerena temperatura nije u potpunosti identična temperaturi unutar reakcione smeše<sup>48,73-75</sup>. Takođe treba naglasiti da se IR senzor ne koristi paralelno sa eksternim hlađenjem reakcionog suda. U slučajevima kada je ono neophodno primenjuje se interni optički senzor. U suprotnom IR senzor detektuje daleko niže vrednosti temperature u odnosu na stvarnu temperaturu unutar reakcionog sistema<sup>73-75</sup>. Pored toga, IR senzorima je potrebno neko vreme do tačnog očitavanja temperature unutar reakcione smeše. Isto tako, toploti koja se oslobađa mikrotalasnim dielektričnim zagrevanjem polarnih komponenata potrebno je određeno vreme za zagrevanje reakcionog

suda. Iako su u pitanju samo sekunde to je ipak dovoljno da dođe do manjih ili većih skokova reakcione temperature, posebno u slučaju snažno mikrotalasno-apsorbirajućih reakcionih smeša.

U slučaju nisko-apsorbirajućih ili skoro mikrotalasno-transparentnih reakcionih smeša imamo suprotan fenomen. Staklo koje se koristi za izradu mikrotalasnih viala u mono-modnim mikrotalasnim reaktorima nije u potpunosti transparentno za mikrotalasno zračenje, te stoga dovodi do zagrevanja reakcionog balona u odnosu na reakcionu smešu (*Tabela 2.3.*). Zagrevanje mikrotalasno-transparentnog rastvarača u staklenom balonu rezultat je indirektnog zagrevanja kondukcionim (provođenjem toplote kroz medijum) i konvencionalnim (preko vruće površine samoapsorbirajućeg stakla) fenomenom. Neophodno je napomenuti da je u slučajevima zagrevanja snažno- ili srednje-apsorbirajućih reakcionih smeša, zagrevanje stakla neznatno te je zanemarljivo u mikrotalasnoj sintezi<sup>76</sup>.

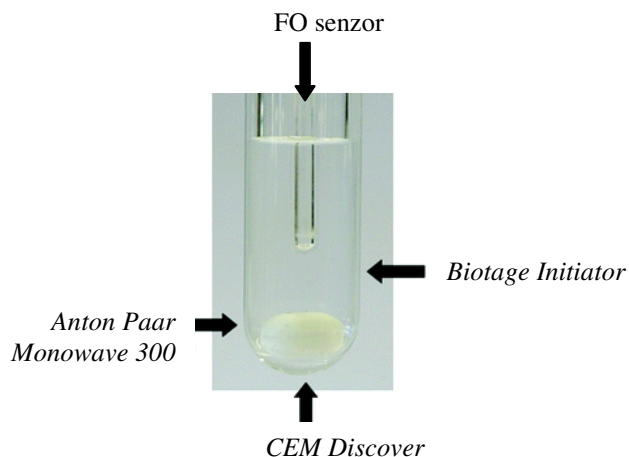
Daleko precizniji način merenja temperature reakcione smeše jeste direktno preko optičkog senzora (*fiber-optic*, FO) ili gas-balon termometra<sup>73-75</sup>. FO su neuporedivo precizniji u odnosu na IR senzore ali su i daleko skuplji, imaju uži opseg merenja (0 - 300 °C) i osetljiviji su prema mehaničkim udarima. Optičke probe su pogodne za praćenje temperature unutar sistema u *CEM Discover*, *Anton Paar Monowave 300* reaktoru kao i u slučaju multi-modnih reaktora *Milestone* i *CEM* kompanije.

Gas-balon termometar (0 - 300 °C) primenjuje se u slučaju merenja interne temperature *Synthos 3000* multi-modnog reaktora kompanije *Anton Paar*. Pored njega, kod većine multi-modnih mikrotalasnih instrumenata, temperatura na površini reakcionog suda je dodatno pod kontrolom IR senzora. Glavni senzor kontrole snage magnetrona u datom slučaju jeste optički (*Milestone*, *CEM*) ili gas-balon termometar (*Anton Paar*). U određenim slučajevima, na polju istraživanja temperature mikrotalasno zagrevane reakcione smeše ili suda od velikog značaja mogu biti i termovizijske kamere<sup>67,68</sup>.

Za rutinsku sintetičku primenu u mono-modnim mikrotalasnim reaktorima (*Biotage Initiator*, *CEM Discover*, *Anton Paar Monowave 300*) primena standardnih IR senzora je prihvatljiva, uglavnom zbog otpornosti na mnogobrojne neželjene efekte u radu kao i niske cene. Generalno, spoljni IR senzori očitavaju stvarnu vrednost temperature reakcione smeše ukoliko je u pitanju homogena reakciona smeša što nije slučaj kod heterogenih reakcija, kao što su reakcije u odsustvu rastvarača, u čvrstom stanju ili viskozim sistemima.

U tri danas najveća proizvođača mono-modnih mikrotalasnih reaktora temperatura se meri na različitim pozicijama (*Slika 2.8.*).





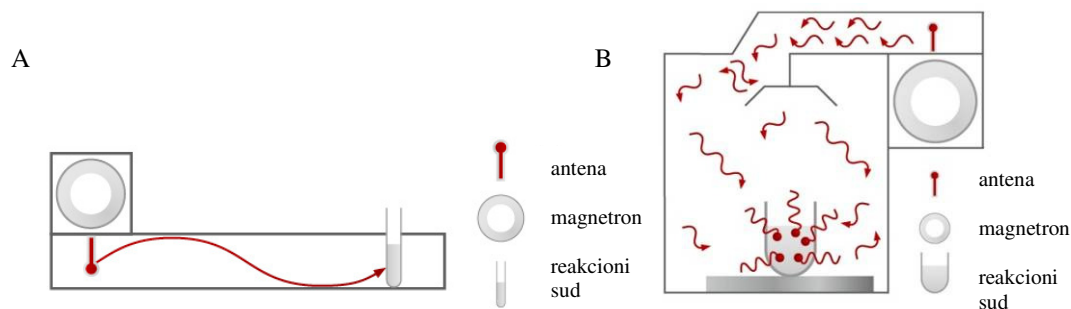
Slika 2.8. Pozicija IR senzora u mono-modnom mikrotalasnom reaktoru kompanije Anton Paar, Biotage i CEM (10 mL Pyrex reakcioni sud, 3 mL uzorka) kao i FO senzora unutar suda.

U principu, većina mikrotalasnih reaktora se oslanja na senzore koji koriste poluprovodni kristal, obično galijum-arsenid, smešten na kraju optičkog senzora.

Jedan od najvažnijih faktora koji doprinosi tačnom očitavanju temperature reakcione smeše jeste njeno adekvatno mešanje tokom zagrevanja, što je u svim modernim reaktorima danas obezbeđeno. U suprotnom, nastali temperaturni gradijenti dovode do netačnih vrednosti temperature, naročito u slučaju dvofaznih sistema ili reakcija u odsustvu rastvarača.

## 2.4. Mikrotalasni reaktori za organsku sintezu

Na tržištu su dostupni mono-modni i multi-modni mikrotalasni reaktori. Kod mono-modnog reaktora zračenje prolazi kroz dobro definisan kanal i usmereno pada na reakcionu posudu koja je na precizno određenoj udaljenosti od izvora, dok se kod multi-modnog zračenje raspoređuje u svim smerovima reflektovanjem od zidove kućišta (*Slika 2.9.*).



*Slika 2.9.* Prikaz zagrevanja kod mono-modnog (A) i multi-modnog (B) mikrotalasnog reaktora.

Mono-modni mikrotalasni reaktori kompanije *Biotage* su *Emrys Liberator* i *Initiator*, sa sensorima za temperaturu (IR; maksimalna 300 °C) i pritisak (maksimalan 20 bar), dizajnirani za rad u maloj skali sa reakcionim sudovima, odnosno vialima zapremine od 0.2 - 0.5 mL, 0.5 - 2 mL, 2 - 5 mL i 10 - 20 mL (*Slika 2.10.*).



*Slika 2.10.* Mono-modni mikrotalasni reaktor *Biotage Emrys Initiator 8 EXP 2.0* sa automatskom rukom i četiri različite zapremine reakcionog suda.

Od mono-modnih mikrotalasnih reaktora kompanije *CEM* na tržištu su dostupni *Discover* sistemi: *BenchMate*, *LabMate* i *S-Class*, snage od 0 - 300 W sa mogućnošću programiranja temperature do 300 °C. *Discover* reaktori funkcionišu po jedinstvenom kružnom toku mikrotalasnog zračenja (*Slika 2.11.*). Podešeni su za balone zapremine 5 - 125 mL, za reakcije pri atmosferskom pritiskom i reakcione sudove

od 10 mL za zatvoreni sistem. Uređaj za kontrolu pritiska, *IntelliVent* kontrolor, ne poseduje mogućnost merenja pritiska pri radu u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora. Ipak, zahvaljujući teflonskim kapama (*snap-on*) koje ne zahtevaju poseban alat za njihovo zatvaranje i otvaranje, dobijen je jedinstven sistem sa mogućnošću automatskog oslobađanja viška pritiska (iznad 20 bar, tj. 300 psi) u čijem odsustvu je moguće postići pritisak od svega 2 bar, tj. 30 psi.



Slika 2.11. CEM Discover BenchMate sa kružnim tokom mikrotalasnog zračenja i šemom mikrotalasnog reaktora.

Danas su tehničke mogućnosti upotrebe multi-modnih reaktora CEM kompanije sve veće, tako novi model reaktora CEM MARS S sa zapreminom pećnice od 48 L, maksimalnom snagom od 1600 W i senzorom za pritisak i temperaturu (IR), je veoma interesantan za poluindustrijske istraživačke laboratorije.

*Monowave 300* je Anton Paar-ov mono-modni mikrotalasni reaktor (Slika 2.12.) sa mogućnošću zagrevanja reakcionih smeša do 300 °C i pri pritisku do 30 bar i maksimalnoj snazi magnetrona od 850 W. Reaktor takođe poseduje mogućnost unutrašnjeg (FO) i spoljašnjeg (IR) merenja temperature. Reakcioni sudovi dizajnirani za rad u *Monowave 300* zapremine su od 0.5 - 2 mL, 2 - 6 mL (Pyrex i SiC reakcioni sud) i 6 - 20 mL.



Slika 2.12. Anton Paar Monowave 300 mono-modni mikrotalasni reaktor i reakcioni sudovi namenjeni za rad u mikrotalasnoj peći.

Anton Paar Synthos 3000 jeste jedan od novijih multi-modnih reaktora na tržištu za mikrotalasno-stimulisane reakcije na velikoj skali. Reaktor nudi mogućnost zagrevanja reakcionih smeša do 80 bar i 300 °C (IR senzor) uz maksimalnu snagu magnetrona od 1400 W (Slika 2.13.).



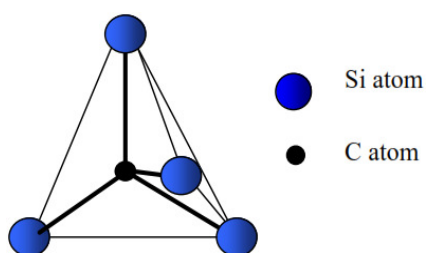
Slika 2.13. Anton Paar Synthos 3000 sa rotorom kapaciteta zagrevanja 48 reakcionih smeša paralelno ili četiri SiC ploče (4 x 20 uzoraka).

Izbor odgovarajućeg reaktora, mono-modnog ili multi-modnog, prvenstveno zavisi od reakcione skale. Najveći broj publikovanih radova iz oblasti mikrotalasno-stimulisane organske sinteze odnosi se na reakcije na maloj skali ( $\leq 1$  g, 1.0 - 5.0 mL) u mono-modnim mikrotalasnim reaktorima, dok su multi-modni reaktori dizajnirani za rad na velikoj skali. Snaga mikrotalasa u multi-modnim reaktorima je daleko viša (1000 - 1600 W) u odnosu na mono-modne reaktore (300 - 400 W) ali je zato gustina mikrotalasa daleko niža čineći zagrevanje malih, individualnih uzoraka otežanim. S druge strane izbor odgovarajućeg instrumenta u okviru mono-modnih reaktora zavisi od temperature zagrevanja i maksimalne vrednosti pritiska unutar sistema, odnosno prirode reakcione smeše.

## 2.5. Značaj i primena silicijum-karbida u oblasti mikrotalasno-stimuliranih reakcija

### 2.5.1. Fizičko-hemijske osobine silicijum-karbida

Silicijum-karbid (SiC) otkriven je 1824. godine od strane Jöns Jacob Berzelius-a<sup>77</sup> kao jedan od poluprovodnika širokog energetskog procepa. SiC se sastoji od tetraedra ugljenika i silicijuma spojenih snažnim vezama u kristalnoj strukturi (Slika 2.14.).



Slika 2.14. Osnovna strukturna jedinica SiC.

Čist SiC je bezbojan, dok smeđa do crna boja industrijskog proizvoda posledica je prisustva čelika kao nečistoće. Njegova osnovna obeležja i prednosti su mala gustina, čvrstoća, nizak stepen toplotnog širenja, visok stepen toplotne provodljivosti, odlična otpornost na termalni šok i visoka hemijska rezistentnost. Visoka električna provodljivost omogućila je njegovu primenu u temperaturno-otpornim električnim elementima, dok je zahvaljujući visokoj vrednosti temperature sublimacije (2700 °C) svoju primenu našao u proizvodnji ležajeva i delova peći. SiC danas predstavlja visoko kvalitetan keramički materijal sa izuzetnim mehaničkim osobinama što mu je omogućilo sve širu primenu.

### 2.5.2. Mikrotalasna sinteza u silicijum-karbidnim reakcionim sudovima

Hemija mikrotalasa generalno se zasniva na mogućnosti reakcionog medijuma da efikasno apsorbuje MW energiju, fenomenom mikrotalasnog dielektričnog zagrevanja<sup>41,42</sup>. Direktnom interakcijom elektromagnetnog zračenja sa molekulima rastvarača, reagenasa ili katalizatora, prisutnim u reakcionoj smeši, postiže se efikasno unutrašnje zagrevanje. Stoga, mikrotaladni reakcioni sudovi napravljeni su od slabo mikrotalasnoposorbujućeg ili transparentnog materijala kao što su borsilikatno staklo (*Pyrex*), kvarc ili odgovarajućeg polimera kao što je PTFE (*Teflon*)<sup>49</sup>. Međutim, pomenuti materijali poseduju

odgovarajuća ograničenja kada je u pitanju otpornost na visoke vrednosti temperature i pritiska, hemijske stabilnosti i mogućnosti zagrevanja mikrotalasno-transparentnih ili slabo mikrotalasno-apsorbirajućih reakcionih medijuma. Pored toga, većina industrijskih procesa uključuje primenu korozivnih reagenasa, pri visokim vrednostima temperature i pritiska, te bi stoga upotreba staklenih sudova dovela do njihove degradacije a time i do kontaminacije reakcione smeše<sup>78,79</sup>. Na osnovu navedenog, očigledno je da postoji potreba za inertnim materijalom, koji bi bio hemijski rezistentan pri visokim vrednostima pritiska i temperature. Kao i većina keramičkih materijala SiC je otporan na koroziju i agresivnije reakcione uslove, kao što su koncentrovane kiseline ili baze, fluorovodonik ili hlor<sup>78,79</sup>.

Poslednjih godina primena sinterovanog SiC u mikrotalasnoj hemiji postala je veoma popularna. SiC je snažno mikrotalasno-apsorbirajući, hemijski inertan, keramički materijal sa mogućnošću zagrevanja do veoma visokih vrednosti temperature (~ 2 700 °C) upravo zbog visoke vrednosti temperature topljenja i veoma niskog koeficijenta toplotnog širenja<sup>80,81</sup>. Jedinstvena kombinacija snažne mikrotalasne apsorpcije i toplotne provodljivosti čini dati materijal idealnim za rad u mikrotalasnim reaktorima (Tabela 2.5.). Mehanizam zagrevanja SiC sudova zasniva se na električnom otporu (omski otpor) mikrotalasno-indukovanom strujom elektrona u poluprovodnom SiC.

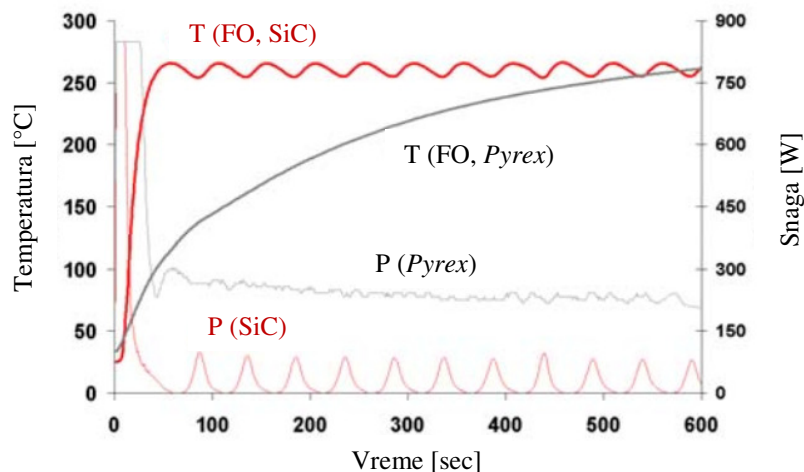
Tabela 2.5. Poređenje karakteristika SiC (ROCAR®S) i borsilikatnog (Pyrex) stakla.

Karakteristike		ROCAR®S	Pyrex
Tačka topljenja	$T_t$ [°C]	≈ 2700	≈ 800
Toplotna provodljivost	$\lambda$ [Wm <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ]	115	1.2
Koeficijent toplotnog širenja	$\alpha$ [K <sup>-1</sup> ]	3.0 x 10 <sup>-6</sup>	3.3 x 10 <sup>-6</sup>
Specifičan toplotni kapacitet	$C_p$ [Jg <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ]	0.6	0.7
Specifična gustina	$\rho$ [gmL <sup>-1</sup> ]	3.15	2.23

SiC reakcionim sudovima omogućeno je mikrotalasno zagrevanje i slabo-apsorbirajućih reakcionih smeša ili rastvarača, što je od posebnog značaja u slučajevima gde su druge opcije povećanja mikrotalasne apsorpcije reakcionog medijuma, npr. dodatak jonskih tečnosti, nepogodne usled inkompatibilnosti sa supstratom. Premda *Monowave 300* reaktor može da zagreje i nepolarne rastvarače daleko iznad njihovih temperatura ključanja, zahvaljujući ekstremno visokoj gustini polja mikrotalasa, vreme neophodno za dostizanje temperatura iznad 200 °C može da traje i do nekoliko minuta (Slika 2.15.). Kao rezultat visoke toplotne provodljivosti SiC (~ 100 puta veća u odnosu na Pyrex staklo) transfer toplote kroz zid suda širine 2.85 mm je veoma brz.

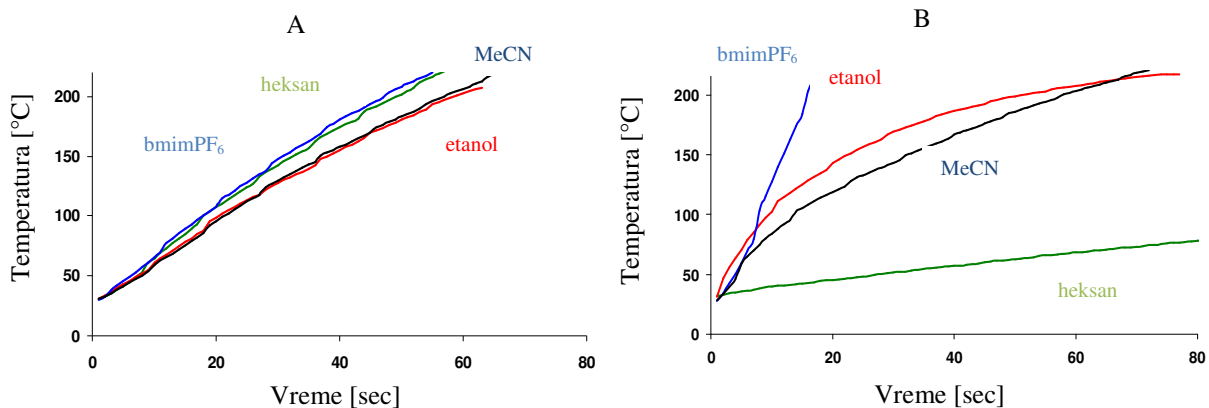
Upotreba SiC reakcionih sudova dovodi do skraćanja vremena trajanja reakcije (*hold time*), odnosno vremena potrebnog za dostizanje željene temperature (*ramp time*) a time i skraćanja ukupnog vremena

zagrevanja (*total irradiation time*), čime se istovremeno redukuje snaga magnetrona što je od posebnog značaja tokom egzotermnih reakcija.



Slika 2.15. Mikrotalasno-stimulisano zagrevanje toluena (5 mL) u SiC i Pyrex vialu.

Prva razmišljanja u sferi njegove primene vodila su ka pretpostavci da bi bilo koji materijal (reakciona smeša) unutar SiC reakcionog suda bio efikasno zaštićen od elektromagnetnog zračenja upravo zbog njegove snažne mikrotalasne apsorpcije čime bi se omogućilo razdvajanje *termičkih* od *specifičnih/netermičkih mikrotalasnih efekata*. Hipoteza je potvrđena zagrevanjem rastvarača različite mikrotalasne apsorpcije (*tangensa gubitka*), pri konstantnoj mikrotalasnoj snazi, u standardnim Pyrex i SiC vialima. Dok u slučaju Pyrex viala profili zagrevanja prate očekivani trend i u korelaciji su sa vrednostima  $\tan \delta$  rastvarača, zagrevanjem rastvarača u SiC vialima dolazi do odstupanja u zavisnosti od nekih drugih parametara kao što su specifičan kapacitet zagrevanja, viskozitet i koeficijent transfera toplote. Činjenica da se u SiC vialima istom brzinom postiže zagrevanje mikrotalasno-transparentnog heksana ( $\tan \delta = 0.02$ ) kao i snažno apsorbujućeg etanola ( $\tan \delta = 0.941$ ) jasno upućuje na to da je polje mikrotalasnog zračenja unutar SiC viala veoma nisko i da se zagrevanje odvija primarno u smislu konvencionalnog mehanizma transfera toplote a ne dielektričnog zagrevanja (Slika 2.16.). Na osnovu prethodnog zaključeno je da mikrotalasno-stimulisani eksperimenti u SiC vialima ne uključuju efekte elektromagnetnog polja s obzirom na to da SiC viali sprečavaju prodiranje mikrotalasnog zračenja do reakcione smeše<sup>82</sup>.



Slika 2.16. Mikrotalasno-stimulisano zagrevanje 3 mL rastvarača u SiC (A) i Pyrex (B) mikrotalasnim reakcionim sudovima.

SiC sudovi dizajnirani za rad u laboratorijskim mikrotalasnim reaktorima dostupni su u dva oblika, pogodnim za rad u mono-modnim i multi-modnim mikrotalasnim reaktorima.

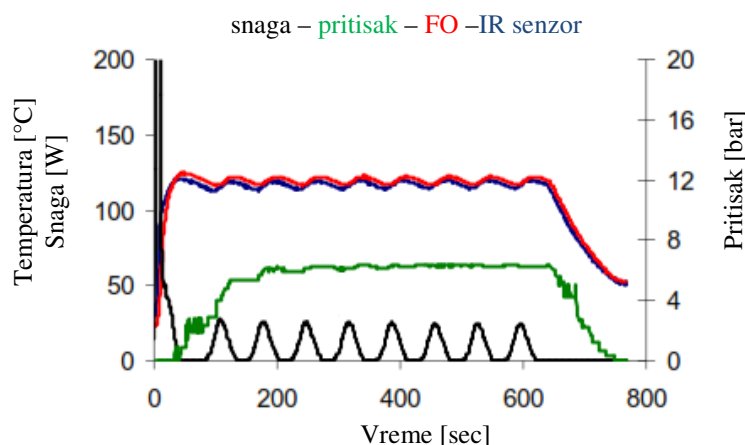
U slučaju mono-modnih mikrotalasnih reaktora SiC sudovi se javljaju u obliku standardnih Pyrex sudova za *Monowave 300* (Anton Paar), iste geometrije i zapremine (Slika 2.17.), sa mogućnošću simultanog merenja temperature sa spoljnim IR i unutrašnjim FO senzorom. Kao i u slučaju standardnih Pyrex viala, za SiC sudove postoje termoplastičke kape i PTFE-obložene silikonske septe za reakcije do 300 °C i 30 bar, sa otvorom za FO senzor.



Slika 2.17. Reakcioni viali izrađeni od silicijum-karbida (SiC) za mono-modni mikrotalasni reaktor Anton Paar Monowave 300.

Visok stepen toplotne provodljivosti omogućava uniformnost zagrevanja reakcione smeše u SiC vialu, a time i skoro identične profile zagrevanja merene FO ili IR senzorom (Slika 2.18.).



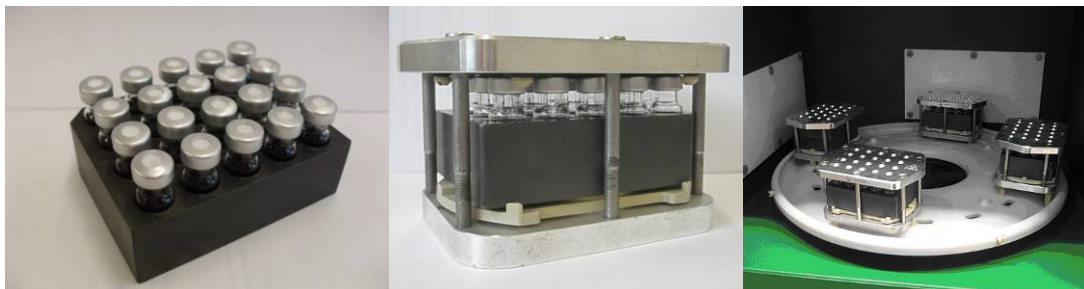


Slika 2.18. Temperaturni (FO i IR) profil, kao i profil pritiska i snage magnetrona, tokom zagrevanja 3 mL vode na 120 °C u SiC reakcionom sudu.

U poređenju sa standardnim *Pyrex* vialima, dizajniranim za rad u mono-modnim mikrotalasnim reaktorima pri pritisku od 20 - 30 bar, otpornim na unutrašnji pritisak do 50 bar, SiC viali odolevaju pritisku od 200 bar.

Drugi oblik silicijum-karbida, dizajniran za rad u multi-modnim mikrotalasnim reaktorima, jesu SiC ploče (dimenzije 82 x 62.5 x 25 mm) sa dvadeset cilindričnih udubljenja odgovarajuće dimenzije (5 x 4 otvora, dimenzije 12 mm dijagonalno i 20 mm dubine) pogodnih za standardne HPLC/GC viala (zapremine 1.5 mL) u ulozu reakcionog suda (Slika 2.19.). Korišćenjem SiC ploča omogućeno je efikasno izvođenje dvadeset reakcija paralelno kao i efikasna optimizacija reakcionih uslova uz maksimalnu uštedu vremena. Postavljanjem aluminijske ploče sa obe strane SiC ploče, spojene pomoću šest čeličnih zavrtnja (Slika 2.19.), omogućeno je zagrevanje reakcione smeše do visokih vrednosti pritiska i temperature (20 bara, 250 °C). Zahvaljujući rotoru, smeštenom unutar mikrotalasne peći (*Synthos 3000*, firme *Anton Paar*), moguće je paralelno izvesti do osamdeset reakcija (20 x 4) u HPLC/GC vialima smeštenim u SiC ploči, čime je povećan stepen produkcije i eliminisan uticaj greške manuelnog transfera uzorka.

Silicijum-karbidne ploče u kombinaciji sa mikrotalasnim zračenjem pokazale su se kao veoma efikasne u procesu optimizacije hemijskih reakcija, s obzirom na to da se većina ključnih parametara različitih hemijskih transformacija (temperatura i vreme trajanja reakcije, rastvarači i katalizatori, molarni odnosi/koncentracije supstrata) može odrediti u veoma kratkom vremenskom periodu<sup>83,84</sup>. Na taj način paralelna mikrotalasna tehnika ima velike prednosti<sup>85</sup> u poređenju sa individualnim ozračivanjem reakcione smeše.



Slika 2.19. Silicijum-karbidna ploča sa HPLC/GC vialima smeštenim u multi-modni reaktor *Synthos 3000*, firme *Anton Paar*.

U prethodnim studijama IR termografije takođe je potvrđeno homogeno zagrevanje celokupne SiC platforme unutar multi-modnog mikrotalasnog reaktora. Minimalne temperaturne devijacije, zabeležene na različitim položajima unutar SiC ploče<sup>86-88</sup>, rezultat su visokog toplotnog kapaciteta i visoke toplotne provodljivosti SiC ploče kao i sposobnosti ublažavanja nehomogenosti polja multi-modnih reaktora<sup>89</sup>. Zbog toga, rastvarači različitog stepena mikrotalasne apsorpcije mogu se zagrejati paralelno do istih vrednosti temperatura unutar multi-modnog mikrotalasnog reaktora. Pored temperaturne homogenosti prazne SiC ploče, ista je potvrđena u slučaju popunjene sa HPLC/GC vialima na primeru BF<sub>3</sub>-posredovane esterifikacije benzojeve kiseline sa metanolom<sup>90</sup>. Datu reakciju karakteriše visoka osetljivost na promene temperaturne, zbog čega svaka mala temperaturna devijacija unutar HPLC/GC viala dovodi do drastične razlike u stepenu konverzije u željeni proizvod. Na osnovu prethodnog, silicijum-karbidne ploče su pogodne za izvođenje različitih sintetskih transformacija. Važno je naglasiti da zapremina rastvarača unutar HPLC viala ima značajan uticaj na krajnji ishod reakcije. Mala zapremina reakcione smeše omogućava veći prostor iznad tečnosti a time i veću količinu reakcione smeše u gasovitoj fazi gde se reakcije praktično ne odvijaju (gasovi ne apsorbuju mikrotalasnu energiju). Stoga, preporučena zapremina za HPLC/GC viala u SiC ploči je 0.5 - 1.5 mL<sup>90</sup>.

## 2.6. Mikrotalasno-stimulisana degradacija aktivnih supstanci lekova

Sve što je čovek stvorio ljudskom rukom podložno je starenju i raspadanju, pa tako i lekovi. Trajnost aktivne supstance leka je veoma bitna za kvalitet leka i svaki lek mora proći i fazu ispitivanja koja se odnosi na trajnost, a to su uvek vremenski duga ispitivanja. Kvalitet lekovite supstance (API, *active pharmaceutical ingredient*) ili gotovog proizvoda (DP, *drug product*) menja se pod uticajem faktora okoline (temperature, vlage, svetlosti), što se manifestuje u razgradnji aktivne komponente i nastajanju degradacionih produkata. Pri kojim uslovima je aktivna supstanca stabilna od velikog je značaja za dizajn gotovog leka, njegov rok upotrebe kao i skladištenje<sup>91-95</sup>.

Rokom trajanja leka se bave timovi farmakologa i farmaceuta ali važnost ovih ispitivanja stabilnosti vidi se i iz regulativa propisanih od strane zakonodavnih tela na raznim nivoima: nacionalnom (npr. FDA, *Food and Drug Administration* u Sjedinjenim Američkim Državama), regionalnom (npr. EMEA, *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products* u Evropskoj Uniji) i međunarodnom (ICH, *International Conference on Harmonisation*; WHO, *World Health Organisation*). Vodeće telo koje se bavi usklađivanjem zahteva za registraciju proizvoda jeste Internacionalna konferencija za harmonizaciju, koju sačinjavaju predstavnici regulatornih tela i industrije tri svetske regije (EU, SAD i Japan). Uvođenje usklađenih zahteva za regulaciju proizvoda uveliko smanjuje kompleksnost, vreme i cenu ispitivanja neophodnih za izlazak leka na brojna tržišta, uz istovremeno ispunjavanje visokih standarda kvaliteta, sigurnosti i delotvornosti<sup>91-95</sup>.

### 2.6.1. Studije stabilnosti aktivnih farmaceutskih ingredijenata

Stabilne supstance, odnosno lekovi moraju imati iste osobine kroz ceo period čuvanja i upotrebe, odnosno iste osobine koje su posedovale u vreme izrade. Stabilnost preparata ukazuje na otpornost prema različitim hemijskim, fizičkim i mikrobiološkim reakcijama koje bi mogle da promene njegove početne osobine, i to za vreme transporta, čuvanja i upotrebe. Važan kriterijum stabilnosti je procena tih efekata na mogućnost upotrebe lekovitog preparata u terapiji. Studije stabilnosti podrazumevaju seriju testova stabilnosti farmaceutskog proizvoda, pružaju informacije, odnosno definišu njegov rok trajanja pod specifičnim uslovima pakovanja i čuvanja.

Za procenu stabilnosti lekovite supstance i preparata primenjuju se: studije u roku trajanja, studije ubrzanog starenja i stresne studije stabilnosti.

Ispitivanja u roku trajanja podrazumevaju da se preparat koji se ispituje čuva pod normalnim uslovima skladištenja, na sobnoj temperaturi od  $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  i pri relativnoj vlažnosti vazduha od  $60\% \pm 5\%$ . U određenim vremenskim intervalima se uzimaju uzorci za ispitivanje na određene fizičko-hemijske i mikrobiološke parametre. Ispitivanje u uslovima skladištenja u predviđenom roku trajanja predstavlja dug proces. Da bi se u kratkom vremenu došlo do podataka o stabilnosti i odredio rok trajanja, koriste se studije ubrzanog starenja, pri čemu se faktor vreme zamenjuje faktorom povišene temperature. Preparat se pored temperaturnih promena izlaže i uslovima povećane vlažnosti, a ako je potrebno i jakom izvoru svetlosti. Ispitivanja se kod studije ubrzanog starenja izvode u periodu od 6 meseci na temperaturi od  $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  i pri relativnoj vlažnosti vazduha od  $75\% \pm 5\%$ .

Stresne studije (stimulisana degradacija), odnosno ispitivanja hemijske, fizičke ili mikrobiološke stabilnosti organske supstance ili lekovitog preparata, obuhvataju primenu određenih stresnih uslova u nekom vremenskom periodu i određivanje efekta tog stresa na određene hemijske, fizičke i mikrobiološke osobine ispitivanog uzorka. Izbor uslova kojima se uzorak podvrgava zavisi od fizičko-hemijske prirode supstance ili preparata i od uslova kojima će preparat verovatno biti podvrgnut za vreme transporta, čuvanja i upotrebe. Testovi pod stresnim uslovima čuvanja izvode se na povišenim temperaturama ( $> 50\text{ °C}$ ) i pri relativnoj vlažnosti vazduha od  $75\% \pm 5\%$ . Arrhenius-ovom jednačinom može se doći do odgovarajuće temperature kao i maksimalnog vremena trajanja termalne degradacije. Tako na primer, na osnovu pretpostavljene  $E_a$  od 15 kcal/mol, skladištenje u periodu od 18 meseci na  $25\text{ °C}$  može se zameniti sa 20 dana skladištenja na  $70\text{ °C}$  ( $20 \times 27.7 = 554$  dana ili oko 18 meseci), 6 dana na  $90\text{ °C}$  ili dva dana na  $110\text{ °C}$  (Tabela 2.6.)<sup>93</sup>.

Tabela 2.6. Zavisnost stepena degradacije aktivne supstance od temperature.

Temperatura (°C)	Stepen degradacije		
	$k = Ae^{-E_a/RT}$ ( $E_a = 12$ kcal/mol)	( $E_a = 15$ kcal/mol)	( $E_a = 18$ kcal/mol)
25	1	1	1
30	1.39	1.52	1.65
40	2.62	3.37	4.29
50	4.78	7.1	10.5
60	8.36	14.3	24.4
70	14.2	27.7	54.0
80	23.5	51.8	114
90	37.7	93.3	231
100	58.9	163	451
110	89.8	277	851
120	134	457	1550

U cilju ispitivanja stabilnosti lekovitih preparata odgovarajući API i DP, u čvrstom stanju ili u rastvoru, podvrgavaju se različitim stresnim uslovima (kisela/bazna hidroliza, zagrevanje, oksidacija i svetlost) u saglasnosti sa ICH regulativnim pravilnicima<sup>91-95</sup>. Stabilnost se često kvantitativno izražava kao rok trajanja (*shelf-life*), odnosno kao vreme za koje je predviđeno da preparat ostane prikladan za upotrebu, pod uslovom da se čuva pri određenim uslovima. Stresni uslovi treba da dovedu do približno 5 - 20 % degradacije odgovarajućeg API, pri čemu specifični uslovi, kao što su intenzitet uslova hemijske degradacije i vreme, prvenstveno zavise od hemijskih karakteristika i stabilnosti API. Smatra se da je preparat stabilan, ukoliko je stepen promene aktivne supstance niži od 5 %, a da pri tom nije došlo do stvaranja toksičnih proizvoda. Kada je u pitanju kisela/bazna hidroliza obično se koriste HCl ili H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.1 - 1 M), odnosno NaOH, LiOH ili KOH (0.1 - 1 M). Oksidacija se izvodi u atmosferi kiseonika ili u prisustvu peroksida (< 3 %). Od analitičkih metoda za praćenje promena koriste se LC-MS i HPLC analiza.

### 2.6.2. Mikrotalasno-stimulisana degradacija lekova

Jedan od osnovnih nedostataka stresnih studija degradacije jeste vreme neophodno za dostizanje željenog stepena degradacije aktivnih farmaceutskih supstanci. U konvencionalnim uslovima, stresne studije izvode se po nekoliko sati ili čak dana, na sobnoj temperaturi ili zagrevanjem uz refluks. Pored toga, značajan problem predstavlja i broj uzoraka kao i vreme neophodno za njihovu pripremu i analizu<sup>96-100</sup>.

Tokom proteklih deset godina mikrotalasno-stimulisana hemija pokazala se kao veoma efikasna i moćna tehnika rada u organskoj laboratoriji. Mogućnost ubrzanog zagrevanja reakcione smeše do temperature koje su daleko iznad temperatura ključanja pri atmosferskom pritisku u modernim, laboratorijskim mikrotalasnim instrumentima, dovela je do drastične redukcije vremena hemijskih transformacija u poređenju sa konvencionalnim uslovima<sup>18</sup>. I pored toga, eksploatacija mikrotalasne tehnologije u oblasti stresnih studija je veoma niska, odnosno do naših istraživanja postojale su samo dve publikacije o upotrebi kućne mikrotalasne peći za ispitivanje stabilnosti aktivnih supstanci lekova<sup>100,101</sup>. Imajući u vidu da je precizna kontrola reakcionih parametara (temperature, pritiska i mešanja) je od presudnog značaja u cilju dobijanja ponovljivih rezultata<sup>67</sup>, primena mikrotalasnih reaktora namenjenih za laboratorijska istraživanja je neophodna.

## 2.7. Nafta-energent i izvor organskih jedinjenja

Nafta (*petroleum, crude oil*) je jedna od najznačajnijih potrošnih supstanci moderne industrije. Reč *petroleum* potiče od latinskih reči *petra* i *oleum* što znači stenovito ulje i odnosi se na ugljovodonike široko rasprostranjene u sedimentnim stenama u obliku gasova, tečnosti ili u čvrstom stanju. Gorivo koje se dobija iz nafte pokriva više od polovine svetskih izvora energije. Jedinjenja izolovana iz nafte predstavljaju polazne supstance u proizvodnji sintetičkih vlakana, plastike, boja, veštačkog đubriva, insekticida, sapuna, sintetičkog kaučuka i još mnogo drugih važnih proizvoda.

Sa hemijskog aspekta nafta je izuzetno kompleksna smeša ugljovodonika čiji se sastav menja od nalazišta do nalazišta, obično sa minimalnim količinama jedinjenja azota, kiseonika, sumpora, kao i jedinjenja metala u tragovima. Među ugljovodonicima koji dominiraju u pojedinim tipovima nafte najzastupljeniji su parafini, nafteni i aromati, te se stoga prema njihovom udelu razlikuju parafinska, naftenska i aromatična nafta.

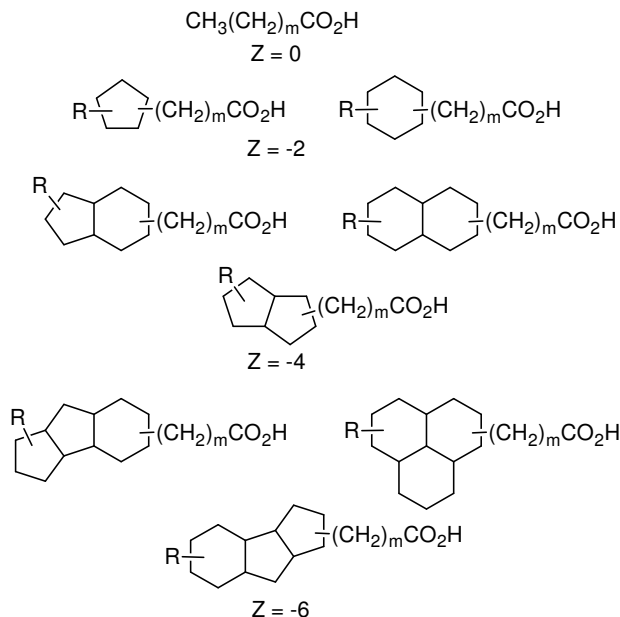
### 2.7.1. Naftenske kiseline

Oblast organske geohemije koja se bavi organskim jedinjenjima kao biološkim markerima počela se intenzivno razvijati nakon otkrića pigmenata porfirina u nafti<sup>102</sup>. Pitanja koja privlače pažnju su evolucija nafte i drugih fosilnih goriva, geohemijski ciklus ugljenika, primena organskih konstituenata za određivanje fizičke, hemijske i biološke istorije stena kao i paleobiohemijski dokaz porekla i evolucije života. Sa tog stanovišta geohemičarima su najinteresantnija jedinjenja nafte strukturno identična ili slična jedinjenjima koja se mogu sresti u živim organizmima.

Biomarkeri ili *molekulski fosili*, su organska jedinjenja detektovana u geosferi čiji osnovni skelet sugerise na nedvosmislenu vezu sa poznatim, prirodnim produktima što predstavlja direktan dokaz da sedimentna organska materija, uključujući i petroleum, poseduje biološko poreklo. Neka jedinjenja koja su identifikovana u nafti mogu se svrstati u grupu biomarkera. Tu spadaju porfirini, izoprenoidi, terpenški ugljovodonici, steroidni ugljovodonici, kao i neke klase kiseoničnih organskih jedinjenja (izoprenoidne kiseline, masne kiseline, alkoholi i dr.).

U nafti, kao kompleksnoj smeši različitih jedinjenja, prisutne su i karboksilne kiseline različitih struktura, odnosno alifatične, aliciklične, aromatične i druge. Naftne kiseline koje su izolovane iz nafte

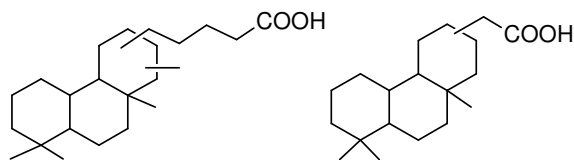
naftenskog tipa nazvane su naftenske kiseline (*naphthenic acids*, NAs) i one najvećim delom sadrže cikličnu ugljovodoničnu strukturu. Empirijska formula za kiseline može se opisati sa  $C_nH_{2n+z}O_2$ , gde se  $z$  odnosi na nedostatak vodonika i predstavlja negativan ili čak ceo broj (*Slika 2.20*).



*Slika 2.20.* Tipične strukture naftenskih kiselina u  $z = 0, -2, -4$  i  $-6$  familijama (R je alkil grupa;  $m$  je  $\geq 0$ ).

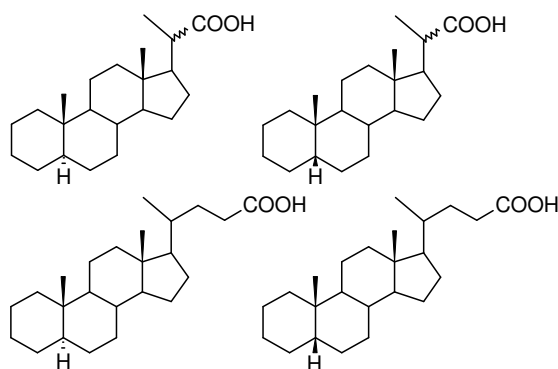
Alifatične naftenske kiseline, dominantno prisutne u parafinskim naftama, poseduju od  $C_{10}$  do  $C_{36}$  atoma<sup>103-105</sup>. U sastav nafte takođe ulaze i kiseline izoprenoidne strukture. Kiseline sa  $C_{14}$  i  $C_{15}$  atoma strukturnu analogiju imaju sa biomolekulom farnezolom, dok za karboksilne kiseline do  $C_{20}$  veza se može se uspostaviti sa fitolom. Najzasupljenije kiseline izoprenoidne strukture su fitanska kiselina sa  $C_{20}$  i pristanska sa  $C_{19}$  atoma za koje se smatra da nastaju iz lipida morskih organizama<sup>106,107</sup>. Cikloalkanske karboksilne kiseline najzasupljenije su u tzv. naftenskim i aromatičnim naftama kao petočlani i šestočlani prstenovi, u zavisnosti od starosti i dubine basena, tako da nafte starijeg porekla sadrže veći procenat šestočlanih prstenova. Monociklične karboksilne kiseline mogu nastati oksidacijom  $\beta$ -karotena ili  $\beta$ -jononskog prstena uz dalje raspadanje do *cis*- ili *trans*-izomera. Biciklične i policiklične naftenske kiseline, koje su sa aspekta geneze nafte najinteresantnije, dugo nisu bile otkrivene, iako se njihovo prisustvo pretpostavljalo. Gallegos i saradnici<sup>108</sup> dali su iscrpnu analizu viših ugljovodonika u nafti. Tankoslojnom i gasnom hromatografijom, a zatim masenom spektrometrijom, utvrdili su prisustvo oko 19 klasa ugljovodonika, od acikličnih i cikloparafinskih (naftenskih) ugljovodonika sa 1 - 6 prstenova, preko kondenzovanih aromatično-naftenskih, monoaromatičnih, bi- i polikondenzovanih aromatičnih ugljovodonika. Triciklične naftenske kiseline otkrivene su od strane Seiferta i saradnika<sup>109</sup>

koji su došli do zaključka da je zastupljenost ovih kiselina nešto niža u odnosu na biciklične kiseline. Analiziranjem izolovanih C<sub>21</sub> i C<sub>24</sub> tricikličnih naftenskih kiselina pomenuti autori su utvrdili terpenoidnu strukturu (Slika 2.21.).



Slika 2.21. Izoprenoidne kiseline.

Isti autori su, takođe, paralelno otkrili i steroidne kiseline u komercijalnim naftenskim kiselinama, ali u vrlo malim količinama. Relativno mala količina steroidnih kiselina u nafti u direktnoj je vezi sa njihovom genezom. Identifikovana 5β-holanska kiselina je A/B *cis*- i stoga termodinamički nestabilnija, a pretpostavlja se da su njeni direktni prekursori životinjske žučne kiseline, koje su pretežno *cis*-C<sub>24</sub>-hidroksiholanske kiseline (Slika 2.22.).



Slika 2.22. Steroidne karboksilne kiseline prisutne u nafti (5α i 5β- pregnan kiseline, 5α i 5β-holanske kiseline).

Konterus<sup>110</sup> je primetio, mnogo pre nego što su otkrivene terpenoidne i steroidne kiseline u nafti, da u komercijalnim naftenskim kiselinama obično ima i malo karboksilnih kiselina sa aromatičnom strukturom. Kasnije je utvrđeno<sup>111</sup> da prisutne aromatične kiseline mogu imati supstituisano benzenovo, naftalensko, fenantrensko i još neka druga kondenzovana aromatična jezgra.



### 2.7.2. Fizičko-hemijske osobine naftnih kiselina

Naftenske kiseline su viskozne tečnosti, sa fenolnim i sumpornim nečistoćama najvećim delom odgovornim za njihov karakterističan miris. Zastupljenost pojedinih struktura karboksilnih kiselina u smeši naftenskih kiselina određuje njihove fizičke i hemijske karakteristike, kao što su molekulska masa, rastvorljivost, boja, viskozitet i dr. (Tabela 2.7.). Boje im variraju od bleđožute do tamnosmeđe. Naftenske kiseline imaju širok opseg tački ključanja (250 - 350 °C). Potpuno su rastvorne u organskim rastvaračima ali su nerastvorne u vodi.

Tabela 2.7. Fizičko-hemijske karakteristike naftnih kiselina.

Parametri	Opšte karakteristike
Molekulska masa	140 - 450 g/mol
Rastvorljivost u vodi	0.06 - 4.52 mg/mL
Kiselinska konstanta	$10^{-5}$ - $10^{-6}$
Tačka ključanja	250 - 350 °C

Hemijski, naftenske kiseline se ponašaju kao i tipične karboksilne kiseline<sup>112-114</sup>. Pored njihove najčešće primene u dobijanju soli metala takođe mogu da reaguju dajući estre, alkohole, amide i druge derivate<sup>105,115</sup>.

### 2.7.3. Derivatizacija naftenskih kiselina

Naftenske kiseline su u višim koncentracijama (iznad 50 mg/L)<sup>116</sup> korozivne i toksične supstance te stoga predstavljaju ozbiljne zagađivače otpadnih voda u rafinerijama a samim tim i prirodne sredine<sup>113,117,118</sup>. Na ovom problemu radio je veliki broj naučnika i razvijeno je nekoliko metoda smanjenja koncentracije NAs u sirovoj nafti<sup>119-121</sup>. Jedna od metoda smanjenja toksičnosti i neželjenih efekata naftenskih kiselina jeste njihova transformacija u proizvodno-iskoristljive ili biološki aktivne derivate.

Poznato je da karboksilne kiseline, estri karboksilnih kiselina i njihove soli imaju široku primenu u industriji, kao emulgatori bitni su sastojci insekticida, stabilizuju najlonske smole, katalizuju dobijanje alkil- i poliestarskih smola<sup>112</sup>, kao slikarski aditivi itd. Pored toga, primena bakarnih i cinkovih naftenata za impregnaciju drveta i proizvodnju sredstava za dezinfekciju umesto kreozota je u konstantnom razvoju<sup>115,116</sup>. Estri NAs imaju široku primenu kao sintetski lubrikanti<sup>122</sup>, plastifikatori<sup>123,124</sup>, u

proizvodnji kože<sup>125</sup>, u oblasti strukturne analize nafte<sup>115</sup> a značajni su i kao intermedijeri u daljoj derivatizaciji NAs<sup>126</sup>.

### 2.7.3.1. Amidacija karboksilnih kiselina

Amidi, bilo prirodni ili sintetički, su među najvažnijim jedinjenjima u organskoj hemiji. Stabilna i polarna amidna grupa je veoma značajna funkcionalna grupa, prisutna u mnogim organskim supstancama među kojima su i prirodni molekuli kao što su proteini. Amino i amidna grupa su prisutne i u sintetičkim jedinjenjima kao što su aktivni farmaceutski sastojci ili prekursori lekova<sup>127,128</sup>. Zahvaljujući ovim činjenica, amidi su predmet velikog interesovanja u pronalaženju i dizajniranju lekova, a jedna od najviše opisivanih transformacija jeste formiranje amida iz amina i karboksilnih kiselina i njihovih derivata.

Najčešće metode za sintezu amida uključuju konverziju karboksilne grupe u reaktivniju funkcionalnu grupu ili neku *in situ* reakciju aktivacijom pomoću kuplujućih reagenasa. Kao najčešći kuplujući reagens koristi se *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid (DCC)<sup>129</sup>,  $\text{TiCl}_4$ <sup>130</sup> ili dvovalentna jedinjenja kalaja<sup>132-133</sup>. Iako su ovim metodama postignuti dobri rezultati osnovni nedostatak je što iziskuju skupe kuplujuće reagense kao i formiranje nusproizvoda što zahteva dodatnu, a vrlo često i komplikovanu dalju obradu. U cilju pojednostavljenja reakcije amidacije, posebno izbegavanja preliminarne, često skupe sinteze reagenasa za kuplovanje, sinteza amida pirolitičkim putem u odsustvu katalizatora i rastvarača smatra se jednom od najpogodnijih metoda<sup>134</sup>. Pomenuta metoda sastoji se od pirolize odgovarajuće soli, dobijene mešanjem amina i karboksilne kiseline (*Shema 2.1.*). Međutim, ova nova metoda sinteze amida iziskuje visoke vrednosti temperature i dug vremenski period zagrevanja.



*Shema 2.1.* (a)  $\Delta$ , -  $\text{H}_2\text{O}$ .

Tako na primer, piroliza primarnih amonijum soli alifatičnih karboksilnih kiselina kraćeg ugljovodoničnog niza<sup>135</sup> ili  $\beta$ -feniletilamina sa feniletanskom kiselinom<sup>136</sup> se odvija pri temperaturi od 180 °C, dok su u slučaju reakcija amidacije oleinske kiseline sa primarnim aminima neophodne izuzetno visoke vrednosti temperature, odnosno iznad 230 °C, u toku 3 - 15 h<sup>137</sup>.

Cossy i saradnici<sup>138</sup> su zahvaljujući upotrebi molekulskih sita uspeli da sintetizuju sekundarne amide pri temperaturi od 140 °C, odnosno 170 °C polazeći od aromatičnih kiselina, u toku dva sata. Kada je u pitanju sinteza tercijarnih amida nije postignuta konverzija karboksilatne soli do odgovarajućih karboksamida pri temperaturi od 180 °C i pored prisustva molekulskih sita. Detaljnija istraživanja u oblasti termalne kondenzacije karboksilnih kiselina i amina u prisustvu molekulskih sita urađena su od strane Gooben-a i saradnika<sup>139</sup>. Amidacijom masnih kiselina sa *N*-benzilaminom isti autori su zaključili da molekulska sita nemaju poseban uticaj na prinos proizvoda reakcije kao i da prisustvo Lewis-ovih ili Brønsted-ovih kiselina dovodi do nižih vrednosti prinosa sekundarnog amida (*Tabela 2.8.*).

*Tabela 2.8.* Uticaj prisustva molekulskih sita, katalizatora i temperature u reakciji undekanske kiseline (1 ekv.) i *N*-benzilamina (1 ekv.) u toku 2 h.

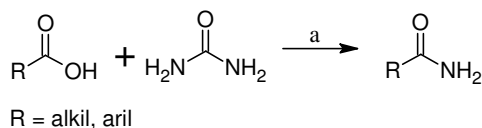
MS veličina [Å]	MS [mg]	Katalizator	T [°C]	Prinos [%]
4	100	-	120	59
4	100	MgSO <sub>4</sub>	120	39
4	100	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	120	45
3	100	-	120	48
4	200	-	120	58
-	-	-	120	49
4	100	-	160	89
-	-	-	160	95

Značajno je naglasiti da u okviru prethodnih eksperimenata najveći uticaj na stepen konverzije karboksilnih kiselina u odgovarajući amid ima vrednost temperature zagrevanja.

Razvojem mikrotalasne tehnologije i širenjem njene primene u različitim oblastima organske sinteze postignuti su značajni rezultati u pogledu skraćanja vremena trajanja različitih hemijskih transformacija, poboljšanju prinosa proizvoda i smanjenju formiranja nusproizvoda<sup>26,27</sup>. Mikrotalasna aktivacija je veoma uspešno primenjena i u više slučajeva sinteze amida, direktnim ozračivanjem smeše amina i karboksilnih kiselina, pri čemu su korišćeni različiti tipovi katalizatora, kao što su: K-10 montmorilonit<sup>140</sup>, imidazol<sup>141</sup>, zeolit-HY<sup>142</sup>, *p*-toluensulfonska kiselina<sup>143</sup>, TaCl<sub>5</sub>-silikagel<sup>144</sup>, KF-aluminat i silikagel<sup>145</sup>. Međutim, pomenute sinteze su izvedene u kućnoj mikrotalasnoj peći bez mogućnosti kontrole temperature i emitovane snage.

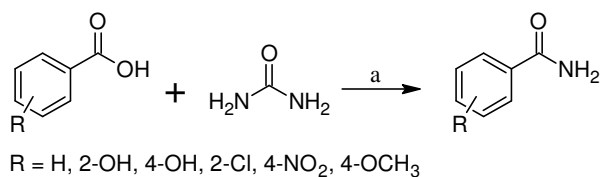
Khalafi-Nezhad i saradnici<sup>146</sup> sintetizovali su primarne amide mikrotalasnim ozračivanjem strukturno različitih karboksilnih kiselina i uree u prisustvu imidazola kao katalizatora u kućnoj mikrotalasnoj peći. Zahvaljujući formiranju polarnih soli karboksilnih kiselina, niske temperature topljenja, postignuta je

efikasnija apsorpcija mikrotalasa od strane novonastale homogene reakcione smeše u odsustvu rastvarača (*Shema 2.2.*).



*Shema 2.2.* (a) imidazol, MW, 90 - 360 sec, 47 - 88 %.

Netoksične soli prelaznih metala takođe su se pokazale kao izuzetno reaktivni katalizatori u reakcijama sinteze primarnih amida<sup>147</sup>. Mikrotalasnim ozračivanjem čistih reaktanata u prisustvu katalitičkih količina cirkonil-hlorida u mono-modnom mikrotalasnom reaktoru, pri temperaturi od 80 °C, sintetizovani su amidi u veoma visokom prinosu (*Shema 2.3.*).



*Shema 2.3.* (a) ZrOCl<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O, MW, 20 - 80 sec, 70 - 90 %.

Važno je napomenuti da u odsustvu katalizatora (ZrOCl<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O) nije došlo do reakcije uree sa aromatičnim karboksilnim kiselinama pri istoj, relativno niskoj vrednosti temperature od 80 °C.

Zahvaljujući prednostima mikrotalasnog zagrevanja i direktnoj interakciji elektromagnetnog zračenja sa reagensima veliku pažnju privukle su *solvent-free* reakcije koje se uklapaju u principe *zelene hemije*<sup>148,149</sup>. U slučaju reakcija amidacije, mikrotalasnim ozračivanjem čistih reaktanata (*neat* reakcije) omogućena je sinteza amida direktno iz neaktiviranih karboksilnih kiselina i amina u odsustvu kuplajućih reagenasa i rastvarača<sup>25,150-155</sup>.

Ispitivanjem uticaja mikrotalasa na brzinu reakcije amidacije, Perreux i saradnici<sup>152</sup> su pretpostavili da usled povećanja polarnosti u prelaznom stanju dolazi do snažnije interakcije sa mikrotalasnim zračenjem rezultujući sniženjem energije aktivacije (*netermički mikrotalasni efekti*). Međutim, ove sinteze sekundarnih amida vođene su u otvorenom sistemu mono-modnog mikrotalasnog reaktora pri temperaturi ključanja reakcione smeše koje se u mnogome ne razlikuju od eksperimenata izvođenih konvencionalnim zagrevanjem. U okviru istih istraživanja zapaženi su poprilično niski prinosi u slučaju slabo baznih amina, kao što je anilin (*Tabela 2.9.*).

Tabela 2.9. Prinosi reakcija anilina sa RCO<sub>2</sub>H na 150 °C pod dejstvom MW zračenja i uz konvencionalno zagrevanje (Δ).

R	Vreme [min]	Molski odnos kiselina : amin	Prinos [%]	
			MW	Δ
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	120	1:1.5	12	-
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>	30	1:1	40	33
	30	1:1.5	40	41
	30	1.5:1	52	45
n-C <sub>9</sub> H <sub>19</sub>	30	1:1.5	14	-
	120	1:1	40	35
	120	1:1.5	34	30

Iz priloženog se vidi da ni produžavanje vremena trajanja reakcije, niti dodatak jednog od reaktanata u višku, nisu doprineli povećanju prinosa željenog proizvoda. Isti autori primetili su i značajne razlike u reaktivnosti u zavisnosti od strukture reaktanata:

Karboksilne kiseline:  $n\text{-C}_9\text{H}_{19}\text{CO}_2\text{H} \geq \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H} \gg \text{C}_6\text{H}_5\text{CO}_2\text{H}$

Amini:  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{NH}_2 > p\text{-CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4\text{NH}_2 > \text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$

Posmatrajući pK vrednosti za amine i karboksilne kiseline (Tabela 2.10.) zaključeno je da su karboksilne kiseline približno iste reaktivnosti dok su u slučaju amina razlike u reaktivnosti daleko izraženije.

Tabela 2.10. pK Vrednosti amina i karboksilnih kiselina

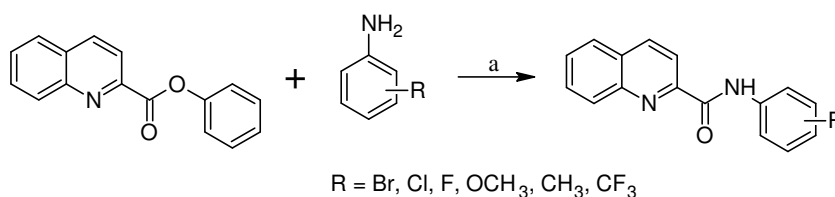
	<i>n</i> -C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> CO <sub>2</sub> H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO <sub>2</sub> H
pK <sub>a</sub>	4.89	4.31	4.21
	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	<i>p</i> -CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NH <sub>2</sub>
pK <sub>b</sub>	4.67	8.66	9.40

Reakcije aminolize aktivnih estara karboksilnih kiselina, pod dejstvom mikrotalasnog zračenja, predstavljaju alternativu reakcijama amidacije karboksilnih kiselina sa slabo baznim aminima. Transformacija estara karboksilnih kiselina u amide je važna sintetička procedura ali se obično vrši pri energičnijim reakcionim uslovima, zahtevajući visoke temperature i produženo reakciono vreme, kao i upotrebu baznih katalizatora<sup>150,154</sup> (Tabela 2.11.).

Tabela 2.11. Reakcija anilina (1.5 ekv.) sa RCOOEt u prisustvu KOtBu (2 ekv.) na 150 °C.

R	Vreme [min]	Aliquat [10 %]	Prinos [%]	
			MW	Δ
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	10	-	88	73
	10	+	90	83
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>	2	+	98	33
n-C <sub>9</sub> H <sub>19</sub>	2	+	84	83

Detaljna istraživanja na polju reaktivnosti estara, odnosno uticaja strukture na reaktivnost, urađena su od strane Gordon-a<sup>157</sup> praćenjem brzine aminolize nekoliko različitih estara. U okviru ovih istraživanja utvrđeno je da su najreaktivniji fenil-, metil- i benzil-estri karboksilnih kiselina. Aminolizom fenil-estara hinolin-2-karboksilne kiseline pod dejstvom mikrotalasnog zračenja, u odsustvu rastvarača i katalizatora, Bobal i saradnici<sup>158</sup> su sintetizovali odgovarajuće anilide u visokom prinosu (60 - 80 %), (Shema 2.4.).



Shema 2.4. (a) MW, 150 °C, 1 h, 60 - 80 %.

Reakcije amidacije naftenskih kiselina, koje predstavljaju kompleksne smeše karboksilnih kiselina, su slabo poznate u literaturi. Primarni amidi naftenskih kiselina, koji su se pokazali kao derivati od velikog značaja u oblasti strukturne analize nafte, sintetizovani su od strane Smith-a i saradnika<sup>115</sup> iz odgovarajućih hlorida kiselina sa NH<sub>4</sub>OH u visokom prinosu.

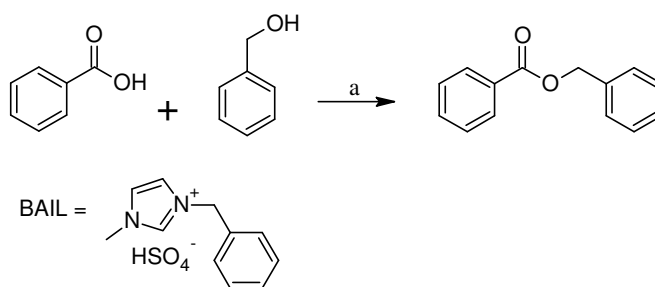
### 2.7.3.2. Sinteza estara karboksilnih kiselina

Reakcije esterifikacije nalaze se među najstarijim i najčešće korišćenim reakcijama u organskoj hemiji sa širokim spektrom primene u hemijskoj i farmaceutskoj industriji<sup>159</sup>. Zahvaljujući velikom značaju estara, ove reakcije su postale predmet velikog broja istraživanja i zahvaljujući tome razvijen je značajan broj sintetskih procedura<sup>160-164</sup>. Organski estri su veoma važni proizvodi i/ili intermedijeri u hemijskoj i farmaceutskoj industriji gde se u velikoj meri koriste za dobijanje aroma, polimera,

poliestara, masnih kiselina i boja<sup>159</sup>. Jedan od najvećih problema direktne metode sinteze estara jeste reverzibilnost reakcije. Zbog toga neophodno je prisustvo viška kiseline ili alkohola, ili konstantno uklanjanje vode ili proizvoda iz reakcione smeše u cilju pomeranja ravnoteže reakcije u pravcu građenja proizvoda<sup>165,166</sup>. Istovremeno, upotreba rastvarača i mineralnih kiselina (kao katalizatora) imaju za posledicu dodatne nedostatke kao što su korozivnost, nusproizvodi i toksičnost<sup>159</sup>.

Među katalizatorima najbolje su se pokazale soli hafnijuma i cirkonijuma. Ishihara i saradnici<sup>167</sup> dokazali su visoku efikasnost  $\text{HfCl}_4$  u toluenu za strukturno različite karboksilne kiseline i alkohole, zagrevanjem uz refluks. Nedostatak pomenute metode jeste dugo reakciono vreme, odnosno reakcija sinteze benzil-benzoata pri datim uslovima trajala je petnaest sati. Pored toga, neophodnost konstantnog uklanjanja vode iz reakcione smeše posebno je izražena kod manje reaktivnih aromatičnih supstrata kao što je benzoeva kiselina i fenol. Chakraborti i saradnici<sup>168</sup> sintetizovali su estre aromatičnih kiselina direktnom kondenzacijom ekvimolarne količine karboksilne kiseline i alkohola u prisustvu perhlorne kiseline kao katalizatora nanete na silikagel ( $\text{HClO}_4\text{-SiO}_2$ ). Druge protične kiseline kao što su  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HBr}$ ,  $\text{TfOH}$ ,  $\text{HBF}_4$  i  $\text{TFA}$  adsorbovane na silikagelu pokazale su niži stepen reaktivnosti u odnosu na  $\text{HClO}_4\text{-SiO}_2$ . U cilju promocije zelene hemije direktna kondenzacija karboksilnih kiselina sa alkoholima u prisustvu jonskih tečnosti tipa Brønsted-ove kiseline (*Brønsted acidic ionic liquids*, BAILs), kao katalizatora<sup>169</sup> jeste jedna od favorizovanih metoda ali pomenute sintetske transformacije zahtevaju višestruko zagrevanje reakcione smeše.

Razvoj mikrotalasne tehnologije i njena sve šira primena u različitim oblastima organske sinteze doprinela je razvoju novih metoda esterifikacije koje podrazumevaju ekvimolarne količine reaktanata, katalizovane netoksičnim reagensima, kao i značajnu redukciju vremena trajanja sinteza u poređenju sa konvencionalnim zagrevanjem<sup>170,171</sup>. Kada su u pitanju manje reaktivni aromatični supstrati, mikrotalasnim ozračivanjem čistih reaktanata Li i saradnici<sup>172</sup> uspešno su sintetizovali benzil-estre u prisustvu Brønsted-ove kiseline kao jonske tečnosti (*Brønsted acidic ionic liquids*, BAILs), u odsustvu rastvarača (*Shema 2.5.*).



*Shema 2.5.* (a) BAIL, MW, 20 min., 120 °C, 88 %.

Visok stepen reaktivnosti jonskih tečnosti tipa Brønsted-ove kiseline pokazale su i u reakcijama esterifikacije salicilne kiseline sa metanolom (3 ekv.) u otvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora pri temperaturi od svega 105 °C, u toku 20 minuta<sup>173</sup>.

Reakcije esterifikacije kompleksne smeše prirodnih naftenskih kiselina od velikog su značaja u oblasti strukturne analize nafte. U tu svrhu razvijeno je nekoliko metoda kvantitativne esterifikacije NAs sa BF<sub>3</sub> u metanolu<sup>104</sup>, *N,N*-dimetilformamid-dimetilacetalom<sup>174</sup>, diazometanom<sup>175,176</sup>, *N*-metil-*N*-(*t*-butildimetilsilil)trifluoroacetamidom<sup>177,178</sup> ili *N,O*-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamidom (BSTFA)<sup>179</sup>. Međutim, pomenute sinteze odvijaju se u prisustvu toksičnih reagenasa kao što je diazometan i/ili tokom dužeg vremenskog perioda (1 - 24 h) pri niskim vrednostima temperature (< 100 °C).

Značajan stepen redukcije vremena trajanja reakcije esterifikacije kompleksne smeše naftenskih kiselina postignut je od strane Ćirin-Novta i saradnika<sup>180</sup> zahvaljujući primeni mikrotalasnog zračenja. U poređenju sa konvencionalnim zagrevanjem (6 - 9 h) nakon svega 5 minuta mikrotalasnog ozračivanja u kućnoj mikrotalasnoj pećnici dobijeni su metil-, etil-, *n*-butil- i *t*-butil-estri u prinosu od 60 - 80 % u prisustvu *p*-toluensulfonske kiseline ili sumporne kiseline kao katalizatora.



## 2.8. Biološka aktivnost naftenskih kiselina

Niske koncentracije naftenskih kiselina (do 0.5 mg/L) kao i njihovih soli pokazale su biološku aktivnost analognu hormonima rasta biljaka<sup>181-188</sup> kao i baktericidnu aktivnost<sup>189,190</sup>. Fiziološka aktivnost alkalnih soli naftnih kiselina po prvi put je primećena od strane Neuberg-a i Sandberg-a<sup>191</sup>. Nakon toga započeta su opširnija istraživanja fiziološke aktivnosti soli naftnih kiselina u agrohemiji, primenom na različitim poljoprivrednim kulturama kod kojih je zabeležen porast produkcije proteina u kukuruzu, pšenici i grašku<sup>116</sup>.

Fiziološki aktivne supstance imaju dominantnu ulogu u kontroli morfogenetskih promena u toku života svake žive jedinke. Kod biljaka su to fitohormoni ili endogeni regulatori rasta, odnosno supstance koje pokazuju odgovarajuće stimulatívno ili inhibitorno dejstvo na odgovarajuće biohemijske procese. Posledica tih dejstava su promene morfoloških osobina i sinteza organskih materija u biljkama. Fitohormoni se dele u pet osnovnih grupa, odnosno na auksine, gibereline, citokinine, abscisinske i etilene. Auksini svoje promotorno dejstvo iskazuju u svim fazama razvoja biljke i regulišu klijanje, cvetanje, formiranje korena, izdanaka i plodova. U prirodne auksine biljaka ubrajaju se 3-indolsirćetna kiselina, indolacetaldehid, indolacetonitril, indolpirogroždana kiselina itd. Giberelini čine drugu značajnu grupu biljnih hormona koja reguliše sazrevanje semena, klijanje, rast, izduživanje i cvetanje. Razlikuju se od drugih hormona po svom hemijskom sastavu i delovanju. Oni su grupa diterpenoidnih tetracikličnih kiselina sa zajedničkom *ent*-giberelanskom osnovom. Giberelini u biljnom svetu uglavnom nisu u obliku slobodnih kiselina, već su vezani u glikozide ili estere.

Vojvođanske naftenske kiseline izolovane iz atmosferskog gasnog ulja, frakcije vojvođanske naftenske nafte *Velebit*, kao kompleksna smeša cikloalifatičnih i alkil-supstituisanih acikličnih karboksilnih kiselina pokazale su biološku aktivnost tipa giberelina i auksina, što se vidi iz rada Miljkovića i saradnika<sup>184</sup>, a kasnije su Grbović i saradnici<sup>188</sup> razdvajanjem kompleksne smeše naftenskih kiselina na uže frakcije, na osnovu različite kiselosti, dobili frakcije od kojih su neke pokazale značajnije izraženu biološku aktivnost. Tako je frakcija izolovana pri pH 8, u kojoj preovladavaju policiklične strukture, pokazala najveću i auksinsku i giberelinsku aktivnost koje odgovaraju aktivnosti 3-indolsirćetne kiseline (prirodni biljni auksinski hormone) i giberelinske kiseline (GA<sub>3</sub>).

Naftenske kiseline stimulaciju fizioloških procesa kod raznih biljnih vrsta izazivaju pri nižim koncentracijama (< 5 mg/L) dok u većim koncentracijama (> 50 mg/L) ispoljavaju toksične efekte.

Naftenske kiseline se smatraju najtoksičnijim komponentama u vodama iz jalovišta uljnih škriļjaca (*oil sands process water*) stoga, ne iznenađuje činjenica da se poslednjih godina intenzivno vrše ispitivanja

koja se bave toksičnošću naftenskih kiselina. Usled njihove slabe rastvorljivosti u vodi (0.06 - 4.52 mg/mL) koncentruju se u vodama jalovišta (do 110 mg/L) znatno doprinoseći toksičnim karakteristikama vode<sup>192,193</sup>. Rasprostranjenost, analiza, toksičnost i biodegradacija NAs ispitivane su od strane Clemente-a i saradnika<sup>116</sup>. Naftenske kiseline prema sisarima ne ispoljavaju toksične efekte ali su zato izrazito toksične prema ribama (sa LC<sub>50</sub> vrednostima između 4 i 78 mg/L), bakterijama i insektima<sup>117</sup>. Toksikološke studije sprovedene na određenim vrstama ribe, kao što je kalifornijska pastrmka, sa natrijum-naftenatima LC<sub>50</sub> vrednosti od 50 do 75 mg/L<sup>112,192,194</sup>.

Toksična priroda NAs pripisuje se njihovim surfaktantskim karakteristikama, odnosno prisustvu hidrofobnih alkil grupa i hidrofilne karboksilatne grupe u njihovim solima<sup>192</sup>. Zahvaljujući surfaktantskim karakteristikama NAs prolaze kroz ćelijski zid i dovode do razaranja ćelijske membrane<sup>195</sup>. Pored toga, ustanovljeno je da NAs dovode i do zagađenja podzemnih i površinskih voda usled odliva procesnih voda naftne industrije. Akutna toksičnost NAs na vodena i kopnena staništa ističe potrebu za pronalaženjem načina njihovog uklanjanja iz otpadnih voda naftnih izvorišta i rafinerija.

S obzirom na to da naftenske kiseline predstavljaju kompleksnu smešu karboksilnih kiselina identifikacija osnovnih toksičnih komponenata je velik problem. Na osnovu višegodišnjih studija zaključeno je da su NAs niže molekulske mase najtoksičnije komponente prisutne u otpadnim vodama industrije nafte<sup>116,193</sup> i da ona opada sa porastom broja ugljenikovih atoma i strukturne kompleksnosti kiselina<sup>196</sup>. Policiklične strukture sa većim brojem račvastih ugljenikovih atoma su najotpornije prema biodegradaciji. Za razliku od njih kiseline niže molekulske mase, manje račvaste i sa manjim brojem C atoma (< 22) su biodostupne mikroorganizmima koji ih degradiraju povećavajući tako udeo kiselina sa većim molekulskim masama u smeši NAs. Stoga, toksičnost vode jalovine opada sa starenjem rezervoara<sup>177,197</sup>. Komercijalno dostupne NAs su više fito-toksične u odnosu na kiseline iz voda jalovišta<sup>198</sup>. Pomenuta razlika pripisivana je distribuciji molekulskih masa NAs, odnosno komercijalne smeše poseduju kiseline niže molekulske mase u većim koncentracijama, te su stoga i toksičnije.

Toksičnost NAs takođe zavisi od pH vrednosti voda jalovišta (pKa vrednosti NAs su između pH 5.2 i 6). Stoga, ukoliko je pH vrednost voda jalovišta viša od standardnih pKa vrednosti NAs su u jonizovanom obliku i manje toksične zbog toga što kao visoko polarizovani molekuli ne mogu proći kroz biološku membranu. U suprotnom, pri nižim vrednostima pH, NAs su u neutralnom obliku i kao takve rastvorljivije u biološkim membranama te stoga i toksičnije.

Drugi značajan aspekt koji se mora uzeti u obzir prilikom određivanja stepena toksičnosti u vodama jalovišta jeste koncentracija naftenskih kiselina prisutnih u kontaminiranim vodama<sup>177</sup>. Koncentracija NAs nađena u vodama jalovine je prilično visoka, odnosno od 40 do 120 mg/L<sup>195,196</sup> i raste sa

učestalošću procesa dobijanja vode jalovišta. Iako je toksičnost vode jalovišta delimično redukovana prirodnom biodegradacijom ipak to je dugotrajan proces za koji je neophodno nekoliko godina do završetka te stoga ne može da prati velike količine proizvedene procesne vode.

### 3. NAŠI RADOVI

Snažan prodor mikrotalasno-stimuliranih metoda rada u sintezama organskih jedinjenja u odsustvu rastvarača (*solvent-free* ili *dry-media*) i katalizatora od velikog je značaja sa aspekta zelene hemije. Ciljevi zelene hemije sažeti su u “pronalaženju, planiranju i primeni hemijskih procesa i proizvoda kojima se smanjuje ili eliminiše upotreba i stvaranje opasnih materija”. Prema ciljevima zelene hemije, interesovanja za upotrebu ekološki prihvatljivih reagenasa i procedura neprestano raste, a izbegavanje organskih rastvarača u organskoj sintezi vodi čistim, efikasnim i ekonomičnim tehnologijama.

Jedan od ciljeva ovog rada je ispitivanje negativnih efekata katalizatora, najzastupljenijih reagenasa u oblasti organskih sinteza, kao i mogućnosti njihovih smanjenja primenom specijalnih silicijum-karbidnih reakcionih sudova u kombinaciji sa mikrotalasnom tehnologijom. Efikasnost mikrotalasnog zračenja, u pogledu eliminacije prisustva katalizatora i brzine izvođenja najrazličitijih hemijskih transformacija, potvrđena je i u okviru sintetskih transformacija karboksilnih kiselina kao što su esterifikacija, amidacija i aminoliza.

Pomenuti derivati, posebno amidi, ulaze u sastav različitih prirodnih i sintetskih biološki aktivnih supstanci i lekova. Stoga, prvi zadatak ovog rada je određivanje stepena stabilnosti amidne veze, pod dejstvom mikrotalasnog zračenja. Da li i u kolikoj meri mikrotalasi utiču na stabilnost biološki aktivnih jedinjenja ispitivano je u okviru stresnih studija aktivnih farmaceutskih komponenata, jedne od trenutno najaktuelnijih tema farmaceutskih razvojnih laboratorija, primenom specijalne silicijum-karbidne ploče, odnosno HPLC/GC viala kao reakcionih sudova. Na taj način, kroz eliminaciju uticaja greške manuelnog transfera uzorka i povećanje stepena produkcije, potvrđen je visok stepen efikasnosti mikrotalasne tehnologije.

Drugi cilj ove doktorske disertacije su sinteze odabranih derivata individualnih naftenskih kiselina, kao i prirodnih naftenskih kiselina nafte *Velebit* i komercijalnih *Aldrich* naftenskih kiselina radi dobijanja derivata koji bi pokazali veću biološku aktivnost. Zahvaljujući prednostima mikrotalasne tehnologije i direktnoj interakciji elektromagnetnog zračenja sa reagensima izvedene su *solvent-free* reakcije, u odsustvu katalizatora, koje se uklapaju u principe zelene hemije. U slučaju reakcija amidacije, mikrotalasnim ozračivanjem čistih reaktanata (*neat* reakcije), omogućena je sinteza amida direktno iz neaktiviranih karboksilnih kiselina i amina, u odsustvu kuplujućih reagenasa i rastvarača. Pomenuta metoda predstavlja reakciju pirolize odgovarajuće soli, dobijene mešanjem amina i karboksilne kiseline.

Odsustvo rastvarača, a naročito odsustvo katalizatora dovelo je do čistijih reakcionih sistema i jednostavnijeg izolovanja željenog proizvoda. Reakcije sinteze amida karboksilnih kiselina ispitane su i u uslovima aminolize aktivnih estara. S obzirom na to da su estri prirodnih naftenskih kiselina od velikog značaja u oblasti strukturne analize nafte vršena je optimizacija reakcija esterifikacije naftenskih kiselina u prisustvu mikrotalasnog zračenja.

Nizak stepen rastvorljivosti naftenskih kiselina u vodi kao primarnom medijumu za biološka ispitivanja usmerio je naša dalja istraživanja prema sintezi polarnijih derivata naftenskih kiselina, odnosno holin-estara.

Mikrotalasno-stimulisanom Wolff-Kishner-ovom redukcijom keto derivata žučnih kiselina sintetizovana je 5 $\beta$ -holanska kiselina, osnovna žučna kiselina i poslednji oblik geohemijskih transformacija biološkog materijala. Derivatizacijom sintetizovane tetraciklične kiseline u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora dobijeni su sekundarni i tercijarni amidi u visokom prinosu. Efikasnost mikrotalasnog zračenja potvrđena je prilikom hemijskih transformacija hidroksilnih, keto i karboksilnih funkcionalnih grupa žučnih kiselina.

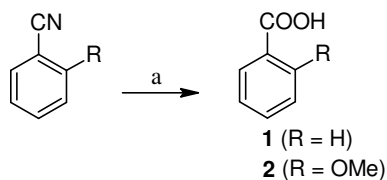
U trećoj, finalnoj fazi ovog rada ispitana je biološka aktivnost sintetizovanih derivata naftenskih kiselina kao i model smeše formirane iz sintetizovanih derivata individualnih naftenskih kiselina.

Od biološke aktivnosti ispitana je je auksinska aktivnost (Test inhibicije klijanja) ovih jedinjenja, efekat na ožiljavanje reznica biljaka (Test ožiljavanja reznica suncokreta), a ispitana je i uticaj na razmnožavanje mikroorganizama i antiproliferativna aktivnost.

### 3.1. Fizičko-hemijska stabilnost silicijum-karbidnih reakcionih sudova

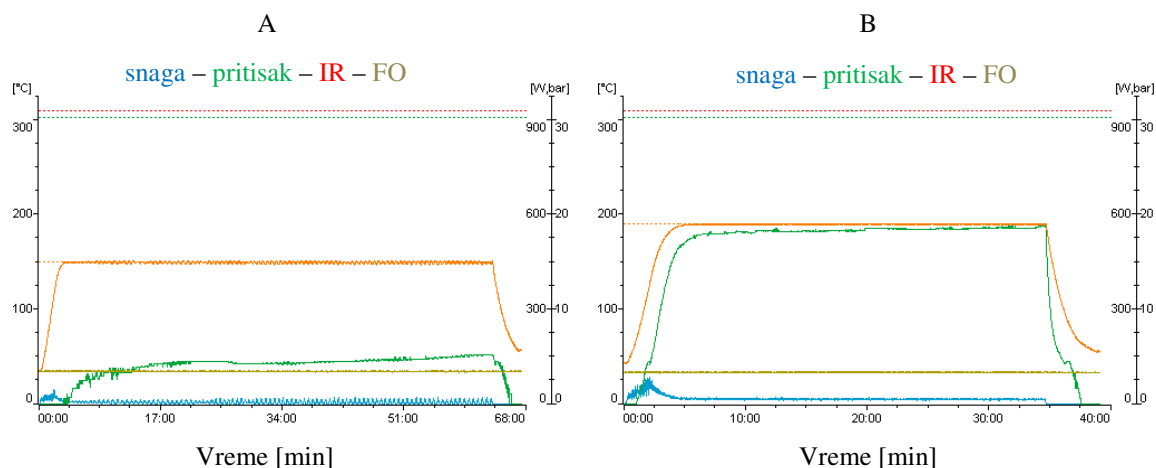
Reakcije koje se odvijaju u prisustvu jakih baza, kao što je hidroliza aromatičnih nitrila, praćene su taloženjem istih na granici faza. Pored toga, u slučaju homogenih reakcionih smeša, katalizovanih prelaznim metalima dolazi do razlaganja katalizatora pri visokim vrednostima temperature tokom mikrotalasnog ozračivanja i njegovog taloženja sa unutrašnje strane zida reakcionog suda (npr. Pd). Snažno mikrotalasno-apsorbujući sloj baze i/ili metala može da dovede do topljenja *Pyrex* reakcionih sudova ili do fenomena varničenja. Oba efekta neizbežno dovode do katastrofalnih oštećenja stakla mikrotalasnog suda kao i samog instrumenta<sup>199</sup>. Zahvaljujući novim, keramičkim, SiC reakcionim sudovima koji onemogućavaju penetraciju elektromagnetnog zračenja pomenuti negativni efekti su uspešno eliminisani<sup>203</sup>.

Poređena je otpornost prema koroziji SiC reakcionih sudova (SiC viala) i *Pyrex* reakcionih sudova, u uslovima bazne hidrolize aromatičnih nitrila, pod dejstvom mikrotalasnog zračenja. U radu je isplanirana model studija hidrolize benzonitrila i 2-metoksibenzonitrila sa 20 % vodenim rastvorom kalijum-hidroksida u zatvorenom sistemu mono-modnog mikrotalasnog reaktora, u temperaturnom opsegu od 150 - 190 °C (*Shema 3.1.*).



*Shema 3.1.* (a) KOH, H<sub>2</sub>O, MW, 1 h, 150 °C, 85 % (1) / 190 °C, 93 % (2).

Dok je u slučaju hidrolize benzonitrila do benzojeve kiseline potrebno zagrevanje od 1 h na temperaturi od 150 °C (2 ekv. KOH, 20 % vodeni rastvor) pod mikrotalasnim zračenjem, reakcija hidrolize sterno zaštićenog 2-metoksibenzonitrila zahteva mikrotalasno ozračivanje od 2 h na temperaturi od 170 °C ili 1 h na 190 °C (5 ekv. KOH, 20 % vodeni rastvor), (*Slika 3.1.*).



Slika 3.1. Profil mikrotalasnog zagrevanja benzonitrila (A) i 2-metoksibenzonitrila (B) u 20 % vodenom rastvoru KOH u Anon Paar Monowave 300.

Rezultati dobijeni praćenjem stepena konverzije (HPLC) nitrila u željeni proizvod, u slučaju *Pyrex* i SiC sudova, su u suštini identični (> 90 %), međutim prinos izolovanog proizvoda iz SiC viala je daleko veći (> 80 %) u odnosu na *Pyrex* reakcione sudove (Tabela 3.1.). Proizvodi bazne hidrolize aromatičnih nitrila potvrđeni su GC-MS spektroskopijom (1, m/z 121; 2, m/z 151)<sup>203</sup>.

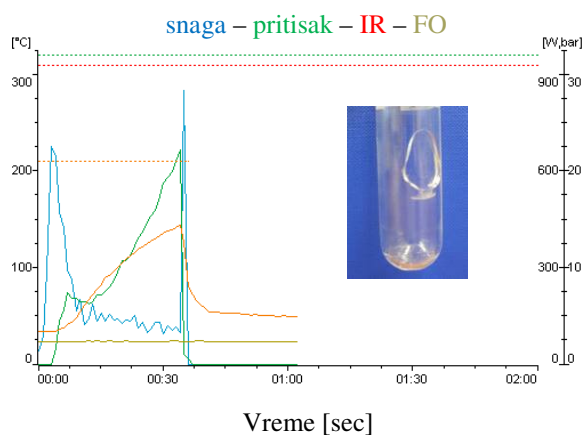
Tabela 3.1. Poređenje prinosa izolovanog proizvoda bazno katalizovane hidrolize nitrila u SiC i *Pyrex* vialima.

Nitril	Temperatura [°C]	Vreme [min]	Prinos [%]	
			<i>Pyrex</i>	SiC
benzonitril	150	60	21	85
2-metoksibenzonitril	190	120	57	93

Eksperimenti izvođeni u *Pyrex* vialima sadrže veću količinu proizvoda degradacije stakla, odnosno silikata (Slika 3.3.) čineći sam proces izolovanja reakcionog proizvoda otežanim. Na osnovu prethodnog, urađena je detaljna evaluacija stepena korozije standardnih *Pyrex* mikrotalasnih reakcionih sudova sa vodenim rastvorom kalijum-hidroksida (20 - 60 %) u temperaturnom opsegu od 100 - 210 °C i vremenu od 10 - 120 minuta (Tabela 4.1.). Pri maksimalnoj operativnoj vrednosti temperature od 190 °C u mikrotalasnom reaktoru *Biotage Initiator*, prosečan gubitak mase reakcionog suda iznosi 0.660 g, dok je u slučaju *Anton Paar Monowave 300* (< 210 °C) reakcionih sudova zabeležen gubitak mase od čak 1.252 g. nakon 120 minuta mikrotalasnog ozračivanja<sup>203</sup>.

Tokom određivanja stepena korozije *Pyrex* viala utvrđeno je da isti zavisi od temperature (> 150 °C) dok koncentracija baze (20 - 60 %) nema uticaja na gubitak mase reakcionog suda (Tabela 4.1.).

U okviru studija korozije, pri visokim vrednostima temperature i pritiska, uočene su i pukotine i eksplozije *Pyrex* viala (Slika 3.2.). Prelaskom rastvarača u gasovitu fazu, pri visokim vrednostima temperature, dolazi do izdvajanja čvrstog KOH na granici faza (Slika 3.3.) a samim tim i do njegove snažne interakcije sa mikrotalasima što je praćeno lokalizovanim topljenjem *Pyrex* stakla. Pored toga, pri datim reakcionim uslovima razvija se i visok pritisak (10 - 20 bar) koji dovodi do pucanja reakcionog suda, oštećenja IR senzora i mikrotalasne peći.



Slika 3.2. Oštećenje mikrotalasnog viala; T/P/p - krive reakcionih uslova (*heat as fast as possible*) za *Monowave 300 Anton Paar*.

Eksplozije i pucanja *Pyrex* viala su u potpunosti eliminisane povećanjem zapremine reakcione smeše. Pritom treba voditi računa o prostoru iznad reakcione smeše s obzirom na to veća zapremina dovodi do viših vrednosti pritiska reakcionog sistema pri nižim vrednostima temperature, kao i postavljanju odgovarajućeg vremena (*ramp time*), neophodnog za dostizanje željene temperature. U suprotnom, korišćenjem opcije za ubrzano dostizanje visokih vrednosti temperature (*heat as fast as possible*), date od strane proizvođača mikrotalasnog uređaja, magnetron oslobađa maksimalnu količinu snage u cilju što bržeg dostizanja željene temperature, i na taj način dolazi do snažne interakcije mikrotalasa sa KOH na granici tečne i gasovite faze.



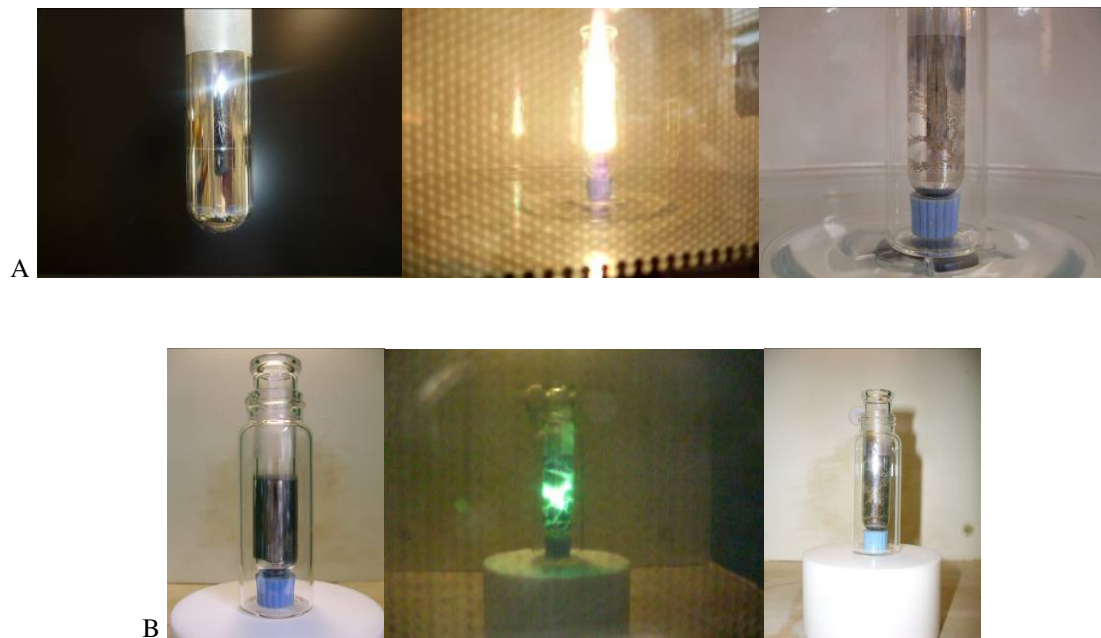


Slika 3.3. Stepen korozije kao i prisustvo nerastvornih silikata iz stakla vezanih na površinu zidova *Pyrex* mikrotalasnih reakcionih sudova (A, *Biotage* - 20 % KOH, 190 °C, 2 h; B, *Anton Paar* - 20 % KOH, 210 °C, 2 h).

Zagrevanjem vodenog rastvora kalijum-hidroksida u silicijum-karbidnim reakcionim sudovima, pri različitim vrednostima temperature i pritiska, nije uočen gubitak mase SiC suda kao ni naprsnuća, eksplozije ni formiranje silikata<sup>203</sup>.

Dodatna karakteristika reakcionih sudova napravljenih od snažno mikrotalasno-apsorbirajućih i temperaturno-otpornih materijala (SiC) jeste eliminacija mogućnosti oštećenja usled stvaranja snažno-apsorbirajućeg filma metala (Ag, Pd), formiranog sa unutrašnje strane zida reakcionog suda tokom pojedinih hemijskih transformacija. S druge strane, sloj metala u *Pyrex* reakcionim sudovima dovodi do topljenja i do fenomena varničenja usled snažne interakcije sa mikrotalasima (Slika 3.4).

S obzirom na to da je penetracija elektromagnetnog polja u SiC sudovima potpuno eliminisana, isti predstavljaju idealnu zamenu za borsilikatno staklo i minimalizaciju fenomena varničenja. Pored toga, značajno viša temperatura topljenja SiC u poređenju sa borsilikatnim (*Pyrex*) staklom, onemogućava topljenje reakcionog suda. Na taj način omogućeno je efikasno i sigurno izvođenje eksperimenata pod dejstvom mikrotalasnog zračenja u prisustvu metala ili drugih snažno mikrotalasno-apsorbirajućih materijala<sup>203</sup>.

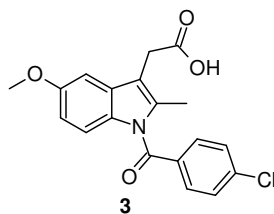


*Slika 3.4.* Varničenje i oštećenja borsilikatnog stakla usled prisustva filma srebra (A) ili filma paladijuma (B), (kućna mikrotalasna peć, 100 W).

### 3.2. Mikrotalasno-stimulisana degradacija aktivnih farmaceutskih komponenata

U prvoj fazi ovog dela naših radova ispitan je uticaj mikrotalasnog zračenja na brzinu procesa degradacije (stresnih studija) aktivnih farmaceutskih komponenata u prisustvu agresivnih supstanci kao što su jake kiseline, jake baze, vodonik-peroksid ali i vode, organskih rastvarača i nekih gasova. Kao model supstanca, odnosno aktivna farmaceutska komponenta, za detaljna istraživanja efikasnosti mikrotalasne tehnologije i SiC sudova u stresnim studijama, izabran je indometacin. Istraživanja su zatim proširena i na stresne studije omeprazola i Pyr3.

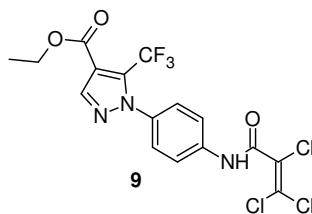
Indometacin ili 1-(4-hlorbenzoil)-5-metoksi-2-metil-1*H*-indol-3-sirćetna kiselina, pripada grupi nesteroidnih, antiinflamatornih lekova (NSAIDS)<sup>204</sup> (Shema 3.2.).



Shema 3.2. Indometacin.

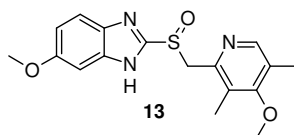
Stepen kao i putevi degradacije indometacina pri različitim stresnim uslovima su poznati u literaturi, međutim studije stabilnosti indometacina zahtevaju dug vremenski period, od nekoliko sati do nekoliko dana pri konvencionalnim uslovima zagrevanja ili na sobnoj temperaturi<sup>205-213</sup>.

Pyr3, hemijski etil-1-[4-(2,3,3-trihlorakrilamido)fenil]-5-(trifluormetil)-1*H*-pirazol-4-karboksilat<sup>214</sup> jeste selektivni inhibitor TRPC3 protein receptora za kontrolu transporta Ca<sup>2+</sup> kroz ćelijsku membranu. Na taj način Pyr3 reguliše krvni pritisak i sprečava pojavu hipertrofije srčanog mišića i zato je njegova stabilnost u uslovima skladištenja u funkciji vremena veoma bitan podatak.



Shema 3.3. Pyr3.

Omeprazol spada u grupu antiulkusnih lekova (antagonist H<sub>2</sub> receptora) koji se primenjuju za lečenje poremećaja povezanih sa povećanom proizvodnjom želudačne kiseline, kao što je gastritis. Ovi lekovi sprečavaju stvaranje želudačnih sokova, najviše hlorovodonične kiseline i enzima pepsina. Omeprazol je prvi pretstavnik inhibitora protonske pumpe, lekova za lečenje peptičkih bolesti (gastritisa, čira na želucu i dvanaestopalačnom crevu). Strukturno gledano, sastoji se od indolskog i piridinskog dela povezanih –SO–CH<sub>2</sub>– mostom<sup>215-217</sup> (Shema 3.4.)



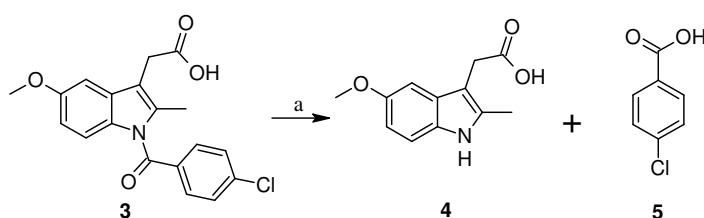
Shema 3.4. Omeprazol.

Višečasovne studije stabilnosti omeprazola, pri konvencionalnim uslovima, pokazale su da je ova aktivna komponenta stabilna pri  $\text{pH} \geq 7$ , dok se u kiseljoj sredini značajno degradira već pri sobnoj temperaturi<sup>218-220</sup>.

S obzirom na to da su načini degradacije i degradacioni proizvodi ispitivanih farmaceutskih aktivnih sastojaka pri različitim stresnim uslovima poznati u literaturi, analitička temeljitost i striktna validacija hromatografske metode nije primarni koncept ovih studija. Stoga, precizna kvantifikacija degradacionih proizvoda, korišćenjem internog standarda, nije rađena. Tačnije, poređenje površine pika pri odgovarajućoj talasnoj dužini (230 nm) primenom HPLC-UV analize je smatrano dovoljno u svrhu validacije koncepta mikrotalasno-posredovane prisiljene degradacije. Eksperimenti su ponovljeni najmanje tri puta da bi osigurali statističku relevantnost metode. Praćenjem stresnih studija HPLC-UV analizom nije otkriven ni jedan dodatni proizvod degradacije u odnosu na literaturno poznate. Strukture degradacionih proizvoda potvrđene su LC-MS analizom.

## 3.2.1. Ispitivanje stepena stabilnosti indometacina pri konvencionalnim reakcionim uslovima

Inicijalni eksperimenti ispitivanja stabilnosti indometacina (**3**,  $M = 357.08 \text{ g/mol}$ ) na sobnoj temperaturi potvrđuju dugotrajnost procesa degradacije<sup>221</sup>. Tačnije, kiselo-katalizovanom hidrolizom amidne veze indometacina na sobnoj temperaturi (0.1 M HCl) stepen degradacije iznosi 11 % nakon 24 h, odnosno 24 % nakon 72 h. Od degradacionih proizvoda identifikovani su LC-MS analizom proizvodi hidrolize, odnosno 5-metoksi-2-metil-3-indolsirćetna kiselina (**4**,  $m/z$  218) i 4-hlorobenzoeva kiselina (**5**,  $m/z$  155), (Shema 3.5.)<sup>221</sup>.

Shema 3.5. (a) H<sup>+</sup>/ OH<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O.

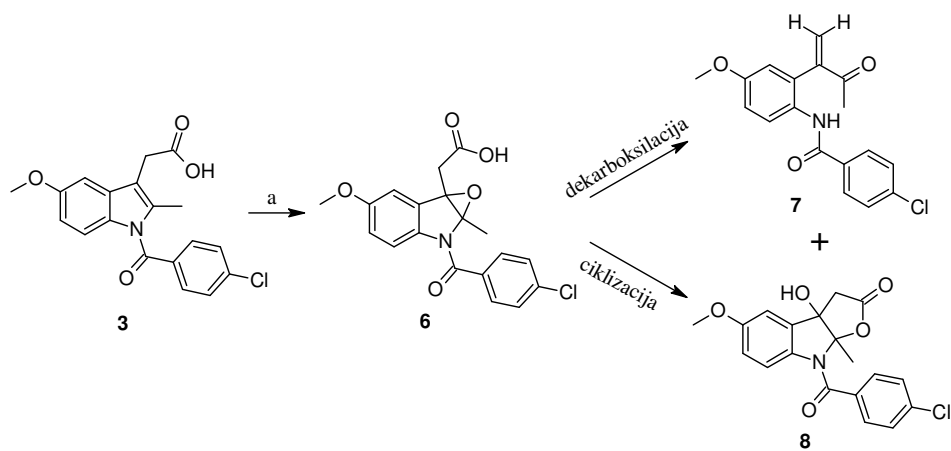
Dalje je ispitan uticaj temperature na brzinu degradacije indometacina. Standardni rastvor aktivnog farmaceutskog ingredijenta **3** podvrgnut je kiselim, baznim i oksidativnim stresnim uslovima kao i neutralnoj sredini. Postepenim povišenjem temperature, od sobne do temperature ključanja reakcione smeše, dobijene su opširnije informacije o stabilnosti aktivnog farmaceutskog ingredijenta **3** u daleko kraćem vremenskom periodu (Tabela 3.2.).

Tabela 3.2. Stepen degradacije indometacina zagrevanjem uz refluks<sup>221</sup>.

Vreme [min]	Stepen degradacije [%]						
	H <sub>2</sub> O	HCl	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	AcOH	NaHCO <sub>3</sub>	NaOH	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
10	0	3	0	0	36	100	0
30	0	6	6	0	100	100	1
60	0	24	13	0	100	100	3
120	1	44	42	1	100	100	7

Poređenjem prethodnih rezultata sa eksperimentima izvedenim pri sobnoj temperaturi, uočen je sličan stepen degradacije indometacina nakon samo 1 h zagrevanja (sa 0.1 M HCl) u odnosu na 72 h na sobnoj temperaturi. Potpuna degradacija indometacina uočena je nakon 30 minuta zagrevanja reakcione smeše u baznoj sredini sa 0.1 M NaOH i NaHCO<sub>3</sub>. Pri oksidativnim stresnim uslovima od degradacionih proizvoda identifikovani su LC-MS analizom 4-hlor-*N*-[4-metoksi-2-(1-metilen-2-oksopropil)fenil]-

benzamid (**7**,  $m/z$  330) i 8-(4-hlorbenzoil)-3a-hidroksi-5-metoksi-8a-metil-3,3a,8,8a-tetrahidro-2H-furo[2,3-b]indol-2-on (**8**,  $m/z$  375), (Shema 3.6.)<sup>221</sup>.



Shema 3.6. (a) 0.02 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, refluks.

Tokom oksidativnih stresnih studija dolazi do formiranja nestabilnog indol-2,3-epoksidnog intermedijera (**6**) koji zatim prelazi u proizvode dekarboksilacije i ciklizacije.

### 3.2.2. Mikrotalasno-stimulisana degradacija indometacina

Skraćenje vremena potrebnog za degradaciju aktivne komponente leka od nekoliko dana do svega nekoliko sati, jednostavnim povišenjem temperature reakcione smeše od sobne do temperature ključanja, otvara nove mogućnosti primene mikrotalasne tehnologije. Mogućnost izvođenja hemijskih transformacija u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora na temperaturama koje su daleko iznad temperatura ključanja samih reaktanata primenjena je u stresnim studijama aktivnih farmaceutskih ingredijenata u cilju dalje redukcije vremena toka degradacije.

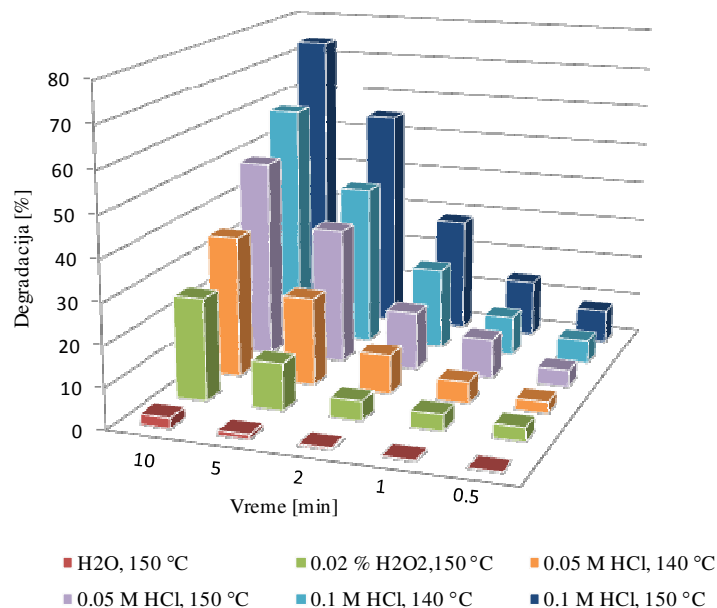
Mikrotalasno-stimulisanom degradacijom, u zatvorenom sistemu mono-modnog mikrotalasnog reaktora, postignut je isti stepen degradacije indometacina na 160 °C u toku 1 minuta (0.1 M HCl) kao na sobnoj temperaturi nakon 72 h (Tabela 3.3.).

Tabela 3.3. Ubrzanje stepena degradacije indometacina sa povišenjem temperature u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora u 0.1 M rastvoru HCl<sup>221</sup>.

T [°C]	Vreme [min]	Degradacija [%]
100	60	47
110	30	47
120	15	43
130	8	40
140	4	36
150	2	31
160	1	27

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa Arrhenius-ovom jednačinom, ukazujući na to da temperaturni inkrementi od 10 °C dovode do redukcije reakcionog vremena za 50 %. Ovo pravilo aproksimativno uključuje dupliranje stepena degradacije, međutim stepen ubrzanja reakcije u funkciji temperature zavisi i od energije aktivacije ( $E_a$ ) koja treba da bude oko 12 - 15 kcal/mol dok je za degradaciju većine lekova prosečna energija aktivacije oko 23 - 24 kcal/mol<sup>93</sup>.

Mikrotalaso-stimulisana degradacija indometacina, u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora *Biotage Initiator*, ispitana je i u destilovanoj vodi i vodonik peroksidu kao reakcionim sredinama. Pri odabranim vrednostima temperature (140 °C, 150 °C) izvršeno je poređenje stepena stabilnosti indometacina pri različitim stresnim uslovima nakon 10 minuta mikrotalasnog ozračivanja (*Slika 3.5*).

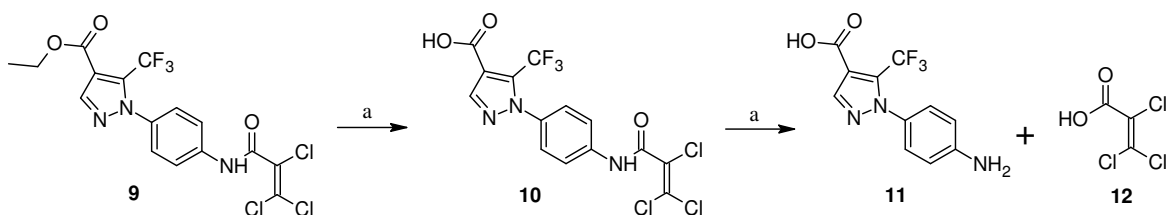


Slika 3.5. Stepenski dekadacija indometacina u zatvorenom sistemu *Biotage Initiator* mikrotalasnog reaktora (140 °C, 150 °C).

Na osnovu rezultata prikazanih na *Slici 3.5.* jasno se vidi uticaj temperature na brzinu degradacije indometacina pri različitim stresnim uslovima. Oksidativnom degradacijom indometacina u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora postignut je znatno viši stepen degradacije (25 %, 10 min.) u odnosu na konvencionalno zagrevanje (*Tabela 3.2.*; 7 %, 120 min.). Indometacin se pokazao kao izuzetno stabilan (3 %, 10 min.) prilikom zagrevanja u vodi pri visokoj vrednosti temperature (150 °C).

### 3.2.3. Mikrotalasno-stimulisana degradacija Pyr3 i omeprazola

Mikrotalasno-stimulisanom degradacijom, u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora, u prisustvu kiseline (0.1 M HCl), vodonik-peroksida (0.1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ili vode, Pyr3 (**9**, M = 454.98 g/mol) se pokazao kao izuzetno stabilno jedinjenje. Međutim, mikrotalasnim ozračivanjem u prisustvu jake baze (0.1 M NaOH) LC-MS analizom je potvrđena hidroliza Pyr3 (**9**, M = 454.98 g/mol) do odgovarajuće kiseline (**10**, m/z 427), (*Shema 3.7.*).



*Shema 3.7.* (a) OH<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O, MW, 100 - 160 °C, 10 min.

Pri visokim vrednostima temperature i pritiska, dobijena kiselina (**10**) je podlegla daljoj degradaciji (*Tabela 3.4.*) do odgovarajućih proizvoda hidrolize amidne funkcionalne grupe (**11**, m/z 270; **12**, m/z 174).

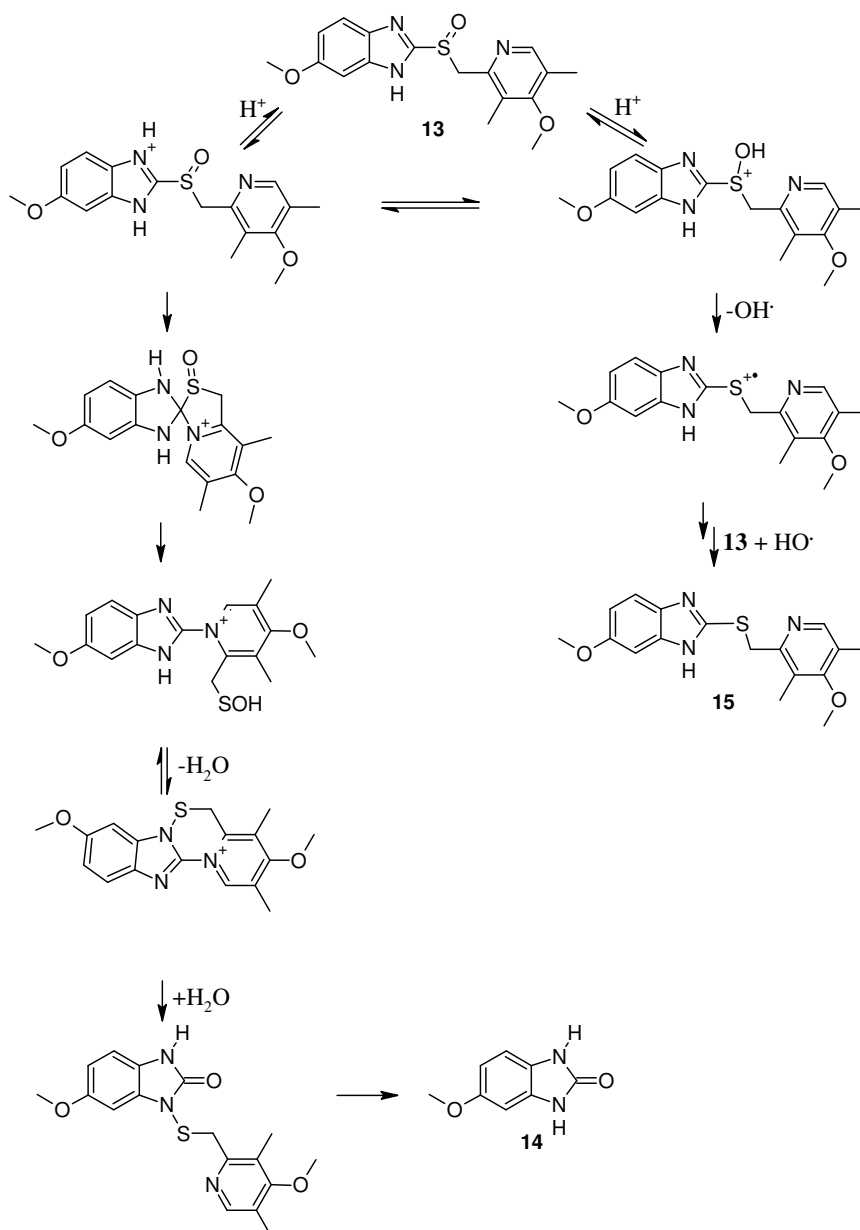
*Tabela 3.4.* Stepen degradacije kiseline (**10**) nakon 10 minuta zagrevanjem sa 0.1 M NaOH.

T [°C]	Degradacija [%]
100	0
120	6
140	18
160	56

Mikrotalasno-stimulisanim zagrevanjem omeprazola (**13**, M = 345.4 g/mol) u kiseloj sredini (0.1 M HCl) pri temperaturi od 100 °C, aktivni ingredijent je u potpunosti hidrolizovan do odgovarajućih



proizvoda **14** i **15** (Shema 3.8.) nakon svega 10 minuta zagrevanja dok je na sobnoj temperaturi potrebno reakciono vreme bilo 43 h<sup>220</sup>.



Shema 3.8. Putevi degradacije omeprazola<sup>220</sup>.

Omeprazol, kao izuzetno stabilan aktivni farmaceutski ingredient pri pH  $\geq 7$  u konvencionalnim uslovima, podlegao je degradaciji u prisustvu jake baze (0.1 M NaOH) tek pod dejstvom mikrotalasnog

zračenja (Tabela 3.5.). Degradacioni proizvodi (**14**, m/z 166; **15**, m/z 330) potvrđeni su LC-MS analizom.

Tabela 3.5. Stepen degradacije omeprazola u mikrotalasnom reaktoru zagrevanjem sa 0.1 M NaOH u toku 10 minuta.

T [°C]	Degradacija [%]
100	2
120	33
140	80
160	98

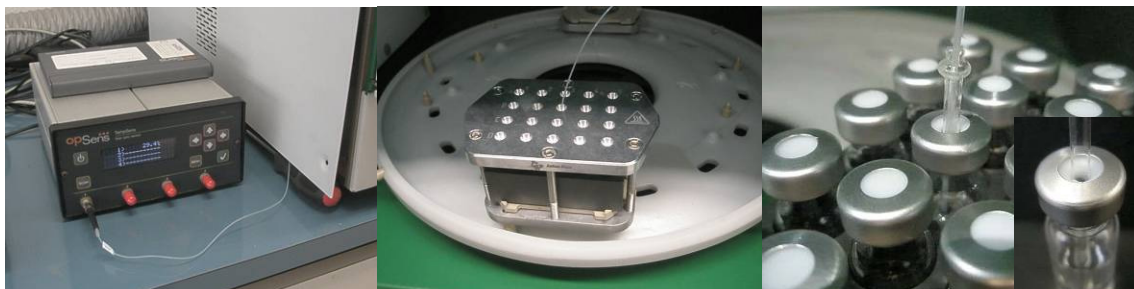
Na osnovu rezultata dobijenih u okviru stresnih studija Pyr3 i omeprazola, koji ukazuju na visok stepen nestabilnosti aktivnih supstanci **9** i **13** pod dejstvom mikrotalasnog zračenja, iste su se pokazale kao nepogodne za dalja istraživanja stresnih studija u silicijum-karbidnim pločama.

#### 3.2.4. Paralelna mikrotalasno-stimulisana degradacija indometacina u silicijum-karbidnim pločama

Mikrotalasno-posredovanom degradacijom indometacina u zatvorenom sistemu mono-modnog mikrotalasnog reaktora *Biotage Initiator* i *Anton Paar Monowave 300*, pri visokim vrednostima temperature i pritiska, uspešno je demonstriran značaj mikrotalasnog zračenja u stresnim studijama. Stoga, naš sledeći korak je bio minijaturizacija procesa i povećanje stepena produkcije stresnih studija zahvaljujući primeni SiC ploča i upotrebom HPLC/GC viala kao reakcionih sudova.

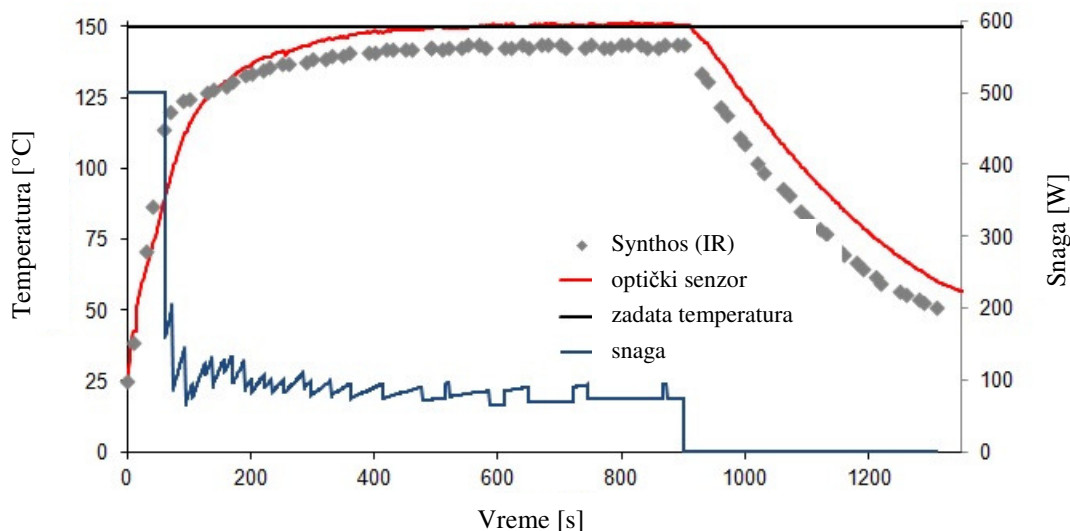
Indometacin izabran je kao model jedinjenje za evaluaciju koncepta izvođenja visoko efikasne mikrotalasno-posredovane degradacije u SiC pločama.

S obzirom na to da je precizno merenje i kontrola temperature tokom mikrotalasno-stimulisanih reakcija od velikog značaja za dobijanje pouzdanih rezultata, određena je stvarna vrednost temperature unutar HPLC/GC viala, smeštenih u SiC ploču. To je postignuto praćenjem reakcione temperature pomoću IR senzora, ugrađenog u podnožje mikrotalasnog reaktora *Anton Paar Synthos 3000*, kojim je registrovana samo temperatura na površini silicijum-karbidne ploče, i multikanalnim OGT-F optičkim senzorom (*TempSens signal conditioner, Opsens*) sa četiri optička vlakna za merenje temperature unutar reakcionog suda (Slika 3.6.).



Slika 3.6. Multikanalni OGT-F optički senzor (*TempSens signal conditioner, Opsens*) sa četiri optička vlakna za merenje temperature unutar HPLC/GC viala.

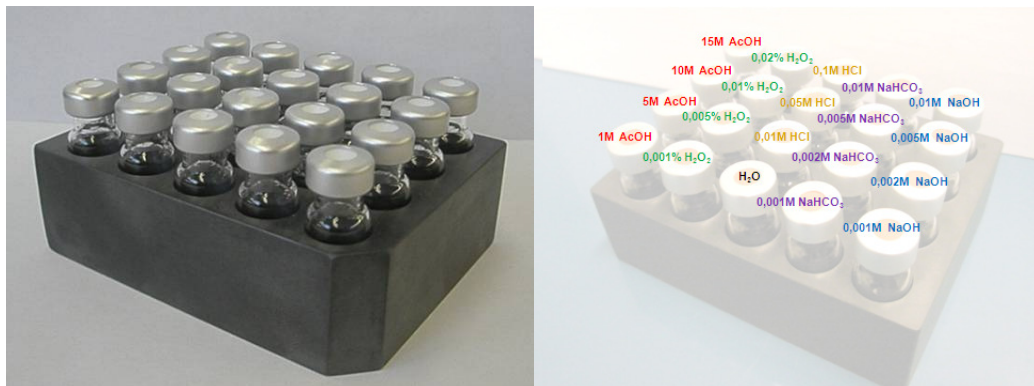
Tokom preliminarnih eksperimenata utvrđeno je da za dostizanje 150 °C 1 mL vode (*Slika 3.7.*) unutar HPLC/GC viala za šest minuta (*ramp time, vreme podizanja temperature*) potrebno održavati temperature, merenu IR senzorom na površini SiC ploče, na 144 °C (pri maksimalnoj snazi magnetrona od 500 W). Temperaturna razlika unutar i na spoljoj strani SiC platforme rezultat je konstantnog hlađenja spoljnog dela SiC od strane hladnog vazduha unutar mikrotalasnog reaktora. Značajno je napomenuti da se pri zadatoj temperaturi od 144 °C SiC ploča hladi komprimovanim vazduhom oko osam minuta<sup>221</sup>.



Slika 3.7. Temperaturni profil zagrevanja 1 mL H<sub>2</sub>O u HPLC/GC vialu unutar SiC ploče.

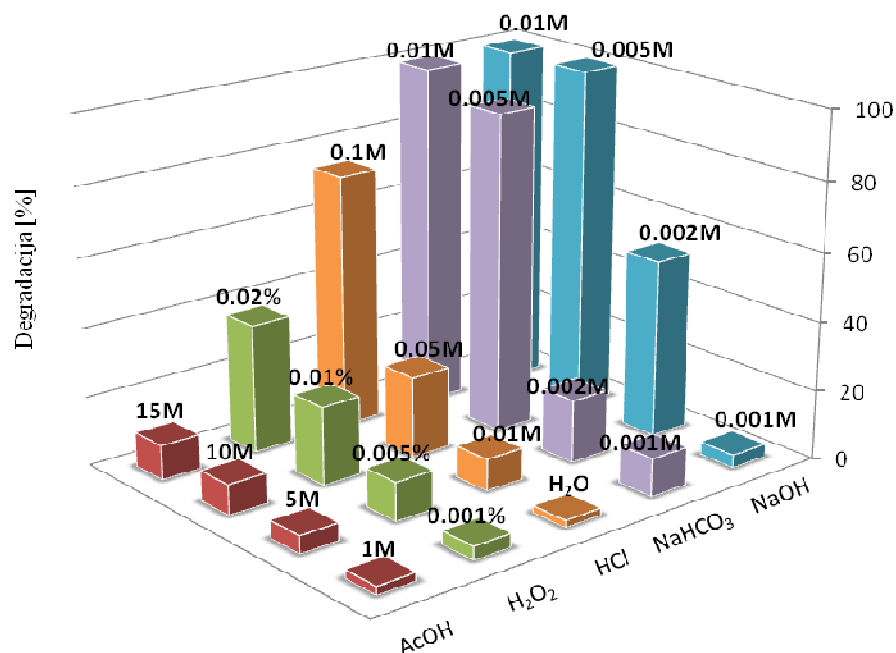
Paralelnom mikrotalasno-stimulisanoj degradaciji indometacina u kiselim, baznim i oksidativnim uslovima (*Slika 3.8.*), pri različitim koncentracijama, na temperaturi od 150 °C omogućen je brz uvid (manje od 20 minuta) u rezultate stresnih studija (*Slika 3.9*) u poređenju sa vremenom trajanja stresnih

studija (60 dana - 20 h) pri nižim vrednostima temperature (25 - 100 °C) i mogućnosti korišćenja samo jednog reakcionog suda. LC-MS analizom potvrđeni su proizvodi hidrolize, odnosno 5-metoksi-2-metil-3-indolsirćetna kiselina (**4**, m/z 218) i 4-hlorobenzoeva kiselina (**5**, m/z 155)<sup>221</sup>.



Slika 3.8. Sinterovana silicijum-karbidna ploča sa 20 standardnih HPLC/GC viala za paralelnu degradaciju indometacina u multi-modnom mikrotalasnom reaktoru *Synthos 3000*.

Pored aspekta uštede vremena, zahvaljujući mogućnosti izvođenja reakcija pri visokim vrednostima temperature i pritiska, kao i mogućnosti istovremenog izvođenja većeg broja reakcija, dodatnu prednost ovog načina rada predstavlja direktna upotreba HPLC/GC viala kao reakcionih sudova. Direktno, po završetku zagrevanja viali se mogu preneti do odgovarajućeg instrumenta za dalju analizu (HPLC-UV, GC-MS, LC-MS) uz eliminaciju uticaja greške manuelnog transfera uzorka.

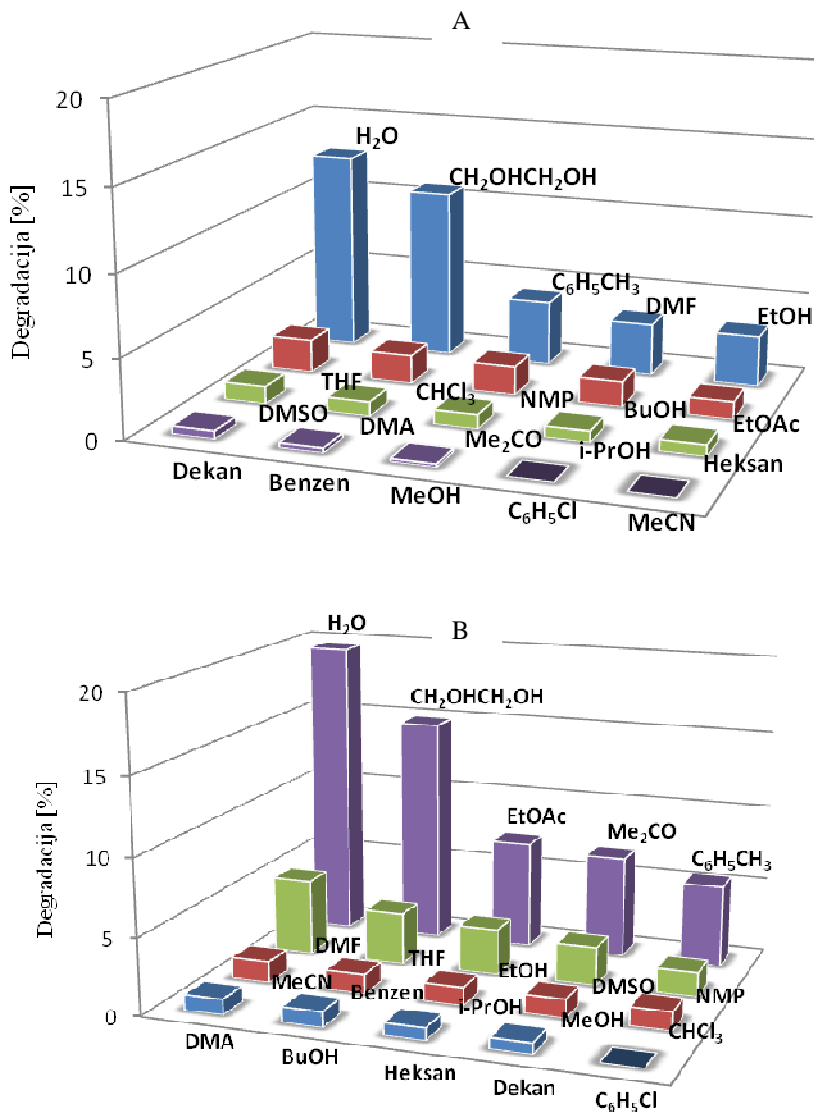


Slika 3.9. Stepen degradacije indometacina u SiC ploči pri temperaturi od 150 °C/5 minuta<sup>221</sup>.

Zahvaljujući rotoru, smeštenom unutar mikrotalasne peći (*Synthos 3000*, firme *Anton Paar*), moguće je paralelno izvesti do osamdeset reakcija (20 x 4) u HPLC/GC vialima smeštenim u silicijum-karbidnoj ploči. S obzirom na to da se većina ključnih parametara različitih hemijskih transformacija (temperatura i vreme trajanja reakcije, rastvarači i katalizatori, molarni odnosi/koncentracije supstrata) mogu odrediti u veoma kratkom vremenskom periodu paralelna mikrotalasna tehnika poseduje velik broj prednosti u poređenju sa individualnim ozračivanjem reakcione smeše<sup>221</sup>.

Efikasnost SiC ploče i HPLC/GC viala kao reakcionih sudova, u kombinaciji sa mikrotalasnim zračenjem potvrđena je i u slučaju studija stabilnosti indometacina u prisustvu različitih rastvarača. Izlaganjem indometacina različitim rastvaračima, na temperaturama od 150 °C i 160 °C u toku 30 minuta, dobijeni su interesantni podaci (Slika 3.10.). Najviši stepen degradacije indometacina uočen je u vodi (20 %) i etilen-glikolu (15 %) kao rastvaraču na 160 °C. LC-MS analizom potvrđeni su proizvodi hidrolize **4** i **5**. Od značaja je napomenuti da su zbog mikrotalasno-apsorbujuće prirode SiC materijala, rastvarači različitih mikrotalasno-apsorbujućih karakteristika (voda, etilen-glikol, toluen, dimetilformamid, etanol, tetrahidrofuran, hloroform, *N*-metilpirolidon, butanol, etil-acetat, dimetilsulfoksid, dimetilacetamid, aceton, *i*-propilalkohol, heksan, dekan, benzen, metanol, hlorbenzen i acetonitril) uspešno zagrejani do željenih vrednosti temperatura u HPLC/GC vialima. Pored toga, usled gornjeg limita pritiska od 20 bar, eksperimenti u SiC pločama tolerišu visoke vrednosti pritiska koji se

razvijaju kod rastvarača niskih vrednosti temperatura ključanja kao što je aceton, tetrahidrofuran ili metanol<sup>221</sup>.



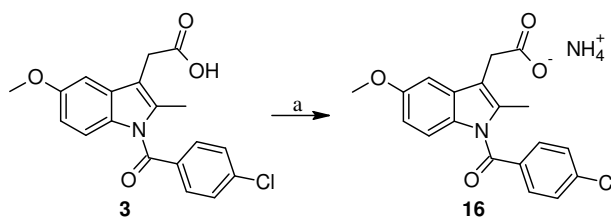
Slika 3.10. Stepen degradacije indometacina u rastvaračima na temperaturi od (A) 150 °C (IR 144 °C) i (B) 160 °C (IR 155 °C) u toku 30 minuta zagrevanja<sup>221</sup>.

Za finalni set eksperimenata 20 HPLC/GC viala sa 0.5 mg indometacina zatvoreno je sa aluminijumskim kapama i isprano sa pet različitih gasova, odnosno sa azotom, argonom, vazduhom, kiseonikom i amonijakom. Zahvaljujući prisustvu 20 mesta za HPLC/GC viala, omogućena su četiri ponavljanja zagrevanjem na 150 °C i 180 °C u toku 30 minuta (Tabela 3.6.).

Tabela 3.6. Mikrotalasno-stimulisana degradacija indometacina u prisustvu različitih gasova (SiC ploča, 30 minuta).

Gasovi	Degradacija [%]	
	150 °C	180 °C
azot	0	1
argon	0	1
kiseonik	5	85
vazduh	2	26
amonijak	46	97

HPLC-UV analizom potvrđen je visok stepen stabilnosti indometacina u prisustvu suvog azota i argona dok su nakon zagrevanja u prisustvu relativno vlažnog vazduha i kiseonika LC-MS analizom potvrđeni proizvodi hidrolize amidne veze (**4** i **5**). Mikrotalasno-stimulisanim zagrevanjem u atmosferi amonijaka dobijena je amonijumova so indometacina (**16**,  $m/z$  374)<sup>221</sup>, (Shema 3.9).



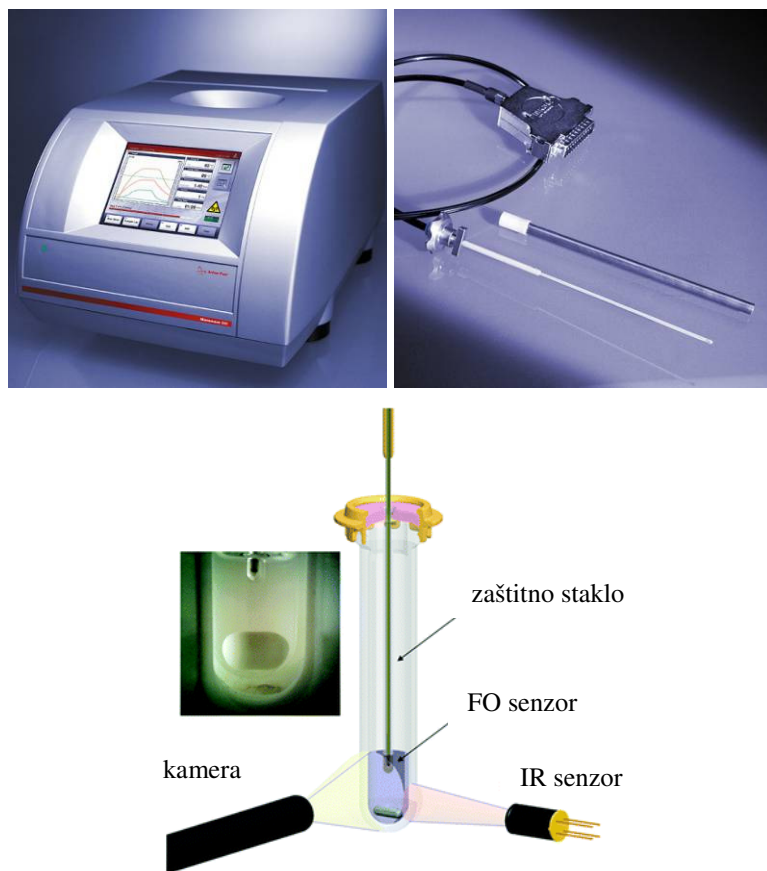
Shema 3.9. (a) NH<sub>3</sub>, MW, 150 °C / 180 °C, 30 min.

### 3.3. Ispitivanje postojanja netermičkih mikrotalasnih efekata

Kao što je već naglašeno, temperaturni monitoring reakcija pod dejstvom mikrotalasnog zračenja važan je aspekt mikrotalasne hemije, posebno u slučaju reakcija u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora pri visokim vrednostima temperature i pritiska. Netačne vrednosti temperature su najvećim delom odgovorne za pogrešna tumačenja hemijskih transformacija kao i postojanje tzv. *netermičkih efekata*.

U cilju potvrde prisustva jedino *termičkih/kinetičkih efekata*, na osnovu Arrhenius-ove jednačine, kao jedino odgovornih za visok stepen ubrzanja hemijskih transformacija i odsustva tzv. *netermičkih mikrotalasnih efekata* paralelno su praćene reakcije u standardnim Pyrex i SiC reakcionim sudovima.

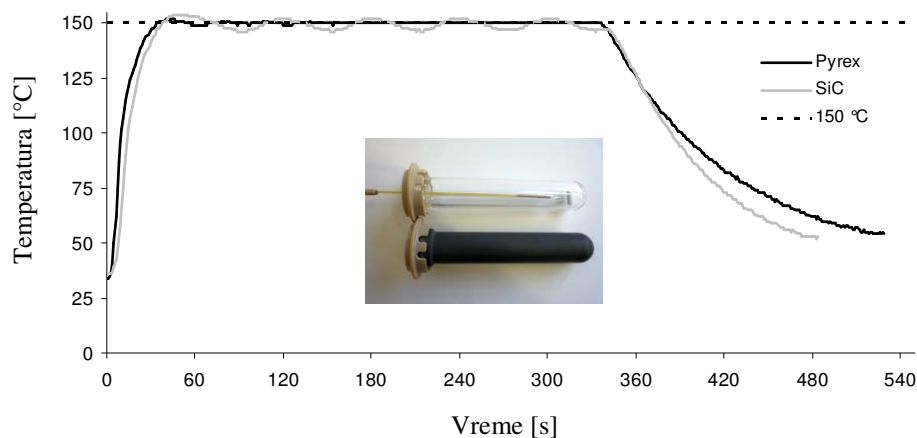
Istraživanja su urađena na primeru degradacije indometacina sa 0.1 M HCl, zagrevanjem na 150 °C, pri konstantnoj mikrotalasnoj snazi, u mono-modnom mikrotalasnom reaktoru. Precizno merenje temperature omogućeno je internim optičkim vlaknom (*Slika 3.11.*).



*Slika 3.11. Anton Paar Monowave 300 mono-modni mikrotalasni reaktor sa optičkim senzorom za merenjem temperature unutar reakcionog suda.*



Preklapanjem temperaturnih profila degradacije indometacina u *Pyrex* i SiC reakcionom sudu potvrđena je identična vrednost temperature reakcione smeše u oba reakciona suda pri istim reakcionim uslovima (Slika 3.12.). S obzirom na to da SiC kao snažno mikrotalasno-apsorbujući materijal sprečava penetraciju elektromagnetnog zračenja reakciona smeša je tokom mikrotalasnog ozračivanja zagrevana konvencionalnim transferom toplote od zida reakcionog suda a ne preko dielektričnog mehanizma zagrevanja<sup>221</sup>.



Slika 3.12. Poređenje temperaturnih profila (FO) mikrotalasno-stimulisane degradacije indometacina sa 0.1M HCl na 150 °C.

Pored toga, stepen degradacije indometacina na 150 °C u toku 5 minuta mikrotalasnog ozračivanja je u oba tipa reakcionog suda isti (~50 %). Na osnovu ovoga proizilazi da su za visok stepen ubrzanja hemijskih transformacija odgovorni isključivo *termički/kinetički efekti*, a da *netermički mikrotalasnici efekti* ne postoje<sup>221</sup> (Tabela 3.7.).

Tabela 3.7. Mikrotalasno-stimulisana degradacija indometacina u *Pyrex* i SiC reakcionom sudu (0.1 M HCl, 150 °C, 5 min.).

Reakcioni sud	Degradacija [%]
Pyrex	52
SiC	46

### 3.4. Mikrotalasno-stimulisane *neat* sinteze derivata naftenskih kiselina

Mikrotalasno ozračivanje čistih reaktanata u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora, dovodi do efikasnog internog zagrevanja celokupne reakcione smeše do temperatura koje su daleko iznad vrednosti temperatura ključanja pri atmosferskom pritisku. Pored toga, u temperaturno-kontrolnom modu drastična ubrzanja hemijskih reakcija posledica su visokih vrednosti temperatura koje se mogu dostići u veoma kratkom vremenskom periodu (od nekoliko sekundi do jednog minuta). S druge strane *neat* sinteze koje podrazumevaju odsustvo rastvarača i katalizatora dovode do čistijih reakcionih sistema i jednostavnijeg izolovanja željenog proizvoda.

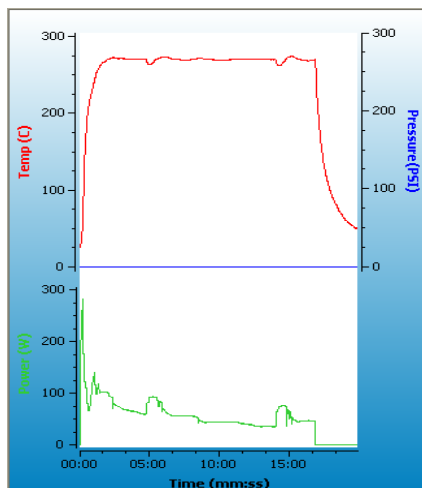
U skladu s tim, u ovom radu sintetizovani su sekundarni i tercijarni amidi individualnih naftenskih kiselina, smeše prirodnih naftenskih kiselina *Velebit* i komercijalnih naftenskih kiselina *Aldrich* mikrotalasnim ozračivanjem čistih reaktanata.

Mikrotalasno-posredovana sinteza amida individualnih naftenskih kiselina ispitana je na primeru pirolize soli slabo reaktivne karboksilne kiseline i slabo baznog amina. U literaturi je poznato da reakcije aromatičnih kiselina i amina zahtevaju visoke vrednosti temperature i/ili dodatak jednog od reagenasa u višku u cilju pomeranja ravnoteže hemijske reakcije ka građenju proizvoda. Na osnovu prethodnog, prva etapa naših istraživanja usmerena je ka određivanju maksimalne vrednosti temperature zagrevanja reakcione smeše u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora, pri maksimalnoj vrednosti pritiska. U narednoj fazi urađeno je i poređenje sa reakcijama aminolize aktivnog estera individualnih i smeše naftenskih kiselina.

#### 3.4.1. Sinteza sekundarnih amida individualnih naftenskih kiselina

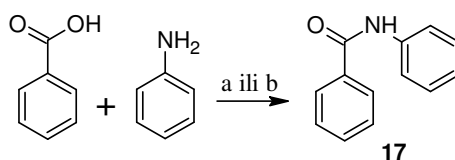
Početna faza ovog dela naših radova obuhvatila je sintezu anilida individualnih naftenskih kiselina u cilju određivanja optimalnih reakcionih uslova, odnosno temperature i vremena trajanja sinteze, pod dejstvom mikrotalasnog zračenja. Reakcije su izvođene u odsustvu katalizatora i organskih rastvarača.

Ispitan je uticaj temperature na brzinu hemijske reakcije između benzoeve kiseline i anilina. Pri maksimalnoj vrednosti početne snage magnetrona, u temperaturno-kontrolnom modu, reakciona smeša je uspešno zagrejana do 270 °C (*Slika 3.13.*) nakon jednog minuta mikrotalasnog ozračivanja.



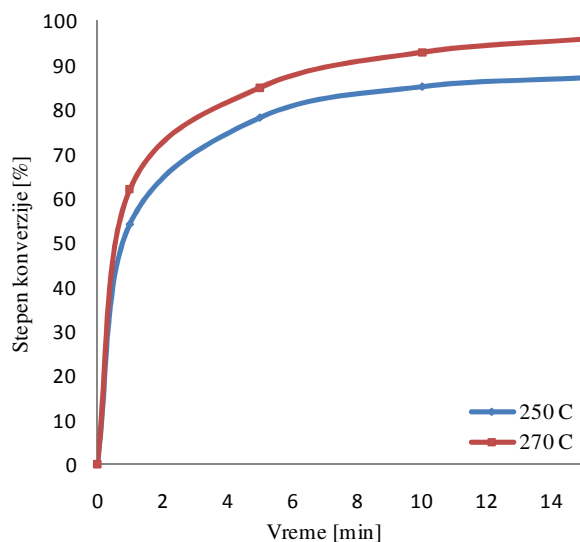
Slika 3.13. Profil mikrotalasnog zagrevanja benzoeve kiseline i anilina pri temperaturi od 270 °C, u zatvorenom sistemu *CEM* mikrotalasnog reaktora.

Za reakciju je, u skladu sa zahtevima ekonomske efikasnosti, odabran molski odnos reaktanata 1 : 1, a reakcija je izvedena uz konvencionalno zagrevanje i u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora (*Shema 3.10.*).



*Shema 3.10.* (a) refluks, 24 h, 61 % ; (b) MW, 270 °C, 15 min., 74 %.

Optimizacija reakcionih uslova (reakcione temperature i vremena trajanja reakcije) izvedena je praćenjem stepena konverzije benzoeve kiseline u željeni proizvod tečnom hromatografijom visoke rezolucije (HPLC) (*Slika 3.14.*).



Slika 3.14. Zavisnost stepena konverzije benzoeve kiseline u *N*-fenilbenzamid od reakcione temperature i vremena u *CEM* mikrotalasnom reaktoru.

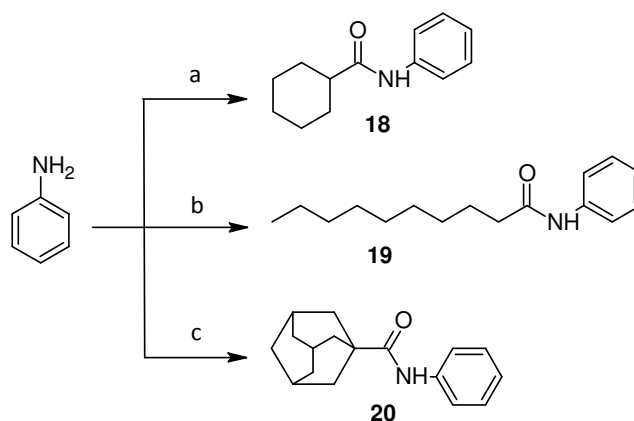
Na osnovu rezultata prikazanih na dijagramu, jasno je da povećanje temperature dovodi do povećanja stepena konverzije benzoeve kiseline u željeni proizvod, međutim zbog maksimalnog operativnog pritiska za datu reakcionu smešu dalje povećanje vrednosti temperature nije bilo izvodljivo. Najveći prinos *N*-fenilbenzamida (**17**) je postignut nakon 15 minuta mikrotalasnog ozračivanja na temperaturi od 270 °C (92 %, HPLC prinos; 74 %, prinos izolovanog proizvoda) što u odnosu na rezultate dobijene od strane Perreux-a i saradnika<sup>152</sup> u otvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora (molski odnos 1 : 1.5 = benzoeva kiselina : anilin, 150 °C/120 min., 12 %) predstavlja značajno poboljšanje sintetske procedure i prinosa reakcije. Izvođenje reakcije bez prisustva katalizatora i rastvarača dodatno povećava značaj ove sinteze jer je čini prihvatljivom i sa stanovišta *zelene hemije*.

Analizom temperaturnih profila sinteze *N*-fenilbenzamida, u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora, može se videti da stepen konverzije benzoeve kiseline u anilid prvenstveno zavisi od temperaturnih uslova. U skladu sa tim može se zaključiti da povećanje polarosti u prelaznom stanju i intenzivnija interakcija sa mikrotalasima ne dovode do sniženja energije aktivacije i promene predeksponencijalnog faktora u Arrhenius-ovoj jednačini, odnosno do pojave *netermičkih mikrotalasnih efekata*, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u prethodnom delu ovog rada (3.3.). Benzoeva kiselina, kao jedna od najmanje reaktivnih individualnih naftenskih kiselina, uspešno je konvertovana u odgovarajući amid zahvaljujući mogućnosti zagrevanja reakcione smeše do temperatura koje su iznad temperature ključanja amina (184 °C) i kiseline (249 °C) pri atmosferskom pritisku. U poređenju sa rezultatima dobijenim reakcijom u konvencionalnim uslovima (refluks, 24 h, 61 %) postignuta je

uspešna redukcija vremena sinteze kao i veći prinos čistog *N*-fenilbenzamida. Pored toga, zahvaljujući odsustvu katalizatora i organskih rastvarača eliminisano je prisustvo silikata (interakcija sa staklenim zidom) i drugih nusproizvoda. Zahvaljujući tome obrada reakcione smeše je jednostavnija, a to je značajan faktor za odabir sintetskog postupka sa aspekta *zelene hemije*, ali nije zanemarljiv ni ekonomski efekat jer se troši manje hemikalija.

U IR spektru sintetizovanog molekula **17** asignirana je intenzivna traka na  $1653\text{ cm}^{-1}$  koja potiče od valencione C=O vibracije amidne funkcionalne grupe ( $\nu\text{ C=O}$ ). U  $^1\text{H}$  NMR spektru *N*-fenilbenzamida prisutan je signal na  $\delta_{\text{H}}$  10.28 ppm koji potiče od vodonika vezanog za azotov atom amidne grupe (CON-H) kao i signali karakteristični za aromatične vodonike na  $\delta_{\text{H}}$  7.10-7.98 (Ar-H) koji potvrđuju prisustvo dva benzenova prstena. U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru signali na  $\delta_{\text{C}}$  120.64-139.24 ppm (Ar-C) potvrđuju prisustvo dva supstituisana aromatična jezgra, a na  $\delta_{\text{C}}$  165.86 ppm je asignirana karbonilna anilidna funkcija (C=O).

Identični reakcioni uslovi (molski odnos 1 : 1, *neat reakcije*) primenjeni su u sintezama anilida alkilkarboksilne (**19**), kao i mono- i policiklične individualne naftenske kiseline (**18** i **20**), a rezultati ovih hemijskih transformacija predstavljeni su šematski (*Shema 3.11.*).



*Shema 3.11.* (a)  $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{COOH}$ , MW,  $270\text{ }^\circ\text{C}$ , 15 min., 98 %; (b)  $\text{n-C}_9\text{H}_{19}\text{COOH}$ , MW,  $270\text{ }^\circ\text{C}$ , 15 min., 78 %; (c)  $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{COOH}$ , MW,  $200\text{ }^\circ\text{C}$ , 240 min., 33 %.

Na osnovu dobijenih rezultata jasno se vidi da su mikrotalasnim ozračivanjem čistih reaktanata postignuti visoki prinosi anilida individualnih naftenskih kiselina, osim u reakciji sinteze anilida policiklične karboksilne kiseline. Duži period mikrotalasnog ozračivanja kao i nešto niži prinos izolovanog anilida policiklične karboksilne kiseline u direktnoj su zavisnosti sa strukturom

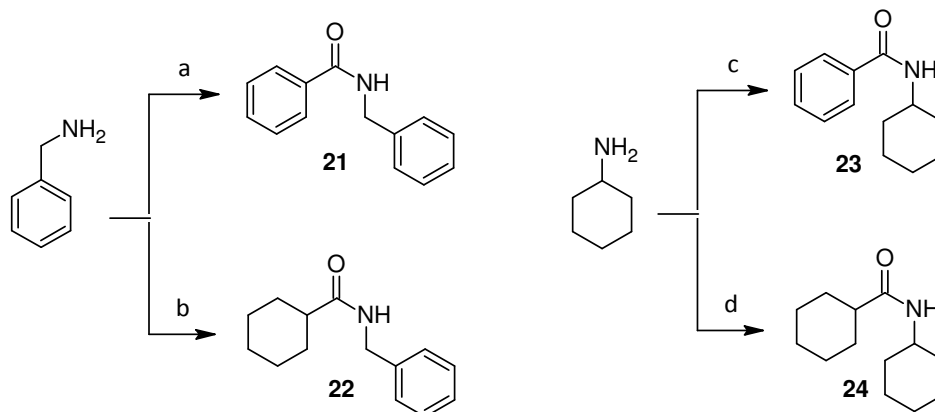
policikličnog ugljovodoničnog dela kao i sa pKa vrednošću (pKa 4.62). Reakciona smeša je zagrejana do svega 200 °C u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora, pri maksimalnoj vrednosti početne snage magnetrona u temperaturno-kontrolisanom sistemu. Pretpostavka je da usled sternih smetnji dolazi do sporijeg građenja amonijum soli, neposrednim mešanjem policiklične karboksilne kiseline i anilina, te stoga dolazi do slabije interakcije reakcione smeše sa mikrotalasima što rezultuje nižom vrednosti temperature reakcije.

Da je izvršena hemijska transformacija karboksilne funkcionalne grupe u amidnu, utvrđeno je na osnovu traka uočenih u IR spektru jedinjenja **18** na 3244 cm<sup>-1</sup> koja potiče od valencionih N-H vibracija (ν NH) i trake u položaju 1659 cm<sup>-1</sup> koja ukazuje na prisustvo karbonilne grupe amidne funkcije (ν C=O). U <sup>1</sup>H NMR spektru jedinjenja **18** prisutni su signali na δ<sub>H</sub> 7.03-7.60 ppm (Ar-H) i δ<sub>H</sub> 7.67 ppm (CON-H) koji zajedno sa signalima prisutnim u <sup>13</sup>C NMR spektru na δ<sub>C</sub> 119.84, 123.97, 128.84, 138.16 ppm (Ar-C) i δ<sub>C</sub> 174.65 ppm (C=O) ukazuju da molekul sadrži karbonilnu grupu anilida.

U IR spektru sintetizovanog molekula **19** uočava se karakteristična apsorpciona traka na 3314 cm<sup>-1</sup> karakteristična za valencione N-H vibracije (ν N-H) i 1657 cm<sup>-1</sup> od karbonila amidne funkcionalne grupe (ν C=O). Prisustvo anilidne funkcionalne grupe u molekulu **19** potvrđeno je signalima na δ<sub>H</sub> 7.04-7.61 ppm (Ar-H) i δ<sub>H</sub> 7.72 ppm (CON-H) u <sup>1</sup>H NMR spektru, odnosno u <sup>13</sup>C NMR spektru signalima na δ<sub>C</sub> 119.90-128.86 ppm (Ar-C) i δ<sub>C</sub> 171.73 ppm (C=O).

Prisustvo trake na 1645 cm<sup>-1</sup> koja potiče od karbonilne amidne funkcije (ν C=O) u IR spektru anilida adamantanske kiseline potvrđuje da je došlo do reakcije amidacije. U <sup>1</sup>H NMR spektru jedinjenja **20** prisutni su signali na δ<sub>H</sub> 7.04-7.60 ppm (Ar-H; CON-H) koji potiču od anilidne funkcionalne grupe u molekulu. Signali na δ<sub>C</sub> 138.02 ppm (Ar-C) i δ<sub>C</sub> 175.98 ppm (C=O) u <sup>13</sup>C NMR spektru dodatno potvrđuju strukturu sintetizovanog anilida **20**.

Istraživanja su zatim proširena na sinteze *N*-benzil- (**21** i **22**) i *N*-cikloheksilamida (**23** i **24**) monocikličnih karboksilnih kiselina. Reakcije amidacije izvedene su u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora (molski odnos 1:1), na temperaturi od 270 °C u toku 2 minuta, bez prisustva rastvarača (*Shema 3.12.*).



Shema 3.12. (a)  $C_6H_5COOH$ , MW,  $270\text{ }^\circ\text{C}$ , 2 min., 92 %; (b)  $C_6H_{11}COOH$ , MW,  $270\text{ }^\circ\text{C}$ , 2 min., 90 %; (c)  $C_6H_5COOH$ , MW,  $270\text{ }^\circ\text{C}$ , 2 min., 84 %; (d)  $C_6H_{11}COOH$ , MW,  $270\text{ }^\circ\text{C}$ , 2 min., 96 %.

Usled delokalizacije slobodnog elektronskog para na azotu sa  $\pi$ -elektronima benzenovog prstena, aromatični amini se ponašaju kao slabije baze u odnosu na alifatične amine. Kvantitativno, baznost amina se može izraziti  $pK_a$  vrednostima ( $pK_a$  (anilin) = 4.6; ( $pK_a$  (benzilamin) = 9.34; ( $pK_a$  (cikloheksilamin) = 10.7) i u skladu s tim, pomenuti amini pokazali su različitu reaktivnost u reakcijama sinteze amida individualnih naftenskih kiselina.

U IR spektru molekula **21** uočavaju se traka na  $3322\text{ cm}^{-1}$  koja potiče od valencionih N-H vibracija ( $\nu$  NH), dok traka na  $1641\text{ cm}^{-1}$  potvrđuje prisustvo amidne funkcije ( $\nu$  C=O). U  $^1\text{H}$  NMR spektru prisutni su signali na  $\delta_H$  4.58 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ),  $\delta_H$  7.13 (CON-H) i  $\delta_H$  7.27-7.85 (Ar-H) koji zajedno sa signalima u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru na  $\delta_c$  43.82 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ),  $\delta_c$  126.95-138.25 (Ar-C) i  $\delta_c$  167.42 (C=O) dodatno potvrđuju strukturu sintetizovanog jedinjenja **21**.

Struktura molekula **22** potvrđena je IR spektrom, odnosno prisustvom trake na  $3284\text{ cm}^{-1}$  koja potiče od valencionih N-H vibracija ( $\nu$  NH) i trakom na  $1642\text{ cm}^{-1}$  koja potiče od valencione C=O vibracije amidne funkcionalne grupe ( $\nu$  C=O). Signali u  $^1\text{H}$  NMR spektru prisutni su na  $\delta_H$  4.35 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ),  $\delta_H$  6.45 (CON-H) i  $\delta_H$  7.11-7.35 (Ar-H), odnosno u  $^{13}\text{C}$  NMR na  $\delta_c$  42.95 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ),  $\delta_c$  127.02-138.58 (Ar-C) i  $\delta_c$  176.03 (C=O).

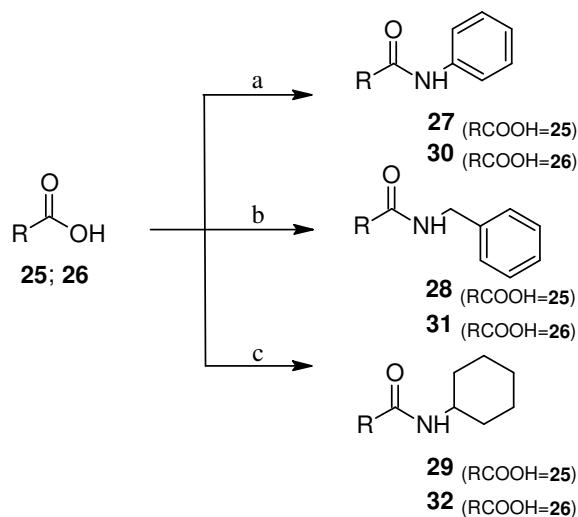
U IR spektru sintetizovanog molekula **23** uočavaju se karakteristične trake za amidnu funkciju na  $3242\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  NH) i  $1628\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  C=O) koje zajedno sa signalima u  $^1\text{H}$  NMR spektru na  $\delta_H$  1.06-2.10 ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta_H$  3.96 (H-1),  $\delta_H$  6.21 (CON-H) i signalima u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru na  $\delta_c$  24.87-33.10 ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta_c$  48.62 (CH-1) i  $\delta_c$  166.57 (C=O) potvrđuju strukturu molekula **23**.

Odsustvo traka na  $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  i  $2800\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  O-H) ukazuje na odsustvo OH grupe u IR spektru sintetizovanog jedinjenja **24** potvrđuje da je došlo do hemijske transformacije karboksilne grupe

u amidnu. U  $^1\text{H}$  NMR spektru prisutni su signali na  $\delta_{\text{H}}$  0.84-1.92 ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta_{\text{H}}$  1.98 (H-1),  $\delta_{\text{H}}$  3.65 (H-1') i  $\delta_{\text{H}}$  5.65 (CON-H), odnosno u  $^{13}\text{C}$  NMR na  $\delta_{\text{C}}$  24.75-33.01 ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta_{\text{C}}$  45.42 (CH-1),  $\delta_{\text{C}}$  47.54 (CH-1') i  $\delta_{\text{C}}$  175.01 (C=O).

### 3.4.2. Sinteza sekundarnih amida naftenskih kiselina *Velebit* i *Aldrich*

Naredna faza naših radova obuhvatila je mikrotalasno-stimulisanu sintezu sekundarnih amida prirodnih *Velebit* (**25**) i komercijalnih *Aldrich* (**26**) naftenskih kiselina u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora. Reakcije su izvođene na temperaturi od 270 °C (molski odnos 1 : 1, *neat* reakcije) pri čemu su dobijeni su *N*-fenil- (**27** i **30**), *N*-benzil- (**28** i **31**) i *N*-cikloheksilamidi (**29** i **32**) naftenskih kiselina (*Shema 3.13.*).



*Shema 3.13.* (a)  $\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$ , MW, 270 °C, 15 min., 76 % (**27**)/73 % (**30**); (b)  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{NH}_2$ , MW, 270 °C, 2 min., 85 % (**28**)/87 % (**31**); (c)  $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NH}_2$ , MW, 270 °C, 2 min., 78 % (**29**)/78 % (**32**).

Mikrotalasno-stimulisanom derivatizacijom kompleksne smeše prirodnih naftenskih kiselina *Velebit* (**25**) kao i komercijalnih naftenskih kiselina *Aldrich* (**26**) dobijeni su nešto manji prinosi amidnih derivata u poređenju sa reakcijama amidacije individualnih naftenskih kiselina. Usled strukturne raznolikosti za očekivati je da pojedini konstituenti ukupne smeše kiselina reaguju teže od drugih što se reflektovalo na prinos izolovanih amida naftenskih kiselina.

Strukture sintetizovanih amida potvrđene su na osnovu spektroskopskih podataka. U IR spektru sintetizovanih anilida naftnih kiselina *Velebit* (**27**) odsustvo -OH grupe, odnosno karboksilne



funkcionalne grupe ukazuje nedostatak traka na  $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  i  $2800\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  O-H). Prisustvo amidne funkcionalne grupe potvrđuje traka u položaju  $1660\text{ cm}^{-1}$ , karakteristična za valencione vibracije karbonilne grupe amida ( $\nu$  C=O).  $^1\text{H}$  NMR spektar sadrži signale na  $\delta_{\text{H}}$  6.62-7.28 ppm od vodonika iz aromatičnih jezgra (Ar-H) i na  $\delta_{\text{H}}$  7.58-8.20 ppm od vodonika vezanih za azotove atome (CON-H). U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru prisustvo supstituisanih aromatičnih jezgara potvrđuju signali na  $\delta_{\text{C}}$  119.98-128.69 ppm (CH-Ar) i  $\delta_{\text{C}}$  138.12 ppm (Ar-C), dok su na  $\delta_{\text{C}}$  171.73-175.20 ppm asignirani ugljenici karbonilnih grupa anilidnih funkcija (C=O).

U IR spektru *N*-benzilamida naftenskih kiselina *Velebit* (**28**) prisutna je traka na  $3287\text{ cm}^{-1}$  koja potiče od valencionih vibracija N-H veze ( $\nu$  NH) i traka na  $1645\text{ cm}^{-1}$  koja potiče od valencione vibracije karbonilne grupe amida ( $\nu$  C=O). U  $^1\text{H}$  NMR spektru prisutni su signali na  $\delta_{\text{H}}$  4.43 (CH<sub>2</sub>Ph),  $\delta_{\text{H}}$  6.06 (CON-H) i  $\delta_{\text{H}}$  7.21-7.45 (Ar-H), odnosno u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru signali na  $\delta_{\text{C}}$  126.94-138.47 (Ar-C) i  $\delta_{\text{C}}$  172.43-176.91 (C=O).

Prisustvo amidne funkcionalne grupe utvrđeno je takođe IR spektrom sintetizovanog jedinjenja **29** na osnovu prisustva traka na  $3289\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  NH) i  $1636\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  C=O). U  $^1\text{H}$  NMR spektru prisutni su karakteristični signali na  $\delta_{\text{H}}$  3.70 (H-1) i  $\delta_{\text{H}}$  5.40 (CON-H) dok su u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru prisutni signali na  $\delta_{\text{C}}$  45.90 (CH-1) i 175.12 (C=O) koji potvrđuju datu strukturu.

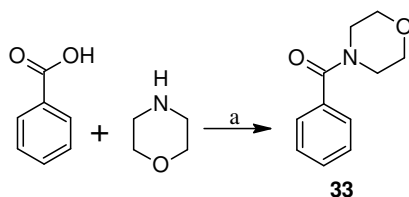
U IR spektru sintetizovanih *N*-fenilamida naftenskih kiselina *Aldrich* (**30**) uočava se odsustvo traka na  $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  i  $2800\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  O-H) ukazujući na odsustvo -OH grupe, odnosno karboksilne funkcionalne grupe. Traka na položaju  $1698\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  C=O) potvrđuje prisustvo amidne funkcionalne grupe. U  $^1\text{H}$  NMR spektru prisutni su signali na  $\delta_{\text{H}}$  7.27-7.55 karakteristični za aromatične vodonike (Ar-H) i vodonik vezan za azotov atom amidne grupe (CON-H). U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru signali na  $\delta_{\text{C}}$  119.91-137.95 ppm (Ar-C) potvrđuju prisustvo supstituisanog aromatičnog jezgra, a na  $\delta_{\text{C}}$  174.50-182.64 ppm je asignirana C=O grupa amida.

Struktura molekula **31** potvrđena je IR spektroskopijom, odnosno prisustvom traka na  $3297\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{as}}$  CN) i  $1699\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  C=O) kao i  $^1\text{H}$  NMR spektrom u kome se uočavaju signali na  $\delta_{\text{H}}$  4.36 (CH<sub>2</sub>Ph),  $\delta_{\text{H}}$  6.03 (CON-H) i  $\delta_{\text{H}}$  7.13-7.46 (Ar-H). U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru prisutni su signali na  $\delta_{\text{C}}$  126.96-138.56 (Ar-C) i  $\delta_{\text{C}}$  173.18-175.85 (C=O) koji dodatno potvrđuju da se željena hemijska transformacija naftenskih kiselina u anilide odigrala.

U IR spektru sintetizovanih *N*-cikloheksilamida naftenskih kiselina *Aldrich* (**32**) traka u položaju  $1702\text{ cm}^{-1}$  potiče od valencione C=O vibracije ( $\nu$  C=O). Na  $3298\text{ cm}^{-1}$  prisutna je traka koja potiče od N-H valencionih vibracija ( $\nu$  NH). U  $^1\text{H}$  NMR spektru ovih amidnih derivata na prisustvo amidne funkcije ukazuje signal na  $\delta_{\text{H}}$  5.40 ppm (CON-H), odnosno u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru na  $\delta_{\text{C}}$  170.55-176.57 ppm (C=O).

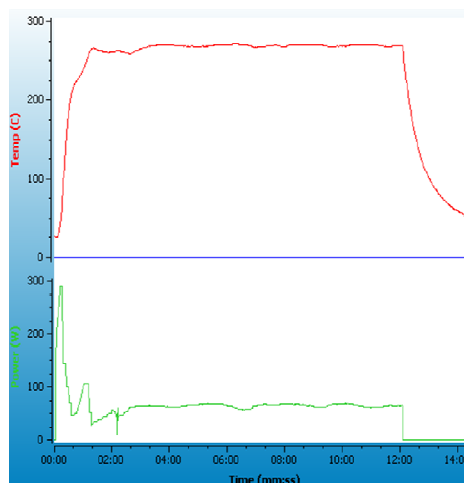
## 3.4.3. Sinteza tercijarnih amida individualnih naftenskih kiselina

Sledeća faza naših radova obuhvatila je sintezu tercijarnih amida individualnih naftenskih kiselina pod dejstvom mikrotalasnog zračenja. Sinteza 4-benzoilmorfolina (**33**) izvedena je u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora, pri molskom odnosu 1:1, u odsustvu katalizatora i organskih rastvarača (*Shema 3.14.*).



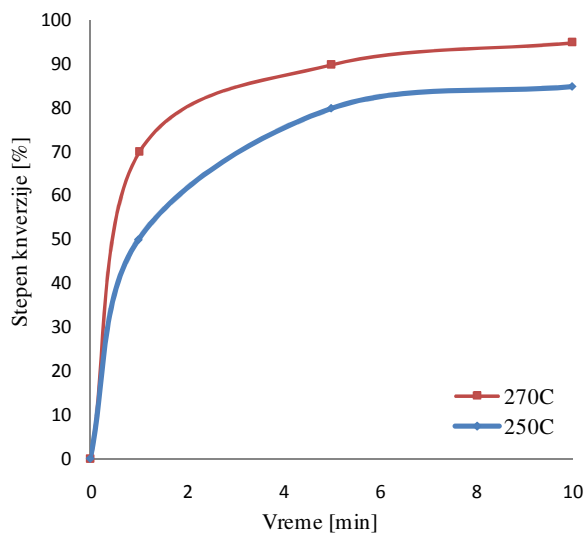
*Shema 3.14.* (a) MW, 270 °C, 10 min, 81 %.

Uticaj temperature na brzinu hemijske reakcije sinteze tercijarnog amida ispitan je na primeru benzoeve kiseline i morfolina. Postepenim povišenjem temperature reakcione smeše, u temperaturno-kontrolnom modu, postignuta je temperatura od 270 °C (*Slika 3.15.*) nakon svega nešto više od jednog minuta mikrotalasnog ozračivanja.



*Slika 3.15.* Profil mikrotalasnog zagrevanja morfolina i benzoeve kiseline u zatvorenom sistemu *CEM* mikrotalasnog reaktora.

Optimizacija reakcionih uslova (reakcione temperature i vremena trajanja reakcije) izvedena je praćenjem stepena konverzije benzoeve kiseline u željeni proizvod (**33**), tečnom hromatografijom visoke rezolucije pri čemu su dobijeni sledeći rezultati (*Slika 3.16.*):

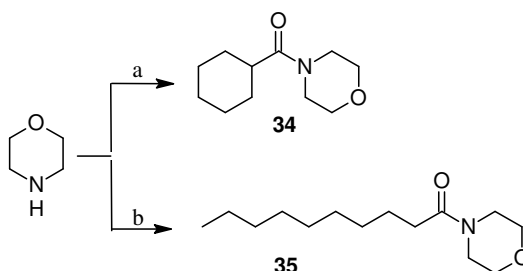


Slika 3.16. Zavisnost stepena konverzije benzojeve kiseline u 4-benzoilmorfolin od reakcione temperature i vremena u *CEM* mikrotalasnom reaktoru.

Na osnovu rezultata prikazanih na dijagramu jasno se vidi da je najveći prinos 4-benzoilmorfolina (**33**) utvrđen nakon 10 minuta zagrevanja reakcione smeše u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora na temperaturi od 270 °C. Poređenjem temperaturnih profila može se zaključiti da brzina hemijske reakcije sinteze tercijarnih amida, isto kao i kod sinteze sekundarnih amida, zavisi od *termičkih/kinetičkih mikrotalasnih efekata*. Sinteza tercijarnog amida uspešno je izvedena u odsustvu katalizatora i rastvarača, što je od posebnog značaja sa aspekta *zelene hemije* i to na primeru najmanje reaktivne individualne naftenske kiseline. Zahvaljujući mogućnosti zagrevanja reakcione smeše do temperatura koje su iznad temperature ključanja morfolina (129 °C) ili kiseline (249 °C) pri atmosferskom pritisku, dobijen je proizvod **33** u visokom prinosu (95 %, HPLC prinos; 81 %, prinos izolovanog proizvoda)

U IR spektru sintetizovanog molekula **33** asignirano je prisustvo apsorpcione trake na 1634  $\text{cm}^{-1}$  koja potiče od valencionih vibracija karbonilne grupe amida ( $\nu \text{C=O}$ ). U  $^1\text{H}$  NMR spektru prisutni su karakteristični signali na  $\delta_{\text{H}}$  7.26-7.54 ppm od vodonika iz aromatičnog jezgra (Ar-H). Na  $\delta_{\text{H}}$  3.24-3.90 ppm prisutni su signali koji potiču od vodonika iz morfolinskog prstena. U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru signali na  $\delta_{\text{C}}$  126.88, 128.35, 129.66 i 135.15 ppm ukazuju na prisustvo aromatičnog prstena (Ar-C). Signal na  $\delta_{\text{C}}$  170.19 ppm potiče od karbonilne funkcionalne grupe ( $\text{C=O}$ ), dok signali na  $\delta_{\text{C}}$  42.34 i  $\delta_{\text{C}}$  47.93 ppm ( $\text{CH}_2\text{NCH}_2$ ) i  $\delta_{\text{C}}$  66.66 ppm ( $\text{CH}_2\text{OCH}_2$ ) potvrđuju prisustvo morfolinskog prstena.

Mikrotalasnim ozračivanjem čistih reaktanata, pri istim reakcionim uslovima (molski odnos 1 : 1, 270 °C, 10 minuta) potvrđena je efikasnost mikrotalasa u reakcijama sinteze tercijarnog amida alkilkarboksilne (**35**) i monociklične (**34**) individualne naftenske kiseline (*Shema 3.15.*).



*Shema 3.15.* (a)  $C_6H_{11}COOH$ , MW, 270 °C, 10 min., 83 %; (b)  $n-C_9H_{19}COOH$ , MW, 270 °C, 10 min., 94 %.

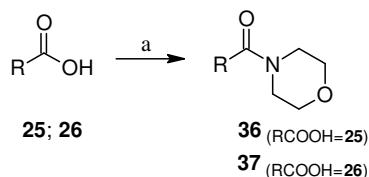
Veći stepen reaktivnosti cikloheksilkarboksilne i dekanske kiseline u odnosu na benzoevu kiselinu, usled odsustva rezonancionog efekta sa aromatičnim prstenom, doveo je do većih prinosa amida morfolina **34** i **35**.

U IR spektru molekula **34** valencione vibracije na  $1651\text{ cm}^{-1}$  ukazuju na prisustvo  $C=O$  iz amidne funkcionalne grupe ( $\nu\text{ C=O}$ ). Dokaz prisustva morfolinskog sistema u sintetizovanom amidu su signali koji se pojavljuju na  $\delta_H$  3.30-3.71 ppm u  $^1H$  NMR spektru, dok su u  $^{13}C$  NMR spektru prisutni signali na  $\delta_C$  41.89 i  $\delta_C$  45.61 ppm ( $CH_2NCH_2$ ) kao i signal na  $\delta_C$  66.63 ppm ( $CH_2OCH_2$ ). Signal na  $\delta_C$  174.39 ppm potiče od karbonilne grupe ( $C=O$ ) amidne funkcije.

Spektroskopski podaci jedinjenja **35** nedvosmisleno ukazuju da je sintetizovan amid dekanske kiseline. U dobijenom IR spektru uočava se apsorpciona traka na  $1651\text{ cm}^{-1}$  koja odgovara valencionim vibracijama karbonilne grupe iz amidne funkcionalne grupe ( $\nu\text{ C=O}$ ), dok se u  $^1H$  NMR spektru uočavaju signali na  $\delta_H$  3.35-3.68 ppm koji su dokaz prisustva morfolinskog sistema u sintetizovanom amidu i potiču od vodonika vezanih za C-atome morfolinskog prstena.  $^{13}C$  NMR spektroskopijom dobijeni su signali na  $\delta_C$  41.73 i  $\delta_C$  45.92 ppm ( $CH_2NCH_2$ ), kao i signali na  $\delta_C$  66.49 i  $\delta_C$  66.75 ppm ( $CH_2OCH_2$ ) koji potvrđuju prisustvo morfolinskog prstena, dok se signal na  $\delta_C$  171.87 ( $C=O$ ) pripisuje karbonilnoj grupi amidne funkcije.

3.4.4. Sinteza tercijarnih amida naftenskih kiselina *Velebit* i *Aldrich*

Uspešna mikrotalasno-stimulisana amidacija prirodnih naftenskih kiselina *Velebit* (**25**) i komercijalnih *Aldrich* (**26**) sa morfolinom izvedena je u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora, na temperaturi od 270 °C. Reakciono vreme koje je bilo neophodno za odigravanje ovih reakcija je 10 minuta pri čemu su dobijeni su čisti amidi morfolina (**36** i **37**) u visokom prinosu (*Shema 3.16.*).



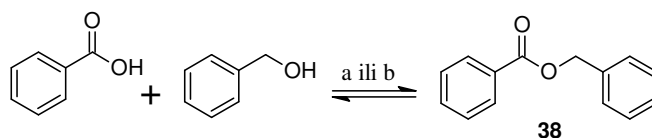
*Shema 3.16.* (a) O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH, MW, 270 °C, 10 minuta, 97 % (**36**)/70 % (**37**).

Struktura sintetizovanih amida naftenskih kiselina *Velebit* (**36**) potvrđena je prisustvom karakterističnih apsorpcionih traka u IR spektru. Aporpciona traka koja se javlja na 1651 cm<sup>-1</sup> posledica je valencionih vibracija (ν C=O) amidne funkcionalne grupe dok traka na 1455 cm<sup>-1</sup> potiče od valencionih vibracija C-N veze (ν C-N). U <sup>1</sup>H NMR spektru nalazi se multiplet na δ<sub>H</sub> 3.35-3.68 ppm koji potvrđuje prisustvo morfolinskih prstenova u jedinjenjima. U <sup>13</sup>C NMR spektru signali na δ<sub>C</sub> 45.97 i δ<sub>C</sub> 46.19 ppm potiču od C-atoma metilenskih grupa susednih azotovom atomu (CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>) a signali na δ<sub>C</sub> 66.57 i δ<sub>C</sub> 66.85 ppm potiču od C-atoma metilenskih grupa susednih kiseonikovom atomu (CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>) i ukazuju na prisustvo morfolinskih sistema. Na δ<sub>C</sub> 171.58-172.85 ppm javljaju se signali ugljenika karbonilne grupe (C=O) koji potvrđuje nastanak amida morfolina naftenskih kiselina *Velebit*.

IR spektar amida morfolina naftenskih kiselina *Aldrich* (**37**) dokazuje prisustvo novosintetizovane amidne grupe u molekulima prisustvom trake koja potiče od valencione C=O vibracije amida (ν C=O) na 1700 cm<sup>-1</sup>. U <sup>1</sup>H NMR multipleti dokazuju prisustvo vodonikovih atoma iz morfolinskog prstena i pojavljuju se na δ<sub>H</sub> 3.30-3.70. Signal na δ<sub>C</sub> 17.88 ppm u <sup>13</sup>C NMR spektru dokazuje prisustvo karbonilne grupe amida (C=O), dok signali na δ<sub>C</sub> 46.05 i δ<sub>C</sub> 46.22 ppm (CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>) i δ<sub>C</sub> 66.63 i δ<sub>C</sub> 66.90 ppm (CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>) potvrđuju da je morfolinski sistem deo sintetizovanih struktura.

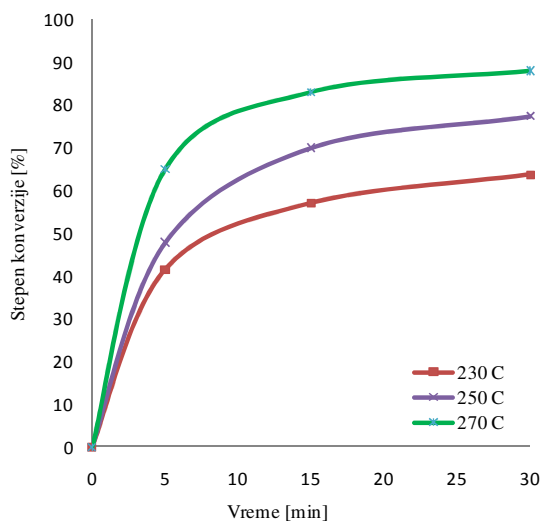
## 3.4.5. Esterifikacija i aminoliza sintetizovanih estara individualnih i smeše naftenskih kiselina

Reakcije esterifikacije individualnih, kao i smeše naftenskih kiselina, izvedene su sa benzil-alkoholom, pri molaskom odnosu 1.5:1 (respektivno), u cilju dobijanja aktivnih estara, odnosno benzil-estara (*Shema 3.17.*).



*Shema 3.17.* (a) refluks, 20 h, 68 %; (b) MW, 270 °C, 30 min, 80 %.

Optimizacija reakcionih uslova izvedena je u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora, na benzojevoj kiselini kao model supstanci, a praćena je tećnom hromatografijom visoke rezolucije (*Slika 3.17.*).



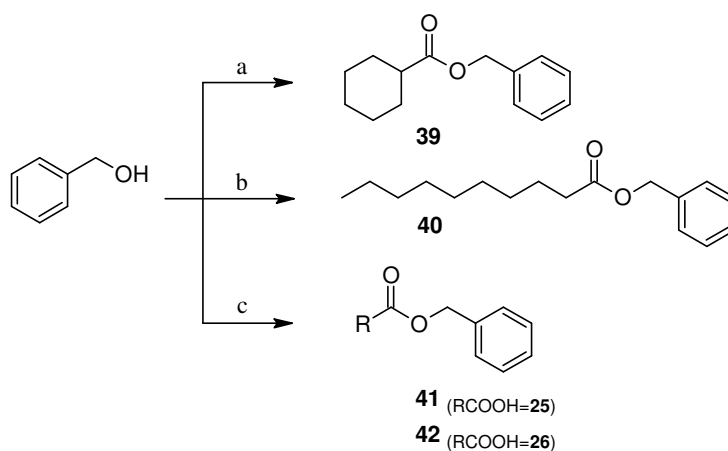
*Slika 3.17.* Zavisnost stepena konverzije benzojeve kiseline u benzil-benzoat od reakcione temperature i vremena u *CEM* mikrotalasnom reaktoru.

Iz grafika na *Slici 3.17.* se vidi da je najveći prinos benzil-benzoata ostvaren nakon 30 minuta mikrotalasnog ozraćivanja, pri temperaturi od 270 °C. U odnosu na konvencionalno zagrevanje (20 h, prinos izolovanog proizvoda 68 %) postignuto je uspešno skraćenje vremena sinteze benzil-estara (30 min.; 88 % HPLC prinos; 80 % prinos izolovanog proizvoda).

Struktura sintetizovanog estara **38** potvrđena je spektralnim podacima. U IR spektru sintetizovanog benzil-benzoata asignirana je intenzivna traka na 1716 cm<sup>-1</sup> koja potiče od valencionih vibracija C=O

grupe ( $\nu$  C=O). Signal na  $\delta_{\text{H}}$  5.45 ppm u  $^1\text{H}$  NMR spektru potiče od vodonika  $\text{CH}_2$ -grupe ( $\text{OCH}_2$ ), dok se signali vodonikovih atoma iz aromatičnih prstenova javljaju na  $\delta_{\text{H}}$  7.40-8.20 ppm. U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru prisutan je signal na  $\delta_{\text{C}}$  166.21 ppm koji potiče od estarskog karbonila (C=O), zatim signali na  $\delta_{\text{C}}$  128.01-135.95 ppm od dvanaest aromatičnih ugljenikovih atoma (Ar-C), i signal na  $\delta_{\text{C}}$  66.51 ppm koji je karakterističan za benzilni C-atom nagrađene estarske grupe ( $\text{OCH}_2$ ).

Mikrotalasno-stimulisana sinteza benzil-estara (**39**, **40**, **41** i **42**) uspešno je izvedena i sa cikloheksilkarboksilnom i dekanskom kiselinom kao i sa prirodnom smešom naftenskih kiselina *Velebit* (**25**) i komercijalnim naftenskim kiselinama *Aldrich* (**26**), (Shema 3.18.).



Shema 3.18. MW, 270 °C, 30 min (a)  $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{COOH}$ , 73 % (**39**); (b)  $n\text{-C}_9\text{H}_{19}\text{COOH}$ , 70 % (**40**); (c) RCOOH (**25/26**), 83 % (**41**)/61 % (**42**).

Zahvaljujući mogućnosti zagrevanja benzil-alkohola do temperatura koje su znatno iznad temperature ključanja alkohola pri atmosferskom pritisku ( $t_{\text{k}} = 205$  °C) sintetizovani su estri naftenskih kiselina u visokom prinosu. S obzirom na to da prirodne i komercijalne naftenske kiseline predstavljaju kompleksnu smešu karboksilnih kiselina dobijeni su i nešto manji prinosi estara u odnosu na reakcije esterifikacije individualnih naftenskih kiselina. Važno je naglasiti da su reakcije esterifikacije izvedene u odsustvu katalizatora i organskih rastvarača, što je od posebnog značaja sa aspekta *zelene hemije*.

U IR spektru jedinjenja **39** uočavaju se apsorpcione trake na  $1732\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  C=O) i  $1312\text{-}1166\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{as}}$  i  $\nu_{\text{sim}}$  C-O-C) koje su dokaz prisustva novosintetizovane estarske funkcionalne grupe. U  $^1\text{H}$  NMR spektru jedinjenja **39** prisutan je signal na  $\delta_{\text{H}}$  5.14 ppm koji potiče od vodonika  $\text{CH}_2$ -grupe ( $\text{OCH}_2$ ) kao i signal karakterističan za aromatične vodonike na  $\delta_{\text{H}}$  7.37 ppm (Ar-H) koji potvrđuju prisustvo benzenovog

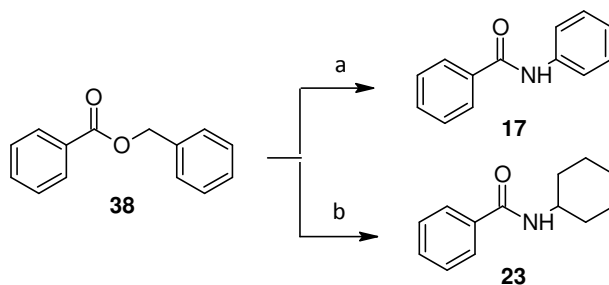
prstena. U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru signal na  $\delta_{\text{C}}$  65.67 ppm ( $\text{OCH}_2$ ) potvrđuje prisustvo benzilnog C-atoma dok je karbonilna funkcija asignirana na 175.60 ppm ( $\text{C}=\text{O}$ ).

Struktura sintetizovanog estera **40** potvrđena je prisustvom traka na  $1739\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{ C}=\text{O}$ ) i  $1300\text{-}1160\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{as}}$  i  $\nu_{\text{sim}}$  C-O-C) u IR spektru, odnosno u  $^1\text{H}$  NMR spektru signalima na  $\delta_{\text{H}}$  5.15 ppm ( $\text{OCH}_2$ ),  $\delta_{\text{H}}$  7.38 ppm (Ar-H) i u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru signalima na  $\delta_{\text{C}}$  65.83 ppm ( $\text{OCH}_2$ ) i  $\delta_{\text{C}}$  173.34 ppm ( $\text{C}=\text{O}$ ).

IR spektar benzil-estara naftenskih kiselina *Velebit* (**41**) dokazuje prisustvo estarske grupe u molekulima prisustvom trake na  $1738\text{ cm}^{-1}$  koja potiče od valencionih vibracija  $\text{C}=\text{O}$  grupe ( $\nu\text{ C}=\text{O}$ ) i trake na  $1258\text{-}1159\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{as}}$  i  $\nu_{\text{sim}}$  C-O-C). Prisustvo estarske funkcije u  $^1\text{H}$  NMR spektru sintetizovanih benzil-naftenata potvrđuje signal na  $\delta_{\text{H}}$  5.15 ppm ( $\text{OCH}_2$ ) a aromatični protoni daju signal na  $\delta_{\text{H}}$  7.38 ppm (Ar-H). U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru prisustvo estarske funkcije dokazuju signali na  $\delta_{\text{C}}$  173.05-173.53 ppm ( $\text{C}=\text{O}$ ) i na  $\delta_{\text{C}}$  65.94 ppm ( $\text{OCH}_2$ ). Signali na 128.05-128.43 dokazuju prisustvo ugljenikovih atoma aromatičnog prstena (Ar-C).

U IR spektru sintetizovanih benzil-estara naftnih kiselina *Aldrich* **42** uočava se jaka traka na  $1733\text{ cm}^{-1}$  koja potiče od valencionih vibracija  $\text{C}=\text{O}$  grupe ( $\nu\text{ C}=\text{O}$ ). Simetrične i asimetrične valencione vibracije ( $\nu\text{ C-O-C}$ ) nastalih benzil-estara apsorbuju u oblasti  $1379\text{-}1158\text{ cm}^{-1}$ . Prisustvo estarske funkcije u  $^1\text{H}$  NMR spektru sintetizovanih benzil-naftenoata potvrđuje signal na  $\delta_{\text{H}}$  5.14 ppm ( $\text{OCH}_2$ ) a aromatični protoni daju signal na  $\delta_{\text{H}}$  7.37 ppm (Ar-H). U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru prisustvo estarske funkcije dokazuju signali na  $\delta_{\text{C}}$  173.10-177.77 ppm ( $\text{C}=\text{O}$ ) i na  $\delta_{\text{C}}$  65.78-65.97 ppm ( $\text{OCH}_2$ ). Signali na 127.55-135.95 dokazuju prisustvo ugljenikovih atoma aromatičnog prstena (Ar-C).

Reakcije aminolize benzil-benzoata izvedene su sa anilinom, odnosno cikloheksilaminom pri molskom odnosu ester : amin = 1 : 1.5, u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora na temperaturi od  $300\text{ }^\circ\text{C}$  u toku 10 minuta (*Shema 3.19.*).



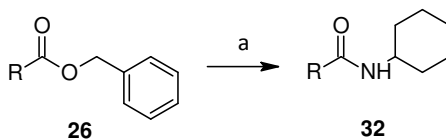
*Shema 3.19.* MW,  $300\text{ }^\circ\text{C}$ , 10 min. (a)  $\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$ , 72 %; (b)  $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NH}_2$ , 92 %.

Aromatični amini, kao što je anilin, generalno su znatno slabije baze u odnosu na alifatične amine usled elektron-privlačnog efekta fenil grupe ( $\text{pK}_{\text{a}}(\text{anilin}) = 4.6$ ;  $\text{pK}_{\text{a}}(\text{cikloheksilamin}) = 10.7$ ). U skladu s tim,



pomenuti amini pokazali su različitu reaktivnost u uslovima mikrotalasno-stimulisanih reakcija aminolize. Pored toga, visoka vrednost temperature ključanja benzil-benzoata (> 300 °C) i maksimalna operativna vrednost temperature reaktora (300 °C) onemogućavaju intenzivnije zagrevanje reakcione smeše pa su zato dobijene približno iste vrednosti prinosa jedinjenja **17** i **23** u odnosu na reakcije amidacije individualnih naftenskih kiselina.

Prethodno utvrđeni reakcioni uslovi primenjeni su na reakciju aminolize aktivnih estara komercijalnih *Aldrich* (**26**) naftenskih kiselina sa *N*-cikloheksilaminom (*Shema 3.20.*).



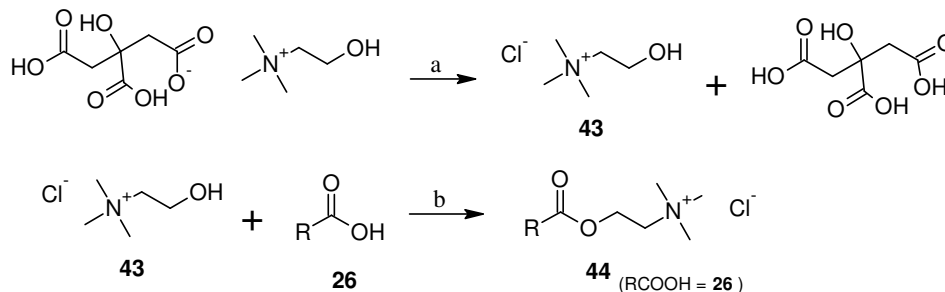
*Shema 3.20.* (a) C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NH<sub>2</sub>, MW, 300 °C, 10 min., 20 %.

Mikrotalasnom sintezom amida aminolizom estara u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora, u odsustvu rastvarača i katalizatora, dobijeni su *N*-cikloheksilamidi naftenskih kiselina *Aldrich* (**32**) u nešto nižem prinosu.

#### 3.4.6. Sinteza holin-estara naftenskih kiselina *Aldrich*

Holin estri naftenskih kiselina s obzirom na svoju strukturu bi trebali biti značajno rastvorljiviji u vodi u odnosu na same naftenske kiseline. S obzirom na to da je voda standardni medijum za biološka ispitivanja, njihovo prevođenje u polarna jedinjenja kao što su kvaternerne amonijumove soli je od velikog značaja za dalja biološka istraživanja naftenskih kiselina.

Na osnovu prethodnog, u narednoj fazi naših istraživanja izvršena je sinteza holin-estara naftenskih kiselina *Aldrich* (**26**). Kao polazno jedinjenje upotrebljen je komercijalno dostupan holin-dihidrogencitrat koji je prvo preveden u holin-hlorid (**43**), čija je -OH grupa prevedena u estarsku reakcijom sa -COOH grupama naftenskih kiselina *Aldrich* (*Shema 3.21.*).



Shema 3.21. (a) cc HCl, H<sub>2</sub>O, MW, 100 °C, 1 h, 88 %; (b) H<sup>+</sup>, MW, 160 °C, 1 h, 30 %.

Mikrotalasnim ozračivanjem naftenskih kiselina *Aldrich* i holin-hlorida u prisustvu katalitičke količine kiseline na temperaturi od 160 °C, u toku jednog časa, sintetizovani su holin estri naftenskih kiselina (**44**). Od značaja je istaći da pregledom postojeće literature ne postoje podaci o sintezi holin estara naftenskih kiselina.

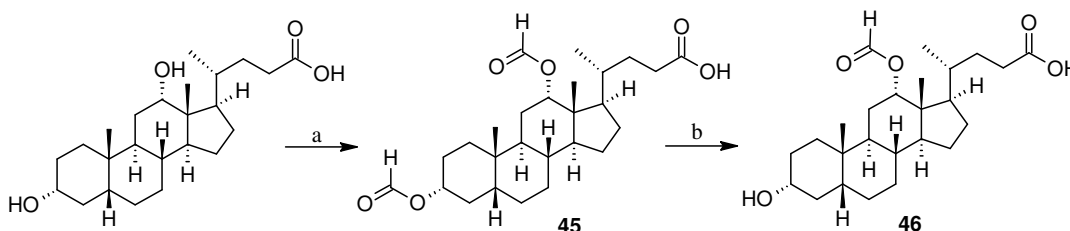
Strukture jedinjenja **43** dokazane su signalima u <sup>1</sup>H NMR spektru na δ<sub>H</sub> 3.32 (CH<sub>3</sub>), 3.64 (NCH<sub>2</sub>) i 4.14 (CH<sub>2</sub>OH), odnosno signalima u <sup>13</sup>C NMR spektru na δ<sub>C</sub> 56.95, 57.01, 57.08 ppm (CH<sub>3</sub>), δ<sub>C</sub> 58.67 ppm (CH<sub>2</sub>OH) i δ<sub>C</sub> 70.42 ppm (NCH<sub>2</sub>). Struktura holin-estara (**44**) potvrđena je signalima u <sup>1</sup>H NMR spektru na δ<sub>H</sub> 0.68-1.84 ppm (CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>), δ<sub>H</sub> 2.43 ppm (CH<sub>2</sub>O), δ<sub>H</sub> 3.40 ppm (CH<sub>3</sub>) i δ<sub>H</sub> 4.06 ppm (CH<sub>2</sub>N), odnosno signalima u <sup>13</sup>C NMR spektru na δ<sub>C</sub> 13.90-44.07 ppm (CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>), δ<sub>C</sub> 45.28, 46.49, 49.55 ppm (CH<sub>3</sub>), δ<sub>C</sub> 57.24 ppm (CH<sub>2</sub>OH), δ<sub>C</sub> 61.46 ppm (NCH<sub>2</sub>) i δ<sub>C</sub> 172.19-175.66 ppm (C=O).

3.4.7. Sinteza i derivatizacija 5 $\beta$ -holanske kiseline

Žučne kiseline predstavljaju najverovatnije prekursore policikličnih karboksilnih kiselina u nafti<sup>109</sup>. Kao prirodni molekuli sa hidroksilnim funkcionalnim grupama koje se tokom procesa geohemijskih transformacija biološkog materijala gube daju tetracikličnu karboksilnu kiselinu, odnosno 5 $\beta$ -holansku kiselinu. U cilju efikasne sinteze 5 $\beta$ -holanske kiseline, kao model supstance pri identifikaciji prirodnih policikličnih naftenskih kiselina prisutnih u nafti, izvršena je mikrotalasno-stimulisana Wolff-Kishner-ova redukcija keto derivata žučnih kiselina.

U planiranim fazama sinteze holanske kiseline ispitan je uticaj mikrotalasa i na reakcije selektivne i potpune oksidacije žučnih kiselina do odgovarajućih keto derivata. S obzirom na to da zaštita hidroksilnih grupa žučnih kiselina predstavlja fundamentalni korak u sintezi različitih derivata žučnih kiselina<sup>222</sup> naš prvi zadatak je bio modifikacija reakcija formilovanja i acetilovanja. Mikrotalasno-stimulisanim formilovanjem 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\beta$ -holanske kiseline dobijena je 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diformiloksi-5 $\beta$ -holanska kiselina (**45**) u visokom prinosu i visokog stepena čistoće nakon 30 minuta mikrotalasnog ozračivanja čime je vreme trajanja reakcije u odnosu na konvencionalne uslove skraćeno za 1 h<sup>223,224</sup>. Od značaja je napomenuti da je sinteza uspešno ostvarena u odsustvu perhlorne kiseline kao katalizatora<sup>171</sup> (Shema 3.22.).

Struktura sintetizovanog jedinjenja **45** potvrđena je signalima u <sup>1</sup>H NMR spektru na  $\delta_H$  8.04 ppm (CHO-3) i  $\delta_H$  8.14 ppm (CHO-12), odnosno signalima na  $\delta_C$  160.56 ppm (CHO-3) i  $\delta_C$  160.69 ppm (CHO-12) u <sup>13</sup>C NMR spektru.

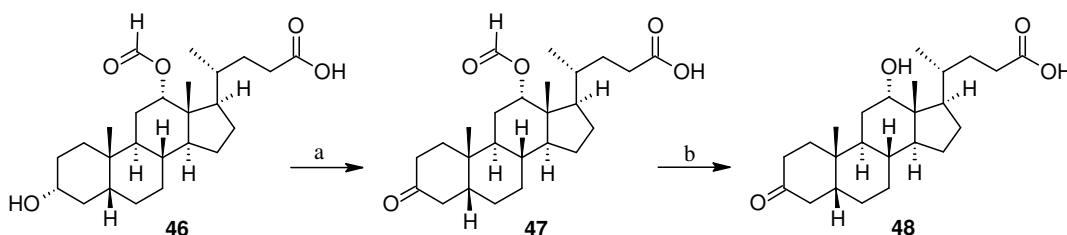


Shema 3.22. (a) HCOOH, (CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O, MW, 55 °C, 30 min, 98 %; (b) 0.2 N NaOH, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, MW, 60 °C, 5 min, 95 %.

U drugoj fazi ovog sintetskog puta, mikrotalasno-stimulisanim selektivnim deformilovanjem jedinjenja **45** dobijena je 12 $\alpha$ -formiloksi-3 $\alpha$ -hidroksi-5 $\beta$ -holanskoj kiselini (**46**). U odnosu na klasičan tok reakcije (1.5 h)<sup>223,224</sup> reakciono vreme je skraćeno na svega 5 minuta, odnosno 18 puta.

Da je dobijen monoformilovani derivat deoksiholne kiseline (**46**) potvrđeno je pomeranjem signala u  $^1\text{H}$  NMR spektru vodonika na C-3 ugljeniku na ppm vrednost koja je manja za približno 1.2 ppm jedinica ( $\delta_{\text{H}}$  3.59 ppm) zbog toga što C-3 OH grupa nije više formilovana kao i prisustvom signala na  $\delta_{\text{H}}$  8.12 ppm (CHO-12).

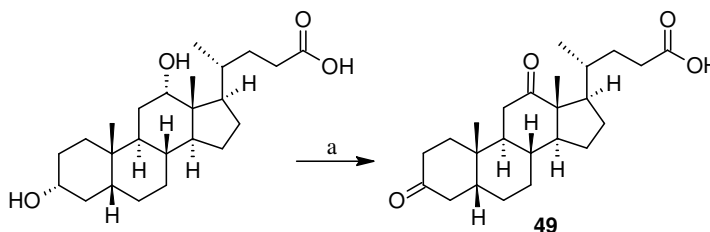
U narednoj fazi ove sinteze izvršena je selektivna oksidacija -OH grupe sa *N*-bromsukcinimidom u *t*-butanolu kao rastvaraču, na temperaturi od 80 °C (a, *Shema 3.23.*).



*Shema 3.23.* (a) NBS, *t*-BuOH/H<sub>2</sub>O, MW, 80 °C, 1 min, 92 %; (b) 0.2 N NaOH, MW, 60 °C, 2 min, 74 %.

Zahvaljujući primeni mikrotalasnog zračenja i u ovoj fazi je postignuto uspešno skraćenje vremena neophodnog za oksidaciju hidroksilne grupe sa 51 h<sup>225</sup> na svega 1 minut, odnosno ubrzanje je 3060 puta. Da je došlo do oksidacije jedinjenja **46** ukazuje odsustvo signala C-3 vodonika u  $^1\text{H}$  NMR spektru jedinjenja **47** koje je deformilovano do jedinjenja **48** (b, *Shema 3.23.*).

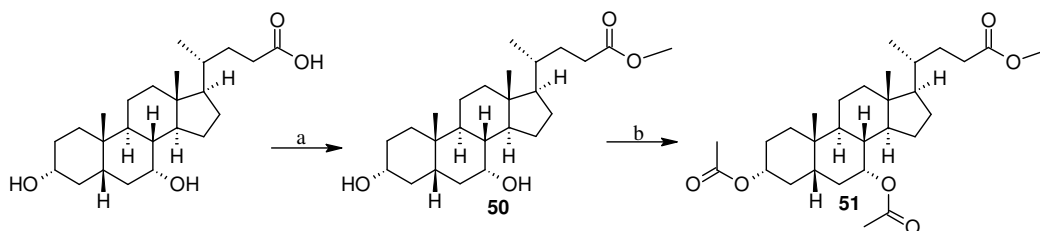
Naposletku, ispitan je uticaj mikrotalasnog zračenja na reakciju potpune oksidacije deoksiholne kiseline pri čemu je dobijen diketo derivat **49** u visokom prinosu nakon 1 minuta mikrotalasnog ozračivanja (*Shema 3.24.*).



*Shema 3.24.* (a) NBS, *t*-BuOH/H<sub>2</sub>O, MW, 80°C, 1 min, 88 %.

Struktura sintetizovanog jedinjenja **49** potvrđena je odsustvom signala C-3 i C-12 vodonikovih atoma u  $^1\text{H}$  NMR spektru, odnosno prisustvom signala na  $\delta_{\text{C}}$  212.34 ppm (C<sub>3</sub>=O) i  $\delta_{\text{C}}$  214.28 ppm (C<sub>12</sub>=O) u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru.

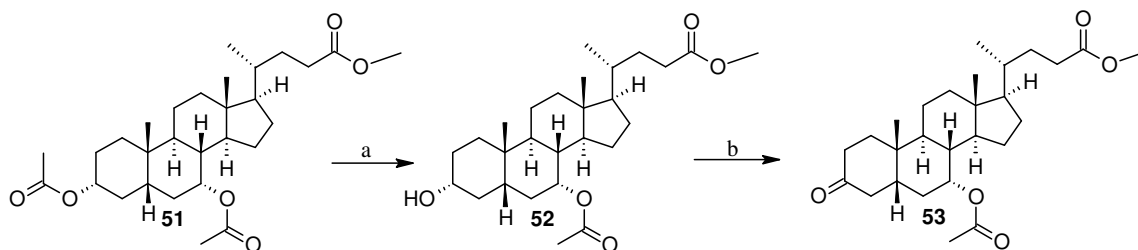
U narednoj fazi ispitivan je uticaj mikrotalasa na reakcije acetilovanja, odnosno selektivnog deacetilovanja i oksidacije henodeoksiholne kiseline. Kao polazno jedinjenje uzet je metil 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\beta$ -holanoat (**50**) koji je prvo preveden u metil 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diacetoksi-5 $\beta$ -holanoat (**51**), (b, *Shema 3.25.*).



*Shema 3.25.* (a) aps. MeOH, cc H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MW, 140 °C, 30 min., 51 %; (b) (AcO)<sub>2</sub>O, Py, MW, 120 °C, 2 min, 96 %.

Potpuno acetilovanje postignuto je nakon 2 minuta mikrotalasnog ozračivanja što u poređenju sa konvencionalnom reakcijom, koja je trajala 4 sata i zahtevala prisustvo katalizatora 4-dimetilaminopiridina (DMAP)<sup>226</sup>, predstavlja ubrzanje reakcije acetilovanja za 120 puta. U protonskom spektru jedinjenja **51** prisustvo signala protona na C-3 i C-7 ( $\delta_H$  4,60 ppm i  $\delta_H$  4,87 ppm) kao i signala metil estra na  $\delta_H$  3,66 ppm dokazuju strukturu sintetizovanog jedinjenja.

Reakcijom selektivnog deacetilovanja OH grupe u položaju C-3 dobijen je molekul **52** u visokom prinosu i visokog stepena čistoće (a, *Shema 3.26.*).



*Shema 3.26.* (a) MeOH, *p*-TSA, MW, 100 °C, 20 min, 92 %; (b) NBS, *t*-BuOH / H<sub>2</sub>O, MW, 80 °C, 1 min, 87 %.

<sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja **52** pokazuje da se signal vodonika na C-3 ugljeniku pomerio na ppm vrednost koja je manja za približno 1.1 ppm jedinica (3.50 ppm) zbog toga što C-3 OH grupa nije više acetilovana.

Selektivno deacetilovan proizvod **52** uspešno je preveden u 3-keto derivat (**53**) oksidacijom sa *N*-bromsukcinimidom (NBS) u *t*-butanolu. Da je došlo do oksidacije jedinjenja **52** ukazuje odsustvo signala C-3 vodonika u <sup>1</sup>H NMR spektru jedinjenja **53**.

Dobijeni rezultati pokazuju da je modifikovanim mikrotalasno-stimulisanim sintezama u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora postignuto poboljšanje efikasnosti hemijskih transformacija u odnosu na konvencionalne metode zagrevanja i zagrevanja u kućnim mikrotalasnim pećnicama<sup>227</sup>.

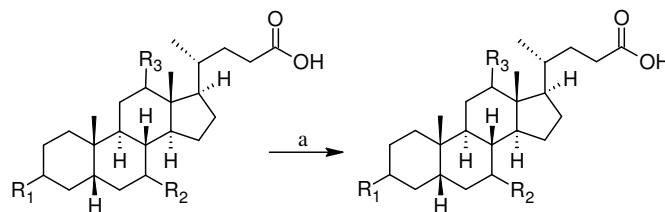
Pomenuto poboljšanje efikasnosti se ogleda u znatno većem prinosu krajnjeg proizvoda uz mali utrošak reagenasa i bez dugotrajnih postupaka prečišćavanja između reakcionih koraka.

Sa aspekta *zelene hemije* i zaštite životne sredine, tradicionalne metode oksidacije žučnih kiselina se smatraju nepogodnim s obzirom na to da većinu prati građenje nusproizvoda koji dovode do ozbiljnog zagađenja životne sredine. Posledično, visok stepen interesovanja fokusiran na pronalaženje netoksičnih oksidacionih agenasa usmerio je naša istraživanja na primenu oksona (*Oxone*) u reakcijama oksidacije -OH grupa žučnih kiselina, u vodi kao rastvaraču.

Okson (*Oxone*) jeste trostruka so, formule 2KHSO<sub>5</sub>·KHSO<sub>4</sub>·K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, u kojoj je aktivni oksidacioni agens kalijum-peroksimonosulfat (KHSO<sub>5</sub>). Kao veoma pristupačan reagens naišao je na široku primenu za oksidaciju sulfida do sulfona, oksidaciju aldehida do kiselina, epoksidaciju alkena i dr<sup>228-232</sup>. Nizak stepen toksičnosti i nastajanja nusproizvoda čini ga veoma pogodnim i za rad u studentskim laboratorijama<sup>233,234</sup>.

Wu i saradnici<sup>235</sup> su otkrili da se u vodenoj sredini okson zajedno sa Lewis-ovom kiselinom (AlCl<sub>3</sub>) pokazao kao veoma efikasno, blago oksidaciono sredstvo u reakcijama oksidacije različitih alkohola. Međutim pomenute sinteze karakteriše višestruko mešanje reakcione smeše na sobnoj temperaturi. Pregledom literature nije pronađen ni jedan rad o primeni oksona u reakcijama oksidacije hidroksilnih grupa žučnih kiselina, što ovu reakciju u mikrotalasnim uslovima čini originalnom.

Mogućnost oksidacije žučnih kiselina sa *Oxone*/AlCl<sub>3</sub> sistemom (*Shema 3.27.*) je ispitana na primeru deoksiholne kiseline (DCA) u destilovanoj vodi kao rastvaraču. Praćenjem reakcije TLC-om utvrđeno je da je reakcija završena nakon 12 minuta mikrotalasnog ozračivanja pri temperaturi od 50°C (> 70 °C-degradacija oksona). Poređenjem sa reakcijom na sobnoj temperaturi postignuto je značajno skraćanje vremena trajanja sinteze. U vodi kao rastvaraču, *Oxone*/AlCl<sub>3</sub> sistem pokazao se kao efikasan u reakcijama oksidacije i drugih žučnih kiselina (CDCA-henodeoksiholna kiselina, CA-holna kiselina, LCA-litoholna kiselina) što je od posebnog značaja sa aspekta *zelene hemije* (*Tabela 3.8.*).

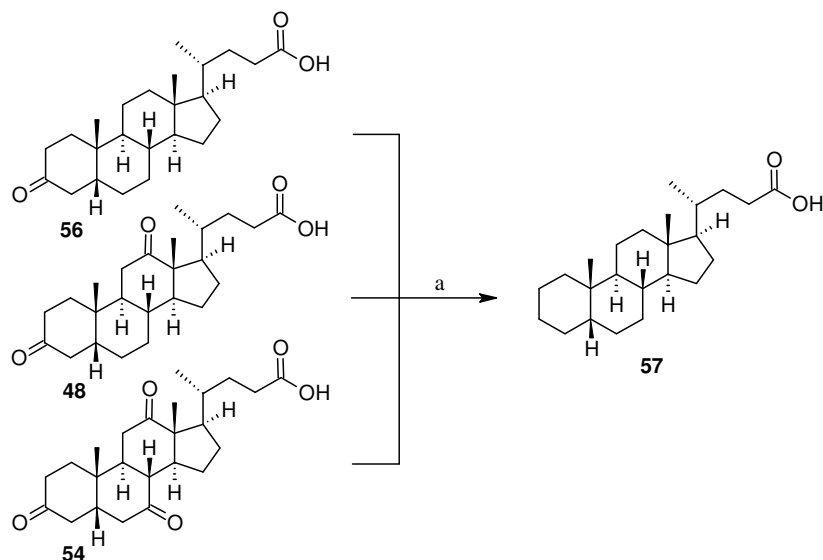
Shema 3.27. (a) *Oxone*/AlCl<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, MW.Tabela 3.8. Mikrotalasno-stimulisana oksidacija žučnih kiselina sa *Oxone*/AlCl<sub>3</sub> sistemom.

Žučna kiselina	T [°C]	Vreme [min]	Proizvod	Prinos [%]		
DCA	R <sub>1</sub> , R <sub>3</sub> = OH	st	180	<b>49</b>	R <sub>1</sub> , R <sub>3</sub> = O	90
	R <sub>2</sub> = H	50	12		R <sub>2</sub> = H	81
CDCA	R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> = OH	50	10	<b>54</b>	R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> = O	83
	R <sup>3</sup> = H				R <sub>3</sub> = H	
CA	R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> = OH	50	30	<b>55</b>	R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> = O	47
LCA	R <sub>1</sub> = OH	50	6	<b>56</b>	R <sub>1</sub> = O	90
	R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> = H				R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> = H	

Jednostavna obrada reakcione smeše, kao i odsustvo toksičnih nusproizvoda oksidacionog sistema čine ga izuzetno pogodnim, posebno u kombinaciji sa mikrotalasnom tehnologijom.

Da je došlo do oksidacije žučnih kiselina ukazuje odsustvo signala C-3 i C-12 vodonika u <sup>1</sup>H NMR spektru jedinjenja **49**, odnosno C-3 i C-7 vodonika jedinjenja **54**, C-13, C-7 i C-12 vodonika jedinjenja **55** i C-3 vodonika u <sup>1</sup>H NMR spektru jedinjenja **56**.

U cilju dobijanja 5β-holanske kiseline (**57**) izvršena je modifikacija Wolff-Kishner-ove metode redukcije prethodno sintetizovanih keto derivata žučnih kiselina (Shema 3.28.). Reakcije su izvođene u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora, pri visokim vrednostima temperature i pritiska.



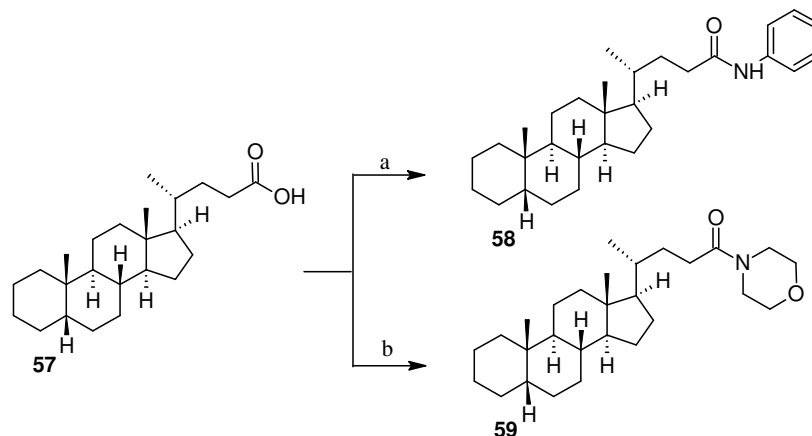
Shema 3.28. (a)  $\text{NH}_2\text{NH}_2$ ,  $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\text{KOH}$ , MW,  $240^\circ\text{C}$ , 15 min.

U odnosu na klasičan postupak reakcije redukcije<sup>236</sup> reakciono vreme je skraćeno za više od četrnaest sati. Saglasno sa rezultatima dobijenim ispitivanjem stepena degradacije Pyrex reakcionih sudova u prisustvu jake baze, po završetku Wolff-Kishner-ove redukcije uočeno je da je došlo do degradacije stakla što je i potvrđeno gubitkom mase reakcionog suda ( $\Delta m = 0.0812\text{ g}$ ).

Identifikacija reakcionog proizvoda **57** rađena je  $^{13}\text{C}$  NMR-spektroskopijom i IR spektroskopijom. U IR spektru  $5\beta$ -holanske kiseline na  $3600\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$  se javlja traka koja potiče od simetričnih i asimetričnih valencionih vibracija slobodne OH grupe karboksilne funkcije, na  $1707\text{ cm}^{-1}$  se javlja samo jedan signal koji odgovara vibracijama karbonilne grupe iz karboksilne funkcije. U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru prisutni su signali na  $\delta_c$  12.05 ppm (C-18),  $\delta_c$  18.23 ppm (C-19) i  $\delta_c$  197.10 ppm (C-24).

Sintetizovana  $5\beta$ -holanska kiselina, kao predstavnik policikličnih naftenskih kiselina, derivatizovana je amidacijom sa anilinom i morfolinom, pri čemu je dobijen sekundarni (**58**) i tercijarni amid (**59**) tetraciklične naftenske kiseline. Reakcije su izvođene u mikrotalasnom reaktoru na temperaturi od  $200^\circ\text{C}$  u toku 1 časa (Shema 3.29).

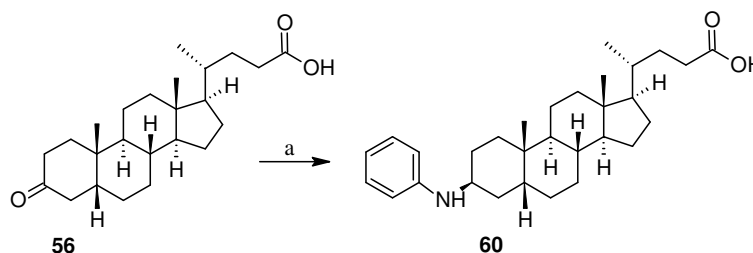




Shema 3.29. MW, 200 °C, 1 h (a)  $C_6H_5NH_2$ , 69 %; (b)  $O(CH_2CH_2)_2NH$ , 78 %.

Usled sternih smetnji, tetracikličnu individualnu naftensku kiselinu karakteriše sporije građenje amonijum soli. Shodno tome, dolazi i do sporije interakcije reakcione smeše sa mikrotalasnim zračenjem što je manifestovano nižim vrednostima temperature reakcione smeše i zahtevalo duže zagrevanje.

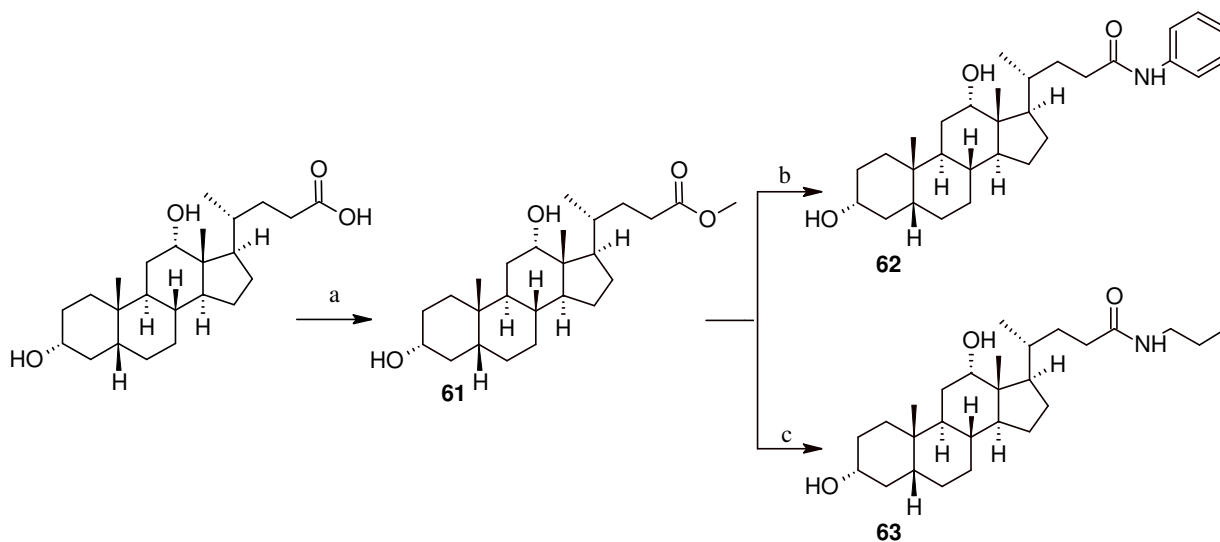
Keto derivati žučnih kiselina pokazali su se i kao veoma značajni intermedijeri u reakcijama reduktivne aminacije u cilju dobijanja amina tetracikličnih naftenskih kiselina (Shema 3.30.).



Shema 3.30. (a)  $C_6H_5NH_2$ ,  $NaBH(OAc)_3$ , AcOH, MW, 140 °C, 5 min., 58 %.

Mikrotalasnim ozračivanjem smeše 3-okso-5 $\beta$ -holanske kiseline (**56**) i anilina u dihloretanu (DCE) sa natrijum-triacetoksiborhidridom i glacijalnom sirćetnom kiselinom dobijena je 3 $\beta$ -fenilamino-5 $\beta$ -holanska kiselina (**60**) u prinosu od 58 %. Da je dobijen 3 $\beta$ -amin potvrđeno je prisustvom signala na 3.76 ppm u  $^1H$  NMR spektru koji potiče od vodonika na C-3. Na datom signalu ne uočavaju se konstante sprezanja što ukazuje na to da je pomenuti vodonik u ekvatorijalnom položaju.

U narednoj fazi naših radova izvršena je derivatizacija i deoksiholne kiseline pri čemu su dobijeni sekundarni amidi žučne kiseline (Shema 3.31.).



Shema 3.31. (a) aps. MeOH, cc H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MW, 140 °C, 30 sekundi, 85 %; MW, 200 °C, 90 min (b) C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NH<sub>2</sub>, 35 %; (c) n-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NH<sub>2</sub>, 54 %.

Aminoliza metil-estra deoksiholne kiseline (**61**) izvedena je u odsustvu rastvarača i katalizatora, u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora, pri temperaturi od 200 °C.

Struktura anilida tetraciklične kiseline **62** potvrđena je signalima na  $\delta_H$  7.00-7.60 ppm (Ar-H) i signalom na  $\delta_H$  6.90 ppm (NH) u <sup>1</sup>H NMR spektru, odnosno u <sup>13</sup>C NMR spektru signalima na  $\delta_C$  113.94-138.10 ppm (C-Ar) i  $\delta_C$  171.90 ppm (C=O). U <sup>1</sup>H NMR spektru jedinjenja **63** prisutni su signali na  $\delta_H$  3.18 ppm (CH<sub>2</sub>N) i signal na  $\delta_H$  5.71 ppm (NH), odnosno u <sup>13</sup>C NMR spektru signal na  $\delta_C$  173,63 ppm (C=O).

### 3.5. Biološka aktivnost naftenskih kiselina i njihovih derivata

Biološka aktivnost naftnih kiselina naftenskog tipa odavno je poznata u literaturi<sup>191</sup>. Tako je utvrđeno da vodeni rastvori kalijumovih soli naftenskih kiselina u određenim koncentracijama utiču na mnogobrojne metaboličke procese kod biljaka<sup>181-188</sup> a da pored toga pokazuju i antibakterijsku aktivnost<sup>189,190</sup>.

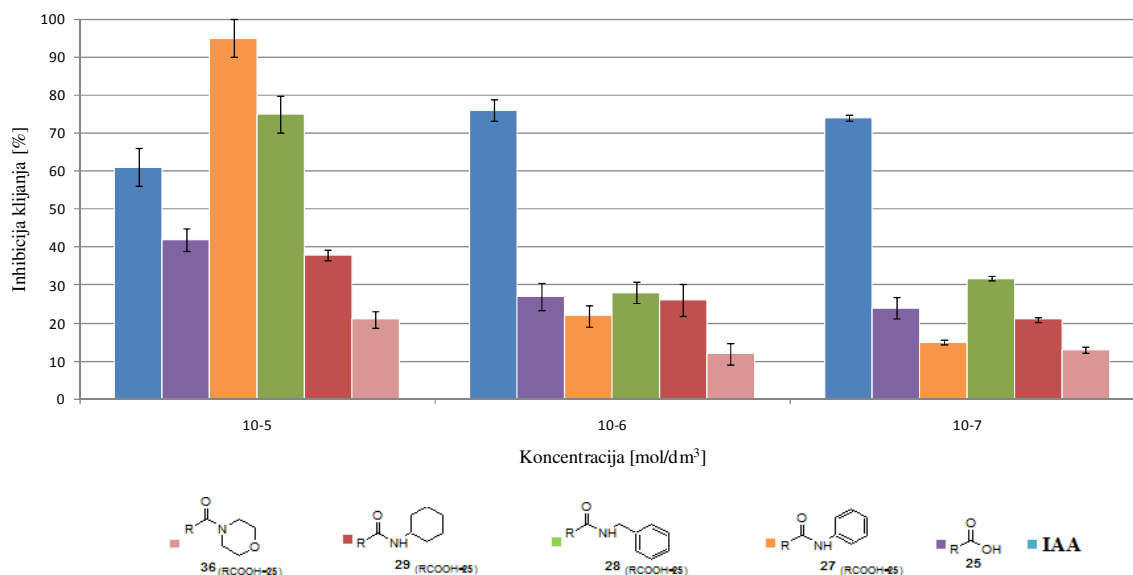
Međutim, biološka aktivnost derivata naftenskih kiselina je veoma slabo obrađena u literaturi. Do sada je uglavnom ispitivana biološka aktivnost metil-estara<sup>237,238</sup> koji su se pokazali kao supstance sa potencijalnom biološkom aktivnošću.

Na osnovu prethodnog, u ovom radu detaljno je ispitana biološka aktivnost slobodnih naftenskih kiselina izolovanih iz atmosferskog gasnog ulja nafte *Velebit*, komercijalnih *Aldrich* naftenskih kiselina, kao i njihovih finalnih derivata (amida, estara i holin-estara) i model smeše formirane od sintetizovanih derivata individualnih kiselina. Od biološke aktivnosti ispitivana je auksinska aktivnost, efekat na ožiljavanje reznica biljka, uticaj na razmnožavanje mikroorganizama i antiproliferativna aktivnost.

#### 3.5.1. Auksinska aktivnost naftenskih kiselina i njihovih derivata

Ispitana je auksinska aktivnost naftenskih kiselina izolovanih iz atmosferskog gasnog ulja nafte *Velebit* i komercijalnih *Aldrich* naftenskih kiselina, kao i sintetizovanih sekundarnih i tercijarnih amida naftenskih kiselina. U tu svrhu je rađen *in vitro* biološki *test inhibicije klijanja* semenom bele slačice (*Sinapis alba*).

U prvoj fazi naših radova ispitana je auksinska aktivnost naftenskih kiselina *Velebit* (**25**) i odgovarajućih derivata, odnosno *N*-fenil- (**27**), *N*-benzil- (**28**), *N*-cikloheksilamida (**29**) kao i amida morfolina (**36**), (*Slika 3.18.*).

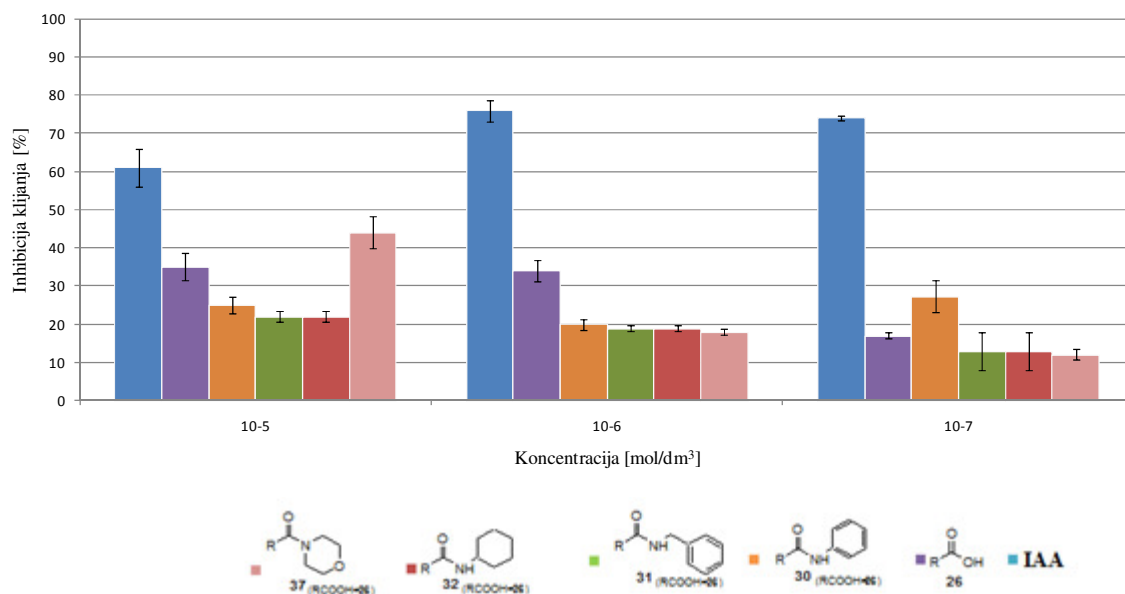


Slika 3.18. Poređenje stepena inhibicije klijanja semena slačice naftenskih kiselina *Velebit* (**25**) i amida naftenskih kiselina (**27**, **28**, **29**, **36**) sa 3-indolsirčetnom kiselinom (IAA).

Na osnovu inhibicije klijanja (veća inhibicija klijanja – veća auksinska aktivnost) semena slačice, nakon tretiranja odgovarajućim rastvorima kiseline ili derivata (Slika 3.18.), jasno je da naftenske kiseline *Velebit* (**25**) pokazuju nižu auksinsku aktivnost u poređenju sa 3-indolsirčetnom kiselinom (IAA). Poređenjem stepena inhibicije klijanja sintetizovanih amida naftenskih kiselina *Velebit* (**27**, **28**, **29**, **36**), očigledno je da amidi naftenskih kiselina ispoljavaju daleko nižu auksinsku aktivnost pri nižim koncentracijama ( $10^{-6}$  i  $10^{-7}$  M) u poređenju sa IAA.

Kod naftenskih kiselina *Velebit*, hemijska transformacija karboksilne funkcionalne grupe u amidnu izgleda da nema uticaj na auksinsku aktivnost osim kod *N*-fenil- (**27**) i *N*-benzilamida (**28**) naftenskih kiselina *Velebit* koji su pokazali veću auksinsku aktivnost jedino pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji ( $10^{-5}$  M).

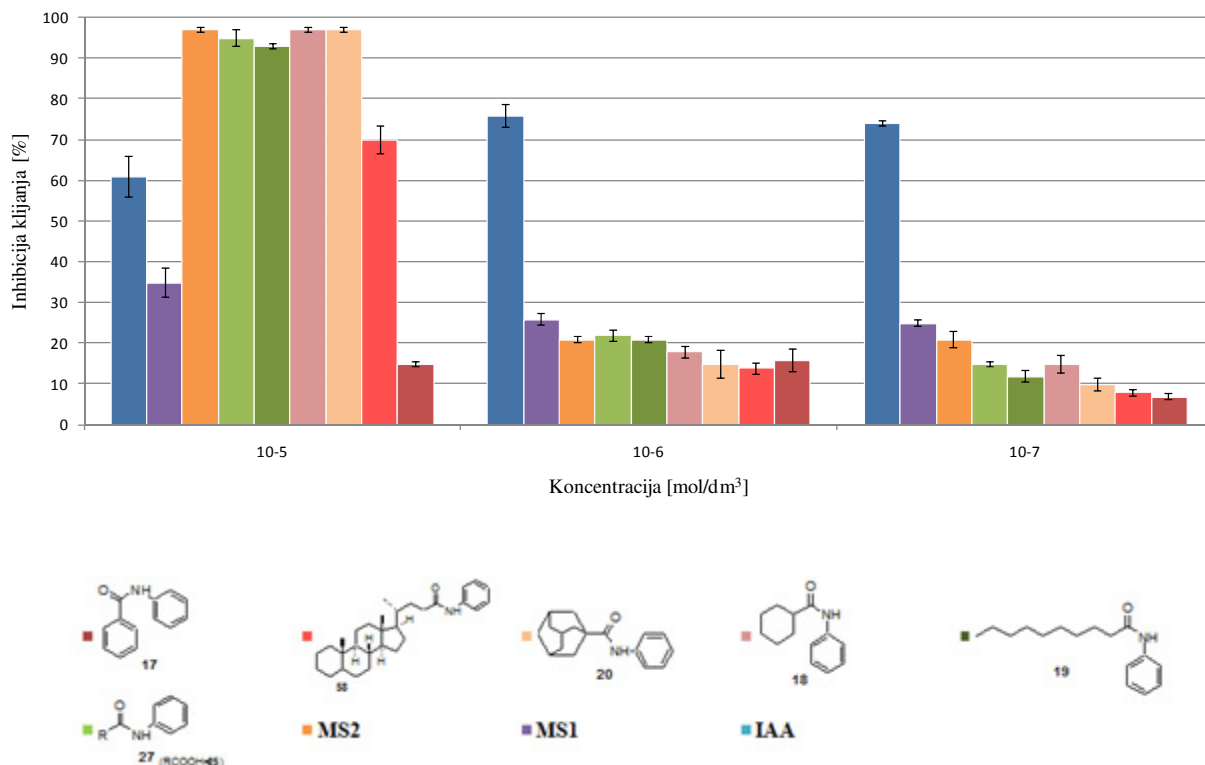
Ispitivanjem auksinske aktivnosti komercijalnih naftenskih kiselina *Aldrich* (**26**) kao i njihovih odgovarajućih derivata, odnosno *N*-fenil- (**30**), *N*-benzil- (**31**), *N*-cikloheksilamida (**32**) kao i amida morfolina (**37**), dobijeni su sledeći rezultati (Slika 3.19.):



Slika 3.19. Poređenje stepena inhibicije klijanja semena slačice naftenskih kiselina Aldrich (26) i amida naftenskih kiselina (30, 31, 32, 37) sa 3-indolsirćetnom kiselinom (IAA).

Na osnovu rezultata prikazanih na prethodnoj slici jasno je da komercijalne naftenske kiseline Aldrich (26) ispoljavaju nižu auksinsku aktivnost u odnosu na IAA. Kod sintetizovanih derivata naftenskih kiselina Aldrich (30, 31, 32, 37) uočava se niža auksinska aktivnost za sve sintetizovane amide, pri svim ispitivanim koncentracijama u poređenju sa 3-indolsirćetnom kiselinom.

S obzirom na to da Velebit naftenske kiseline (25) predstavljaju kompleksnu smešu prirodnih karboksilnih kiselina<sup>239</sup>, ispitana je auksinska aktivnost pet strukturno različitih individualnih karboksilnih kiselina, odnosno anilida aromatične (17), aciklične (19), monociklične (18), triciklične (20) i tetraciklične (58) individualne naftenske kiseline. Pored toga, ispitan je stepen inhibicije klijanja semena slačice model smeše MS1 (smeše slobodnih, individualnih karboksilnih kiselina) i MS2 (smeše anilida individualnih karboksilnih kiselina), (Slika 3.20.).



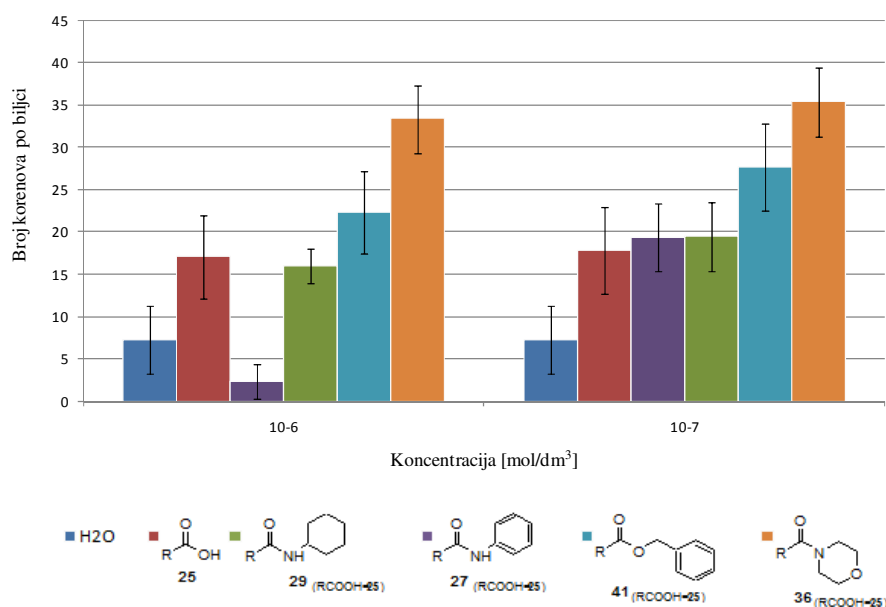
Slika 3.20. Poređenje stepena inhibicije klijanja semena slačice anilida naftenskih kiselina *Velebit* (27), anilida individualnih kiselina (17, 18, 19, 20 i 58), model smeše individualnih (MS1) i derivatizovanih naftenskih kiselina (MS2).

Poređenjem stepena inhibicije klijanja anilida aromatične (17), aciklične (19), monociklične (18), triciklične (20) i tetraciklične (58) individualne naftenske kiseline jasno je da njihova struktura nema posebnog uticaja na auksinsku aktivnost. Veće koncentracije sintetizovanih anilida individualnih naftenskih kiselina (17, 18, 19, 20 i 58) delovale su veoma inhibitorno u odnosu na IAA, a što je uočeno i nakon tretiranja semena slačice model smešom slobodnih, individualnih karboksilnih kiselina (MS1) i model smešom anilida individualnih karboksilnih kiselina (MS2).

## 3.5.2. Ožiljavanje reznica biljaka

Vegetativno razmnožavanje biljaka je od velikog značaja za poljoprivrednu proizvodnju. Za pojedine sintetičke supstance pokazano je da pospešuju ožiljavanje biljaka iako ne spadaju u klasu do sada poznatih biljnih hormona rasta. Tako su se soli naftenskih kiselina pokazale kao stimulatori formiranja adventivnih korenova biljaka, pri čemu je najveći efekat ostvaren pri nižim koncentracijama natrijum-naftenata<sup>239</sup>.

U ovom delu rada ispitan je uticaj naftenskih kiselina *Velebit* (**25**), kao i njihovih sintetizovanih derivata, odnosno amida (**27**, **29**, **36**) i benzil-estara (**41**) naftenskih kiselina na ožiljavanje reznica suncokreta (*Slika 3.21.*).

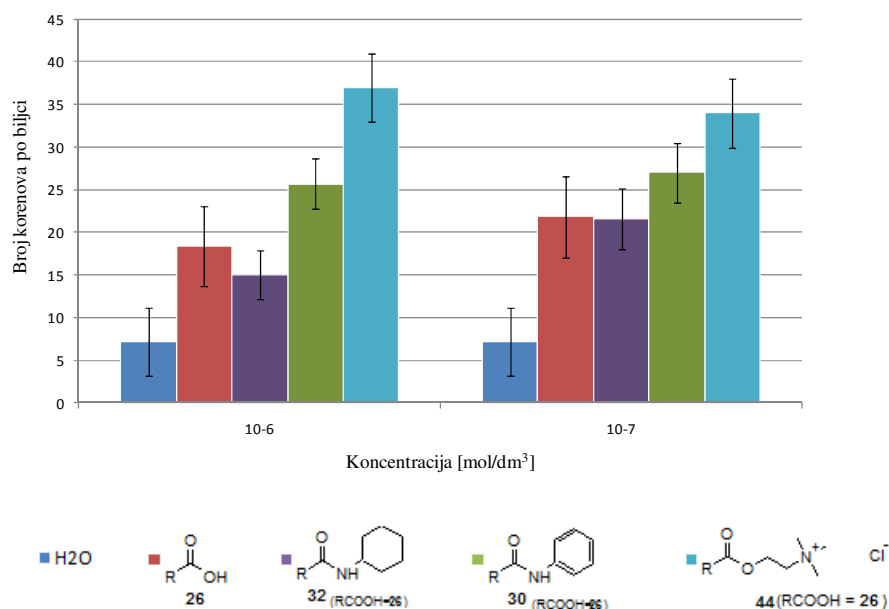


*Slika 3.21.* Uticaj različitih koncentracija naftenskih kiselina *Velebit* (**25**) i odgovarajućih derivata naftenskih kiselina (**27**, **29**, **36** i **41**) na ožiljavanje reznica suncokreta.

Na osnovu rezultata prikazanih na prethodnoj slici može se uočiti da rastvori naftenskih kiselina *Velebit* (**25**) stimulišu formiranje adventivnih korenova. Broj korenova po biljci je dva puta veći kod biljaka koje su bile potopljene u rastvor naftenskih kiselina u odnosu na one koje su bile potopljene u vodu. Poređenjem sa rezultatima dobijenim tretiranjem reznica suncokreta sa sintetizovanim benzil-estrima naftenskih kiselina *Velebit* (**41**), kao i sekundarnim (**29** i **27**) ili tercijarnim amidima (**36**) uočava se nešto veći broj korenova po biljci pri nižoj koncentraciji. Od značaja je napomenuti, da je najveći broj

adventivnih korenova po biljci zabeležen kod amida morfolina naftenskih kiselina *Velebit* (**36**), pri obe ispitivane koncentracije.

Komercijalne naftenske kiseline *Aldrich* (**26**) takođe su se pokazale kao stimulatori formiranja adventivnih korenova suncokreta, odnosno broj korenova po biljci je dva puta veći kod biljaka koje su bile potopljene u rastvor naftenskih kiselina u odnosu na one koje su bile potopljene u vodu (Slika 3.22.).



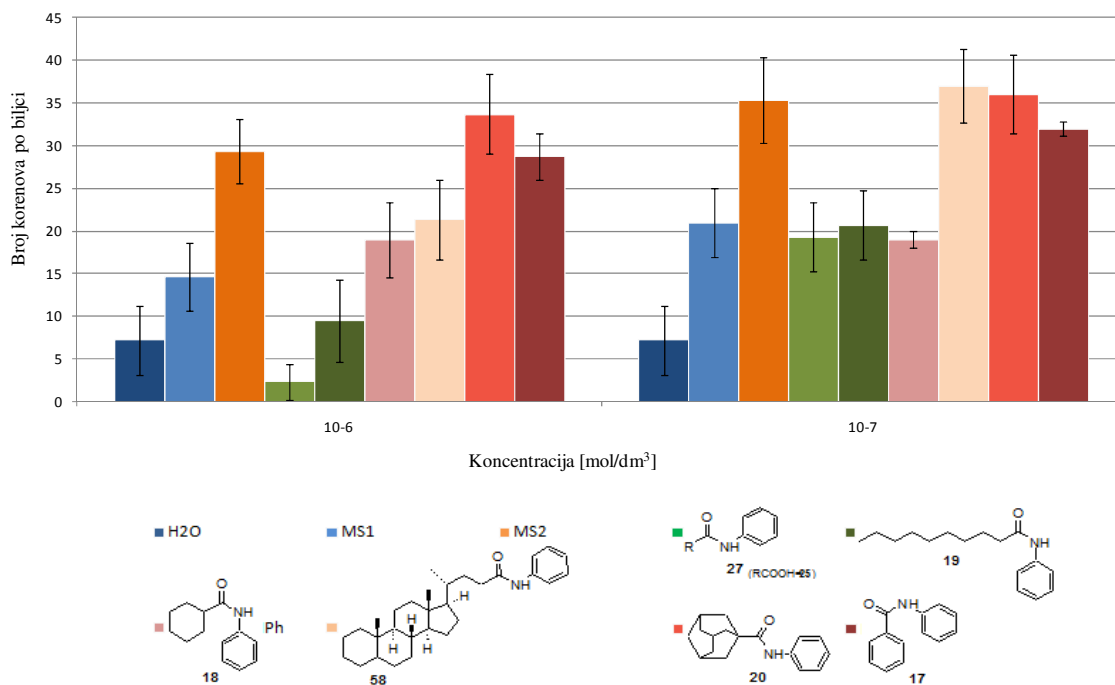
Slika 3.22. Uticaj različitih koncentracija naftenskih kiselina *Aldrich* (**26**) i odgovarajućih derivata naftenskih kiselina (**30**, **32** i **44**) na ožiljavanje reznica suncokreta.

Efekat na ožiljavanje reznica suncokreta ispitan je i na primeru odabranih derivata naftenskih kiselina *Aldrich*. Za mlade biljke suncokreta, potopljene u rastvor *N*-fenil- (**30**) i *N*-cikloheksilamida (**32**) naftenskih kiselina *Aldrich*, uočen je nešto veći broj korenova po biljci, posebno pri nižoj koncentraciji (10<sup>-7</sup> M). Važno je istaći da je najveći broj adventivnih korenova zabeležen u slučaju holin-estara naftenskih kiselina *Aldrich* (**44**).

Prirodne naftenske kiseline *Velebit* (**25**) čine kompleksnu smešu strukturno različitih karboksilnih kiselina<sup>239</sup>, u skladu sa navedenim ispitan je efekat na ožiljavanje reznica suncokreta pet strukturno različitih individualnih karboksilnih kiselina. Istraživanja su izvedena na anilidima aromatične (**17**), aciklične (**19**), monociklične (**18**), triciklične (**20**) i tetraciklične (**58**) individualne naftenske kiseline. U



okviru ovog dela rada izvršeno je i poređenje efekta ožiljavanja reznica suncokreta sa model smešom MS1 (smeša slobodnih, individualnih karboksilnih kiselina) i MS2 (smeša anilida individualnih karboksilnih kiselina), (Slika 3.23.).



Slika 3.23. Efikasnost ožiljavanja reznica suncokreta anilida prirodnih *Velebit* (**27**), individualnih (**17**, **18**, **19**, **20** i **58**), model smeše individualnih (MS1) i derivatizovanih naftenskih kiselina (MS2).

Sintetizovani anilidi individualnih naftenskih kiselina pokazali su se kao stimulatori formiranja adventivnih korenova suncokreta, pri čemu je najviši stimulatorni efekat zabeležen nakon tretiranja reznica suncokreta anilidima benzoeve (**17**), adamantanske (**20**) i holanske kiseline (**58**). Broj korenova po biljci je i do sedam puta veći kod biljaka koje su bile potopljene u rastvor jedinjenja **17**, **20** i **58** u odnosu na biljke koje su bile potopljene u vodu.

Poređenjem efikasnosti ožiljavanja reznica suncokreta model smeše MS1 i MS2 očigledno je da se hemijskom transformacijom karboksilne funkcionalne grupe u amidnu dolazi do povećanja stimulatornog efekta naftenskih kiselina na ožiljavanje biljaka, kao i to da istom posebno doprinose policiklične karboksilne kiseline.

### 3.5.3. Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti

Među osnovnim ciljevima organskih sintetičara jeste iznalaženje novih, efikasnijih antitumorskih agenasa koji bi u niskim koncentracijama snažno inhibirali rast neoplastičnih ćelija. Efikasnost inhibicije proliferacije tumorskih ćelija određenih jedinjenja kvantitativno se izražava u procentima ili kao  $IC_{50}$  vrednost, odnosno kao koncentracija ispitivanog jedinjenja pri kojoj se broj tretiranih ćelija smanjuje za 50 % u odnosu na kontrolu. Prema opšte prihvaćenim kriterijumima, neko jedinjenje pokazuje zadovoljavajuću antiproliferativnu aktivnost ukoliko je njegova  $IC_{50}$  vrednost niža od 20  $\mu$ M. U slučaju  $IC_{50}$  vrednosti u intervalu 20-100  $\mu$ M jedinjenje pokazuje umerenu, odnosno slabu aktivnost, dok se jedinjenja čija vrednost  $IC_{50}$  prelazi 100  $\mu$ M smatraju neaktivnim.



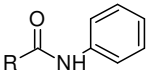
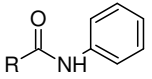
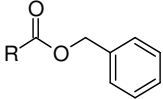
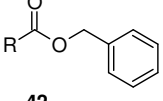
U ovom radu ispitan je uticaj smeše prirodnih natenskih kiselina *Velebit* (**25**) i komercijalnih naftenskih kiselina *Aldrich* (**26**), kao i njihovih odabranih sintetizovanih derivata (**27**, **30**, **41**, **42**), na proliferaciju pet humanih malignih ćelija, odnosno na karcinom dojke MCF-7 (estrogen receptor pozitivan, ER+), karcinom dojke MDA-MB-231 (estrogen receptor negativan, ER-), karcinom kolona HT-29, fibroblasti pluća MRC-5 i karcinoma pluća A549 (*Tabela 3.9.*).

*In vitro* citotoksičnost je određena kolorimetrijskim MTT testom<sup>240</sup>. Princip ove metode se zasniva na redukciji tetrazolijumove soli [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromide, (MTT)] u plavo obojeni proizvod formazan, u prisustvu mitohondrijalnog enzima sukcinat-dehidrogenaze. Količina nagrađenog formazana direktno je proporcionalna broju živih ćelija (vijabilne).

Ćelije su sakupljene u logaritamskoj fazi rasta, istaložene centrifugiranjem i izbrojane u 0.1 % tripan plavom. Vijabilne ćelije su posejane u kvadrplikatu u mikrotitar ploče sa 96 otvora, tako da je u 90  $\mu$ L medijuma 5 x 10<sup>3</sup> ćelija. Ploče sa zasejanim ćelijama ostavljene su u termostatu na 37 °C, sa 5 % CO<sub>2</sub> naredna 24 h. Po isteku inkubacije, u sve otvore osim kontrolnih (ćelije u medijumu), dodato je po 10  $\mu$ L ispitivane supstance odgovarajuće koncentracije (0.01, 0.1, 1, 10, 100  $\mu$ M) i inkubacija je nastavljena pod istim uslovima u toku 48 h. Rastvor MTT, pripremljen neposredno pre dodavanja, dodat je u sve otvore na ploči u zapremini od 10  $\mu$ L/otvoru i inkubacija je nastavljena naredna 3 h. Apsorbancija je očitavana odmah po isteku inkubacije na čitaču za mikrotitar ploče (*Multiscan, MCC/340*) na talasnoj dužini od 492 nm i referentnoj od 690 nm. Otvori na ploči koji su sadržavali samo medijum i MTT, ali ne i ćelije, služili su kao slepa proba (*blank*).

Citotoksičnost je izražena procentom prema formuli:  $CI = (1 - A_s/A_k) \cdot 100$ , pri čemu je  $A_k$  apsorbancija kontrolnih uzoraka, a  $A_s$  apsorbancija uzoraka sa ispitivanom supstancijom.

Tabela 3.9. *In vitro* antiproliferativna aktivnost naftenskih kiselina *Velebit* (**25**) i *Aldrich* (**26**), anilida naftenskih kiselina (**27**, **30**) i benzil-estara (**41**, **42**) izražena kao vrednost  $IC_{50}$ .

Jedinjenje	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]				
	MCF-7	MDA-MB-231	HT-29	A549	MRC-5
 <b>25</b>	>100	>100	11.77	>100	>100
 <b>26</b>	>100	2.14	2.39	11.55	>100
 <b>27</b> (RCOOH=25)	>100	>100	>100	>100	>100
 <b>30</b> (RCOOH=26)	>100	60.28	>100	>100	>100
 <b>41</b> (RCOOH=25)	>100	>100	>100	>100	>100
 <b>42</b> (RCOOH=26)	>100	>100	22.39	>100	>100

■ vrednosti niže od kontrole

Analizom rezultata prikazanih u prethodnoj Tabeli 3.9. uočena je jaka inhibicija rasta ćelijskih linija MDA-MB-231 ( $IC_{50}$  2.14  $\mu$ M), HT-29 ( $IC_{50}$  2.39  $\mu$ M) i A549 ( $IC_{50}$  11.55  $\mu$ M) komercijalnih naftenskih kiselina *Aldrich* (**26**). Iz Tabele 3.9. se vidi da su naftenske kiseline *Velebit* (**25**) ispoljile jaku antiproliferativnu aktivnost prema samo jednoj ćelijskoj liniji, HT-29 ( $IC_{50}$  11.77  $\mu$ M). Ispitivanjem efikasnosti inhibicije proliferacije tumorskih ćelija određenih derivata naftenskih kiselina slabu citotoksičnu aktivnost pokazalo je jedinjenje **30** prema ćelijskoj liniji MDA-MB-231 ( $IC_{50}$  60.28  $\mu$ M) i jedinjenje **42** prema ćelijskoj liniji HT-29 ( $IC_{50}$  22.39  $\mu$ M). Jedinjenje **27** i **41** nisu pokazali antiproliferativnu aktivnost prema testiranim tumorskim ćelijskim linijama.

Na osnovu dobijenih rezultata jasno je da su komercijalne naftenske kiseline *Aldrich* (**26**) potentnije od smeše prirodnih naftenskih kiselina *Velebit* (**25**), pokazujući antiproliferativnu aktivnost prema tri od ukupno četiri ćelijske linije. Derivati naftenskih kiselina *Velebit* (**27**, **41**) nisu pokazali antiproliferativnu aktivnost prema testiranim tumorskim ćelijskim linijama za razliku od anilida (**30**) i benzil-estara (**42**) naftenskih kiselina *Aldrich*.


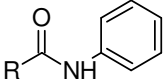
#### 3.5.4. Uticaj slobodnih i derivatizovanih naftenskih kiselina *Velebit* na brojnost ispitivanih sojeva *Pseudomonas* sp

Patogeni mikroorganizmi koji napadaju biljke predstavljaju veliki i hroničan problem za proizvodnju hrane i stabilnost ekosistema. Ekološki prihvatljiv metod kontrole bolesti bilja u poljoprivredi obuhvata primenu rizosfernih mikroorganizama<sup>241</sup> koji produkuju sekundarne antimikrobne metabolite, a među kojima su identifikovani različiti antibiotici<sup>242-244</sup>. Pomenute rizobakterije koje pospešuju biljni rast (PGPR- *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) žive slobodno u zemljištu i pozitivno utiču na rast biljaka kolonizirajući njihov koren<sup>245</sup>. U PGPR pored *Azotobacter*- a i *Azospirillum*-a svrstavaju se i *Acetobacter*, *Azoarcus*, te nekoliko vrsta *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*).

Usled izlivanje nafte tokom petrohemijskih procesa njene prerade naftenske kiseline, kao prirodni konstituenti nafte, mogu se naći u prvim slojevima zemlje i na taj način u direktnom kontaktu sa korenima biljaka. Efekat naftenskih kiselina i njihovih derivata na rizobakterije, a time i na kolonizaciju korena biljaka nije poznat te je stoga jedan od ciljeva ovog rada bio ispitivanje uticaja slobodnih i derivatizovanih naftenskih kiselina *Velebit* na brojnost ispitivanih sojeva *Pseudomonas* sp.

Ispitivanje efekta naftenskih kiselina rađeno je na četiri soja *Pseudomonas* sp., odnosno njihov rast, u tečnoj kulturi. Sojevi *Pseudomonas* sp. (sa oznakama: PS4, P Violeta, PS2 i PS Dragana) deponovani su u kolekciji kultura Odeljenja za mikrobiologiju Poljoprivrednog fakulteta iz Novog Sada. Sojevi su umnožavani u tečnoj King B podlozi (tripton: 10 g; pepton: 10 g; MgSO<sub>4</sub>: 1.5 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1.5 g; glicerol: 10 ml; dest.voda: 1000 mL; pH 7). Inkubacija bakterijskih sojeva je izvršena na rotacionom šejkeru (*BIOSAN Incubator ES-20/60*), RPM 120, na 28 °C. Nakon 24 h dobijene su starter kulture, brojnosti 10<sup>8</sup> CFU/mL. Za određivanje uticaja naftnih kiselina i njihovih derivata, korišćena je 24 h kultura ispitivanih sojeva. Dodavano je 450 µL naftnih kiselina ili njihovih derivata za svaki bakterijski soj. Kontrola je bila čista bakterijska kultura bez dodataka. Nakon dodatka ispitivane supstance nastavljena je inkubacija sojeva. Rast bakterijskih sojeva je praćen očitavanjem optičke gustine na spektrofotometru (*UNICAM sp600*) na 600 nm, nakon 24 h odnosno 48 h a rezultati su prikazani tabelarno (*Tabela 3.10.*).

Tabela 3.10. Uticaj slobodnih (**25**) i derivatizovanih (**27**) naftenskih kiselina *Velebit* na brojnost ispitivanih sojeva *Pseudomonas* sp. ( $\times 10^8$  CFU/mL).

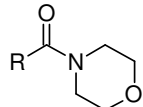
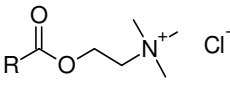
Jedinjenje	Brojnost ispitivanih sojeva nakon 24 h i 48 h								
	PS4		P Violeta		PS2		PS Dragana		
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	
Kontrola	1,80	2,24	2,58	1,86	2,53	2,56	2,22	2,58	
	$10^{-5}$	1,504	1,38	2,05	2,96	1,81	3,04	1,98	2,40
<b>25</b>	$10^{-6}$	0,28	1,47	2,16	2,72	1,87	2,80	1,86	2,96
	$10^{-5}$	0,69	1,74	2,70	3,20	1,28	3,20	2,016	2,56
<b>27</b> (RCOOH=25)	$10^{-6}$	1,08	1,92	2,56	2,80	1,68	3,20	1,57	2,26

■ vrednosti više od kontrole

Bakterijski sojevi P Violeta i PS2 su nakon 48 h imali bolji rast u odnosu na kontrolu, ukazujući na stimulatívni efekat naftenskih kiselina i njihovih sintetizovanih anilida, pri obe ispitivane koncentracije. Naftenske kiseline *Velebit* uticale su i na brojnost soja PS Dragana nakon dužeg perioda inkubacije, pri nižoj ispitivanoj koncentraciji ( $10^{-6}$  M), dok prema soju PS4 nisu pokazale stimulatívni efekat.

Na osnovu rezultata prikazanih u prethodnoj tabeli (*Tabela 3.10.*), odnosno brojnosti ispitivanih sojeva *Pseudomonas* sp. (P Violeta i PS2) takođe zaključujemo da je uticaj anilida naftenskih kiselina na brojnost mikroorganizama veći u odnosu na smešu prirodnih naftenskih kiselina *Velebit*. To je pomerilo naša istraživanja prema ispitivanju stimulatívnoeg efekta drugih derivata naftenskih kiselina na brojnost sojeva *Pseudomonas* sp. (*Tabela 3.11.*)

Tabela 3.11. Uticaj derivata naftenskih kiselina na brojnost ispitivanih sojeva *Pseudomonas* sp. ( $\times 10^8$  CFU/mL).

Jedinjenje		Brojnost ispitivanih sojeva nakon 24 h i 48 h							
		PS4		P Violeta		PS2		PS Dragana	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Kontrola		1,79	1,79	1,28	2,08	0,79	3,2	1,79	1,82
 <b>36</b> (RCOOH= <b>25</b> )	$10^{-3}$	1,04	1,15	0,66	1,08	0,94	3,04	1,44	2,16
	$10^{-5}$	0,10	1,63	1,10	1,50	1,0	2,88	1,33	2,08
	$10^{-7}$	0,42	1,54	1,03	1,6	0,86	2,56	1,10	1,89
 <b>44</b> (RCOOH= <b>26</b> )	$10^{-3}$	0,21	2,72	0,98	1,98	0,96	2,88	1,17	1,42
	$10^{-5}$	1,02	1,2	1,15	2,0	1,06	2,64	1,09	1,82
	$10^{-7}$	1,02	1,57	0,58	0,92	1,02	2,56	1,50	1,76

■ vrednosti više od kontrole

Na osnovu prethodnih rezultata jasno je da sintetizovani derivati **36** i **44** utiču na razmnožavanje soja *Pseudomonas* sp. PS2 koji produkuje glavni inhibitor rasta fitopatogenih gljiva (fenazin) već nakon 24 h, u svim ispitivanim koncentracijama. Tercijarni amidi naftenskih kiselina *Velebit* pokazali su se kao stimulatori razmnožavanja bakterijskog soja PS Dragana, nakon 48 h u odnosu na kontrolu. Soj PS4 je nakon 48 h imao bolji rast pri različitim koncentracijama derivata naftenskih kiselina, a najviši je pokazao za amine holin estara naftenskih kiselina *Aldrich* (**44**) u najvišoj i najnižoj ispitivanoj koncentraciji.

Poređenjem rezultata prikazanih u *Tabeli 3.10.* i *Tabeli 3.11.* može se uočiti da ispitivani derivati naftenskih kiselina najviše utiču na brojnost bakterijskog soja PS2.

## 4. EKSPERIMENTALNI DEO

### Opšte metode

NMR spektri su snimljeni na instrumentu *Bruker AC 250 E*, a hemijska pomeranja ( $\delta$ -skala) su izražena u ppm vrednostima u odnosu na tetrametilsilan kao interni standard. Protonski NMR spektri su asignirani metodom *homo*-dekuplovanja.  $^{13}\text{C}$  Spektri su asignirani metodom selektivnog dekuplovanja. IR spektri su snimljeni na FT spektrofotometru *Nexus 670*, a položaj traka je dat u  $\text{cm}^{-1}$ .

GC-MS spektri snimljeni su korišćenjem *Thermo Focus GC* kuplovanog sa *Thermo DSQ II* (EI, 70 eV). Korišćena je HP5-MS kolona (30 m x 0.250 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ). Gas nosač je bio helijum (1 mL/min, *constant flow*). Temperatura injektora je postavljena na 280 °C. Temperaturni program je sledeći: startna temperatura je 50 °C i održava se 1 minut, posle čega se povećava brzinom od 25 °C/min. do 300 °C, gde se održava 4 minuta.

Mikrotalasno-stimulisana degradacija aktivnih supstanci lekova praćena je na HPLC-UV aparatu (*Shimadzu LC 20 AD*). Razdvajanje komponenti postignuto je na C 18 koloni, dimenzija 150 mm x 4.6 mm x 5  $\mu\text{m}$ , primenom mobilne faze A ( $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$  90:10 (v/v) + 0.1 % TFA) i B (MeCN + 0.1 % TFA) uz protok od 1 mL/min. Metod: linerano povećanje faze B 30 - 100 % tokom 5 minuta nakon čega se tu se održava 1 minut.

HPLC-MS analiza (*Shimadzu LC 20 AD*, *Shimadzu LCMS 2020*) izvedena je na C 18 koloni, dimenzija 150 mm x 4.6 mm x 5  $\mu\text{m}$ , primenom mobilne faze A ( $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$  90:10 (v/v) + 0.1 % HCOOH) i B (MeCN + 0.1 % HCOOH) uz protok od 0.6 mL/min. Metod: linerano povećanje faze B 30 - 100 % tokom 9 minuta nakon čega se tu održava 6 minuta.

Aparat *HPLC Agilent Technologies* serije 1100 sa DAD detektorom korišćen je za optimizaciju reakcionih uslova derivatizacije naftenskih kiselina. Razdvajanje komponenti postignuto je na *Eclipse XDB-C18* koloni (*Agilent Technologies*) dimenzija 150 mm x 4.6 mm x 5  $\mu\text{m}$ , na temperaturi od 25°C, uz eluiranje u gradijentnom modu, uz protok od 1 mL/min, pri čemu je mobilna faza A– $\text{H}_2\text{O}$  a faza B–MeCN.

Mono-modni mikrotalasni reaktori korišćeni u ovom radu su *Discover BenchMate* (CEM, Matthews, Severna Karolina), *Emrys Initiator 8 EXP 2.0* (*Biotage*, Uppsala, Švedska) i *Monowave 300* (*Anton Paar GmbH*, Graz, Austrija) za reakcione smeše čiji operativni pritisak prelazi 20 bar. Od multi-modnih

reaktora korišćen je *Synthos 3000* (Anton Paar GmbH, Graz, Austrija) sa ugrađenim rotorom na koji staju četiri SiC ploče. Mikrotalasno-stimulisane sinteze izvedene su u C10 SiC (ROCAR®S) i G10 Pyrex vialu zapremine 10 mL, odnosno za *Biotage Emrys Initiator 8 EXP 2.0* korišćeni su reakcioni sudovi zapremine 0.5 - 2 mL i 2 - 5 mL. Reakcione sudove za multi-modni reaktor predstavljaju HPLC/GC viali smešteni u SiC ploču. Temperatura reakcije je praćena spoljašnjim IR senzorom (pozicija senzora objašnjena na *Slici 2.9.*) i FO senzorom za merenje temperature unutar reakcionog suda. Temperatura unutar HPLC/GC viala je praćena multikanalnim OGT-F optičkim senzorom (*TempSens signal conditioner, Opsens*, Quebec, Kanada).

Tankoslojnom hromatografijom (TLC) na aluminijumskim folijama *Silica gel 60 F<sub>254</sub>* (Merck) praćen je tok reakcija. Hromatogrami su izazivani sa 50 %-nom sumpornom kiselinom uz naknadno zagrevanje na 120 °C.

*Silica gel 60* (0.040 - 0.063 mm, 230 - 400 mesh ASTM; Merck) korišćen je za *flash* hromatografiju. Protok eluenta kroz kolonu je 50 mL/min. Sušenje ekstrakata vršeno je pomoću anhidrovanog natrijum-sulfata. Organski rastvarači su uparavani na rotacionom vakuum uparivaču pri temperaturi vodenog kupatila do 50 °C.



#### 4.1. Poređenje stabilnosti SiC i *Pyrex* reakcionih sudova u uslovima bazne hidrolize nitrila

Prethodno odmerenom benzonitrilu (5.23 mmol, 545 mg, 545  $\mu$ L), odnosno 2-metoksibenzonitrilu (1.85 mmol, 246 mg, 227  $\mu$ L) doda se 3 mL 20 % vodenog rastvora KOH (11 mmol). Reakciona smeša se zagreva u mono-modnom mikrotalasnom reaktoru *Anton Paar Monowave 300* pri temperaturi od 150 °C, odnosno 190 °C, u toku jednog časa. Tokom zagrevanja temperatura je praćena IR senzorom. Nakon hlađenja do sobne temperature reakciona smeša se profiltrira (u slučaju *Pyrex* viala) i zakiseli do pH7 uz izdvajanje belog taloga benzoeve kiseline (**1**), odnosno 2-metoksibenzoeve kiseline (**2**). Prekristalizacijom iz vode dobijena je čista benzoeva kiselina u prinosu od 21 % (*Pyrex*) i 85 % (SiC), odnosno 2-metoksibenzoeva kiselina u prinosu od 57 % (*Pyrex*) i 93 % (SiC).

Proizvodi **1** i **2** potvrđeni su GC-MS analizom.

Jedinjenje **1**:

GC-MS: m/z 121 [M-H]<sup>+</sup>

Jedinjenje **2**:

GC-MS: m/z 151 [M-H]<sup>+</sup>

#### 4.2. Ispitivanje fizičko-hemijske stabilnosti *Pyrex* i SiC viala

Postupak A

Preliminarna istraživanja stepena korozije izvedena su zagrevanjem 3 mL 20 - 60 % vodenog rastvora KOH u *Biotage Emrys Optimizer* (do 190 °C, < 20 bar) i *Anton Paar Monowave 300* (210 °C, < 30 bar) mikrotalasnom reaktoru. *Pyrex* reakcioni sud je prethodno opran, sušen do konstantne mase u sušnici i izmeren na analitičkoj vagi, postupak je ponovljen i nakon zagrevanja. Eksperimenti su praćeni IR senzorom. Stepem korozije borsilikatnog stakla, odnosno gubitak u masi *Pyrex* mikrotalasnih reakcionih sudova prikazan je tabelarno (*Tabela 4.1.*).

Tabela 4.1. Stepen korozije Pyrex viala. Levo: *Biotage Initiator*, prosečna masa viala 16.5 g; desno: *Anton Paar Monowave 300*, prosečna masa viala 25.4 g

KOH	Temp. [°C]	Vreme [min]	Pritisak [bar]	$\Delta m$ [g]	KOH	Temp. [°C]	Vreme [min]	Pritisak [bar]	$\Delta m$ [g]
20%	100	10	-	0.001	150	10	3	0.020	
		30	-	0.001		30	4	0.043	
		60	-	0.002		60	4	0.060	
		120	-	<b>0.007</b>		120	4	<b>0.121</b>	
	150	10	7	0.018	170	10	7	0.060	
		30	7	0.034		30	7	0.098	
		60	7	0.071		60	7	0.200	
		120	7	<b>0.099</b>		120	7	<b>0.332</b>	
	170	120	8	<b>0.252</b>	190	10	10	0.118	
		190	120	<b>0.660</b>		30	11	0.230	
	40%	100	10	-		0.001	60	11	0.416
			30	-		0.002	120	13	<b>0.800</b>
60			-	0.005	210	10	16	0.290	
120			-	<b>0.009</b>		30	18	0.599	
150	10	4	0.014	60	19	1.005			
	30	4	0.035	120	16	<b>1.252</b>			
	60	5	0.058						
	120	5	<b>0.119</b>						
60%	100	10	-	0.001					
		30	-	0.002					
		60	-	0.003					
		120	-	<b>0.011</b>					
	150	10	3	0.016					
		30	3	0.045					
		60	4	0.063					
		120	4	<b>0.106</b>					

#### Postupak B

Tollens-ovom reagensu (3 - 4 mL) u *Pyrex* reakcionom sudu dodato je nekoliko kapi rastvora dekstroze pri čemu je formiran film srebra. Nakon uklanjanja ostatka rastvora i sušenja, reakcioni sud je zagrevan u kućnoj mikrotalasnoj pećnici.

#### Postupak C

Film paladijuma dobijen je zagrevanjem paladijum(II)-acetata (120 mg) u DMF (3 - 4 mL) na temperaturi od 150 °C u toku 1 h. Po završetku zagrevanja i uklanjanja rastvora kapalicom reakcioni sud je sušen na 50 °C i zatim zagrevan u mikrotalasnoj peći.

### 4.3. Hemijska degradacija indometacina do 5-metoksi-2-metil-3-indolsirćetne kiseline (4) i 4-hlorobenzojeve kiseline (5)

#### Postupak A

Prethodno odmerenom standardnom rastvoru indometacina (0.1 mL, 5 mg/mL, u MeCN) doda se 0.9 mL 0.1 M HCl. Reakciona smeša se meša na sobnoj temperaturi u toku 24 h i 72 h.

#### Postupak B

Standardnom rastvoru indometacina (0.5 mL, 5 mg/mL, u MeCN) doda se 4.5 mL vode, 0.1 M HCl, 0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1 M AcOH, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> ili 0.1 M NaOH. Reakciona smeša je zagrevana uz refluks 10, 30, 60 ili 120 min.

#### Postupak C

Standardnom rastvoru indometacina (0.1 mL, 5 mg/mL) doda se 0.9 mL kiseline (0.05 M HCl, 0.1 M HCl) ili vode. Reakciona smeša je zagrevana u mono-modnom mikrotalasnom reaktoru u temperaturnom opsegu od 100 - 160 °C u periodu od 0.5 - 60 minuta.

#### Postupak D

Paralelna degradacija indometacina izvedena je u HPLC/GC vialima, smeštenim u SiC ploču, mešanjem standardnog rastvora indometacina (0.1 mL, 5 mg/mL) sa 0.9 mL kiseline (0.01 - 0.1 M HCl, 1 - 15 M AcOH), baze (0.001 - 0.01 M NaOH), 0.001 - 0.01 M NaHCO<sub>3</sub> ili vode. Reakcione smeše su zagrevane na temperaturi od 150 °C u toku pet minuta, u multi-modnom reaktoru. Reakciona smeša je rastvorena direktno u HPLC vialu (0.5 mL MeCN) za dalju analizu.

#### Postupak E

Ispitivanje stabilnosti indometacina u različitim rastvaračima (voda, etilen-glikol, toluen, dimetilformamid, etanol, tetrahidrofuran, hloroform, *N*-metilpirolidon, butanol, etil-acetat, dimetilsulfoksid, dimetilacetamid, aceton, *i*-propilalkohol, heksan, dekan, benzen, metanol, hlorbenzen i acetonitril) izvedeno je u 20 HPLC/GC viala smeštenim u SiC ploču. U svaki vial je dodato po 0.1 mL standardnog rastvora indometacina. Nakon isparavanja rastvarača indometacinu je dodato po 1 mL odgovarajućeg rastvarača. Uzorci su zagrevani na temperaturi od 150 °C i 160 °C u toku 30 minuta, u multi-modnom reaktoru. Po završetku hlađenja, reakciona smeša je rastvorena direktno u HPLC vialu (0.5 mL MeCN) za dalju analizu.

## Postupak F

Čvrst indometacin je tretiran različitim gasovima (argon, azot, kiseonik, vazduh). HPLC/GC viali sa čvrstim indometacinom su isprani sa gasom u toku 30 sekundi, nakon čega je ceo sistem zagrevan na temperaturi od 150 °C i 180 °C u toku 30 minuta, u multi-modnom reaktoru. Po završetku hlađenja, sadržaj suda je rastvoren direktno u reakcionom HPLC vialu (0.5 mL MeCN) za dalju analizu.

## Postupak G

Ispitivanje mikrotalasnih efekata izvedeno je zagrevanjem standardnog rastvora inometacina (0.1 mL, 5 mg/mL) sa 0.9 mL kiseline (0.1 M HCl) u standardnom *Pyrex* i SiC reakcionom sudu. Reakciona smeša je zagrevana u mono-modnom mikrotalasnom reaktoru, *Anton Paar Monowave 300*, pri temperaturi od 150 °C u toku 5 minuta. Temperatura reakcije je praćena paralelno FO i IR senzorom.

Degradacioni proizvodi **4** i **5** potvrđeni su LC-MS analizom.

Jedinjenje **4**:

LC-MS: m/z 218 [M-H]<sup>+</sup>

Jedinjenje **5**:

LC-MS: m/z 155 [M-H]<sup>+</sup>

#### 4.4. Oksidativna degradacija indometacina do 4-hlor-*N*-[4-metoksi-2-(1-metilen-2-oksopropil)fenil]-benzamida (**7**) i 8-(4-hlorbenzoil)-3a-hidroksi-5-metoksi-8a-metil-3,3a,8,8a-tetrahidro-2*H*-furo[2,3-*b*]indol-2-ona (**8**)

## Postupak A

Standardnom rastvoru indometacina (0.5 mL, 5 mg/mL, u MeCN) doda se 4.5 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.02 %). Reakciona smeša je zagrevana uz refluks 10, 30, 60 ili 120 min.

## Postupak B

Standardnom rastvoru indometacina (0.1 mL, 5 mg/mL) doda se 0.9 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.02 %). Reakciona smeša je zagrevana u mono-modnom mikrotalasnom reaktoru na temperaturi od 150 °C u periodu od 0.5 - 10 minuta.

## Postupak C

Paralelna degradacija indometacina izvedena je u HPLC/GC vialima, smeštenim u SiC ploču, mešanjem standardnog rastvora indometacina (0.1 mL, 5 mg/mL) sa 0.9 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.001 - 0.02 %). Reakcione smeše su zagrevane na temperaturi od 150 °C u toku pet minuta u multi-modnom reaktoru. Reakciona smeša je rastvorena direktno u HPLC vialu (0.5 mL MeCN) za dalju analizu.

Degradacioni proizvodi **7** i **8** potvrđeni su LC-MS analizom.

Jedinjenje **7**:

LC-MS: m/z 330 [M+H]<sup>+</sup>

Jedinjenje **8**:

LC-MS: m/z 375 [M+H]<sup>+</sup>

#### 4.5. Hemijska degradacija Pyr3 do 1-(4-aminofenil)-5-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-4-karboksilne kiseline (**11**) i 2,3,3-trihloro-2-propenske kiseline (**12**)

U mikrotalasni reakcioni sud, zapremine 0.5 – 2 mL, odmeri se 0.5 mg Pyr3. Zatim se u sud doda 1 mL rastvora 0.1 M HCl, 0.1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1 M NaOH ili vode. Reakciona smeša se zagreva u mono-modnom mikrotalasnom reaktoru, u temperaturnom opsegu od 100 - 160 °C, u toku 10 minuta.

Degradacioni proizvodi **11** i **12** potvrđeni su LC-MS analizom.

Jedinjenje **11**:

LC-MS: m/z 270 [M-H]<sup>+</sup>

Jedinjenje **12**:

LC-MS: m/z 174 [M-H]<sup>+</sup>

#### 4.6. Hemijska degradacija omeprazola do 5-metoksi-1,3-dihidro-2*H*-benzimidazol-2-on (**14**) i 6-metoksi-2-[[4-metoksi-3,5-dimetil-2-piridinil)metil]sulfanil}-1*H*-benzimidazol(**15**)

Prethodno odmerenom omeprazolu (0.5 mg) u mikrotalasnom reakcionom sudu zapremine 0.5 - 2 mL doda se 1 mL odgovarajućeg ratvora 0.1 M HCl ili 0.1 M NaOH. Reakciona smeša se zagreva pri temperaturi od 100 °C, u slučaju 0.1 M HCl, odnosno u temperaturnom opsegu od 100 - 160 °C u slučaju 0.1 M NaOH, u toku 10 minuta.

Degradacioni proizvodi **14** i **15** potvrđeni su LC-MS analizom.

Jedinjenje **14**:

LC-MS: m/z 166 [M+H]<sup>+</sup>

Jedinjenje **15**:

LC-MS: m/z 330 [M+H]<sup>+</sup>

#### 4.7. Hemijska degradacija indometacina do amonijumove soli indometacina (**16**)

HPLC/GC vial sa čvrstim indometacinom je isprani sa amonijakom u toku 30 sekundi. Nakon što se vial smesti u SiC ploču, ceo sistem se zagreva na temperaturi od 150 °C i 180 °C u toku 30 minuta. Po završetku hlađenja, indometacin je rastvoren direktno u vialu sa 0.5 mL MeCN za dalju analizu.

Degradacioni proizvod **16** potvrđen je LC-MS analizom.

Jedinjenje **16**:

LC-MS: m/z 374 [M-H]<sup>+</sup>

#### 4.8. *N*-Fenilbenzamid (**17**)

Postupak A

Prethodno odmerenoj benzojevoj kiselini (1 ekv., 10 mmol, 1.22 g) doda se anilin (1 ekv., 10 mmol, 0.912 mL). Reakciona smeša se zagreva 24 h, na temperaturi ključanja reakcione smeše. Tok reakcije

praćen je TLC-om (petroletar : etil-acetat = 7 : 3). Nakon hlađenja do sobne temperature sadržaj balona je rastvoren u hloroformu (30 mL) a dobijeni rastvor je ispran sa 1 M HCl (2 x 10 mL), 5 % NaHCO<sub>3</sub> (2 x 10 mL) i H<sub>2</sub>O (2 x 5 mL), do pH 7. Prečišćavanjem *flash* hromatografijom (petroletar : etil-acetat = 7 : 3) dobijen je čist *N*-fenilbenzamid u obliku belih kristala (**17**, 1.21 g, 61 %).

#### Postupak B

Benzojevoj kiselini (1 ekv., 10 mmol, 1.22 g) doda se anilin (1 ekv., 10 mmol, 0.912 mL) i reakciona smeša se zatim zagreva u mono-modnom mikrotalasnom reaktoru na temperaturi od 270 °C u toku 15 minuta. Tok reakcije je praćen TLC-om (petroletar : etil-acetat = 7 : 3) i tečnom hromatografijom visoke rezolucije (92 %, HPLC prinos). Nakon zagrevanja reakciona smeša se obradi kako je opisano u Postupku A, pri čemu se dobija čisto jedinjenje **17** u vidu sitnih belih kristala (1.45 g, 74 %).

#### Postupak C

Benzil-benzoatu (1 ekv., 7 mmol, 1.33 mL) doda se anilin (1.5 ekv., 10.5 mmol, 0.95 mL). Reakciona smeša se zagreva pod dejstvom mikrotalasnog zračenja na temperaturi od 300 °C u toku 10 minuta. Tok reakcije je praćen tankoslojnom hromatografijom (petroletar : etil-acetat = 7 : 3).

Sadržaj reakcionog suda je rastvoren u metilen-hloridu (30 mL). Organski rastvor je ispiran sa 1 M HCl (2 x 20 mL), zatim sa 5 % NaHCO<sub>3</sub> (2 x 20 mL) i konačno sa H<sub>2</sub>O (2 x 20 mL), do pH 7. *Flash* hromatografijom na koloni silikagela (petroletar : etil-acetat = 7 : 3) dobijen je čist *N*-fenilbenzamid (**17**, 0.99 g, 72 %)

IR (KBr): 3345; 3053; 1653; 1600; 1437; 1322; 751.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 7.10-7.98 (m, 10H, Ar-H); 10.28 (s, 1H, NH).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 120.64, 123.91, 127.78, 128.54, 128.76, 131.71, 135.09 i 139.24 (Ar-C); 165.86 (C=O).

### 4.9. *N*-Fenilcikloheksankarboksamid (**18**) i *N*-fenildekanamid (**19**)

Individualnoj kiselini (1 ekv., 10 mmol) doda se anilin (1 ekv., 10 mmol) uz mešanje. Reakciona smeša se zatim zagreva u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora na temperaturi od 270 °C u toku 15 minuta. Reakciona smeša je zatim rastvorena u metilen-hloridu (30 mL). Metilen-hloridni rastvor je zatim ispran 1 M HCl (2 x 10 mL), 5 % NaHCO<sub>3</sub> (2 x 10 mL) i H<sub>2</sub>O (2 x 5 mL). Proizvod se prečisti

*flash* hromatografijom (petroletar : etil-acetat = 7 : 3) pri čemu se dobija čisto jedinjenje **18** u obliku belih kristala (2.05 g; 98 %), odnosno jedinjenje **19** u obliku belih kristala (0.96 g, 78 %).

**Jedinjenje 18:**

IR (KBr): 3244; 2932; 1659; 1597; 1442; 757.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.11-2.01 (m, 10H, 5 x CH<sub>2</sub>); 2.25 (tt, 1H, H-1); 7.03-7.60 (m, 5H, Ar-H); 7.67 (br s, 1H, NH).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 25.58 i 29.59 (CH<sub>2</sub>); 46.39 (CH-1); 119.84, 123.97, 128.84 i 138.16 (Ar-C); 174.65 (C=O).

**Jedinjenje 19:**

IR (KBr): 3314; 2919; 1657; 1600; 1443; 692.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0.89 (t, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.10-1.40 (m, 14H, 7 x CH<sub>2</sub>); 2.35 (dd, CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>); 7.04-7.61 (m, 5H, Ar-H); 7.72 (s, 1H, NH).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 14.05 (CH<sub>3</sub>); 22.61, 25.66, 29.23, 29.25, 29.36, 29.41 i 31.81 (CH<sub>2</sub>); 37.73 (CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>); 119.90, 124.07, 128.86 i 138.04 (Ar-C); 171.73 (C=O).

#### 4.10. *N*-Fenil-1-adamantankarboksamid (**20**)

1-Adamantankarboksilnoj kiselini (1 ekv., 1.66 mmol, 0.30 g) se uz mešanje doda anilin (20 ekv., 33.34 mmol, 3.07 mL), nakon čega se reakciona smeša zagreva u mono-modnom mikrotalasnom reaktoru pri temperaturi od 200 °C u toku 4 sata. Nakon hlađenja reakciona smeša je rastvorena u metilen-hloridu (30 mL). Organski sloj je zatim ispran 1 M HCl (2 x 10 mL), 5 % NaHCO<sub>3</sub> (2 x 10 mL) i H<sub>2</sub>O (2 x 5 mL), do pH 7. *Flash* hromatografijom (petroletar : etil-acetat = 7 : 3) dobijeno je čisto jedinjenje **20** u vidu ljubičastih kristala (0.14 g, 33 %).

**Jedinjenje 20:**

IR (KBr): 3299; 2900; 1645; 1597; 1439; 756.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.57-2.25 (m, 15H, C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>); 7.04-7.60 (m, 5H, Ar-H i 1H, NH).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 28.07 i 28.32 (CH); 36.36, 36.63 i 39.17 (CH<sub>2</sub>); 41.41 (C<sub>q</sub>); 119.91, 123.99, 128.83, 128.83 i 138.02 (Ar-C); 175.98 (C=O).



#### 4.11. *N*-Benzilbenzamid (**21**), *N*-benzilcikloheksankarboksamid (**22**), *N*-cikloheksilbenzamid (**23**) i *N*-cikloheksilcikloheksankarboksamid (**24**)

##### Postupak A

Individualnoj kiseline (1 ekv., 10 mmol) doda se benzilamin, odnosno cikloheksilamin (1 ekv., 10 mmol) uz mešanje. Nakon zagrevanja u mono-modnom reaktoru, pri temperaturi od od 270 °C u toku 2 minuta, reakcione smeša je ohlađena i rastvorena u metilen-hloridu (30 mL). Organski ekstrakt je zatim ispran 1 M HCl (2 x 10 mL), 5 % NaHCO<sub>3</sub> (2 x 10 mL) i H<sub>2</sub>O (2 x 5 mL). Prečišćavanjem *flash* hromatografijom (metilen-hlorid : etil-acetat = 8 : 2) dobijena su čista jedinjenja, u obliku belih kristala:

Jedinjenje	Masa [g]	Prinos [%]
<b>21</b>	1.93	92
<b>22</b>	2.00	90
<b>23</b>	1.71	84
<b>24</b>	2.07	96

##### Postupak B (**23**)

Benzil-benzoatu (1 ekv., 7 mmol, 1.33 mL) doda se cikloheksilamin (1.5 ekv., 10.5 mmol, 1.20 mL). Reakciona smeša se zagreva pod dejstvom mikrotalasnog zračenja na temperaturi od 300 °C u toku 10 minuta. Tok reakcije je praćen tankoslojnom hromatografijom (petroletar : etil-acetat = 7 : 3).

Sadržaj reakcionog suda je rastvoren u metilenhloridu (30 mL). Organski rastvor je ispiran sa 1 M HCl (2 x 20 mL), zatim sa 5 % NaHCO<sub>3</sub> (2 x 20 mL) i konačno sa H<sub>2</sub>O (2 x 20 mL), do pH 7. *Flash* hromatografijom na koloni silikagela (petroletar : etil-acetat = 7 : 3) dobijeni je čist proizvod **23** (1.31 g, 92 %).

##### Jedinjenje **21**:

IR (KBr): 3322; 3059; 1641; 1543; 1418; 694.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 4.58 (d, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 7.13 (br s, 1H, NH), 7.27-7.85 (m, 10H, Ar-H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 43.82 (CH<sub>2</sub>Ph); 126.95, 127.28, 127.63, 128.07, 128.34, 128.52, 131.30, 134.24 i 138.25 (Ar-C); 167.42 (C=O).

##### Jedinjenje **22**:

IR (KBr): 3284; 2928; 2852; 1642; 1551; 1453; 1218; 752; 696.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.12-1.89 (m, 10H, 5 x  $\text{CH}_2$ ); 2.13 (tt,  $J = 11.3$  Hz,  $J = 3.4$  Hz, 1H, H-1); 4.35 (d,  $J = 5.8$  Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 6.45 (br s, 1H, NH); 7.11-7.35 (m, 5H, Ar-H).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 25.54 i 29.49 ( $\text{CH}_2$ ); 42.95 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ); 45.17 (CH-1); 127.02, 127.35, 128.35 i 138.58 (Ar-C); 176.03 (C=O).

Jedinjenje **23**:

IR (KBr): 3343; 2928; 2852; 1627; 1537; 1331; 678.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.06-2.10 (m, 10H, 5 x  $\text{CH}_2$ ); 3.96 (m, 1H, H-1); 6.21 (br s, 1H, NH); 7.30-7.81 (m, 5H, Ar-H).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 24.87 i 25.48 ( $\text{CH}_2$ ); 48.62 (CH-1); 126.79, 128.37, 131.09 i 135.03 (Ar-C); 166.57 (C=O).

Jedinjenje **24**:

IR (KBr): 3295; 2928; 1641; 1548; 1440; 758.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.84-1.92 (m, 20H, 10 x  $\text{CH}_2$ ); 1.98 (tt, 1H, H-1); 3.65 (m, 1H, H-1'); 5.65 (d, 1H, NH).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 24.75, 25.40, 25.59, 29.56, 33.01 ( $\text{CH}_2$ ); 45.42 (CH-1); 47.54 (CH-1'); 175.01 (C=O).

#### 4.12. *N*-Fenil-, *N*-benzil- i *N*-cikloheksilamidi naftenskih kiselina **Velebit (27, 28, 29)** i *Aldrich (30, 31, 32)*

Postupak A

Naftenskim kiselinama (1 ekv., 5 mmol) doda se anilin, odnosno benzilamin ili cikloheksilamin (1 ekv., 5 mmol). Reakciona smeša se zagreva na temperaturi od 270 °C u toku petnaest, odnosno dva minuta, respektivno, uz mešanje. Tok reakcije je praćen tankoslojnom hromatografijom (metilen-hlorid : etil-acetat = 9.5 : 0.5). Nakon hlađenja reakciona smeša je rastvorena u metilen-hloridu (40 mL). Organski sloj je zatim ispran 1 M HCl (3 x 10 mL), 5 %  $\text{NaHCO}_3$  (3 x 10 mL) i  $\text{H}_2\text{O}$  (3 x 10 mL), do pH 7. *Flash* hromatografijom (metilen-hlorid : etil-acetat = 9.5 : 0.5) dobijeni su čisti amidi, u vidu žute uljaste tečnosti:

Amini	Proizvod	Masa [g]	Prinos [%]	Proizvod	Masa [g]	Prinos [%]
anilin	<b>27</b>	1.35	76	<b>30</b>	1.17	73
benzilamin	<b>28</b>	1.60	85	<b>31</b>	1.42	87
cikloheksilamin	<b>29</b>	1.40	78	<b>32</b>	1.27	78

U reakciji sinteze amida naftenskih kiselina *Aldrich* (**30**, **31**, **32**) kao eluent prilikom prečišćavanja korišćen je petroletar : etil-acetat = 6 : 4.

#### Postupak B (**32**)

Benzil-estrima naftenskih kiselina *Aldrich* (1 ekv., 4 mmol, 1.34 g) doda se cikloheksilamin (1.5 ekv., 6 mmol, 0.688 mL). Reakciona smeša se zagreva na temperaturi od 300 °C u toku 10 minuta. Tok reakcije je praćen TLC-om (petroletar : dietil-etar = 7 : 3). Reakciona smeša je rastvorena u metilen-hloridu (30 mL) koji je zatim ispiran sa 1 M HCl (3 x 20 mL), 5 % NaHCO<sub>3</sub> (3 x 20 mL) i H<sub>2</sub>O. *Flash* hromatografijom na koloni silikagela (petroletar : dietil-etar = 7 : 3) dobijeni su čisti *N*-cikloheksilamidi naftenskih kiselina *Aldrich* (**32**, 0.250 g, 20 %).

#### Smeša jedinjenja **27**:

IR (KBr): 3296; 2925; 1660; 1601; 1548; 1310; 754; 691.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0.28-2.10 (m, CH+CH<sub>2</sub>+CH<sub>3</sub>); 6.62-7.28 (m, 5H, Ar-H); 7.58-8.20 (br s, 1H, NH).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 14.07-47.50 (C+CH+CH<sub>2</sub>+CH<sub>3</sub>); 119.98, 123.92, 128.69 i 138.12 (Ar-C); 171.73-175.20 (C=O).

#### Smeša jedinjenja **28**:

IR (KBr): 3287; 2925; 1645; 1548; 1455; 729; 697.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0.64-2.25 (m, CH+CH<sub>2</sub>+CH<sub>3</sub>); 4.43 (d, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 6.06 (br s, 1H, NH), 7.21-7.45 (m, 5H, Ar-H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 14.07-47.65 (C+CH+CH<sub>2</sub>+CH<sub>3</sub>); 126.94, 127.34, 128.42, 129.24, 130.74 i 138.47 (Ar-C); 172.43-176.91 (C=O).

#### Smeša jedinjenja **29**:

IR (KBr): 3289; 2927; 1636; 1548; 1450; 733.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0.50-2.40 (m, CH+CH<sub>2</sub>+CH<sub>3</sub>); 3.70 (m, 1H, H-1); 5.40 (s, 1H, NH).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 14.07-39.31 (C+CH+CH<sub>2</sub>+CH<sub>3</sub>); 45.90 (CH-1); 175.12 (C=O).

Smeša jedinjenja **30**:

IR (KBr): 3305; 2957; 1698; 1600; 1541; 1442; 753.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.88-1.67 (m,  $\text{CH}+\text{CH}_2+\text{CH}_3$ ); 7.27-7.55 (m, 6H, Ar-H i 1H, NH).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 8.85-50.66 ( $\text{C}+\text{CH}+\text{CH}_2+\text{CH}_3$ ); 119.91, 124.10, 128.88 i 137.95 (Ar-C); 174.50-182.64 (C=O).

Smeša jedinjenja **31**:

IR (KBr): 3297; 2957; 1699; 1645; 1538; 1455; 752.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.52-2.26 (m,  $\text{CH}+\text{CH}_2+\text{CH}_3$ ); 4.36 (d, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 6.03 (br s, 1H, NH), 7.13-7.46 (m, 5H, Ar-H).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 8.81-49.68 ( $\text{C}+\text{CH}+\text{CH}_2+\text{CH}_3$ ); 126.94, 127.33, 127.93, 128.58, 130.75 i 138.56 (Ar-C); 173.18-175.85 (C=O).

Smeša jedinjenja **32**:

IR (KBr): 3298; 2931; 1702; 1638; 891.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.50-2.20 (m,  $\text{CH}+\text{CH}_2+\text{CH}_3$ ); 3.65 (m, 1H, H-1); 5.40 (s, 1H, NH).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 8.68-47.91 ( $\text{C}+\text{CH}+\text{CH}_2+\text{CH}_3$ ); 49.76 (CH-1); 170.55-176.57 (C=O).

#### 4.13. 4-Benzoilmorfolin (**33**)

Benzojevoj kiselini (1 ekv., 10 mmol, 1.22 g) doda se morfolin (1 ekv., 10 mmol, 0.865 mL) uz mešanje. Reakciona smeša se zatim zagreva u mikrotalasnom reaktoru na temperaturi od 270 °C u toku 10 minuta. Tok reakcije je praćen TLC-om i tečnom hromatografijom visoke rezolucije (95 %, HPLC prinos). Nakon hlađenja do sobne temperature, sadržaj reakcionog suda je rastvoren u metilen-hloridu (10 mL). Organski rasvor je ispran sa 1 M HCl (2 x 10 mL), 5 %  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 10 mL) i  $\text{H}_2\text{O}$  (2 x 5 mL), do pH 7. Nakon hromatografskog prečišćavanja (metilen-hlorid : etil-acetat = 8 : 2) dobija se čisto jedinjenje **33** u vidu žute uljaste tečnosti (1.54 g, 81 %).

IR (KBr): 3565; 1634; 1428; 1300.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 3.24-3.90 (m, 8H, iz morfolinskog prstena); 7.26-7.54 (m, 5H, Ar-H).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 42.34 i 47.93 ( $\text{CH}_2\text{NCH}_2$ ); 66.66 ( $\text{CH}_2\text{OCH}_2$ ); 126.88, 128.35, 129.66 i 135.15 (Ar-C); 170.19 (C=O).

#### 4.14. 4-(Cikloheksilkarbonil)morfolin (**34**) i 4-dekanoilmorfolin (**35**)

Cikloheksilkarboksilna (1 ekv., 10 mmol, 1.32 g), odnosno dekanska kiselina (1 ekv., 10 mmol, 1.79 g) pomeša se sa morfolinom (1 ekv., 10 mmol, 0.865 mL) i reakciona smeša se zagreva u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora na temperaturi od 270 °C u toku 10 minuta. Po završetku zagrevanja reakciona smeša je rastvorena u metilen-hloridu (10 mL), rastvor je zatim ispran 1 M HCl (2 x 10 mL), 5 % NaHCO<sub>3</sub> (2 x 10 mL) i H<sub>2</sub>O (2 x 5 mL). *Flash* hromatografijom (metilen-hlorid : etil-acetat = 8 : 2) dobijen je čist proizvod **34** u vidu tamno žute uljaste tečnosti (1.69 g, 83 %), odnosno **35** u vidu žute uljaste tečnosti (2.36 g, 94 %).

Jedinjenje **34**:

IR (KBr): 3493; 2929; 1651; 1447; 1248.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.01-1.85 (m, 10H, 5 x CH<sub>2</sub>); 2.33 (tt, 1H, H-1); 3.30-3.71 (m, 8H, iz morfolinskog prstena).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 25.49 i 29.01 (CH<sub>2</sub>); 39.89 (CH-1); 41.62 i 45.61 (CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>); 66.63 (CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>); 174.39 (C=O).

Jedinjenje **35**:

IR (KBr): 3480; 2924; 1651; 1456; 1272.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0.81 (t, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.08-1.65 (m, 14H, 7 x CH<sub>2</sub>); 2.25 (dd, CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>); 3.35-3.68 (m, 8H, iz morfolinskog prstena).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 13.91 (CH<sub>3</sub>); 22.74, 25.10, 28.98, 29.08, 29.24, 29.70 i 31.68 (CH<sub>2</sub>); 32.93 (CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>); 41.73 i 45.92 (CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>); 66.49 i 66.75 (CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>); 171.87 (C=O).

#### 4.15. Amidi morfolina naftenskih kiselina *Velebit* (**36**) i *Aldrich* (**37**)

Naftenskim kiselinama (1 ekv., 5 mmol) se uz mešanje doda morfolin (1 ekv., 5 mmol). Reakciona smeša se zagreva u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora na temperaturi od 270 °C u toku 10 minuta. Nakon zagrevanja sadržaj reakcionog suda je rastvoren u metilen-hloridu (20 mL) i ispran 1M HCl (2 x 10 mL), 5 % NaHCO<sub>3</sub> (2 x 10 mL) i naposljetku H<sub>2</sub>O (2 x 5 mL) do pH 7. Hromatografskim prečišćavanjem na koloni silikagela (metilen-hlorid : etilacetat = 8 : 2) dobijeni su čisti amidi morfolina naftenskih kiselina *Velebit* u vidu tamno žute uljaste tečnosti (**36**, 1.68 g, 97 %) i morfolidi naftenskih kiselina *Aldrich* u obliku žute uljaste tečnosti (**37**, 1.29 g, 70 %).

Smeša jedinjenja **36**:

IR (KBr): 2924; 1651; 1456; 1228.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.60-2.41 (m, CH+CH<sub>2</sub>+CH<sub>3</sub>); 3.35-3.68 (m, 8H, iz morfolinskog prstena).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 14.07-39.24 (C+CH+CH<sub>2</sub>+CH<sub>3</sub>); 45.97 i 46.19 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{N}\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ); 66.57 i 66.85 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ); 171.58-172.85 (C=O).

Smeša jedinjenja **37**:

IR (KBr): 2957; 1724; 1462; 1229.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.86-2.40 (m, CH+CH<sub>2</sub>+CH<sub>3</sub>); 3.30-3.70 (m, 8H, iz morfolinskog prstena).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 12.01-37.94 (C+CH+CH<sub>2</sub>+CH<sub>3</sub>); 46.05 i 46.22 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{N}\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ); 66.63 i 66.90 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ); 174.88-183.70 (C=O).

#### 4.16. Benzil-benzoat (**38**)

Postupak A:

Benzoeva kiselina (1.5 ekv., 15 mmol, 1.83 g) se rastvori u benzil-alkoholu (1 ekv., 10 mmol, 1.04 mL) uz mešanje. Reakciona smeša se zatim zagreva uz refluks u toku 20 h. Nakon zagrevanja reakciona smeša je izručena u vodu (50 mL) i ekstrahovana petroletrom (3 x 20 mL), nakon čega su organski ekstrakti isprani zasićenim ratvorom NaHCO<sub>3</sub> (2 x 20 mL) a zatim i H<sub>2</sub>O (2 x 20 mL) do pH 7. *Flash* hromatografijom na koloni silikagela (petroletar : dietil-etar = 8 : 2) dobijen je čist estar **38** u obliku bezbojnog ulja (1.45 g, 68 %).

Postupak B:

Benzoeva kiselina (1.5 ekv., 15 mmol, 1.83 g) se uz mešanje rastvori u benzil-alkoholu (1 ekv., 10 mmol, 1.04 mL), nakon čega se sadržaj reakcionog suda zagreva u mono-modnom mikrotalasnom reaktoru na temperaturi od 270 °C u toku 30 minuta. Tok reakcije je praćen TLC-om i tečnom hromatografijom visoke rezolucije (88 %, HPLC prinos). Po završetku zagrevanja reakciona smeša je obrađena kao u Postupku A. Sirov proizvod se prečisti *flash* hromatografijom (petroletar : dietil-etar = 8 : 2) pri čemu se dobija čist estar **38** (1.69 g, 80 %).

IR (KBr): 3065; 1716; 1452; 1270; 1108; 711.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 5.45 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>); 7.40-8.20 (m, 10H, Ar-H).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 66.51 ( $\text{OCH}_2$ ); 128.01, 128.08, 128.22, 128.45, 129.55, 130.01, 132.86 i 135.95 (Ar-C); 166.21 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

#### 4.17. Benzil-cikloheksilkarboksilat (**39**) i benzil-dekanoat (**40**)

Individualnoj kiselini (1.5 ekv., 15 mmol) doda se benzil-alkohol (1 ekv., 10 mmol) uz mešanje. Reakciona smeša se zatim zagreva u mikrotalasnom rektoru na temperaturi od 270 °C u toku 30 minuta. Nakon zagrevanja reakciona smeša je izručena u vodu (50 mL) i ekstrahovana petroletrom (3 x 20 mL), nakon čega su organski ekstrakti isprani zasićenim ratvorom  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 20 mL) a zatim i  $\text{H}_2\text{O}$  (2 x 20 mL). *Flash* hromatografijom na koloni silikagela (petroletar : dietil-etar = 8 : 2) dobijen je čist benzil-cikloheksilkarboksilat u obliku bezbojnog ulja (**39**, 1.56 g, 73 %), odnosno benzil-dekanoat u vidu bezbojnog ulja (**40**, 1.82 g, 70 %).

Jedinjenje **39**:

IR (KBr): 2933; 1732; 1452; 1312; 1166; 697.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.15-2.10 (m, 10H, 5 x  $\text{CH}_2$ ); 2.40 (tt, 1H, H-1); 5.14 (s, 2H,  $\text{OCH}_2$ ); 7.37 (s, 5H, Ar-H).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 25.27, 28.85 ( $\text{CH}_2$ ); 43.01 ( $\text{CH}$ -1); 65.67 ( $\text{OCH}_2$ ); 127.77, 127.86, 128.33, 136.20 (Ar-C); 175.60 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

Jedinjenje **40**:

IR (KBr): 2926; 1739; 1456; 1160; 697.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.94 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1.10-1.69 (m, 14H, 7 x  $\text{CH}_2$ ); 2.39 (t,  $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ); 5.15 (s, 2H,  $\text{OCH}_2$ ); 7.38 (s, 5H, Ar-H).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 13.94 ( $\text{CH}_3$ ); 22.52, 24.81, 28.98, 29.15, 29.28, 31.73 (7 x  $\text{CH}_2$ ); 34.14 ( $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ); 65.83 ( $\text{OCH}_2$ ); 127.93, 127.98, 128.33 i 136.07 (Ar-C); 173.34 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

#### 4.18. Benzil-estri naftenskih kiselina *Velebit* (**41**) i *Aldrich* (**42**)

Prethodno odmerenim naftenskim kiselinama (1.5 ekv., 7.5 mmol) doda se benzil-alkohol (1 ekv., 5 mmol). Reakciona smeša se podvrgava mikrotalasnom zračenju, u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora, u toku 30 minuta (270 °C). Tok reakcije je praćen tankoslojnom hromatografijom (petroletar :

dietil-etar = 9 : 1). Nakon hlađenja reakciona smeša je rastvorena u petroletru (30 mL). Petroletarski rastvor je ispran zasićenim rastvorom NaHCO<sub>3</sub> (2 x 20 mL) i H<sub>2</sub>O (2 x 20 mL) do pH 7. *Flash* hromatografijom na koloni silikagela (petroletar : dietil-etar = 9 : 1) dobijeni su čisti benzil-estri naftenskih kiselina *Velebit* u obliku žute uljaste tečnosti (**41**, 0.73 g, 83 %), odnosno *Aldrich* u obliku bezbojnog ulja (**42**, 1.02 g, 61 %).

Smeša jedinjenja **41**:

IR (KBr): 2925; 1738; 1456; 1159; 697.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0.60-2.40 (m, CH+CH<sub>2</sub>+CH<sub>3</sub>); 5.15 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>); 7.38 (s, 5H, Ar-H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 14.06-39.28 (C+CH+CH<sub>2</sub>+CH<sub>3</sub>); 65.94 (OCH<sub>2</sub>); 128.05, 128.43, 136.09 i 136.25 (Ar-C); 173.05-173.53 (C=O).

Smeša jedinjenja **42**:

IR (KBr): 2955; 1733; 1456; 1158; 749; 697.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0.60-2.50 (m, CH+CH<sub>2</sub>+CH<sub>3</sub>); 5.14 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>); 7.37 (s, 5H, Ar-H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 8.84-47.25 (C+CH+CH<sub>2</sub>+CH<sub>3</sub>); 65.78 (OCH<sub>2</sub>), 127.55, 128.01, 128.33, 129.64, 136.10 i 138.22 (Ar-C); 173.10-177.77 (C=O).

#### 4.19. Holin-hlorid (**43**)

Holin-dihidrogencitrat (1 ekv., 3 mmol, 886 mg) se rastvori u 1 mL vode. Rastvoru se doda cc HCl (1.5 ekv., 4.5 mmol, 0.384 mL), nakon čega se zagreva u mikrotalasnom reaktoru na temperaturi od 100 °C u toku jednog časa. Nakon hlađenja reakcionoj smeši se doda 10 % NaOH do pH 10, a zatim 10 % CaCl<sub>2</sub> do prestanka izdvajanja belog taloga. Nakon ceđenja i uparavanja, ostatak se rastvori u 5 mL etanola nakon čega se doda rastvor Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (H<sub>2</sub>O : MeOH = 1 : 1) do prestanka izdvajanja belog taloga. Nakon ceđenja i uparavanja rastvora dobijen je čist proizvod **43** u obliku belih kristala (37 mg, 88 %).

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O): 3.32 (s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub>); 3.64 (t, 2H, NCH<sub>2</sub>); 4.14 (m, 2H, CH<sub>2</sub>O).

<sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O): 56.95, 57.01, 57.08 (CH<sub>3</sub>); 58.67 (CH<sub>2</sub>O); 70.42 (NCH<sub>2</sub>).



#### 4.20. Holin-estri naftenskih kiselina *Aldrich* (**44**)

Prethodno odmerenim naftenskim kiselinama *Aldrich* (8 ekv., 8 mmol, 1.95 g) doda se holin-hlorid (1 ekv., 1 mmol, 139.6 mg) i 75 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (0.075 mmol, 5.82  $\mu\text{L}$ ). Reakciona smeša se zagreva u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora na temperaturi od 160 °C, u toku jednog časa. Po završetku zagrevanja reakciona smeša se rastvori u metilen-hloridu (50 mL) i ispere 5 %  $\text{NaHCO}_3$  (3 x 20 mL). *Flash* hromatografijom na koloni silikagela (MeOH : AcOH = 10 : 0.1) dobijen je čist proizvod **44** u obliku žutih kristala (11 mg, 30 %).

$^1\text{H}$  NMR (DMSO): 0.68-2.20 (m, CH+CH<sub>2</sub>+CH<sub>3</sub>); 2.43 (m, 2H, CH<sub>2</sub>O); 3.40 (s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub>); 4.06 (t, 2H, NCH<sub>2</sub>).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO): 13.90-44.07 (C+CH+CH<sub>2</sub>+CH<sub>3</sub>); 45.28, 46.49, 49.55 (CH<sub>3</sub>); 57.24 (CH<sub>2</sub>O); 61.46 (NCH<sub>2</sub>); 172.19-175.66 (C=O).

#### 4.21. 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Diformiloksi-5 $\beta$ -holanska kiselina (**45**)

3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihidroksi-5 $\beta$ -holanska kiselina (1 ekv., 1.27 mmol, 500 mg) se rastvori u metanskoj kiselini (41 ekv., 52 mmol, 2 mL) uz mešanje. Reakciona smeša se zatim podvrgava mikrotalasnom zračenju pri temperaturi od 55 °C u trajanju od 30 min. Tok reakcije je praćen TLC-om (hloroform : aceton = 6 : 4). Po završetku reakcije reakcionoj smeši se doda anhidrid sirćetne kiseline (2 mL) kap po kap do prestanka izdvajanja mehurića. Reakciona smeša se zatim izlije u 50 mL hladne vode i reakcioni proizvod se ekstrahuje hloroformom (3 x 20 mL). Tankoslojnom hromatografijom na silikagelu potvrđen je visok stepen čistoće izolovanog proizvoda **45** u obliku belih kristala (562 mg, 98 %).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.75 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 0.83 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 0.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 1.09-2.40 (m, skeletni vodonici); 4.83 (m, 1H, H-3); 5.25 (s, 1H, H-12); 8.04 (s, 1H, CHO-3); 8.14 (s, 1H, CHO-12).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 12.33 (CH<sub>3</sub>-18); 17.43 (CH<sub>3</sub>-21); 22.92 (CH<sub>3</sub>-19); 23.43, 25.74, 25.89, 26.47, 26.77, 27.34, 30.47, 30.87, 32.09, 34.02, 34.20, 34.66, 34.77, 35.60, 41.73, 45.01, 47.35 i 49.25 (C-1, C-2, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-20, C-22, C-23); 74.10 (C-3); 76.49 (C-12); 160.56 (CHO-3); 160.69 (CHO-12); 179.78 (CO<sub>2</sub>H).

#### 4.22. 12 $\alpha$ -Formiloksi-3 $\alpha$ -hidroksi-5 $\beta$ -holanska kiselina (**46**)

3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Diformiloksi-5 $\beta$ -holanska kiselina (1 ekv., 0.22 mmol, 100 mg) se rastvori u acetonu (1,12 mL). Dobijenom rastvoru se uz mešanje doda 0.2 M NaOH (2.2 ekv., 0.48 mmol, 2.4 mL). Reakciona smeša se zatim podvrgava mikrotalasnom zračenju pri temperaturi od 60 °C u toku 5 min. Tok reakcije je praćen TLC-om (hloroform : aceton = 6 : 4). Reakciona smeša se zatim izlije u razblaženi rasvor sirćetne kiseline (13  $\mu$ L glacijalne sirćetne kiseline u 102  $\mu$ L vode). Dobijeni proizvod se ekstrahuje hloroformom (3 x 20 mL). Tankoslojnom hromatografijom potvrđen je visok stepen čistoće proizvoda **46** u obliku belih kristala (89 mg, 95 %).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0.75 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 0.83 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 0.91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 1.12-2.39 (m, skeletni vodonici); 3.59 (m, 1H, H-3); 5.24 (s, 1H, H-12); 8.12 (s, 1H, CHO-12).

#### 4.23. 12 $\alpha$ -Formiloksi-3-okso-5 $\beta$ -holanska kiselina (**47**)

12 $\alpha$ -Formiloksi-3 $\alpha$ -hidroksi-5 $\beta$ -holanska kiselina (1 ekv., 0.25 mmol, 103 mg) se rastvori u *t*-butanolu (2 mL). *N*-Bromsukcinimid (1.9 ekv., 0.46 mmol, 82 mg) se rastvori u vodi (1 mL) uz zagrevanje. Dobijeni rastvor NBS-a doda se prethodno pripremljenom rastvoru. Reakciona smeša se podvrgava mikrotalasnom zračenju pri temperaturi od 80 °C u toku 1 minuta. Tok reakcije je praćen TLC-om (hloroform : aceton = 6 : 4). Nakon hlađenja reakcione smeše *t*-butanol se delimično upari i proizvod se ekstrahuje hloroformom (3 x 20 mL). Tankoslojnom hromatografijom na silikagelu potvrđen je visok stepen čistoće izolovanog proizvoda **47**, u vidu belih kristala (95 mg, 92 %).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0.79 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 0.84 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 1.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 1.17-2.17 (m, skeletni vodonici); 5.29 (s, 1H, H-12); 8.13 (s, 1H, CHO-12).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 12.38 (CH<sub>3</sub>-18); 17.44 (CH<sub>3</sub>-21); 22.27 (CH<sub>3</sub>-19); 23.41, 25.36, 26.08, 26.39, 27.31, 30.45, 30.87, 34.27, 34.54, 34.77, 35.33, 36.58, 36.89, 42.17, 43.95, 45.07, 47.37 i 49.21 (C-1, C-2, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-20, C-22, C-23); 160.47 (CHO-12); 179.65 (CO<sub>2</sub>H); 212.93 (C-3).

#### 4.24. 12 $\alpha$ -Hidroksi-3-okso-5 $\beta$ -holanska kiselina (**48**)

Prethodno odmerenoj 12 $\alpha$ -formiloksi-3-okso-5 $\beta$ -holanskoj kiselini (1 ekv., 0,38 mmol, 150 mg) doda se 0.2 M NaOH (2 ekv., 0.77 mmol, 3.84 mL). Reakciona smeša se zatim zagreva u mikrotalasnom reaktoru pri temperaturi od 60 °C u toku 2 min. Tok reakcije je praćen TLC-om na silikagelu kao adsorbentu uz pogodan sistem rastvarača (hloroform : aceton = 6 : 4). Reakciona smeša se zatim izlije u razblaženi rasvor sirćetne kiseline (13  $\mu$ L glacijalne sirćetne kiseline u 102  $\mu$ L vode). Dobijeni proizvod se ekstrahuje hloroformom (3 x 20 mL). Tankoslojnom hromatografijom potvrđen je visok stepen čistoće belih kristala proizvoda **48** (104 mg, 74 %).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0.67 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 0.96 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 1.21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 1.26-2.75 (m, skeletni vodonici); 4.01 (s, 1H, H-12); 5.97 (br s, 2H, OH i CO<sub>2</sub>H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 12.59 (CH<sub>3</sub>-18); 17.11 (CH<sub>3</sub>-21); 23.49 (CH<sub>3</sub>-19); 26.40, 27.36, 28.66, 29.17, 29.54, 30.60, 31.61, 32.70, 33.60, 35.53, 36.70, 42.13, 44.14, 46.40, 48.18, 53.68, 36.91 i 54.81 (C-1, C-2, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-20, C-22, C-23); 73.22 (C-12); 178.77 (CO<sub>2</sub>H); 213.97 (C-3).

#### 4.25. 3,12-Diokso-5 $\beta$ -holanska kiselina (**49**)

##### Postupak A

3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihidroksi-5 $\beta$ -holanska kiselina (1 ekv., 0.49 mmol, 192 mg) se rastvori u *t*-butanolu (4 mL). *N*-Bromsukcinimid (3.7 ekv., 1.84 mmol, 327 mg) se rastvori u vodi (2 mL) uz zagrevanje i mešanje, nakon čega se dobijeni rastvor NBS-a doda u rastvor deoksiholne kiseline. Reakciona smeša se zagreva u mono-modnom reaktoru pri temperaturi od 80 °C u toku 1 min. Tok reakcije je praćen TLC-om (hloroform : aceton = 6 : 4). Nakon hlađenja, *t*-butanol se delimično upari i proizvod se ekstrahuje hloroformom (3 x 20 mL) iz ostatka reakcione smeše. *Flash* hromatografijom na koloni silikagela (hloroform : aceton = 6: 4) dobijeni su čisti beli kristali 3,12-diokso-5 $\beta$ -holanske kiseline (**49**, 168 mg, 88 %).

##### Postupak B

3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihidroksi-5 $\beta$ -holanska kiselina (1 ekv., 0.1 mmol, 39 mg), *Oxone* (2.4 ekv., 0.24 mmol, 148 mg) i AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (2.7 ekv., 0.27 mmol, 65 mg) se rastvore u vodi (2 mL). Reakciona smeša se meša na sobnoj temperaturi 3 sata. Po završetku reakcije reakciona smeša je ekstrahovana sa etil-acetatom. *Flash*

hromatografijom na koloni silikagela (hlороform : acetон : glaciјalna sirćetna kiselina = 6 : 4 : 0.1) dobijen je čist proizvod **49** (35 mg, 90 %).

#### Postupak C

3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihidroksi-5 $\beta$ -holanska kiselina (1 ekv., 0.1 mmol, 39 mg), *Oxone* (2.4 ekv., 0.24 mmol, 148 mg) i AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (2.7 ekv., 0.27 mmol, 65 mg) se rastvore u vodi (2 mL). Reakciona smeša se zatim zagreva u mikrotalasnom reaktoru na 50 °C u toku 12 minuta. Obradom reakcione smeše i prečišćavanjem sirovog proizvoda kao u Postupku B dobijen je čisto jedinjenje **49** (31 mg, 81 %).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0.83 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 1.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 1.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 1.30-2.58 (m, skeletni vodonici).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 11.63 (CH<sub>3</sub>-21); 18.47 (CH<sub>3</sub>-18); 22.02 (CH<sub>3</sub>-19); 24.20, 25.34, 26.48, 27.37, 30.16, 31.20, 35.32, 35.45, 35.51, 36.69, 36.78, 38.23, 41.99, 43.61, 44.17, 46.39, 57.49 i 58.44 (C-1, C-2, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-20, C-22, C-23); 179.72 (CO<sub>2</sub>H); 212.34 (C-3); 214.28 (C-12).

#### 4. 26. Metil 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\beta$ -holanoat (**50**)

Prethodno odmerena henodeoksiholna kiselina (1 ekv., 1.5 mmol, 589 mg) se rastvori u apsolutnom metanolu (51 ekv., 76.6 mmol, 3.10 mL). Rastvoru se doda cc H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.15 mmol, 10  $\mu$ L) i reakciona smeša se zagreva u mikrotalasnom reaktoru na temperaturi od 140 °C, u toku 30 minuta. Nakon hlađenja reakciona smeša se izlije u 60 mL vode i ekstrahuje sa hlороformom (3 x 20 mL). Ekstrakti se isperu zasićenim rastvorom NaHCO<sub>3</sub> (2 x 25 mL) i vodom (2 x 25 mL). *Flash hromatografijom* na koloni silikagela (hlороfom : acetон = 6 : 4) dobija se čist proizvod **50** u obliku žutog ulja (31 mg, 51 %).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0.65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 0.90 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0.91 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 1.06-2.39 (m, skeletni vodonici); 3.44 (m, 1H, H-3); 3.66 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.84 (s, 1H, H-7).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 11.68 (CH<sub>3</sub>-18); 18.20 (CH<sub>3</sub>-19); 22.00 (CH<sub>3</sub>-21); 20.52, 23.57, 28.07, 30.56, 30.91, 32.77, 34.60, 34.96, 35.26, 35.30, 39.33, 39.59, 39.68, 41.46, 42.57, 50.36, 51.40 i 55.75 (C-1, C-2, C-4, C-5, C-6, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-20, C-22, C-23); 51.40 (OCH<sub>3</sub>); 68.31 (C-7); 71.80 (C-3); 174.67 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

#### 4.27. Metil 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diacetoksi-5 $\beta$ -holanoat (**51**)

Metil 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\beta$ -holanoat (1 ekv., 0.12 mmol, 50 mg) se rastvori u piridinu (2 mL) nakon čega se doda acetanhidrid (100 ekv., 12 mmola, 1.12 mL). Reakciona smeša se zagreva u mikrotalasnom reaktoru na temperaturi od 120 °C u toku 2 minuta. Tok reakcije je praćen TLC-om (etil-acetat : toluen = 1 : 1). Nakon hlađenja reakcionoj smeši se doda 1 mL vode uz mešanje i hlađenje suda, a zatim se reakciona smeša izlije u 40 mL hladne vode i ekstrahuje sa dietil-etrom (3 x 20 mL). Ekstrakti se isperu sa 10 % rastvorom HCl (2 x 10 mL), zasićenim rastvorom NaHCO<sub>3</sub> (2 x 10 mL) i vodom (2 x 25 mL). Tankoslojnom hromatografijom potvrđen je visok stepen čistoće izolovanog proizvoda **51**, u vidu belih kristala (58 mg, 96 %).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0.65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0.91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 0.93 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 1.06-2.03 (m, skeletni vodonici); 2.05, 2.07 (s, 6H, COCH<sub>3</sub>-3, COCH<sub>3</sub>-7); 3.66 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 4.52 (m, 1H, H-3); 4.87 (s, 1H, H-7).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 11.67 (CH<sub>3</sub>-19); 18.25 (CH<sub>3</sub>-18); 20.63 (CH<sub>3</sub>-21); 21.45, 21.55, 22.66, 23.52, 26.77, 27.99, 30.94, 30.97, 31.30, 34.05, 34.61, 34.77, 34.88, 35.26, 37.88, 39.47, 40.94 i 42.67 (C-1, C-2, C-4, C-5, C-6, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-20, C-22, C-23); 50.38 (OCH<sub>3</sub>); 71.22 (C-7); 74.15 (C-3); 170.40, 170.62 (COCH<sub>3</sub>-3, COCH<sub>3</sub>-7); 174.66 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

#### 4.28. Metil 7 $\alpha$ -acetoksi-3 $\alpha$ -hidroksi-5 $\beta$ -holanoat (**52**)

Prethodno rastvorenom metil 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diacetoksi-5 $\beta$ -holanoatu (1 ekv., 0.10 mmol, 50 mg) u metanolu (2 mL) doda se *p*-toluensulfonska kiselina (3.8 ekv., 0.03 mmol, 5 mg). Reakciona smeša se ozračuje u mikrotalasnom reaktoru na temperaturi od 100 °C u toku 20 minuta. Tok reakcije je praćen pomoću TLC-a (etil-acetat : toluen = 1 : 1). Reakciona smeša se zatim izlije u 30 mL vode i ekstrahuje sa etil-acetatom (3 x 20 mL). Organski sloj se ispere zasićenim rastvorom NaHCO<sub>3</sub> (2 x 10 mL) i vodom (2 x 25 mL). Tankoslojnom hromatografijom dobijeni su čisti beli kristali proizvoda **52** (42 mg, 92 %).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0.65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0.91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 0.92 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 1.21-2.03 (m, skeletni vodonici); 2.05 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>-7); 3.50 (m, 1H, H-3); 3.66 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 4.86 (s, 1H, H-7).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 11.67 (CH<sub>3</sub>-19); 18.25 (CH<sub>3</sub>-18); 20.61 (CH<sub>3</sub>-21); 21.59, 22.69, 23.52, 26.76, 27.99, 29.67, 30.58, 30.92, 30.95, 31.29, 31.40, 34.07, 34.71, 34.87, 35.17, 35.26, 37.89 i 42.67 (C-1, C-2, C-4,

C-5, C-6, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-20, C-22, C-23); 50.37 (OCH<sub>3</sub>); 71.34 i 71.74 (C-7 i C-3); 170.63 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-7); 174.69 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

#### 4.29. Metil 7 $\alpha$ -acetoksi-3-okso-5 $\beta$ -holanoat (**53**)

Metil 7 $\alpha$ -acetoksi-3 $\alpha$ -hidroksi-5 $\beta$ -holanoat (1 ekv., 0.18 mmol, 81 mg) se rastvori u *t*-butanolu (2 mL) nakon čega se rastvoru doda topla suspenzija *N*-bromsukcinimida (1.9 ekv., 0.34 mmol, 61 mg) u vodi (1 mL). Reakciona smeša se zagreva u mikrotalasnom reaktoru u toku 1 minuta, na temperaturi od 80 °C. Tok reakcije je praćen TLC-om (etil-acetat : toluen = 1 : 1). Nakon hlađenja reakciona smeša se izlije u vodu (50 mL) i ekstrahuje sa hloroformom (3 x 20 mL). Tankoslojnom hromatografijom potvrđen je visok stepen čistoće izolovanog proizvoda **53** u obliku belih kristala (70 mg, 87 %).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0.67 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0.93 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 1.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 1.08-1.99 (m, skeletni vodonici); 2.02 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>-7); 2.98 (t, 1H, H-4); 3.65 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 4.94 (s, 1H, H-7).

#### 4.30. 3,7-Diokso-5 $\beta$ -holanska kiselina (**54**)

3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -Dihidroksi-5 $\beta$ -holanska kiselina (1 ekv., 0.1 mmol, 39 mg), *Oxone* (2.4 ekv., 0.24 mmol, 148 mg) i AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (2.7 ekv., 0.27 mmol, 65 mg) se rastvore u vodi (2 mL). Reakciona smeša se zatim zagreva u mikrotalasnom reaktoru na temperaturi od 50 °C, u toku 10 minuta. Po završetku reakcije reakciona smeša je ekstrahovana sa etil-acetatom. *Flash* hromatografijom na koloni silikagela (hloroform : aceton : glacijalna sirćetna kiselina = 6 : 4 : 0.1) dobijeni su čisti beli kristali proizvoda **54** (32 mg, 83 %).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0.69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 0.92 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 1.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 1.25-2.90 (m, skeletni vodonici).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 12.05 (CH<sub>3</sub>-18); 18.30 (CH<sub>3</sub>-21); 22.07 (CH<sub>3</sub>-19); 22.38, 24.70, 28.18, 30.66, 30.95, 35.12, 35.37, 36.69, 38.80, 42.63, 42.80, 42.86, 44.94, 47.72, 48.78, 49.51 i 54.74 (C-1, C-2, C-4, C-5, C-6, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-20, C-22, C-23); 179.95 (CO<sub>2</sub>H); 210.43, 211.28 (C-3 i C-7).

#### 4.31. 3,7,12-Triokso-5 $\beta$ -holanska kiselina (**55**)

3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Trihidroksi-5 $\beta$ -holanska kiselina (1 ekv., 0.1 mmol, 41 mg), *Oxone* (4.8 ekv., 0.48 mmol, 295 mg) i AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (5.4 ekv., 0.54 mmol, 130 mg) se rastvore u vodi (2 mL), nakon čega se reakciona smeša zagreva pod dejstvom mikrotalasnog zračenja, pri temperature od 50 °C, u toku 30 minuta. Po završetku reakcije reakciona smeša se ekstrahuje sa etil-acetatom. Proizvod se prečisti *flash* hromatografijom (hlороform : aceton : glaciјalna sirćetna kiselina = 6 : 4 : 0.1) pri čemu se dobijaju čisti beli kristali jedinjenja **55** (19 mg, 47 %).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0.85 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 1.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 1.25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 1.28-2.91 (m, skeletni vodonici).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 11.83 (CH<sub>3</sub>-21); 18.57 (CH<sub>3</sub>-18); 21.88 (CH<sub>3</sub>-19); 25.11, 27.59, 29.67, 30.18, 31.16, 35.45, 35.99, 36.46, 38.60, 42.76, 44.95, 45.53, 45.61, 46.82, 48.94, 51.73 i 56.88 (C-1, C-2, C-4, C-5, C-6, C-8, C-9, C-10, C-11, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-20, C-22, C-23); 179.23 (CO<sub>2</sub>H); 208.75, 209.17, 212.03 (C-3, C-7 i C-12).

#### 4.32. 3-Okso-5 $\beta$ -holanska kiselina (**56**)

Rastvoru *Oxone*-a (2.4 ekv., 0.24 mmol, 148 mg) i AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (2.7 ekv., 0.27 mmol, 65 mg) u MeCN (0.5 mL) i vodi (1.5 mL) doda se 3 $\alpha$ -hidroksi-5 $\beta$ -holanska kiselina (1 ekv., 0.15 mmol, 57 mg). Reakciona smeša se zagreva u mikrotalasnom reaktoru na 50 °C u toku 6 minuta. Po završetku zagrevanja reakciona smeša se ekstrahuje sa etil-acetatom. Hromatografskim prečišćavanjem (hlороform : aceton : glaciјalna sirćetna kiselina = 6 : 4 : 0.1) dobijen je čist proizvod **55** u vidu belih kristala (51 mg, 90 %).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0.67 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 0.91 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 1.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 1.03-2.69 (m, skeletni vodonici); 9.50 (br s, 1H, CO<sub>2</sub>H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 12.00 (CH<sub>3</sub>-18); 18.17 (CH<sub>3</sub>-21); 21.10 (CH<sub>3</sub>-19); 22.55, 24.07, 25.67, 26.51, 28.05, 30.65, 30.97, 34.79, 35.20, 35.43, 36.91, 37.09, 39.94, 40.63, 42.24, 42.69, 44.23, 55.85 i 56.32 (C-1, C-2, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-20, C-22, C-23); 180.20 (CO<sub>2</sub>H); 213.81 (C-3).

### 4.33. 5 $\beta$ -Holanska kiselina (**57**)

#### Postupak A

3-Okso-5 $\beta$ -holanska kiselina (1 ekv., 0.61 mmol, 228 mg) se rastvori u etilen-glikolu (2.74 mL) nakon čega se doda hidrazin-hidrat (4 ekv., 2.44 mmol, 121  $\mu$ L) i KOH (276 mg). Reakciona smeša se zagreva na temperaturi od 240 °C, u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora, u toku 15 minuta. Nakon zagrevanja reakciona smeša se zakiseli do pH 2, ekstrahuje sa dietil-etrom (3 x 20 mL) i ispere 4 % NaCl. *Flash* hromatografijom na koloni silikagela dobijen je čist proizvod **57** u obliku belih kristala (160 mg, 73 %).

#### Postupak B

U reakcionim sudovima sa etilen-glikolom (2.74 mL) se dodaju 3,12-dioekso-5 $\beta$ -holanska kiselina (1 ekv., 0.52 mmol, 200 mg), hidrazin-hidrat (8 ekv., 4.12 mmol, 204  $\mu$ L) i KOH (276 mg). Nakon 15 minuta mikrotalasnog ozračivanja, pri temperaturi od 240 °C, reakciona smeša se zakiseli do pH 2, ekstrahuje sa dietil-etrom (3 x 20 mL) i ispere 4 % NaCl. Hromatografskim prečišćavanjem dobijen je čist proizvod **57** (170 mg, 92 %).

#### Postupak C

3,7,12-Triekso-5 $\beta$ -holanska kiselina (1 ekv., 0.50 mmol, 200 mg) se rastvori u etilen-glikolu (2.74 mL) nakon čega se dodaju hidrazin-hidrat (12 ekv., 5.97 mmol, 296  $\mu$ L) i KOH (276 mg). Reakciona smeša se zagreva 15 minuta, pri temperaturi od 240 °C, u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora. Nakon isteka reakcionog vremena, reakciona smeša se zakiseli do pH 2, ekstrahuje sa dietil-etrom (3 x 20 mL) i ispere 4 % NaCl. *Flash* hromatografijom na koloni silikagela dobijen je čist proizvod **57** (120 mg, 67 %).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0.65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 0.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0.94 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 1.00-2.68 (m, skeletni vodonici).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 12.05 (CH<sub>3</sub>-18); 18.23 (CH<sub>3</sub>-19); 20.81 (CH<sub>3</sub>-19); 21.33, 24.21, 24.26, 26.54, 27.01, 27.23, 27.50, 28.18, 30.76, 30.95, 35.30, 35.35, 35.87, 37.57, 40.25, 40.49, 42.75, 43.71, 55.94 i 56.59 (C-1, C-2, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-20, C-22, C-23); 197.10 (CO<sub>2</sub>H).



#### 4.34. *N*-Fenil-5 $\beta$ -holan-24-amid (**58**) i *N*-morfolil-5 $\beta$ -holan-24-amid (**59**)

Holanska kiselina (1 ekv., 0.83 mmol, 300 mg) i anilin, odnosno morfolin (20 ekv., 16.67 mmol) se pomešaju i zagrevaju pod dejstvom mikrotalasa u toku jednog časa, na temperaturi od 200 °C. Nakon hlađenja, reakciona smeša je rastvorena u metilen-hloridu (30 mL), isprana 5 % NaHCO<sub>3</sub> (2 x 10 mL), 1 M HCl (2 x 10 mL) i vodom (2 x 15 mL). Hromatografskim prečišćavanjem (petroletar : etil-acetat = 6 : 4) dobijen je čist proizvod **58** u vidu žutog ulja (250 mg, 69 %), odnosno beli kristali proizvoda **59** (280 mg, 78 %).

Jedinjenje **58**:

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0.65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 0.93 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 0.95 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 1.06-1.92 (m, skeletni vodonici); 7.25-7.60 (m, 5H, Ar-H); 7.93 (s, 1H, NH).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 12.03 (CH<sub>3</sub>-18); 18.36 (CH<sub>3</sub>-21); 20.76 (CH<sub>3</sub>-19); 21.28, 24.17, 24.21, 26.50, 26.98, 27.19, 27.45, 28.21, 31.68, 34.53, 35.28, 35.50, 35.81, 37.53, 40.24, 40.46, 42.70, 43.66, 56.02 i 56.52 (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-20, C-22, C-23); 119.91, 123.97, 128.80, 138.13 (Ar-C); 172.24 (C=O).

Jedinjenje **59**:

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0.59 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 0.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 0.89 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 1.04-1.83 (m, skeletni vodonici); 3.42-3.67 (m, 8H, iz morfolinskog prstena); 7.30 (s, 1H, NH).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 12.00 (CH<sub>3</sub>-18); 18.44 (CH<sub>3</sub>-19); 20.76 (CH<sub>3</sub>-21); 21.27, 24.17, 24.20, 26.48, 26.96, 27.17, 27.43, 28.23, 30.01, 31.28, 35.27, 35.56, 35.80, 37.52, 40.22, 40.44, 42.70, 43.64, 55.97 i 56.54 (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-20, C-22, C-23); 41.78, 46.01 (CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>); 66.61, 66.87 (CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>); 172.24 (C=O).

#### 4.35. 3 $\beta$ -Fenilamino-5 $\beta$ -holanska kiselina (**60**)

Rastvoru 3-okso-5 $\beta$ -holanske kiseline (1 ekv., 1 mmol, 375 mg) i anilina (1 ekv., 0.5 mmol, 45  $\mu$ L) u dihloretanu (2 mL) doda se NaBH(OAc)<sub>3</sub> (1.25 ekv., 1.25 mmol, 265 mg) i AcOH (1.5 mmol, 86  $\mu$ L). Reakciona smeša se zagreva u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora u toku 5 minuta, pri temperaturi od 140 °C. Nakon zagrevanja reakciona smeša se rastvori u metilen-hloridu, ispire zasićenim rastvorom NaHCO<sub>3</sub> (3 x 10 mL), suši i upari. *Flash* hromatografijom na koloni silikagela (petroletar : etil-acetat = 6 : 4) dobijen je čist proizvod **60** u obliku belih kristala (130 mg, 58 %).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.68 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18); 0.94 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -21); 0.99 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -19); 1.08-2.43 (m, skeletni vodonici); 3.76 (s, 1H, H-3); 6.61-7.27 (m, 5H, Ar-H).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 12.05 ( $\text{CH}_3$ -18); 18.23 ( $\text{CH}_3$ -21); 21.05 ( $\text{CH}_3$ -19); 24.04, 24.16, 24.39, 26.27, 26.82, 28.14, 30.52, 30.75, 30.87, 31.02, 35.05, 35.28, 35.65, 37.43, 39.91, 40.20, 42.76, 55.96 i 56.56 (C-1, C-2, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-20, C-22, C-23); 48.04 (C-3); 113.16, 116.83, 129.22 i 147.19 (Ar-C); 180.39 (C=O).

#### 4.36. Metil $3\alpha,12\alpha$ -dihidroksi- $5\beta$ -holanoat (**61**)

Deoksiholna kiselina (1 ekv., 1.5 mmol, 589 mg) se rastvori u apsolutnom metanolu (50 ekv., 76.12 mmol, 3.08 mL). Rastvoru se polako, uz mešanje doda cc  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0.15 mmol, 10  $\mu\text{L}$ ). Reakciona smeša se zagreva u mikrotalasnom reaktoru na temperaturi od 140  $^\circ\text{C}$ , u toku 30 sekundi. Nakon hlađenja reakciona smeša se izlije u vodu (60 mL) i ekstrahuje sa hloroformom (3 x 20 mL). Ekstrakti se isperu zasićenim rastvorom  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 25 mL) i vodom (2 x 25 mL). *Flash* hromatografijom na koloni silikagela (hloroform : aceton = 6 : 4) dobija se čist proizvod **61** u obliku žute uljaste tečnosti (519 mg, 85 %).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.65 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18); 0.88 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -19); 0.94 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -21); 1.04-2.72 (m, 28H, skeletni vodonici i 2OH); 3.57 (s, 1H, H-3); 3.64 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.96 (s, 1H, H-12).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 12.62 ( $\text{CH}_3$ -18); 17.15 ( $\text{CH}_3$ -21); 23.04 ( $\text{CH}_3$ -19); 23.60, 26.05, 27.06, 27.42, 28.53, 30.29, 30.81, 31.04, 33.49, 34.03, 35.14, 35.19, 35.92, 36.30, 41.99, 46.39, 47.13, 48.09 (C-1, C-2, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-20, C-22, C-23); 51.41 ( $\text{OCH}_3$ ); 71.56 (C-3); 73.00 (C-12); 174.68 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ).

#### 4.37. *N*-Fenil- $3\alpha,12\alpha$ -dihidroksi- $5\beta$ -holan-24-amid (**62**)

Prethodno odmerenom metil  $3\alpha,7\alpha$ -dihidroksi- $5\beta$ -holanoatu (1 ekv., 1.33 mmol, 541 mg) doda se anilin (20 ekv., 26.6 mmol; 2.43 mL) uz mešanje. Reakciona smeša se zagreva u mikrotalasnom reaktoru na temperaturi od 200  $^\circ\text{C}$  u toku 90 minuta. Nakon hlađenja sadržaj reakcionog suda se izlije u hladnu vodu (3 mL), ekstrahuje etil-acetatom i upari. Hromatografskim prečišćavanjem (hloroform : aceton = 6 : 4) dobijen je čist proizvod **62** u obliku belih kristala (215 mg, 35 %).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.68 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18); 0.91 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -19); 0.90 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -21); 1.20-2.50 (m, 28H, skeletni vodonici); 3.60 (m, 1H, H-3); 4.00 (s, 1H, H-12); 6.50-7.60 (m, 5H, Ar-H i 1H, NH)

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 12.76 ( $\text{CH}_3$ -18); 17.49 ( $\text{CH}_3$ -19); 23.14 ( $\text{CH}_3$ -21); 23.67, 26.14, 27.14, 27.51, 28.64, 29.68, 30.52, 31.36, 33.67, 34.13, 34.28, 35.17, 35.22, 36.02, 36.41, 42.07, 46.51, 46.78, 46.99 i 48.22 (C-1, C-2, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-20, C-22, C-23); 73.04 (C-3); 76.50 (C-12); 113.94-138.10 (Ar-C); 171.90 (C=O).

#### 4.38. *N*-Propil-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\beta$ -holan-24-amid (**63**)

Prethodno odmerenom metil 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroksi-5 $\beta$ -holanoatu (1 ekv., 1 mmol, 406 mg) doda se *N*-propilamin (20 ekv., 20 mmol, 850  $\mu\text{L}$ ) uz mešanje. Reakciona smeša se zagreva u mikrotalasnom reaktoru na temperaturi od 150  $^\circ\text{C}$  u toku 90 minuta. Nakon hlađenja sadržaj reakcionog suda se izlije u vodu (3 mL), ekstrahuje etil-acetatom i upari. *Flash* hromatografijom na koloni silikagela (metilenhlorid : aceton = 7 : 3) dobijen se čist proizvod **63** u vidu belih kristala (234 mg, 54 %).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.67 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18); 0.88 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -19); 0.90 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ -21); 0.91-2.17 (m, 28H, skeletni vodonici); 3.18 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ); 3.60 (m, 1H, H-3); 3.97 (s, 1H, H-12); 5.71 (s, 1H, NH).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 11.34 ( $\text{CH}_3$ -18); 12.71 ( $\text{CH}_3$ -19); 17.39 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 22.84 ( $\text{CH}_3$ -21); 23.10, 23.64, 26.10, 27.10, 27.48, 28.57, 30.42, 31.69, 33.47, 33.59, 34.09, 35.18, 35.98, 36.36, 42.04, 46.46, 47.08 i 48.17 (C-1, C-2, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-20, C-22, C-23); 71.71, 73.11 (C-3 i C-12); 173.63 (C=O).

#### 4.39. Test inhibicije klijanja

Seme bele slačice (*Sinapis alba*) postavi se u *Petri* posude ( $\varnothing$  9 cm) sa filter-hartijom u podlozi. U posude se dodaje po 3.50 mL rastvora (koncentracije od  $10^{-5}$ - $10^{-7}$  M) naftenskih kiselina *Velebit* (**25**), *Aldrich* (**26**), njihovih odgovarajućih sintetizovanih derivata (**27**, **28**, **29**, **30**, **31**, **32**, **36**, **37**), anilida individualnih karboksilnih kiselina (**17**, **18**, **19**, **20** i **58**) ili model smeše (MS1, MS2). Model smeša MS1 dobijena je mešanjem ekvimolarne količine individualnih karboksilnih kiselina (dekanske, cikloheksilkarboksilne, adamantanske i holanske kiseline) i 0.1 mol benzoeve kiseline. Mešanjem anilida individualnih karboksilnih kiselina pri istom molskom odnosu, izuzev benzoeve kiseline (0.1

mol), dobijena je model smeša MS2. Za kontrolu je uzet rastvor 3-indolsirćetne kiseline u koncentracijama od  $10^{-5}$ - $10^{-7}$  M. Svi ogledi se rade paralelno sa po dve probe. U svaku posudu se stavi po 50 semenki bele slačice. Klijanje se izvodi u mraku, u zaklopljenim posudama, pri temperaturi od 25 °C. Prebrojavanjem se ustanovi kada iskliaja 50 % ( $\pm 2$  %) semena. U ovom testu vreme klijanja je 24 sata. Iskljalim se smatraju ona semena sa izdankom čija dužina iznosi polovinu dužine semena. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija.

#### 4.40. Ožiljavanje reznica suncokreta

Mlade biljke dobijene su naklijavanjem semena suncokreta u pesku. Odabranim poncima, visine do oko 15 cm, sa formiranim prvim parom listova, odstranjen je koren prerezivanjem na mestu gde su izbijali iz peska. Mlade biljke suncokreta, u grupama od po pet komada, su potapane do visine od oko 6 cm u vodu i u rastvore različitih koncentracija ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  M) naftenskih kiselina *Velebit* (**25**) ili *Aldrich* (**26**), kao i njihovih odgovarajućih derivata (**27**, **29**, **30**, **32**, **36**, **41**, **44**), anilida individualnih karboksilnih kiselina (**17**, **18**, **19**, **20** i **58**) ili model smeše (MS1, MS2). Model smeša MS1 dobijena je mešanjem ekvimolarne količine individualnih karboksilnih kiselina (dekanske, cikloheksilkarboksilne, adamantanske i holanske kiseline) i 0.1 ekv. benzoeve kiseline. Mešanjem anilida individualnih karboksilnih kiselina pri istom molskom odnosu, izuzev benzoeve kiseline (0.1 ekv.), dobijena je model smeša MS2.

Nakon 10 dana stajanja u komori (temperatura 20 °C, vlažnost 80 %, dan 12 sati, noć 12 sati) i povremenog dolivanja vode da se nadokanadi isparena voda prebrojani su adventivni korenovi (svi koji su veći od 2 mm) i rezultati izraženi kao prosečni broj adventivnih korenova po biljci. Svi testovi su rađeni u tri ponavljanja a rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija.

## 5. ZAKLJUČAK

U prvom delu rada potvrđen je visok stepen efikasnosti, brzine i preciznosti mikrotalasne tehnologije, zahvaljujući prednostima mikrotalasnog dielektričnog zagrevanja i novih, keramičkih, silicijum-karbidnih reakcionih sudova, u okviru studija korozije i stresnih studija aktivnih farmaceutskih komponenata.

Ispitivanjem fizičko-hemijske stabilnosti standardnih *Pyrex* i SiC reakcionih sudova u mikrotalasno-stimulisanim reakcijama hidrolize aromatičnih nitrila određen je visok stepen korozije, naprsnuća i eksplozije borsilikatnog stakla, kao i negativan uticaj prisutnih silikata na proces izolovanja benzoove kiseline (**1**, 21 %) i 2-metoksibenzoove kiseline (**2**, 57 %). Detaljnijom evaluacijom stepena korozije *Pyrex* reakcionih sudova, mikrotalasnim zagrevanjem vodenog rastvora kalijum-hidroksida, u mikrotalasnom reaktoru *Biotage Initiator* (pri maksimalnoj operativnoj vrednosti temperature od 190 °C) prosečan gubitak mase reakcionog suda je iznosio 0.660 g dok je u slučaju *Anton Paar Monowave 300* (< 210 °C) reakcionih sudova iznosio 1.252 g, nakon 120 minuta mikrotalasnog ozračivanja. Pored toga, utvrđeno je i da stepen korozije borsilikatnog stakla zavisi od temperature (> 150 °C) dok koncentracija baze nema uticaja na gubitak mase reakcionog suda. Hemijskim reakcijama u SiC vialima, koji onemogućavaju penetraciju elektromagnetnog zračenja, pomenuti negativni efekti katalizatora su uspešno eliminisani. Mikrotalasnim zagrevanjem reakcionih smeša, pri visokim vrednostima temperature i pritiska, u SiC vialima nije zabeležen gubitak mase reakcionog suda, naprsnuća i eksplozije, kao ni otežano izolovanje i niži prinosi reakcionih proizvoda (**1**, 85 %; **2**, 93 %). Pored toga, snažno mikrotalasno-apsorbujući i temperaturno-otporni SiC sudovi pokazali su se i kao izuzetno pogodni za sigurno izvođenje eksperimenata u prisustvu metala.

Primenom specijalnih silicijum-karbidnih reakcionih sudova, brzina i preciznost izvođenja mikrotalasno-stimulisanih transformacija potvrđena je i kroz stresne studije aktivnih farmaceutskih komponenata, posebno u SiC ploči, odnosno HPLC/GC vialima kao reakcionim sudovima.

- ✓ U uslovima mikrotalasnog dielektričnog zagrevanja postignuto je drastično skraćanje vremena potrebnog za degradaciju aktivne komponente leka sa ciljem određivanja veka trajanja aktivne supstance leka. Jednostavnim povišenjem temperature reakcione smeše od sobne (0.1 M HCl, 24 %, 72 h) do temperatura koje su daleko iznad temperatura ključanja samih reaktanata, u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora *Biotage Initiator* i *Anton Paar Monowave 300*,

postignuta je značajna redukcija vremena toka degradacije indometacina (0.1 M HCl, 160 °C, 27 %, 1 minut). Od degradacionih proizvoda pri kiselim i baznim stresnim uslovima kao i neutralnoj sredini identifikovani su LC-MS analizom proizvodi hidrolize indometacina, odnosno 5-metoksi-2-metil-3-indolsirćetna kiselina (**4**) i 4-hlorobenzoeva kiselina (**5**).

- ✓ Oksidativnom degradacijom indometacina u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora takode je postignut znatno viši stepen degradacije u daleko kraćem vremenskom periodu (25 %, 10 min.), u poređenju sa konvencionalnim zagrevanjem (7 %, 120 min.), do 4-hlor-*N*-[4-metoksi-2-(1-metilen-2-oksopropil)fenil]-benzamida (**7**) i 8-(4-hlorbenzoil)-3a-hidroksi-5-metoksi-8a-metil-3,3a,8,8a-tetrahidro-2*H*-furo[2,3-*b*]indol-2-ona (**8**), (*Shema 3.6.*). Mikrotalasnim zagrevanjem indometacina u vodi pri visokoj vrednosti temperature (150 °C), aktivna komponenta se pokazala kao izuzetno stabilna (*Slika 3.5.*).
- ✓ Istraživanja su zatim proširena i na stresne studije Pyr3 (**9**) koji se pokazao kao izuzetno stabilno jedinjenje u prisustvu kiseline, vodonik-peroksida ili vode dok je u prisustvu jake baze potpuno hidrolizovan do jedinjenja **10**, odnosno jedinjenja **11** i **12** (*Shema 3.7.*) nakon 10 minuta zagrevanja (160 °C, 56 %). U okviru stresnih studija omeprazola (**13**), aktivni ingredijent je u potpunosti hidrolizovan do odgovarajućih proizvoda **14** i **15** (*Shema 3.8.*) nakon svega 10 minuta zagrevanja u kiseljoj sredini pri temperaturi od 100 °C, odnosno 160 °C u baznoj sredini.
- ✓ Paralelnim zagrevanjem do osamdeset reakcija u HPLC/GC vialima kao reakcionim sudovima smeštenih unutar SiC ploče, u multi-modnom mikrotalasnom reaktoru *Synthos 3000*, firme *Anton Paar*, postignuto je značajno skraćenje vremena trajanja degradacije indometacina, minijaturizacija procesa i brz uvid u rezultate stresnih studija pri različitim kiselim, baznim i oksidativnim stresnim uslovima (*Slika 3.9.*). Primenom HPLC/GC viala kao reakcionih sudova koji su direktno po završetku zagrevanja preneti do odgovarajućeg instrumenta za dalju analizu (HPLC-UV, GC-MS, LC-MS) eliminisan je i uticaj greške manuelnog transfera uzorka. Efikasnost SiC ploče i HPLC/GC viala kao reakcionih sudova, u kombinaciji sa mikrotalasnim zračenjem, potvrđena je i u slučaju studija stabilnosti indometacina u prisustvu različitih rastvarača i gasova. Najviši stepen degradacije indometacina uočen je u vodi (20 %) i etilen-glikolu (15 %) kao rastvaraču na 160 °C, a od degradacionih proizvoda identifikovani su proizvodi hidrolize amidne veze **4** i **5** (*Slika 3.10.*). U prisustvu suvog azota i argona uočen je visok stepen stabilnosti indometacina nakon 30 minuta mikrotalasnog ozračivanja pri temperaturi od 150 °C i 180 °C, dok je u prisustvu relativno vlažnog vazduha (150 °C, 2 %; 180

°C, 26 %) i kiseonika (150 °C, 5 %; 180 °C, 85 %) hidrolizovao do proizvoda **4** i **5**. Mikrotalasno-stimulisanim zagrevanjem u atmosferi amonijaka dobijena je amonijumova so indometacina (**16**, 150 °C, 46 %; 180 °C, 97%).

- ✓ Postojanje *netermičkih mikrotalasnih efekata* je opovrgnuto primenom SiC kao snažno mikrotalasno-apsorbujućeg materijala koji sprečava penetraciju elektromagnetnog zračenja. U skladu sa tim, reakciona smeša je tokom mikrotalasnog ozračivanja zagrevana konvencionalnim transferom toplote od zida reakcionog suda a ne preko dielektričnog mehanizma zagrevanja. Pored toga, stepen degradacije indometacina na 150 °C (0.1 M HCl) u toku 5 minuta mikrotalasnog ozračivanja je u oba tipa reakcionog suda isti (oko 50 %) što nas je dovelo do zaključka da su za visok stepen ubrzanja hemijskih transformacija odgovorni jedino *termički/kinetički efekti*.

U drugom delu ovog rada razvijene su nove sintetske metode i izvršena je modifikacija postojećih konvencionalnih metoda sinteze amida i estara individualnih naftenskih kiselina, kao i prirodnih naftenskih kiselina nafte *Velebit* i komercijalnih *Aldrich* naftenskih kiselina. Sinteze su izvedene mikrotalasnim ozračivanjem čistih reaktanata, u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora, pri maksimalnim vrednostima temperature i pritiska reakcione smeše. U skladu sa tim, *neat* sinteze koje podrazumevaju odsustvo rastvarača i katalizatora dovele su do čistijih reakcionih sistema uz maksimalno skraćenje vremena trajanja reakcije, kao i do jednostavnijeg izolovanja i visokih vrednosti prinosa finalnih proizvoda.

- ✓ Direktno iz neaktiviranih karboksilnih kiselina i amina, pri molskom odnosu 1 : 1, sintetizovani su sekundarni amidi, odnosno anilidi benzoeve (**17**, 74 %), cikloheksilkarboksilne (**18**, 98 %) i dekanske kiseline (**19**, 78 %) pri temperaturi od 270 °C, nakon 15 minuta mikrotalasnog ozračivanja u temperaturno-kontrolnom modu *CEM Discover BenchMate* mikrotalasnog reaktora (*Shema 3.10.*; *3.11.*). U reakciji amidacije triciklične karboksilne kiseline uočen je niži stepen reaktivnosti adamantanske kiseline u prisustvu mikrotalasnog zračenja (200 °C, 240 min.) što je rezultovalo nižim vrednostima prinosa *N*-fenil-1-adamantankarboksamida (**20**, 33 %). Od sekundarnih amida sintetizovani su i *N*-benzil- (**21** i **22**) i *N*-cikloheksilamidi (**23** i **24**) benzoeve i cikloheksilkarboksilne kiseline u visokom prinosu (iznad 80 %), nakon 2 minuta mikrotalasnog ozračivanja (*Shema 3.12.*). Primenom prethodno utvrđenih reakcionih uslova mikrotalasno-stimulisane sinteze individualnih naftenskih kiselina, postignuta je efikasna sinteza *N*-fenil- (**27** i **30**), *N*-benzil- (**28** i **31**) i *N*-cikloheksilamida (**29** i **32**) prirodnih naftenskih

kiselina *Velebit* i komercijalnih *Aldrich* naftenskih kiselina u visokom prinosu (iznad 70 %) pod dejstvom mikrotalasnog zračenja (*Shema 3.13.*). Zahvaljujući prednostima mikrotalasne tehnologije i direktnoj interakciji elektromagnetnog zračenja sa reagensima uspešno su sintetizovani i tercijarni amidi naftenskih kiselina pri temperaturi od 270 °C, u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora, nakon 10 minuta mikrotalasnog ozračivanja. Modifikovanim sintetskim postupkom dobijeni su amidi morfolina individualnih naftenskih kiselina, odnosno 4-dekanoilmorfolin (**35**, 94 %), 4-(cikloheksilkarbonil)morfolin (**34**, 83 %) i 4-benzoilmorfolin (**33**, 81 %), kao i amidi morfolina smeše naftenskih kiselina *Velebit* (**36**, 97 %) i *Aldrich* (**37**, 70 %), (*Shema 3.14.*; *3.15.*; *3.16.*).

- ✓ U daljem radu izvršena je optimizacija reakcija esterifikacije naftenskih kiselina u prisustvu mikrotalasnog zračenja, a u cilju sinteze amida karboksilnih kiselina aminolizom aktivnih estara. Najveći prinos benzil-estra (**38**, 80 %) ostvaren je nakon 30 minuta zagrevanja u temperaturno-kontrolnom modu *CEM Discover BenchMate* mikrotalasnog reaktora, pri temperaturi od 270 °C, u odsustvu katalizatora. Na osnovu prethodnog, sintetizovani su i benzil-estri drugih individualnih naftenskih kiselina, odnosno benzil-cikloheksilkarboksilat (**39**, 73 %) i benzil-dekanoat (**40**, 70 %), kao i smeše prirodnih *Velebit* (**41**, 83 %) i komercijalnih *Aldrich* (**42**, 61 %) naftenskih kiselina. Od značaja je istaći da su reakcije esterifikacije izvedene u odsustvu katalizatora i organskih rastvarača, što je od posebnog značaja sa aspekta *zelene hemije* (*Shema 3.18.*). Aminolizom sintetizovanog benzil-benzoata sa anilinom, odnosno cikloheksilaminom, pri molskom odnosu estar : amin = 1 : 1.5 na temperaturi od 300 °C u toku 10 minuta mikrotalasnog ozračivanja, dobijeni su proizvodi **17** (72 %) i **23** (92 %). Prethodno utvrđeni reakcioni uslovi primenjeni su na reakciju aminolize benzil-estara komercijalnih *Aldrich* naftenskih kiselina sa *N*-cikloheksilaminom do odgovarajućeg amida **32** (20 %), (*Shema 3.20.*).

U cilju povećanja stepena rastvorljivosti naftenskih kiselina u vodi kao primarnom medijumu za biološka ispitivanja izvršeno je njihovo prevođenje u polarnija jedinjenja kao što su kvaternerne amonijumove soli. Kao polazno jedinjenje upotrebljen je holin-dihidrogencitrat koji je prvo preveden u holin-hlorid (**43**, 88 %). Mikrotalasnim ozračivanjem naftenskih kiselina *Aldrich* i holin-hlorida u prisustvu katalitičke količine kiseline pri temperaturi od 160 °C, u toku jednog časa mikrotalasnog ozračivanja, sintetizovani su holin-estri naftenskih kiselina *Aldrich* (**44**, 30 %), (*Shema 3.21.*).



Efikasnost mikrotalasne tehnologije potvrđena je i u reakcijama sinteze 5 $\beta$ -holanske kiseline, model supstance pri identifikaciji prirodnih policikličnih naftenskih kiselina prisutnih u nafti. Mikrotalasnostimulisanom oksidacijom litoholne, deoksiholne, henodeoksiholne i holne kiseline sa *Oxone*/AlCl<sub>3</sub> sistemom u destilovanoj vodi kao rastvaraču dobijeni su odgovarajući keto derivati žučnih kiselina (**49**, **54**, **55**, **56**), (Shema 3.27.). Odsustvo toksičnih nusproizvoda koji dovode do ozbiljnog zagađenja životne sredine čine ovu metodu izuzetno pogodnom sa aspekta *zelene hemije* i zaštite životne sredine u odnosu na tradicionalne metode oksidacije žučnih kiselina.

Wolff-Kishner-ovom redukcijom sintetizovanih keto derivata žučnih kiselina pri temperaturi od 240 °C, nakon 15 minuta mikrotalasnog ozračivanja, dobijena je 5 $\beta$ -holanska kiselina (**57**), (Shema 3.28.). Od značaja je istaći da je u odnosu na klasičan postupak reakcije redukcije reakciono vreme skraćeno za više od četrnaest sati. Derivatizacijom sintetizovane tetraciklične kiseline u zatvorenom sistemu mikrotalasnog reaktora *CEM Discover BenchMate* dobijen je *N*-fenil-5 $\beta$ -holan-24-amid (**58**, 69 %) i *N*-morfolil-5 $\beta$ -holan-24-amid (**59**, 78%), (Shema 3.29.). Pored toga, keto derivati žučnih kiselina pokazali su se i kao veoma značajni intermedijeri u reakcijama reduktivne aminacije u cilju dobijanja amina tetracikličnih naftenskih kiselina. Mikrotalasnim ozračivanjem smeše 3-okso-5 $\beta$ -holanske kiseline (**56**) i anilina u dihloretanu sa natrijum-triacetoksiborhidridom i glacijalnom sirćetnom kiselinom sintetizovana je 3 $\beta$ -fenilamino-5 $\beta$ -holanska kiselina (**60**) u prinosu od 58 % (Shema 3.30.). Efikasnost mikrotalasnog dielektričnog zračenja potvrđena je i u okviru hemijskih transformacija hidroksilnih, keto i karboksilnih funkcionalnih grupa žučnih kiselina, odnosno u reakcijama formilovanja i acetilovanja, kao i esterifikaciji i amidaciji žučnih kiselina (Shema 3.22.; 3.23., 3.25.; 3.26.; 3.31.).

U trećoj, finalnoj fazi ovog rada ispitana je biološka aktivnost slobodnih naftenskih kiselina izolovanih iz atmosferskog gasnog ulja nafte *Velebit*, komercijalnih *Aldrich* naftenskih kiselina, kao i njihovih finalnih derivata (amida, estara i holin-estara) i model smeše formirane od sintetizovanih derivata individualnih kiselina.

- ✓ Ispitivanjem auksinske aktivnosti, testom inhibicije klijanja semena slačice, određeno je da dva od osam ispitivanih derivata naftenskih kiselina *Velebit* i *Aldrich* inhibišu klijanje više nego 3-indolsirćetna kiselina u koncentraciji 10<sup>-5</sup> M (Slika 3.18.; 3.19.). Poređenjem auksinske aktivnosti sintetizovanih amida naftenskih kiselina *Velebit* (**27**, **28**, **29**, **36**), utvrđeno je da se hemijskom transformacijom karboksilne funkcionalne grupe u amidnu postiže visoka auksinska aktivnost kod derivata *N*-fenil- (**27**) i *N*-benzilamida (**28**) naftenskih kiselina *Velebit*. Sintetizovani anilidi individualnih naftenskih kiselina (**17**, **18**, **19**, **20** i **58**) delovali su veoma

inhibitorno u odnosu na IAA, što znači da imaju izrazitu auksinsku aktivnost određenu u testu sa semenom slačice, a takođe visoku auksinsku aktivnost pokazuje i model smeša MS2, smeša anilida individualnih karboksilnih kiselina (Slika 3.20.).

- ✓ U okviru testa ožiljavanja reznica suncokreta uočeno je da rastvori naftenskih kiselina *Velebit* i *Aldrich* stimulišu formiranje adventivnih korenova. Broj korenova po biljci je i do pet puta veći kod biljaka koje su bile potopljene u rastvor amida morfolina naftenskih kiselina *Velebit* (**36**) i holin-estara naftenskih kiselina *Aldrich* (**44**) u odnosu na one koje su bile potopljene u vodu (Slika 3.21.; 3.22.).
- ✓ Anilidi individualnih naftenskih kiselina takođe su se pokazali kao stimulatori formiranja adventivnih korenova suncokreta, pri čemu je najviši stimulatorni efekat zabeležen nakon tretiranja reznica suncokreta anilidima benzoeve (**17**), adamantanske (**20**) i holanske kiseline (**58**). Poređenjem efikasnosti ožiljavanja reznica suncokreta model smeše slobodnih karboksilnih kiselina (MS1) i anilida individualnih karboksilnih kiselina (MS2) očigledno je da hemijskom transformacijom karboksilne funkcionalne grupe u amidnu dolazi do povećanja stimulativnog efekta naftenskih kiselina na ožiljavanje biljaka, kao i to da istom posebno doprinose policiklične karboksilne kiseline (Slika 3.23.).
- ✓ Ispitivanjem antiproliferativne aktivnosti, uočena je jaka inhibicija rasta ćelijskih linija MDA-MB-231 (IC<sub>50</sub> 2.14 μM), HT-29 (IC<sub>50</sub> 2.39 μM) i A549 (IC<sub>50</sub> 11.55 μM) komercijalnih naftenskih kiselina *Aldrich*, dok je slabu citotoksičnu aktivnost ispoljio odgovarajući sintetizovani derivat **30** prema ćelijskoj liniji MDA-MB-231 (IC<sub>50</sub> 60.28 μM) i jedinjenja **42** prema ćelijskoj liniji HT-29 (IC<sub>50</sub> 22.39 μM). Smeša prirodnih naftenskih kiselina *Velebit* ispoljila je jaku antiproliferativnu aktivnost prema samo jednoj ćelijskoj liniji, HT-29 (IC<sub>50</sub> 11.77 μM).
- ✓ Ispitivanjem uticaja slobodnih i derivatizovanih naftenskih kiselina *Velebit* na brojnost ispitivanih sojeva *Pseudomonas* sp. uočen je njihov stimulativni efekat (soja P Violeta i PS2) pri čemu je uticaj anilida naftenskih kiselina na brojnost mikroorganizama veći u odnosu na smešu prirodnih naftenskih kiselina *Velebit*. Sintetizovani derivati **36** i **44** takođe su se pokazali kao stimulatori razmnožavanja bakterijskog soja *Pseudomonas* sp. PS2 (Tabela 3.10.; 3.11.). Ovaj test daje veoma važan podatak sa aspekta ekologije jer su naftenske kiseline veliki zagađivači prirode tako da bi prevođenjem u neke od adekvatnih derivata bila omogućena mikrobiološka degradacija kiselina u prirodi.

## 6. SKRAĆENICE

Ac – acetil

API – *Active Pharmaceutical Ingredient* (lekovita supstanca)

Ar – aromatični sistem

BAILS – *Brønsted*-ove kiseline kao jonske tečnosti

BSTFA – *N,O*-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamid

CA – holna kiselina

CDCA – henodeoksiholna kiselina

DP – *drug product* (gotov proizvod)

E<sub>a</sub> – energija aktivacije

EMA – *European Agency for the Evaluation of Medical Products* (Evropska agencija za procenu medicinskih proizvoda)

FDA – *Food and Drug Administration* (Američka agencija za kontrolu hrane i lekova)

FO – optički senzor

GA<sub>3</sub> – giberelinska kiselina

GC-MS – gasna hromatografija-masena spektrometrija

HPLC – tečna hromatografija visokih performansi

IAA – 3-indolsirćetna kiselina

ICH – *International Conference on Harmonisation* (Internacionalna konferencija za harmonizaciju)

IC<sub>50</sub> – koncentracija ispitivanog jedinjenja pri kojoj se broj tretiranih ćelija smanjuje za 50% u odnosu na kontrolu

IR – infracrveni senzor

LCA – litoholna kiselina

LC-MS – tečna hromatografija-masena spektrometrija

MAOS - *Microwave Assisted Organic Synthesis* (mikrotalasno-stimulisana organska sinteza)

Me – metil

MS1 – smeša slobodnih, individualnih karboksilnih kiselina

MS2 – smeša anilida individualnih karboksilnih kiselina

MW – *microwaves* (mikrotalasi)

NAs – *naphthenic acids* (naftenske kiseline)

NMP – 1-metil-2-pirolidon

OGT-F – optički senzor (*TempSens signal conditioner, Opsens*)

PGPR – *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*

Ph – fenil

Pyr3 – etil-1-[4-(2,3,3-trihlorakrilamido)fenil]-5-(trifluormetil)-1*H*-pirazol-4-karboksilat)

Pyrex – borsilikatno staklo

SiC – silicijum karbid

tan  $\delta$  - tangens gubitka

WHO – *World Health Organisation* (svetska zdravstvena organizacija)

## 7. LITERATURA

1. R. Gedye, F. Smith, K. Westaway, H. Ali, L. Baldisera, L. Laberge, J. Rousell, *Tetrahedron Letters* **27** (1986) 279.
2. R.J. Giguere, T.L. Bray, S.M. Duncan, G. Majetich, *Tetrahedron Letters* **27** (1986) 4945.
3. A. Loupy (2002) *Microwaves in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim.
4. B.L. Hayes (2002) *Microwave Synthesis: Chemistry at the Speed of Light*, CEM Publishing, Matthews.
5. M. Larhed, K. Olofsson (2006) *Microwave Methods in Organic Synthesis*, Springer, Berlin.
6. M. Larhed, A. Hallberg, *Drug Discovery Today* **6** (2001) 406.
7. W.D. Shipe, S.E. Wolkenberg, C.W. Lindsley, *Drug Discovery Today: Technologies* **2** (2005) 155.
8. F. Mavandadi, A. Pilotti, *Drug Discovery Today* **11** (2006) 165.
9. A. Chighine, G. Sechi, M. Bradley, *Drug Discovery Today* **12** (2007) 459.
10. F. Wiesbrock, R. Hoogenboom, U.S. Schubert, *Macromolecular Rapid Communications* **25** (2004) 1739.
11. U.S. Schubert, R. Hoogenboom, *Macromolecular Rapid Communications* **28** (2007) 368.
12. S. Barlow, S.R. Marder, *Advanced Functional Materials* **13** (2003) 517.
13. J. Perelaer, B.-J. de Gans, U.S. Schubert, *Advanced Material* **18** (2006) 2101.
14. S.H. Jung, T. Jin, Y.K. Hwang, J.-S. Chang, *Chemistry-A European Journal* **13** (2007) 4410.
15. M. Tsuji, M. Hashimoto, Y. Nishizawa, M. Kubokawa, T. Tsuji, *Chemistry-A European Journal* **11** (2005) 440.
16. J.M. Collins, N.E. Leadbeater, *Organic and Biomolecular Chemistry* **5** (2007) 1141.
17. J.R. Lill, E.S. Ingle, P.S. Liu, V. Pham, W.N. Sandoval, *Mass Spectrometry Reviews* **26** (2007) 657.
18. C.O. Kappe, D. Dallinger, S.S. Murphree (2006) *Practical Microwave Synthesis for Organic Chemists*, Wiley-VCH, Weinheim.
19. R.S. Varma, *Green Chemistry* **1** (1999) 43.
20. R.S. Varma, *Tetrahedron* **58** (2002) 1235.
21. A. Loupy, *Comptes Rendus Chimie* **7** (2004) 103.
22. J. Robinson, S. Kingman, D. Irvine, P. Licence, A. Smith, G. Dimitrakis, D. Obermayer, C. O. Kappe, *Physical Chemistry Chemical Physics* **12** (2010) 4750.
23. N. Kuhnert, *Angewandte Chemie-International Edition* **41** (2002) 1863.
24. C.R. Strauss, *Angewandte Chemie-International Edition* **41** (2002) 3589.

25. L. Perreux, A. Loupy, *Tetrahedron* **57** (2001) 9199.
26. K.D. Raner, C.R. Strauss, R.W. Trainor, J.S. Thorn, *Australian Journal of Chemistry* **60** (1995) 2456.
27. B.A. Roberts, C.R. Strauss, *Accounts of Chemical Research* **38** (2005) 653.
28. C.O. Kappe, *Angewandte Chemie-International Edition* **43** (2004) 6250.
29. C.O. Kappe, E. Van der Eycken, *Chemical Society Reviews* **39** (2010) 1280.
30. P. Lidstrom, J. Tiernez, B. Wathey, J. Westman, *Tetrahedron* **57** (2001) 9225.
31. D.V. Kuznetsov, V.A. Raev, G.L. Kuranov, O.V. Arapov, R.R. Kostikov, *Russian Journal of Organic Chemistry* **41** (2005) 1719.
32. C.O. Kappe, *Molecular Diversity* **7** (2003) 95.
33. N.E. Leadbeater, *Tetrahedron* **62** (2006) 4623.
34. Biotage Pathfinder Database (<http://www.biotagepathfinder.com>).
35. Microwave Chemistry Literature Highlights (<http://www.organic-chemistry.org/Highlights/microwave.shtm>).
36. The Kappe Group Homepage (<http://www.maos.net>).
37. A.R. Katritzky, C. Cai, M.D. Collins, E.F.V. Scriven, S.K. Singh, E.K. Barnhardt, *Journal of Chemical Education* **83** (2006) 634.
38. W. Karuehanon, W. Fanfuenha, A. Rujiwatra, M. Pattarawarapan, *Tetrahedron Letters* **53** (2012) 3486.
39. T.A. Shell, J.R. Shell, K.A. Poole, T.F. Guetzloff, *Journal of Chemical Education* **88** (2011) 1439.
40. American Chemical Society, *Journal of Organic Chemistry* (<http://pubs.acs.org/journal/joceah>).
41. D.R. Baghurst, D.M.P. Mingos, *Chemical Society Reviews* **20** (1991) 1.
42. C. Gabriel, S. Gabriel, E.H. Grant, B.S. Halstead, D.M.P. Mingos, *Chemical Society Reviews* **27** (1998) 213.
43. D.V. Stass, J.R. Woodward, C.R. Timmel, P.J. Hore, K.A. McLauchlan, *Chemical Physics Letters* **329** (2000) 15.
44. C.R. Timmel, P.J. Hore, *Chemical Physics Letters* **257** (1996) 401.
45. C.O. Kappe, *Chemical Society Reviews* **37** (2008) 1127.
46. D. Bogdal, A. Prociak (2007) *Microwave-Enhanced Polymer Chemistry and Technology*, Blackwell Publishing, Oxford.
47. P. Lidstrom, J.P. Tierney (2005) *Microwave-Assisted Organic Synthesis*, Blackwell Publishing, Oxford.
48. M. Nuchter, B. Ondruschka, W. Bonrath, A. Gum, *Green Chemistry* **6** (2004) 128.
49. A. de La Hoz, A. Diaz-Ortiz, A. Moreno, *Current Organic Chemistry* **8** (2004) 903.

50. C.O. Kappe, B. Pieber, D. Dallinger, *Angewandte Chemie-International Edition* **52** (2013) 1088.
51. K. Bougrin, A.K. Bannani, S.F. Tetouani, M. Soufiaoui, *Tetrahedron Letters* **35** (1994) 8373.
52. S. Horikoshi, S. Iida, M. Kajitani, S. Sato, N. Serpone, *Organic Process Research & Development* **12** (2008) 257.
53. H. Koizumi, Y. Itoh, T. Ichikawa, *Chemistry Letters* **35** (2006) 1350.
54. A. Stadler, C.O. Kappe, *European Journal of Organic Chemistry* **3** (2001) 919.
55. D.R. Baghurst, D.M.P. Mingos, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **9** (1992) 674.
56. R. Saillard, M. Poux, J. Berlan, M. Audhuy-Peaudecerf, *Tetrahedron* **51** (1995) 4033.
57. F. Chemat, E. Esveld, *Chemical Engineering & Technology* **24** (2001) 735.
58. J.P. Gilday, P. Lenden, J.D. Moseley, B.G. Cox, *The Journal of Organic Chemistry* **73** (2008) 3130.
59. N.-F.K. Kaiser, U. Bremberg, M. Larhed, C. Moberg, A. Hallberg, *Angewandte Chemie-International Edition* **39** (2000) 3596.
60. R. Laurent, A. Laporterie, J. Dubac, J. Berlan, S. Lefeuvre, M. Audhuy, *The Journal of Organic Chemistry* **57** (1992) 7099.
61. J.D. Moseley, C.O. Kappe, *Green Chemistry* **13** (2011) 794.
62. J. Jacob, L.H.L. Chia, F.Y.C. Boey, *Journal of Materials Science* **30** (1995) 5321.
63. J.G.P. Binner, N.A. Hassine, T.E. Cross, *Journal of Materials Science* **30** (1995) 5389.
64. C. Shibata, T. Kashima, K. Ohuchi, *Japanese Journal of Applied Physics* **35** (1996) 316.
65. A. de La Hoz, A. Diaz-Ortiz, A. Moreno, *Chemical Society Reviews* **34** (2005) 164.
66. A. Loupy, F. Maurel, A. Sabatie-Gogova, *Tetrahedron* **60** (2004) 1683.
67. M.A. Herrero, J.M. Kremsner, C.O. Kappe, *The Journal of Organic Chemistry* **73** (2008) 36.
68. C.O. Kappe, *Chemical Society Reviews* **42** (2013) 4977.
69. B.L. Hayes, *Aldrichimica Acta* **37** (2004) 66.
70. J.J. Chen, S.V. Deshpande, *Tetrahedron Letters* **44** (2003) 8873.
71. F. Mathew, K.N. Jayaprakash, B. Fraser-Reid, J. Mathew, J. Scicinski, *Tetrahedron Letters* **44** (2003) 9051.
72. C.J. Bennett, S.T. Caldwell, D.B. McPhail, P.C. Morrice, G.G. Duthie, R.C. Hartley, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **12** (2004) 2079.
73. M. Nuchter, B. Ondruschka, D. Weiß, W. Bonrath, A. Gum, *Chemical Engineering & Technology* **28** (2005) 871.
74. N.E. Leadbeater, S.J. Pillsbury, E. Shanahan, V.A. Williams, *Tetrahedron* **61** (2005) 3565.
75. M. Hosseini, N. Stiasni, V. Barbieri, C.O. Kappe, *The Journal of Organic Chemistry* **72** (2007) 1417.

76. J.M. Kremsner, C.O. Kappe, *The Journal of Organic Chemistry* **71** (2006) 4651.
77. Highlights in SiC research (<http://img.chem.ucl.ac.uk/www/kelly/moissanite.htm>).
78. J.M. Kremsner, M. Rack, C. Pilger, C.O. Kappe, *Tetrahedron Letters* **50** (2009) 3665.
79. F. Meschke, G. Riebler, V. Hessel, J. Schrer, T. Baier, *Chemical Engineering and Technology* **28** (2005) 465.
80. G.L. Harris (1995) *Properties of Silicon Carbide*, Institute of Electrical Engineers, London.
81. S.-K. Lee (2002) *Doktorska disertacija*, Royal Institute of Technology Department of Microelectronics and Information Technology Device Technology Laboratory, Stockholm.
82. D. Obermayer, B. Gutmann, C.O. Kappe, *Angewandte Chemie-International Edition* **121** (2009) 8471.
83. V. Polshettiwar, R.S. Varma, *Accounts of Chemical Research* **41** (2008) 629.
84. D. Dallinger, C.O. Kappe, *Chemical Reviews* **107** (2007) 2563.
85. J.M. Kremsner, A. Stadler, C.O. Kappe, *Journal of Combinatorial Chemistry* **9** (2007) 285.
86. T. Razzaq, J.M. Kremsner, C.O. Kappe, *Journal of Organic Chemistry* **73** (2008) 6321.
87. M. Treu, T. Karner, R. Kousek, H. Berger, M. Mayer, D.B. McConnell, A. Stadler, *Journal of Combinatorial Chemistry* **10** (2008) 863.
88. M. Koppitz, *Journal of Combinatorial Chemistry* **10** (2008) 573.
89. M. Damm, C.O. Kappe, *Molecular Diversity* **13** (2009) 529.
90. M. Damm, C.O. Kappe, *Journal of Combinatorial Chemistry* **11** (2009) 460.
91. FDA (2003) Guidance for Industry Q1A (R2) *Stability Testing of New Drug Substances and Products*, U.S. Department of health and Human Services, Rockville.
92. S. Yoshioka, V.J. Stella (2002) *Stability of Drugs and Dosage Forms*, Kluwer Academic Publisher, New York.
93. K.M. Alsante, A. Ando, R. Brown, J. Ensing, T.D. Hatajik, W. Kong, Y. Tsuda, *Advanced Drug Delivery Reviews* **59** (2007) 29.
94. S. Singh, M. Bakshi, *Pharm Technol On-line* **24** (2000) 1.
95. J.T. Carstensen, C.T. Rhodes (2000) *Drug Stability Principles and Practices*, Marcel Dekker, New York.
96. P. Srinivasu, V.D. Subbarao, V.K.R. Vegesna, S.K. Babu, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **52** (2010) 142.
97. S.V.I. Raju, P. Raghuram, J. Sriramulu, *Chromatographia* **70** (2009) 545.
98. L. Bajerski, R.C. Rossi, C.L. Dias, M.A. Bergold, P.E. Froehlich, *Chromatographia* **68** (2008) 991.
99. Y. Bao, X. Mo, X. Xu, Y. He, X. Xu, H. An, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **48** (2008) 664.



100. S. Sonawane, P. Gide, *Scientia Pharmaceutica* **79** (2011) 85.
101. A. Madhavi, G.S. Reddy, M.V. Suryanarayana, A. Naidu, *Chromatographia* **68** (2008) 399.
102. A. Treibs, *Ann. Chem.* **510** (1934) 42.
103. V.S. Aksenov, T.A. Sagachenko, F.V. Kamyaynov, *Naftekhimija* **23** (1983) 3.
104. J.E. Cooper, E.E. Bray, *Geochemica et Cosmochimica Acta* **27** (1983) 1113.
105. L.R. Nascimento, L.M.C. Reboucas, L. Koike, F. de A.M. Reis, A.L. Soldan, J.R. Cerqueira, A.J. Marsaioli, *Organic Geochemistry* **30** (1999) 1175.
106. J. Cason, D. W. Graham, *Tetrahedron* **21** (1965) 471.
107. J. Cason, I. A. Khodair, *Journal of Organic Chemistry* **32** (1967) 3430.
108. E.J. Gallegos, J.W. Green, L.P. Lindeman, R.L. LeTourneau, R.M. Teeter, *Analytical Chemistry* **39** (1967) 1838.
109. W.K. Seifert, E.J. Gallegos, R.M. Teeter, *Angewandte Chemie* **10** (1971) 747.
110. J. Konterus, *Journal of the Institute of Petroleum* **43** (1957) 307.
111. P. Haug, H.K. Schnoes, A.Z. Burlingame, *Geochimica et Cosmochimica Acta* **32** (1968) 358.
112. J.A. Brient, P.J. Wessner, M.N. Doyle (1995) *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology Naphthenic acids*, John Wiley and Sons, New York.
113. J.V. Headley, D.W. McMartin, *Journal of Environmental Science and Health A* **39** (2004) 1989.
114. D.C. Herman, P.M. Fedorak, J.W. Costerton, *Canadian Journal of Microbiology* **39** (1993) 576.
115. B.E. Smith, S.J. Rowland, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22** (2008) 3909.
116. J.S. Clemente, P.M. Fedorak, *Chemosphere* **60** (2005) 585.
117. D.C.L. Wong, R. van Compernelle, J.G. Nowlin, D.L. O'Neal, G.M. Johnson, *Chemosphere* **32** (1996) 1669.
118. S.S. Leung, M.D. MacKinnon, R.E.H. Smith, *Aquatic Toxicology* **62** (2003) 11.
119. A. Zhang, Q. Ma, K. Wang, X. Liu, P. Shuler, Y. Tang, *Applied Catalysis A-General* **303** (2006) 103.
120. M. Huang, S. Zhao, P. Li, D. Huisingh, *Journal of Cleaner Production* **14** (2006) 736.
121. Y. Wang, Z. Chu, B. Qiu, C. Liu, Y. Zhang, *Fuel* **85** (2006) 2489.
122. R.S. Kuliev, B.A. Sadykhova, Z.A. Abdullaeva, N.S. Rudnitskaya, *Chemische Technik (Leipzig)* **23** (1971) 37.
123. S.A. Fam, *Hungarian Journal of Industrial Chemistry* **12** (1984) 41.
124. M. Hilal, S.A. Fam, M.M. El-Sukkary, E.M. Sadek, *Petrochemie* **48** (1995) 24.
125. B.S. Kochetygov, P.I. Levenko, *Kozhevenno-Obuvnaya Promyshlennost* **10** (1983) 42.
126. S. Repić, D. Čomić, V. Ćirin-Novta, *Hemijska industrija* **51** (1997) 335.
127. W. Brown, *IDrugs* **2** (1999) 1059.

128. F. Albericio, *Current Opinion in Chemical Biology* **8** (2004) 211.
129. J.C. Sheehan, G.P. Hess, *Journal of the American Chemical Society* **77** (1955) 1067.
130. J.D. Wilson, C.F. Hobbs, H.J. Wengaten, *Journal of Organic Chemistry* **15** (1970) 1542.
131. C. Burnell-Curty, E.J. Roskamp, *Tetrahedron Letters* **34** (1993) 5193.
132. P. Froyen, *Synthetic Communications* **25** (1995) 959.
133. D.O. Jang, D.J. Park, J. Kim, *Tetrahedron Letters* **40** (1999) 5323.
134. B.S. Jursic, Z. Zdravkovski, *Synthetic Communications* **23** (1993) 2761.
135. J.A. Mitchell, E.E. Reid, *Journal of the American Chemical Society* **53** (1931) 1879.
136. E.E. Shepard, H.D. Porter, J.F. Noth, C.K. Simmans, *Journal of Organic Chemistry* **17** (1952) 568.
137. E.T. Roe, J.T. Scanlan, D. Swern, *Journal of the American Chemical Society* **71** (1949) 2215.
138. J. Cossy, C. Pale-Grosdemange, *Tetrahedron Letters* **30** (1989) 2771.
139. L.J. Gooben, D.M. Ohlmann, P.P. Lange, *Synthesis* **1** (2008) 160.
140. P. Ruault, J.F. Pilard, B. Touaux, F. Texwer-Boullet, J. Hamelin, *Synlett* **5** (1994) 935.
141. B.W. Baldwin, T. Hirose, Z.H.J. Wang, *Chemical Communications* **23** (1996) 2669.
142. S. Gadhwal, M.P. Dutta, A. Boruah, D. Prajapati, J.S. Sandhu, *Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry* **37** (1998) 725.
143. A.R. Hajipour, M. Ghasemi, *Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry* **40** (2001) 504.
144. S. Chandrasekhar, M. Takhi, G. Uma, *Tetrahedron Letters* **38** (1997) 8089.
145. H. Marquez, A. Plutin, Y. Rodriguez, E. Perez, A. Loupy, *Synthetic Communications* **30** (2000) 1067.
146. A. Khalafi-Nezhad, B. Mokhtari, M. Navid Soltani Rad, *Tetrahedron Letters* **44** (2003) 7325.
147. C.S. Reddy, A. Nagaraj, P. Jalapathi, *Chinese Chemical Letters* **18** (2007) 1213.
148. A. Loupy, A. Pett, J. Hamelin, F. Taxier-Boullet, P. Jacquault, D. Mathe, *Synthesis - Stuttgart* (1998) 1213.
149. R.S. Varma, *Green Chemistry* (1999) 1213.
150. R. Varma, K. Naicker, *Tetrahedron Letters* **40** (1999) 6177.
151. L. Perreux, A. Loupy, *Tetrahedron* **57** (2001) 9199.
152. L. Perreux, A. Loupy, F. Volatron, *Tetrahedron* **58** (2002) 2155.
153. E. Gelens, L. Smeets, L. Sliedregt, B. Van Steen, C. Kruse, R. Leurs, R.V. Orru, *Tetrahedron Letters* **46** (2005) 3751.
154. F. Massicot, R. Plantier-Royon, C. Portella, D. Saleur, A. Sudha, *Synthesis - Stuttgart* **16** (2001) 2441.
155. L. Perreux, A. Loupy, M. Delmotte, *Tetrahedron* **59** (2003) 2185.

156. N. Karis, W. Loughlin, I. Jenkins, *Tetrahedron* **63** (2007) 12303.
157. M. Gordon, J.G. Miller, A.R. Daz, *Journal of the American Chemical Society* **70** (1948) 1946.
158. P. Bobal, J. Suján, J. Otevrel, A. Imramovsky, Z. Padelkova, J. Jampilek, *Molecules* **17** (2012) 1292.
159. J. Otera, Esterification Methods. Reactions and Applications; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2003.
160. M.L.M. Fernandes, E. Bolzani Saad, J.A. Meira, L.P. Ramos, D.A. Mitchell, N.J. Krieger, *Journal of Molecular Catalysis B - Enzymatic* **44** (2007) 8.
161. Y. Liu, E. Lotero, J.G.J. Goodwin, *Journal of Catalysis* **243** (2006) 221.
162. S.L. Barbosa, M.J. Dabdoub, G.R. Hurtado, S.I. Klein, A.C.M. Baroni, C. Cunha, *Applied Catalysis a-General* **313** (2006) 146.
163. W.B. Pan, F.R. Chang, L.M. Wei, M.J. Wu, Y.C. Wu, *Tetrahedron Letters* **44** (2003) 331.
164. K. Mohammed Khan, G.M. Maharvi, S. Hayat, Z. Ullah, M.L. Choudhary, A. Rahman, *Tetrahedron* **59** (2003) 5549.
165. B.M. Trost, *Science* **254** (1991) 1471.
166. B.M. Trost, *Angewandte Chemie International Edition* **34** (1995) 259.
167. K. Ishihara, M. Nakayama, S. Ohara, H. Yamamoto, *Tetrahedron* **58** (2002) 8179.
168. A.K. Chakraborti, B. Singh, S.V. Chankeshwara, A.R. Patel, *Journal of Organic Chemistry* **74** (2009) 5967.
169. J.S. Wilkes, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **214** (2004) 11.
170. B. Major, I. Kelemen-Horváth, Z. Csanádi, K. Bélafi-Bakó, L. Gubicza, *Green Chemistry* **11** (2009) 614.
171. X.J. Liao, G.S.V. Raghavan, V.A. Yaylayan, *Tetrahedron Letters* **43** (2002) 45.
172. X. Li, W. Eli, G. Li, *Catalysis Communications* **9** (2008) 2264.
173. H. Shi, W. Zhu, H. Li, H. Liu, M. Zhang, Y. Yan, Z. Wang, *Catalysis Communications* **11** (2010) 588.
174. J.B. Green, B.K. Stierwalt, J.S. Thomson, C.A. Treese, *Analytical Chemistry* **57** (1985) 2207.
175. W.K. Seifert, W.G. Howells, *Analytical Chemistry* **41** (1969) 554.
176. T. Barth, S. Hoiland, P. Fotland, K.M. Askvik, B.S. Pedersen, A.E. Borgund, *Organic Geochemistry* **35** (2004) 1513.
177. F.M. Holowenko, M.D. MacKinnon, P.M. Fedorak, *Water Research* **36** (2002) 2843.
178. J.S. Clemente, P.M.J. Fedorak, *Journal of Chromatography A* **1047** (2004) 117.
179. A.G. Shepher, V. van Mispelaar, J. Nowlin, W. Genuit, M. Grutters, *Energy Fuels* **24** (2010) 2300.

180. V. Ćirin-Novta, K. Kuhajda, S. Kevrešan, J. Kandrač, Lj. Grbović, Đ. Vujin, *Journal of the Serbian Chemical Society* **71** (2006) 1263.
181. J. Severson, *Phytochemistry* **11** (1972) 71.
182. V. Ćirin-Novta, A. Lazić, T. Savkov, S. Repić, D. Miljković, *IV Sastanak hemičara Vojvodine, Zrenjanin* (1984).
183. R. Kastori, N. Petrovic, T. Savkov, D. Miljkovic, *Acta Biological Medical Experiments* **13** (1988) 83.
184. D. Miljković, V. Ćirin-Novta, S. Repić, *Zbornik Matice Srpske za prirodne nauke* **83** (1992) 33.
185. V. Ćirin-Novta (1991) *Doktorska disertacija*, PMF Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
186. V. Ćirin-Novta, K. Kuhajda, S. Kevrešan, J. Kandrač, Lj. Radić, *Acta Periodica Technologica* **33** (2002) 135.
187. V. Ćirin-Novta, K. Kuhajda, S. Kevrešan, J. Kandrač, Lj. Grbović, P. Rodić, *Acta Periodica Technologica* **35** (2004) 87.
188. Lj. Grbović, K. Pavlović, B. Prekodravac, K. Kuhajda, S. Kevrešan, M. Popsavin, J. Milić, V. Ćirin-Novta, *Journal of the Serbian Chemical Society* **77** (2012) 147.
189. M. Turkyilmaz, M.T. Otkun, A. Feyizoglu, *B. Serisi Fen Bilimleri* **4** (2003) 17.
190. M.A. Samedov, L.I. Alieva, V.M. Abbasov, *Protectio of Metals* **44** (2008) 397.
191. C. Neuberg, M. Sandberg, *Biochemische Zeitschrift* **126** (1921) 153.
192. V.V. Rogers, K. Liber, M.D. MacKinnon, *Chemosphere* **48** (2002) 519.
193. V.V. Rogers, M. Wickstrom, K. Liber, M.D. MacKinnon, *Toxicological Sciences* **66** (2002) 347.
194. B.K. Dokholyan, A.K. Magomedov, *Journal of Ichthyology* **23** (1984) 125.
195. L.L. Schramm, „Surfactants: Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry”, Cambridge University Press, Cambridge (2000).
196. S. Mishra (2009) *Doktorska disertacija*, University of Saskatchewan, Saskatoon.
197. R.A. Frank, R. Kavanagh, B.K. Burnison, G. Arsenault, K.M. Peru, G.V.D. Kraak, K.R. Solomon, J.V. Headley, *Chemosphere* **72** (2008) 1309.
198. S.A. Armstrong, J.V. Headley, K.M. Peru, J.J. Germida, *Journal of Enviromental Science and Healt. Part A, Toxic* **43** (2008) 36.
199. V.G. Van Baelen, B.U.W. Maes, *Tetrahedron* **64** (2008) 5604.
200. P. Appukkuttan, E. Van der Eycken, *European Journal of Organic Chemistry* **7** (2008) 1133.
201. P. Nilsson, K. Olofsson, M. Larhed, *Topics in Current Chemistry* **266** (2006) 103.
202. M. Larhed, C. Moberg, A. Hallberg, *Accounts of Chemical Research* **35** (2002) 717.
203. B. Gutmann, D. Obermayer, B. Reichart, B. Prekodravac, M. Irfan, J.M. Kremsner, C.O. Kappe, *Chemistry-A European Journal* **16** (2010) 12182.

204. T.Y. Shen, S. Lucas, L.H. Sarett, A. Rosegrey, G.W. Nuss, J.T. Willett, R.L. Ellis, F.W. Holly, A.R. Matzuk, A.N. Wilson, C.A. Winter, T.B. Windholz, E.A. Risley, C.H. Stammer, W.J. Holtz, B.E. Witzel, *Journal of the American Chemical Society* **85** (1963) 488.
205. B.R. Hajratwala, J.E. Dawson, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **66** (1977) 27.
206. S.H. Curry, E.A. Brown, H. Kuck, S. Cassin, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **60** (1981) 988.
207. A.H. Archontaki, *Analyst* **120** (1995) 2627.
208. J.T. Carstensen, T. Morris, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **82** (1993) 657.
209. M. Rusu, M. Olea, D. Rusu, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **24** (2000) 19.
210. W. Zhou, R.K. Gilpin, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **93** (2004) 1545.
211. B. Garcia, F.J. Hoyuelos, S. Ibeas, J.M. Leal, *Journal of Organic Chemistry* **71** (2006) 3718.
212. M. Li, B. Conrad, G.R. Maus, M.S. Pitzenberger, R. Subramanian, X. Fang, A.J. Kinzer, J.H. Perpall, *Tetrahedron Letters* **46** (2005) 3533.
213. X. Chen, K.R. Morris, U.J. Griesser, S.R. Byrn, J.G. Stowell, *Journal of American Chemical Society* **124** (2002) 15012.
214. T.N. Glasnov, K. Groschner, C.O. Kappe, *ChemMedChem* **4** (2009) 1816.
215. D. McTavish, M.T. Buckley, R.C. Heel, *Drugs* **42** (1991) 138.
216. P.N. Maton, *The New England Journal of Medicine* **324** (1991) 965.
217. B. Wallmark, P. Lorentzon, H. Larsson, *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **108** (1985) 37.
218. B. Wallmark, P. Lindberg, *Pharmacology* **1** (1987) 158.
219. A. Brandstrom, P. Lindberg, N-K. Bergman, T. Alminger, K. Ankner, U. Junggren, *Acta Chemica Scandinavica* **43** (1989) 538.
220. M. DellaGreca, M.R. Iesce, L. Previtiera, M. Rubino, F. Temussi, M. Brigante, *Chemosphere* **63** (2006) 1087.
221. B. Prekodravac, M. Damm, C.O. Kappe, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **56** (2011) 867.
222. A.A. Malik, R.J. Cormier, C.M. Sharts, *Organic Preparation and Procedures International* **18** (1986) 345.
223. K.Y. Tsern, P.D. Klein, *Steroids* **29** (1977) 635.
224. L. Fieser, S. Rajagopalan, *Journal of the American Chemical Society* **72** (1950) 5530.
225. M. Poša (2008) *Doktorska disertacija*, PMF Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
226. D. Škorić (2012) *Master rad*, PMF Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
227. B. Dayal, K. Rao, G. Salen, *Steroids* **60** (1995) 453.
228. J.R. McCarthy, D.P. Matthews, J.P. Paolini, *Organic Syntheses* **72** (1995) 209.

229. B.R. Travis, M. Sivakumar, G.O. Hollist, B. Borhan, *Organic Letters* **5** (2003) 1031.
230. R. Gandhari, P.P. Maddukuri, T.K. Vinod, *Journal of Chemical Education* **84** (2007) 852.
231. N. Hashimoto, A. Kanda, *Organic Process Research & Development* **6** (2002) 405.
232. W.C. Broshears, J.J. Esteb, J. Richter, A.M. Wilson, *Journal of Chemical Education* **81** (2004) 1018.
233. M. Sundar, D. Easwaramoorthy, S.K. Rani, M. Palanichamy, *Journal of Solution Chemistry* **36** (2007) 1129.
234. P.T. Lang, A.M. Harned, J.E. Wissinger, *Journal of Chemical Education* **88** (2011) 652.
235. S. Wu, H. Ma, Z. Lei, *Tetrahedron* **66** (2010) 8641.
236. G. Benedeković (1994) *Diplomski rad*, PMF Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
237. D. Štajner, V. Ćirin-Novta, A. Pavlović, *Zeitschrift fur Naturforschung-Section C Journal of Biosciences* **53** (1998) 871.
238. D. Štajner, V. Ćirin-Novta, K. Bajin-Katić, *Oxidation Communications* **24** (2001) 515.
239. Lj. Grbović (2009) *Doktorska disertacija*, PMF Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
240. T. Mosmann, *Journal of Immunological Methods* **65** (1983) 55.
241. S. Pavlović (2009) *Doktorska disertacija*, PMF, Novi Sad.
242. J.A. Newton, R.G. Fray, *Cellular Microbiology* **6** (2004) 213.
243. J.M. Raaijmakers, M. Vlami, J.T. Desouza, *Antonie Leeuwenhoek* **81** (2002) 537.
244. T.H. Nielsen, D. Sorensen, C. Tobiasen, J.B. Andersen, C. Christepersen, M. Givskov, J. Sorensen, *Applied and Environmental Microbiology* **68** (2002) 3416.
245. J.W. Kloepper, R. Rodriguez-Ubana, G.W. Zehnder, J.F. Murphy, E. Sikora, C. Fernandez, *Australasian Plant Pathology* **28** (1999) 21.

## 8. BIOGRAFIJA



Bojana Vasiljević (Prekodravac) je rođena 29.07.1983. godine u Osijeku, Republika Hrvatska. Srednju medicinsku školu "Draginja Nikšić" je završila u Sremskoj Mitrovici, smer farmaceutski tehničar. Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, u Novom Sadu je upisala 2002. godine, smer Diplomirani hemičar-profesor hemije. Diplomirala je 2007. godine nakon čega je iste godine upisala Diplomске akademske studije-master na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu. Školske 2008/09. godine upisala je Doktorske akademske studije hemije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Katedri za organsku hemiju, pod mentorstvom prof. dr Vere Ćirin-Novta.

U zvanje istraživača-pripravnik izabrana je 2007. godine, odnosno od 2010. godine u zvanje istraživača-saradnika. Od 2008. godine angažovana je na projektima Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Srbije: "Sinteza biološki aktivnih molekula i analoga od potencijalnog interesa za biomedicinu i agronomiju" i "Sinteza i biološka ispitivanja novih mimetika ili derivata odabranih citotoksičnih laktona, antitumorskog agensa tijazofurina i prirodnih naftnih kiselina". Od 2011-2013. godine bila je angažovana na jednom međunarodnom projektu IPA prekograničnog programa Mađarska-Srbija pod nazivom "Bile Acid Nanosystems as Molecule Carriers in Pharmaceutical Applications".

Učestvovala je u projektima međunarodne razmene studetana (Erasmus JoinEU-See i CEPPUS) u toku 2010. i 2011. godine i tom prilikom bila član Christian Doppler laboratorije za mikrotalasnu hemiju (CDLMC) Univerziteta u Gracu, pod rukovodstvom prof. dr Christian Oliver Kappe-a.

Autor i koautor je dva naučna rada u vrhunskom međunarodnom časopisu i tri rada u međunarodnom časopisu, deset naučnih saopštenja prezentovanih na međunarodnim i šest saopštenja prezentovanih na domaćim naučnim skupovima.

Član je Srpskog hemijskog društva.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

<b>Redni broj:</b> RBR	
<b>Identifikacioni broj:</b> IBR	
<b>Tip dokumentacije:</b> TD	Monografska dokumentacija
<b>Tip zapisa:</b> TZ	Tekstualni štampani materijal
<b>Vrsta rada:</b> VR	Doktorska disertacija
<b>Autor:</b> AU	Bojana R. Vasiljević
<b>Mentor:</b> MN	Dr Vera Ćirin-Novta, redovni profesor PMF-a u Novom Sadu u penziji
<b>Naslov rada:</b> NR	Mikrotalasno stimulisana sinteza odabranih derivata naftenskih i žučnih kiselina, ispitivanje njihove biološke aktivnosti kao i termičke i hemijske stabilnosti odabranih lekova
<b>Jezik publikacije:</b> JP	Srpski (latinica)
<b>Jezik izvoda:</b> JI	Srpski
<b>Zemlja publikovanja:</b> ZP	Srbija
<b>Uže geog. područje:</b> UGP	Vojvodina
<b>Godina:</b> GO	2014.
<b>Izdavač:</b> IZ	Autorski reprint
<b>Mesto i adresa:</b> MA	Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3
<b>Fizički opis rada:</b> FO	Broj poglavlja: 9 (uključujući poglavlje Prilog). Strana: 213 (60 strana poglavlja Prilog). Lit. citata: 245. Tabela: 23. Shema: 36. Slika: 188 (143 slika spektara u prilogu)
<b>Naučna oblast:</b> NO	Hemija
<b>Naučna disciplina:</b> ND	Mikrotalasna organska hemija
<b>Predmetna odrednica/Ključne reči:</b> PO	Naftenske kiseline, mikrotalasno-stimulisana sinteza, amidi, estri, silicijum-karbid, aktivne komponente lekova, mikrotalasni efekti,



	biološka aktivnost
UDK Čuva se: ČU	Biblioteka Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, PMF, Trg Dositeja Obradovića 3, Novi Sad
Važna napomena: VN	—
Izvod: IZ	<p>Predviđena istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji su usmerena u pravcu iznalaženja novih, efikasnijih i bržih mikrotalasno-stimulisanih metoda hemijskih transformacija koje ne uključuju prisustvo katalizatora i/ili organskih rastvarača. Primenom specijalnih silicijum-karbidnih reakcionih sudova, brzina i preciznost izvođenja mikrotalasno-stimulisanih transformacija prikazana je kroz stresne studije aktivnih farmaceutskih ingredijenata u SiC ploči, odnosno HPLC/GC vialima kao reakcionim sudovima. Ispitano je postojanje netermičkih mikrotalasnih efekata i njihov značaj za precizno tumačenje rezultata mikrotalasne sinteze.</p> <p>U drugom delu ove doktorske disertacije izvršena je mikrotalasno-stimulisana sinteza potencijalno biološki aktivnih supstanci iz prirodnih lako dostupnih materijala kao što su naftenske kiseline. Sintetizovani su amidi i estri individualnih i prirodnih naftenskih kiselina <i>Velebit</i>.</p> <p>U radu je takođe ispitana biološka aktivnost sintetizovanih derivata. Proučavan je uticaj prirodnih naftnih kiselina <i>Velebit</i> i njenih derivata na rast pet sojeva <i>Pseudomonas</i> sp., kao i uticaj odabranih sintetisanih jedinjenja na proliferaciju pet ćelijskih linija humanih tumora pri čemu je kao kontrola služila jedna zdrava humana ćelijska linija.</p>
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	21.09.2012.
Datum odbrane: DO	2014. godina
Članovi komisije: (Naučni stepen/ime/prezime/zvanje/fakultet) KO Predsednik: Mentor: Član: Član: Član:	<p>dr Janoš Čanadi, redovni profesor PMF-a u Novom Sadu</p> <p>dr Vera Ćirin-Novta, redovni profesor PMF-a u Novom Sadu u penziji</p> <p>dr Mirjana Popsavin, redovni profesor PMF-a u Novom Sadu</p> <p>dr Ljubica Grbović, docent PMF-a u Novom Sadu</p> <p>dr Slavko Kevrešan, redovni profesor Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu u penziji</p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY  
KEY WORD DOCUMENTATION**

<b>Accession number:</b> ANO	
<b>Identification number:</b> INO	
<b>Document type:</b> DT	Monograph documentation
<b>Type of record:</b> TR	Textual printed material
<b>Contents code:</b> CC	Doktorska disertacija
<b>Author:</b> AU	Bojana R. Vasiljević
<b>Mentor:</b> MN	Professor Vera Ćirin-Novta, PhD, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, retired
<b>Title:</b> TI	Microwave-assisted synthesis of selected naphthenic and bile acids derivatives, examin their biological activity as well as thermal and chemical stability of selected medicines
<b>Language of text:</b> LT	Serbian (Latin)
<b>Language of abstract:</b> LA	Serbian / English
<b>Country of publication:</b> CP	Serbia
<b>Locality of publication:</b> LP	Vojvodina
<b>Publication year:</b> PY	2014.
<b>Publisher:</b> PU	Author's reprint
<b>Publication place:</b> PP	Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3
Physical description: PD	Chapters: 9 (including the chapter Appendix). Pages: 213 (60 pages in the chapter Appendix). References: 245. Tables: 23. Schemes: 36. Figures: 188 (143 figures of spectras in the chapter Appendix).
Scientific field SF	Chemistry
Scientific discipline SD	Microwave-assisted organic chemistry
Subject, Key words SKW	Naphthenic acids, microwave-assisted synthesis, amides, esters, silicon-carbide, ingredients, microwave effects, biological activity.

Holding data: HD	Library of the Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental protection, Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 3, Novi Sad
Note: N	—
Abstract: AB	<p>Scientific research predicted in this PhD thesis is directed to ascertainment new, efficient and faster microwave-assisted methods of chemical transformations in the absence of catalysts and/or organic solvents. Applying special silicon-carbide reaction vessels, speed and accuracy of microwave-assisted transformations are illustrated within stress testing of active pharmaceutical ingredients in HPLC/GC vials placed in SiC plate. Existence of nonthermal microwave effects and their influence on accurate interpretation of microwave synthesis results are also investigated.</p> <p>In the second part of this thesis microwave-assisted synthesis of potentially biologically active compounds from readily available natural materials, such as naphthenic acid is accomplished. Amides and esters of individual and natural naphthenic acids <i>Velebit</i> are synthesised. The thesis also examined the biological activity of the synthesized products. The effect of natural petroleum acids <i>Velebit</i> and its derivatives are examined on the growth of five strains of <i>Pseudomonas</i> sp., and the impact of selected synthesized compounds on the proliferation of five human tumor cell lines in which a healthy human cell line is used as the control.</p>
Accepted on Scientific Board on: AS	21.09.2012.
Defended: DE	2014. godina

Thesis Defend Board: DB	president: professor Janoš Čanadi, PhD, Faculty of Sciences, University of Novi Sad mentor: professor Vera Ćirin-Novta, PhD, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, retired member: professor Mirjana Popsavin, PhD, Faculty of Sciences, University of Novi Sad member: assistant professor Ljubica Grbović, PhD, Faculty of Sciences, University of Novi Sad member: professor Slavko Kevrešan, PhD, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, retired
----------------------------	--

**Ms Bojana Vasiljević**

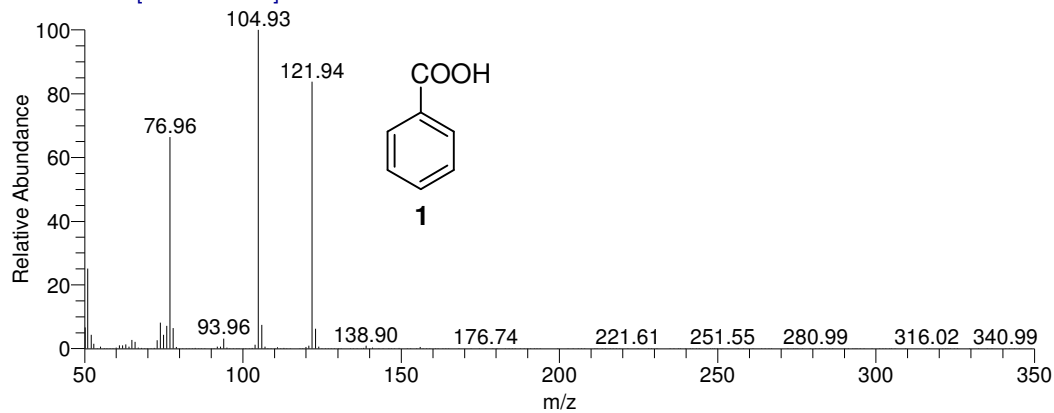
**MIKROTALASNO STIMULISANA SINTEZA ODABRANIH DERIVATA  
NAFTENSKIH I ŽUČNIH KISELINA, ISPITIVANJE NJIHOVE  
BIOLOŠKE AKTIVNOSTI KAO I TERMIČKE I HEMIJSKE  
STABILNOSTI ODABRANIH LEKOVA**

**-doktorska disertacija-**

**9. PRILOG**

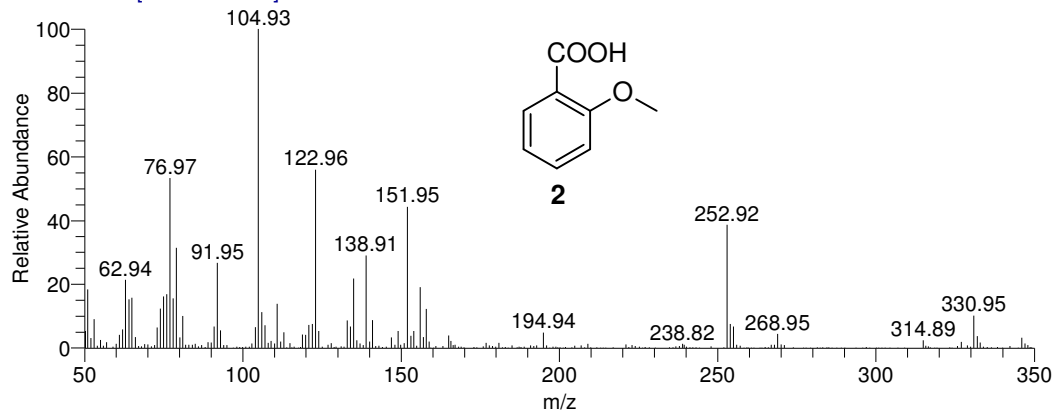
## GC-MS spektar jedinjenja 1

Benzoicacid2 #643 RT: 5.16 AV: 1 AV: 5 SB: 12 636-641 645-650 NL: 1.54E7  
T: + c Full ms [ 50.00-350.00]

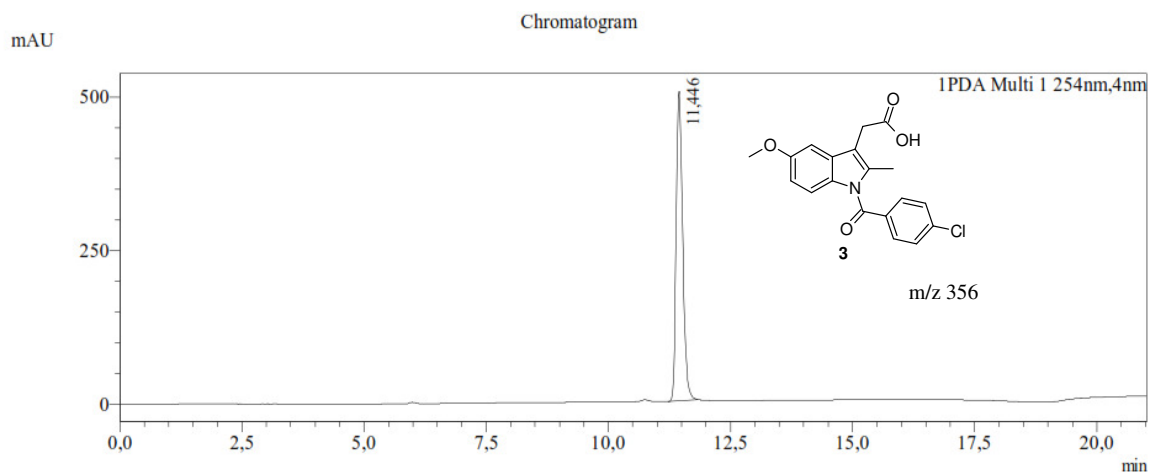


## GC-MS spektar jedinjenja 2

2MeOBenzoicacid\_100428133755 #1077 RT: 6.96 AV: 1 AV: 5 SB: 12 1070-1075 1079-1084 NL: 7.94E5  
T: + c Full ms [ 50.00-350.00]



## LC-MS hromatogram i maseni spektar jedinjenja 3

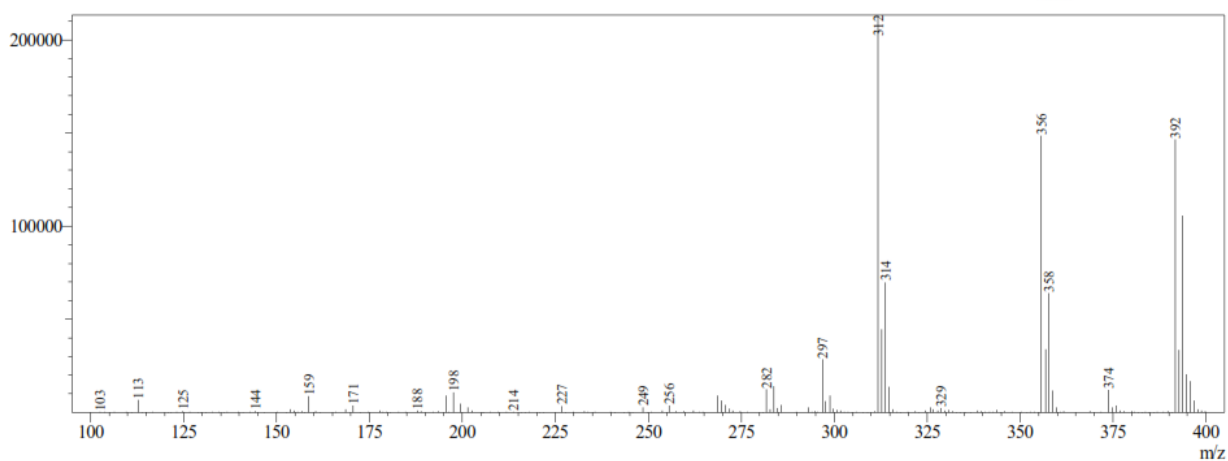
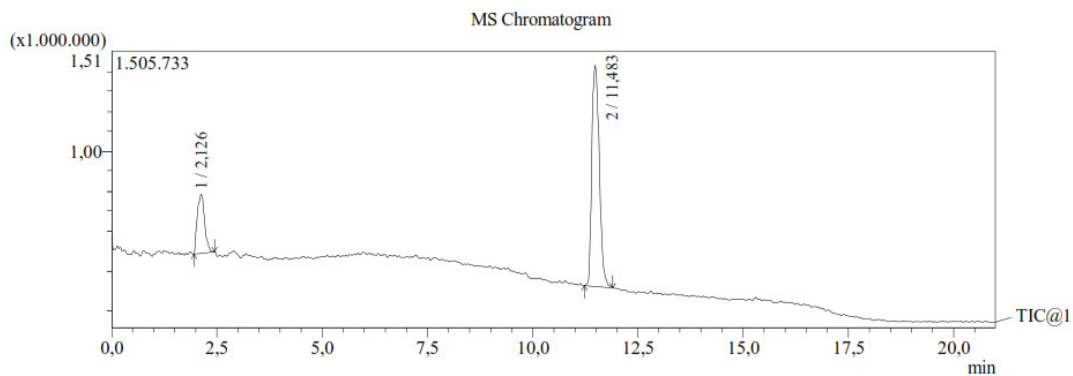


Peak Table

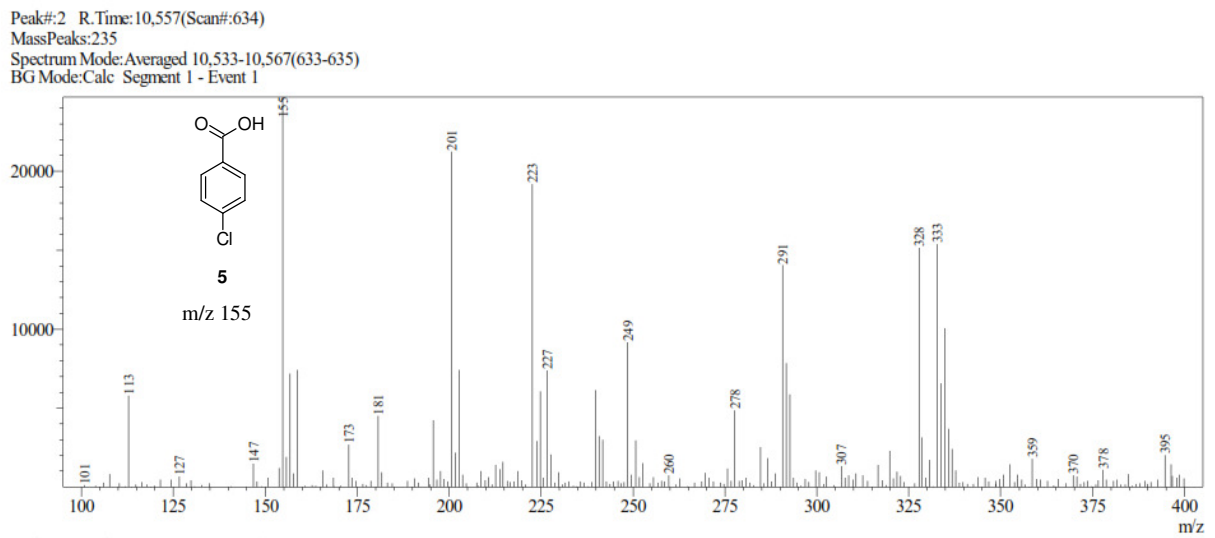
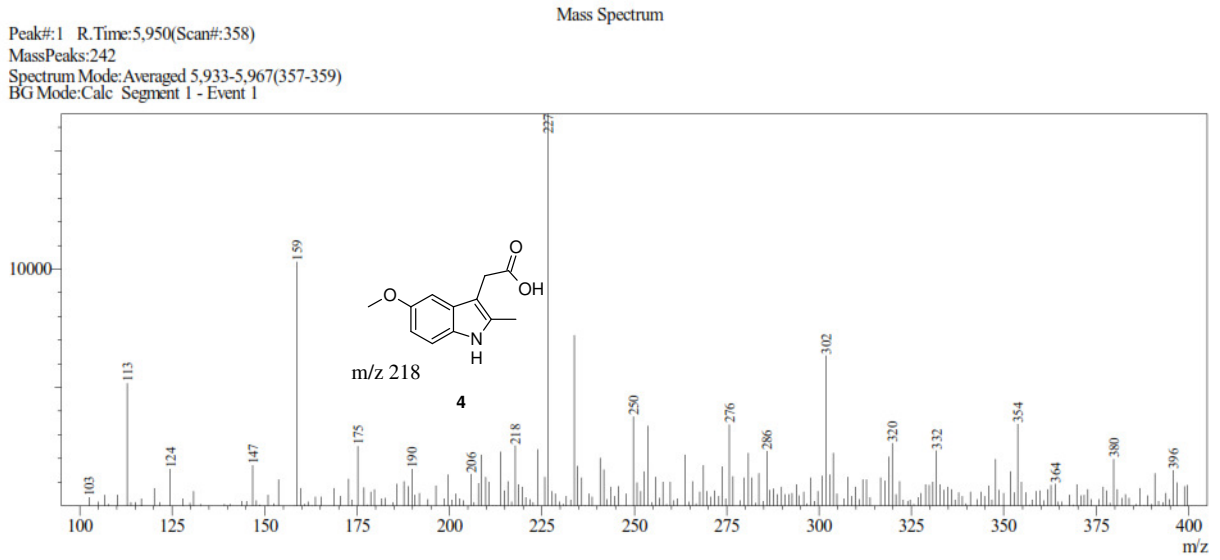
Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	11,446	4683883	100,000
Total		4683883	100,000

MASS Peak Table TIC(Event)

Peak#	Ret. Time	Event#	m/z	Area	Area%
1	2,126	1-1	TIC	3610132	20,872
2	11,483	1-1	TIC	13686250	79,128
Total				17296382	100,000



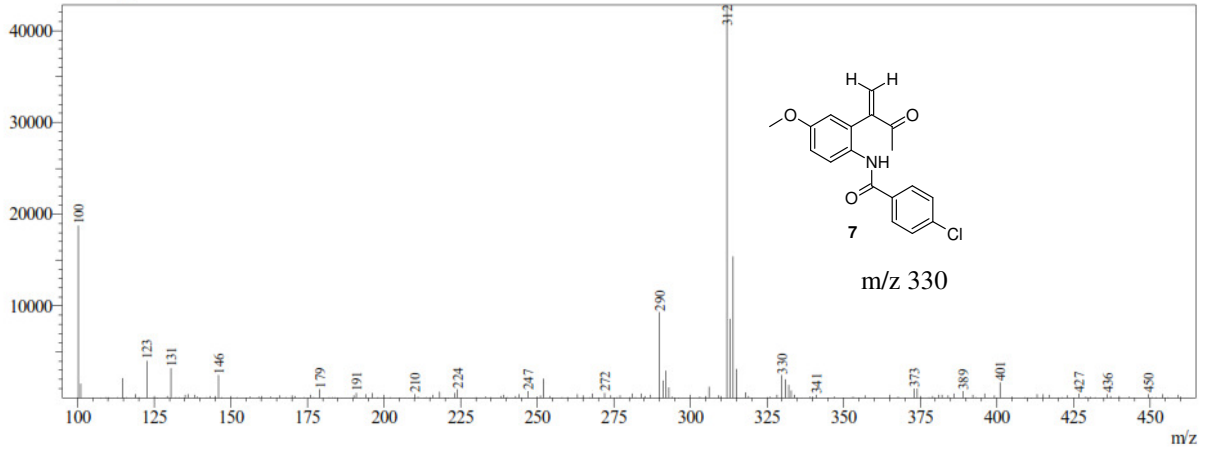
# LC-MS maseni spektar jedinjenja 4 i 5



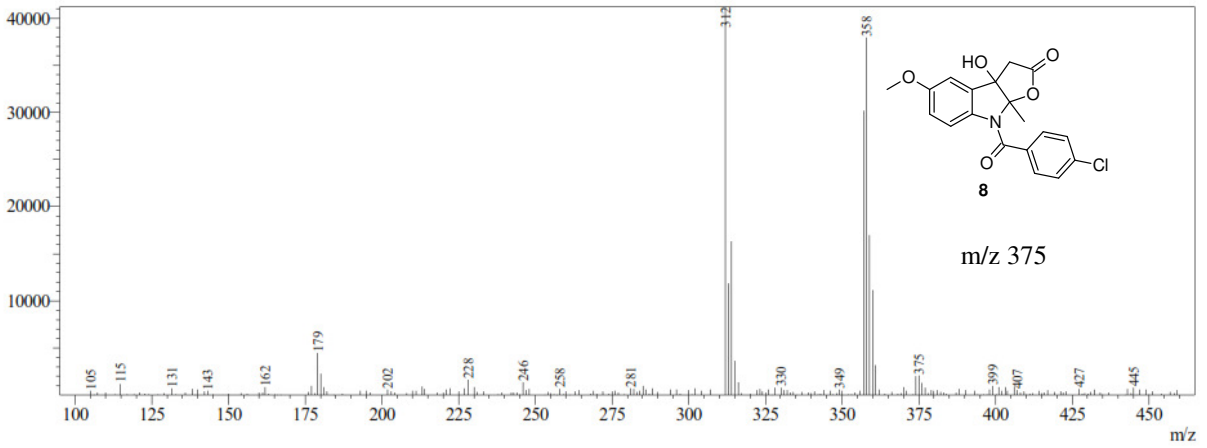


# LC-MS maseni spektar jedinjenja 7 i 8

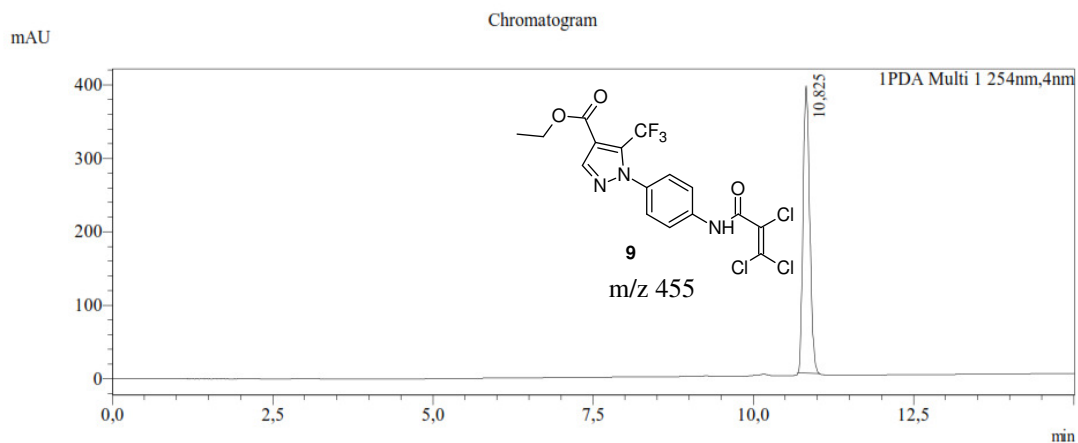
Peak#:4 R.Time:8,608(Scan#:517)  
MassPeaks:162  
Spectrum Mode:Averaged 8,583-8,617(516-518)  
BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1



Peak#:5 R.Time:9,583(Scan#:576)  
MassPeaks:221  
Spectrum Mode:Averaged 9,567-9,600(575-577)  
BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1



## LC-MS hromatogram i maseni spektar jedinjenja 9

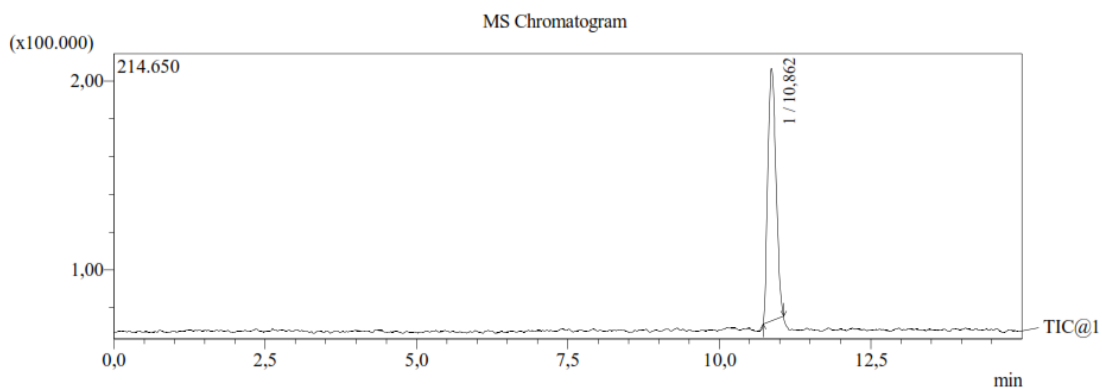


Peak Table

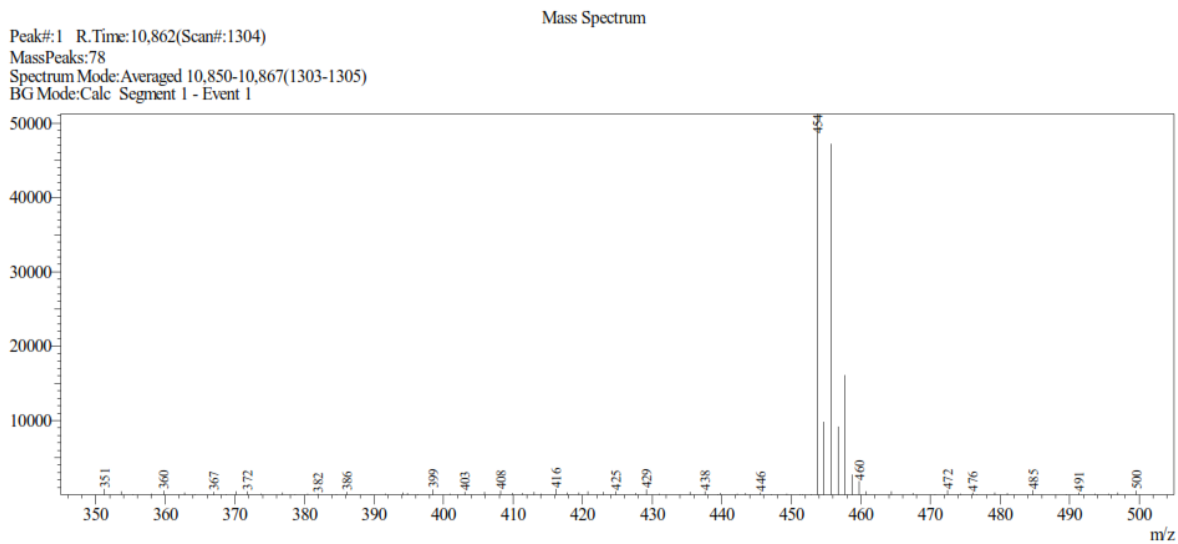
Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	10,825	2810840	100,000
Total		2810840	100,000

MASS Peak Table TIC(Event)

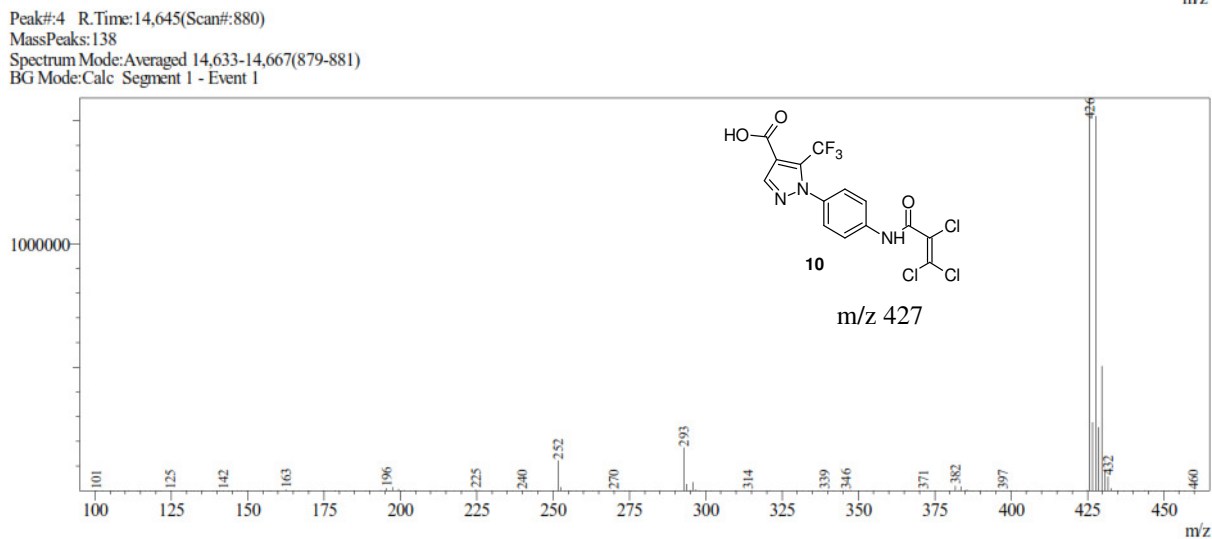
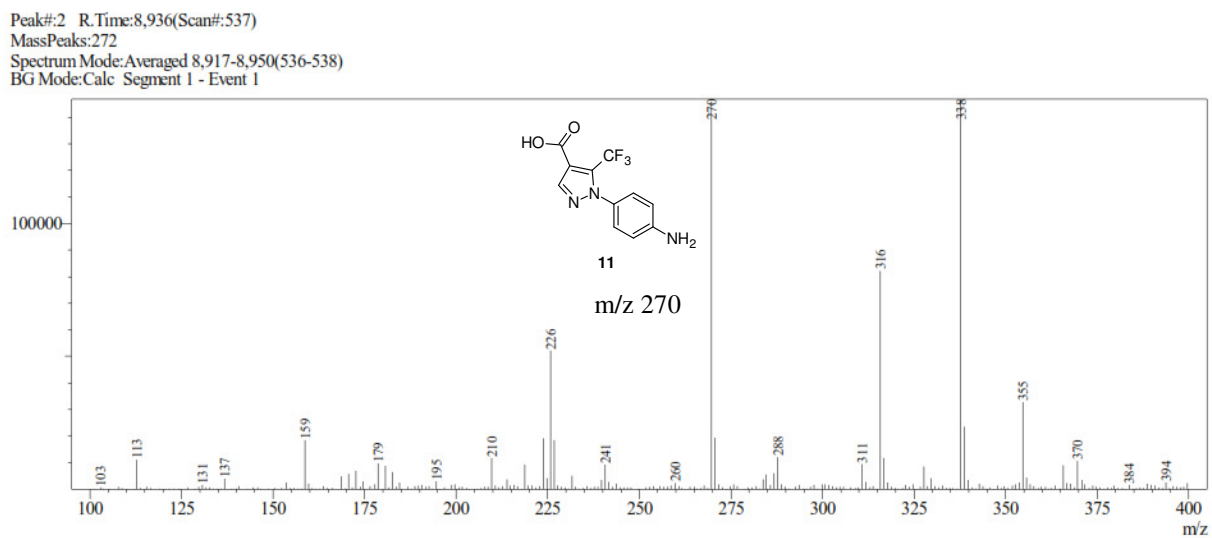
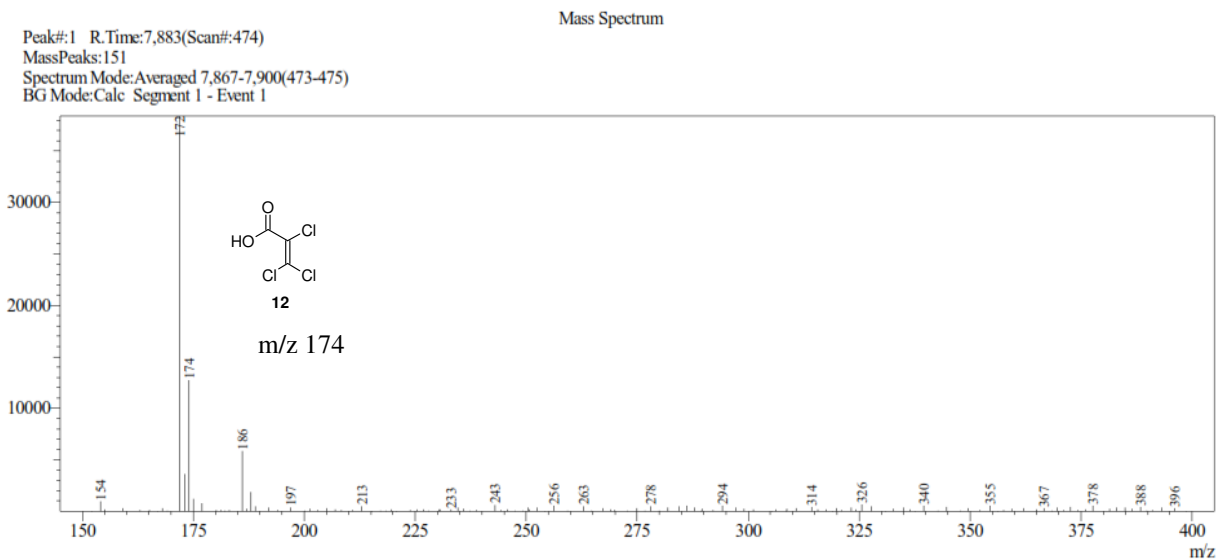
Peak#	Ret. Time	Event#	m/z	Area	Area%
1	10,862	1-1	TIC	1261715	100,000
Total				1261715	100,000



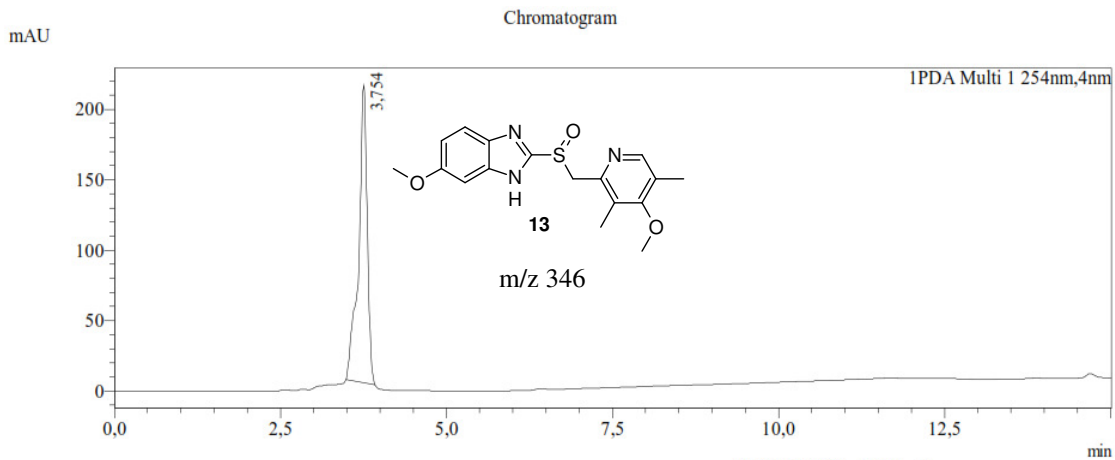
Peak#:1 R.Time:10,862(Scan#:1304)  
 MassPeaks:78  
 Spectrum Mode:Averaged 10,850-10,867(1303-1305)  
 BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1



## LC-MS maseni spektar jedinjenja 10, 11 i 12



# LC-MS hromatogram i maseni spektar jedinjenja 13

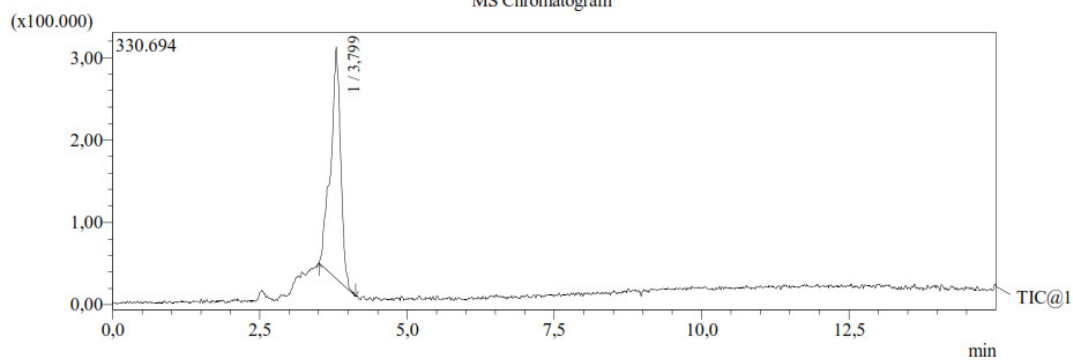


Peak Table

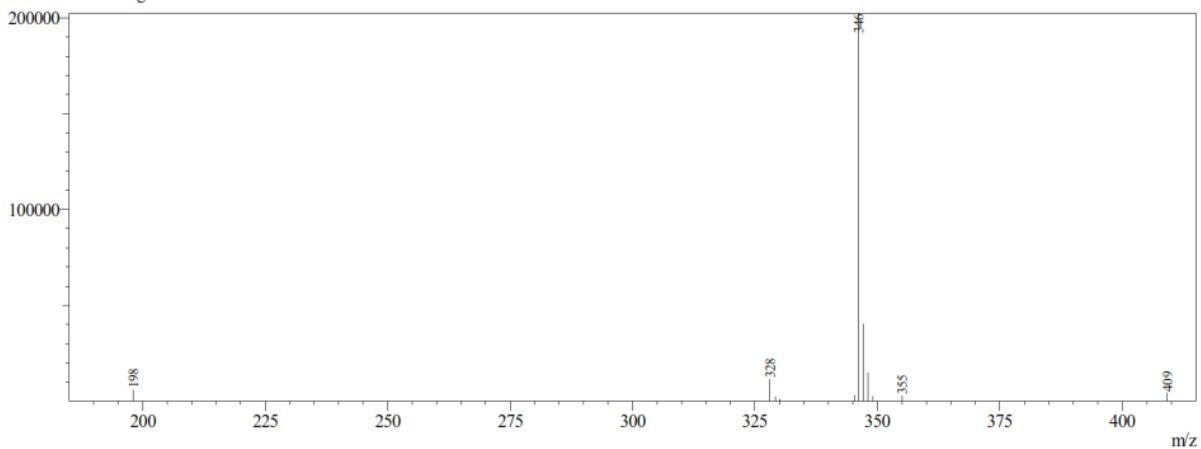
Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	3,754	1916377	100,000
Total		1916377	100,000

MASS Peak Table TIC(Event)

Peak#	Ret. Time	Event#	m/z	Area	Area%
1	3,799	1-1	TIC	3335449	100,000
Total				3335449	100,000

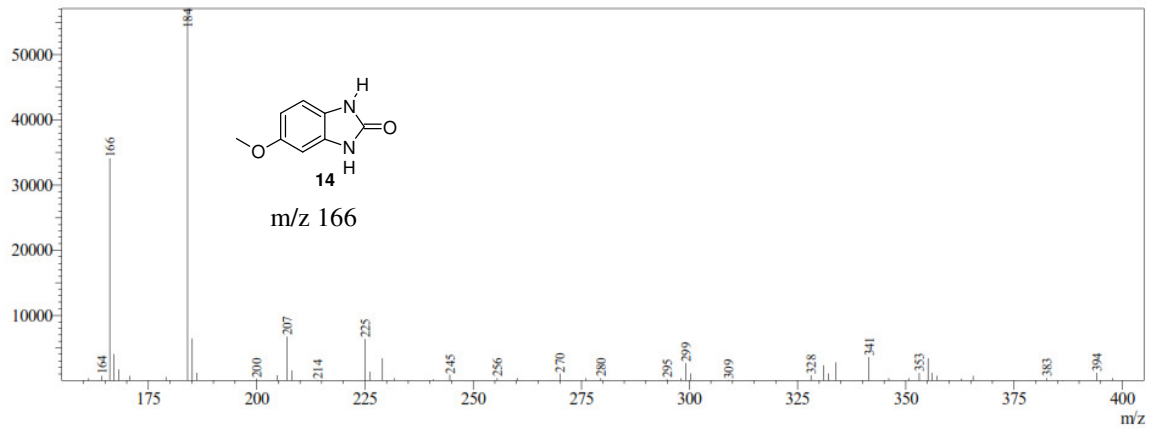


Peak#:1 R. Time:3,799(Scan#:457)  
 MassPeaks:11  
 Spectrum Mode:Averaged 3,792-3,808(456-458)  
 BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1

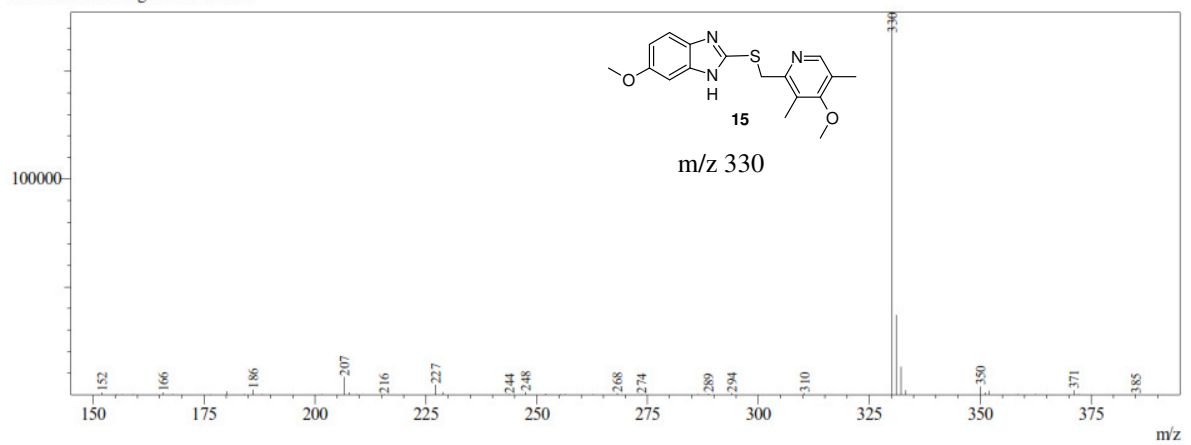


# LC-MS maseni spekter jedinjenja 14 i 15

Peak#:1 R.Time:3,118(Scan#:375)  
MassPeaks:49  
Spectrum Mode:Averaged 3,108-3,125(374-376)  
BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1

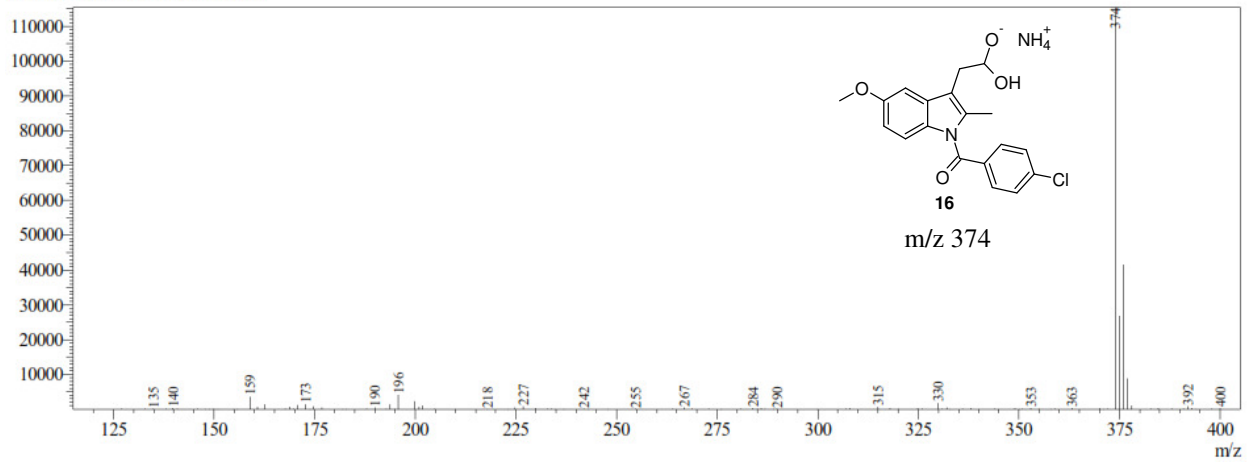


Peak#:2 R.Time:3,310(Scan#:398)  
MassPeaks:43  
Spectrum Mode:Averaged 3,300-3,317(397-399)  
BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1

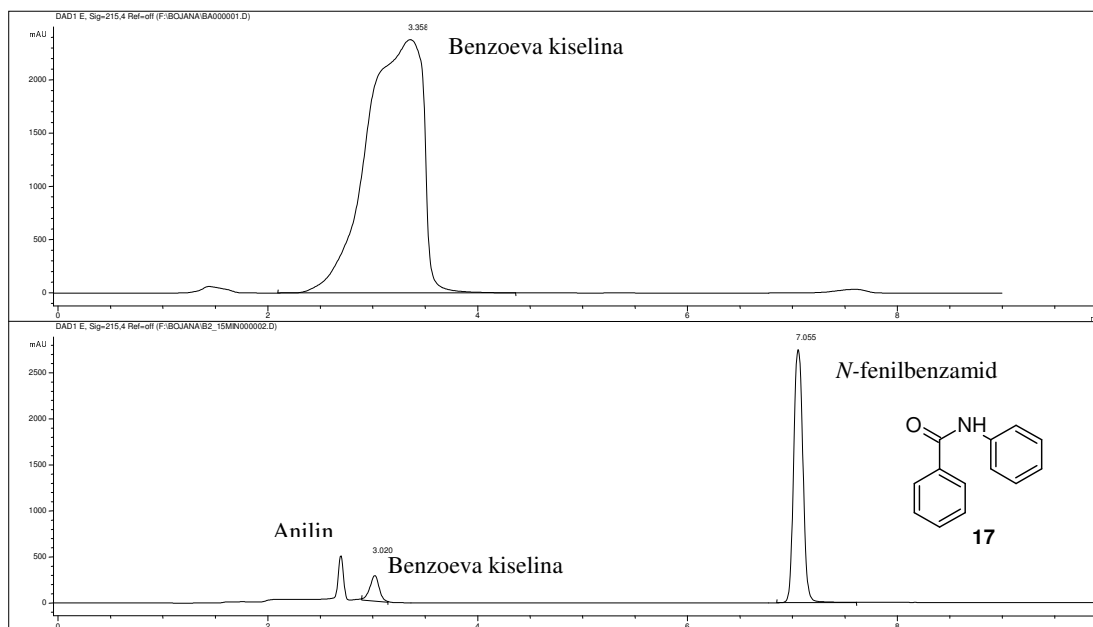


# LC-MS maseni spektar jedinjenja 16

Peak#:3 R.Time:8,027(Scan#:483)  
MassPeaks:104  
Spectrum Mode:Averaged 8,017-8,050(482-484)  
BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1

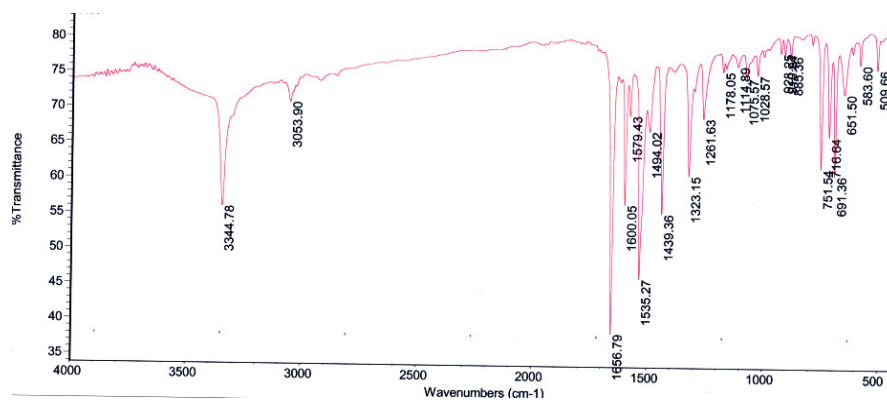


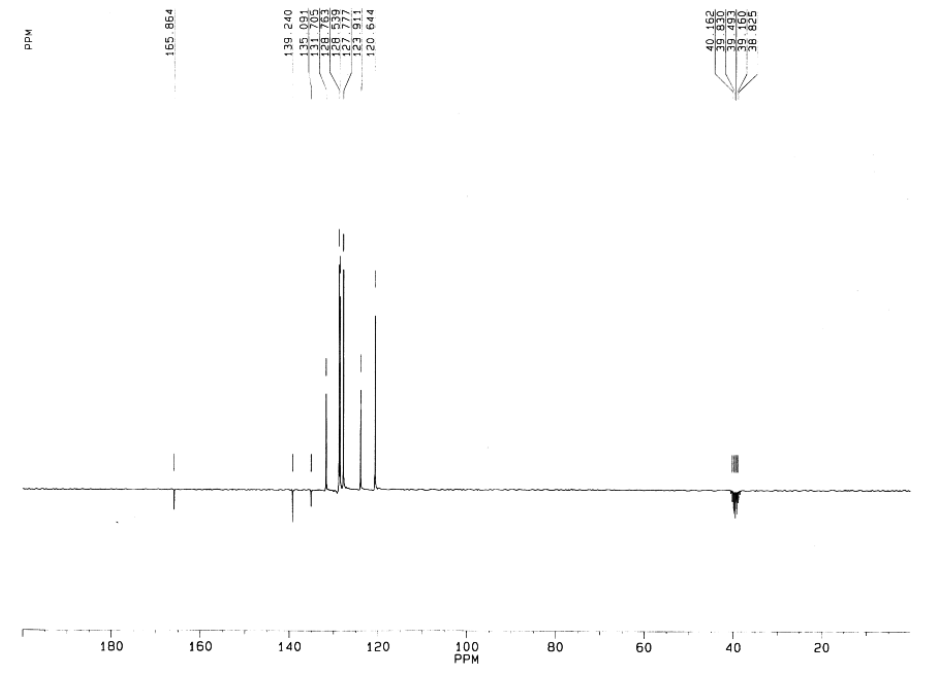
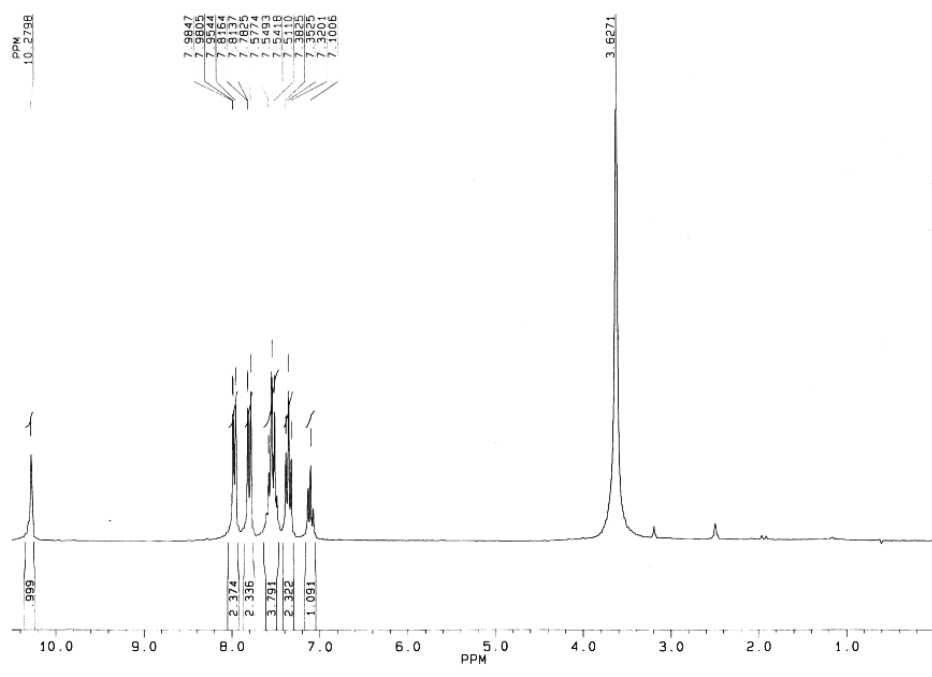
# HPLC chromatogram, IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektar jedinjenja 17



Signal 1: DAD1 E, Sig=215,4 Ref=off

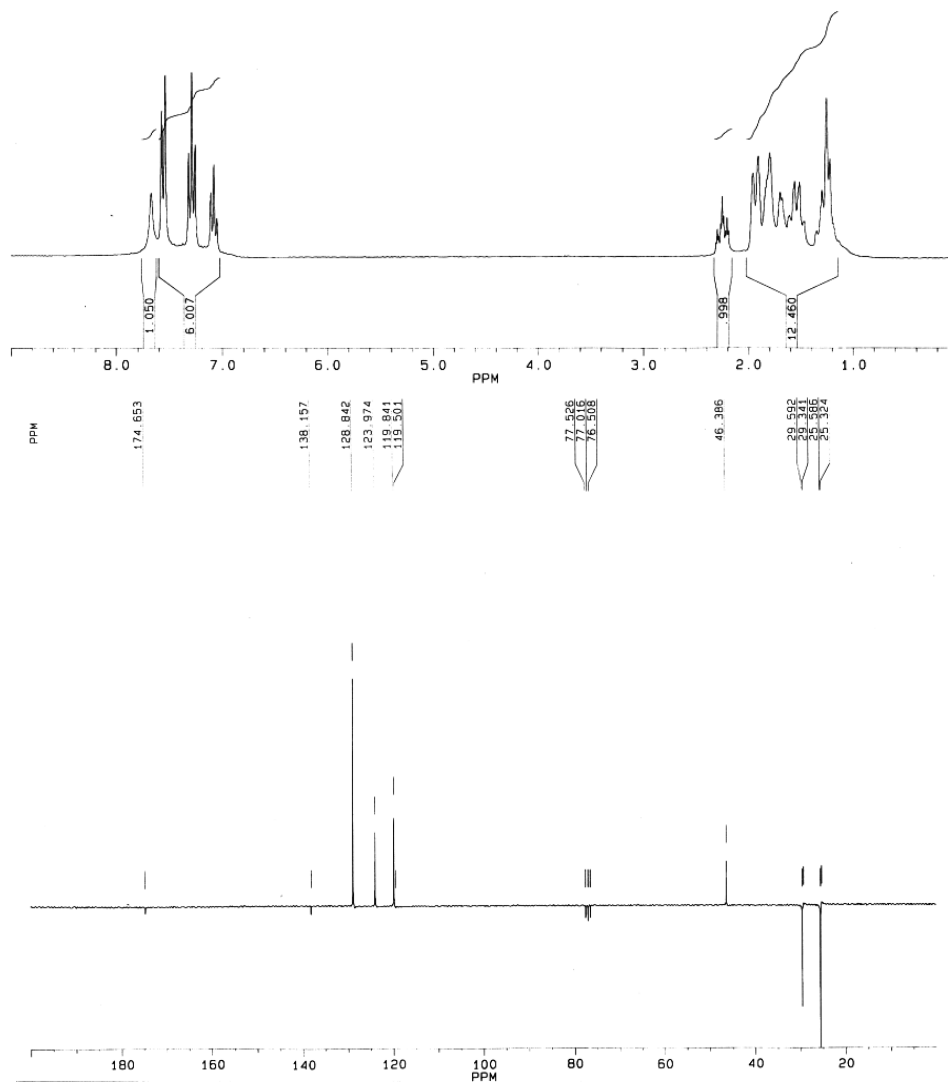
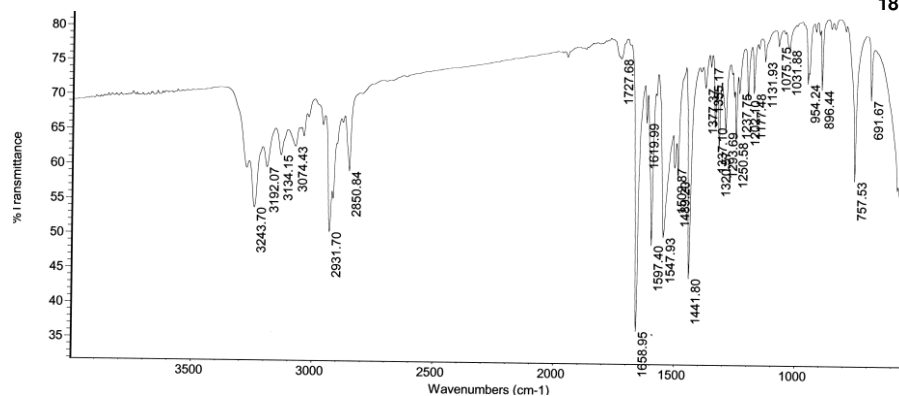
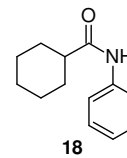
Peak #	RetTime [min]	Sig	Type	Area [mAU*s]	Area %
1	3.020	1	MM	1513.70715	8.2622
2	7.055	1	BB	1.68071e4	91.7378



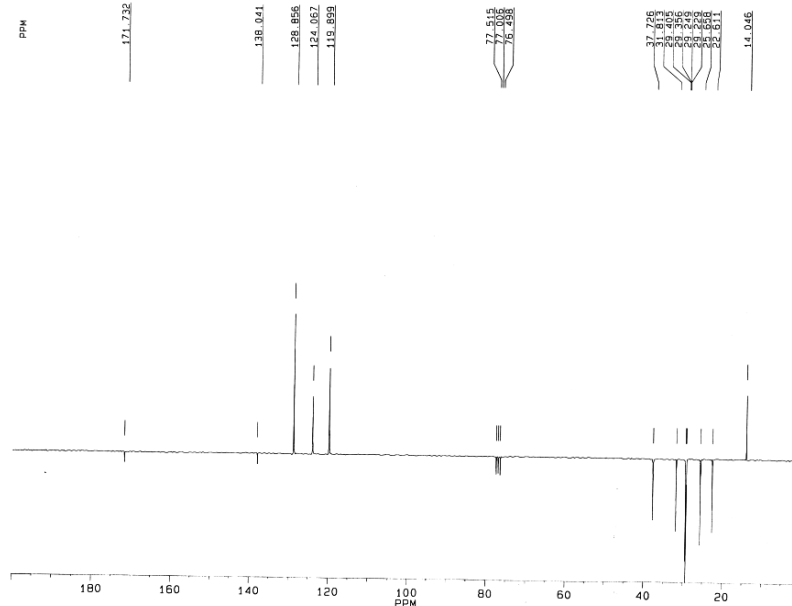
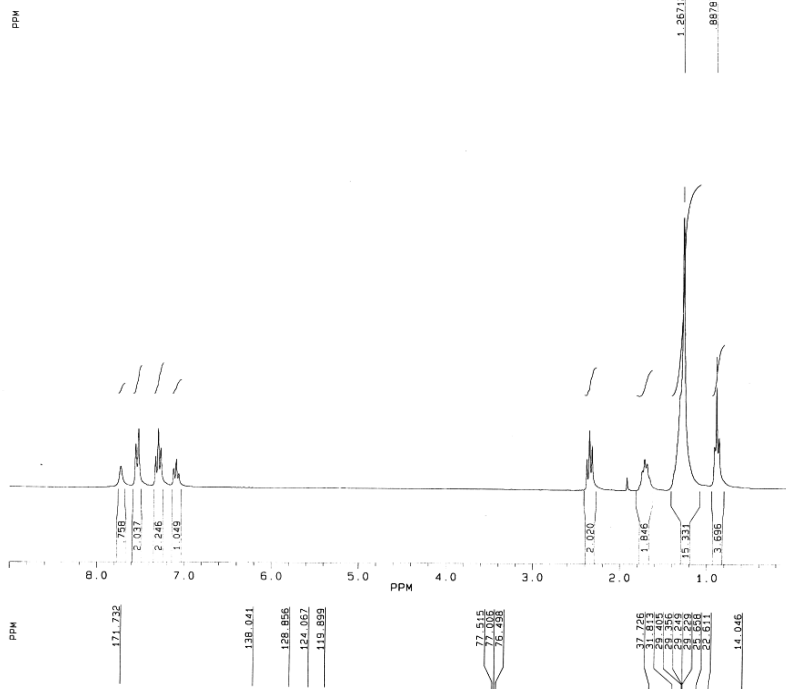
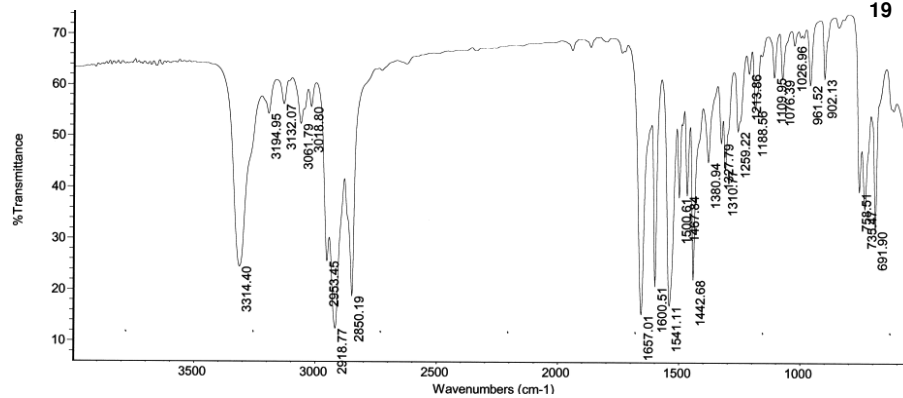
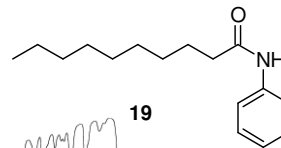




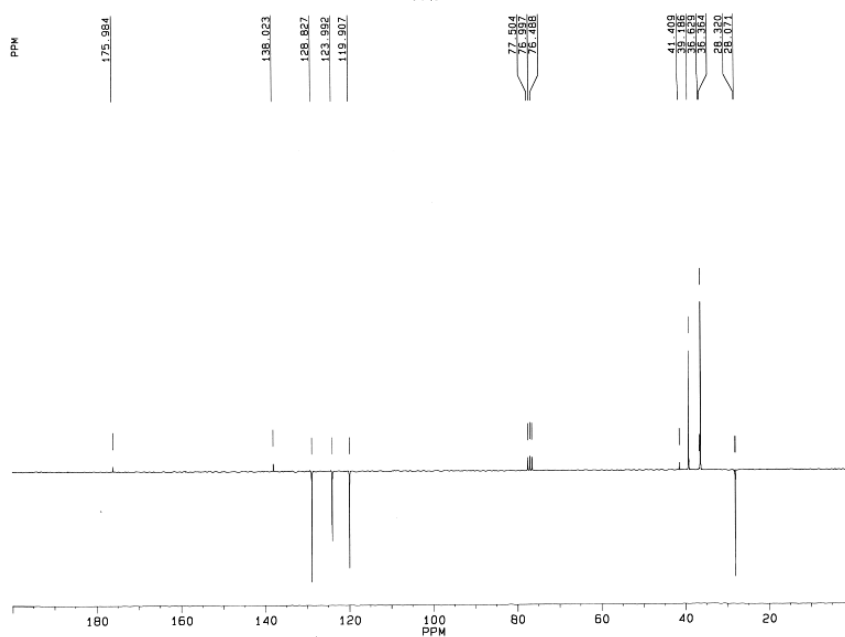
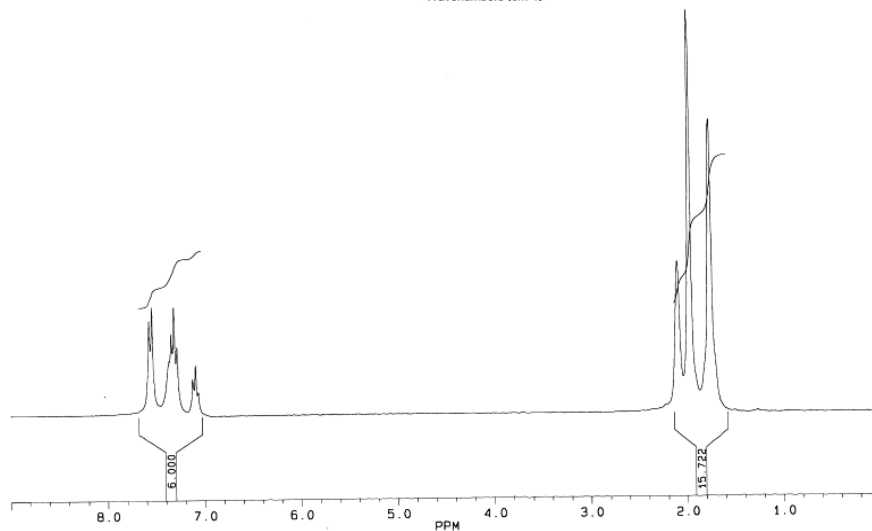
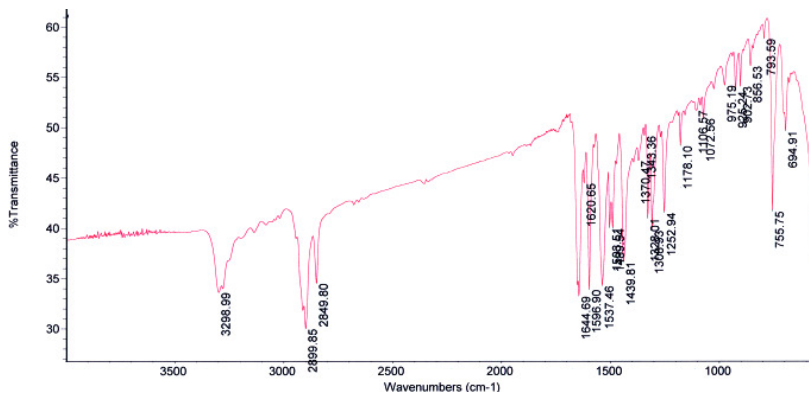
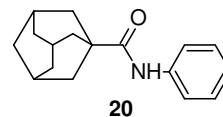
IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektar jedinjenja 18



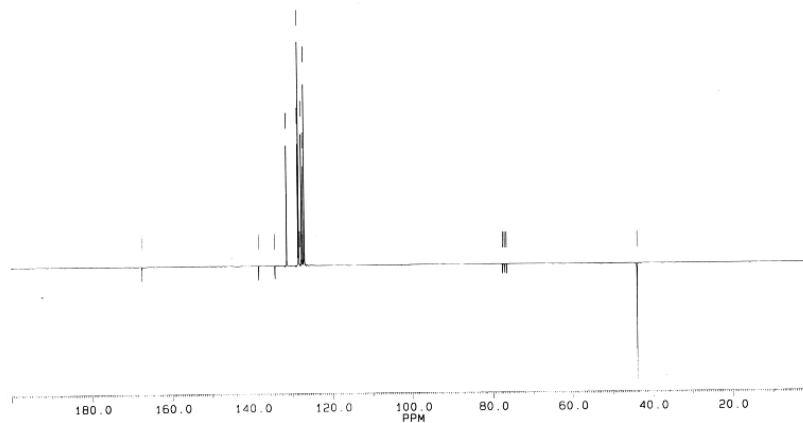
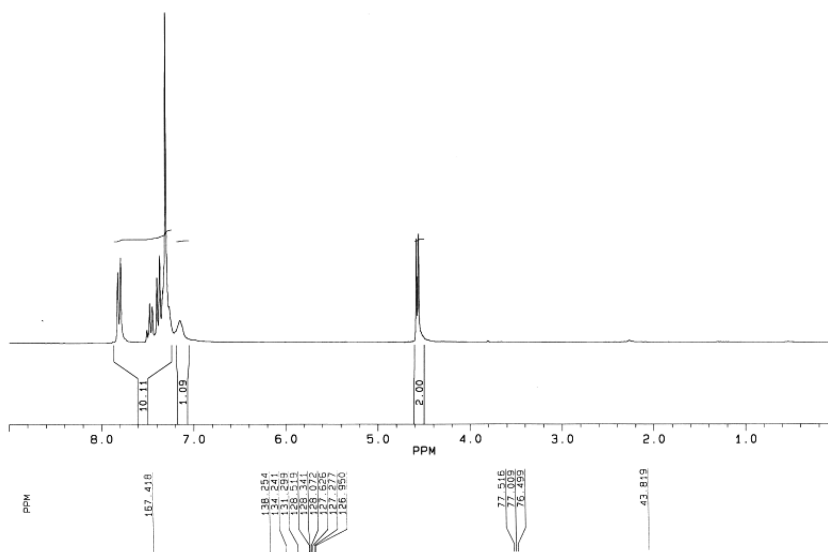
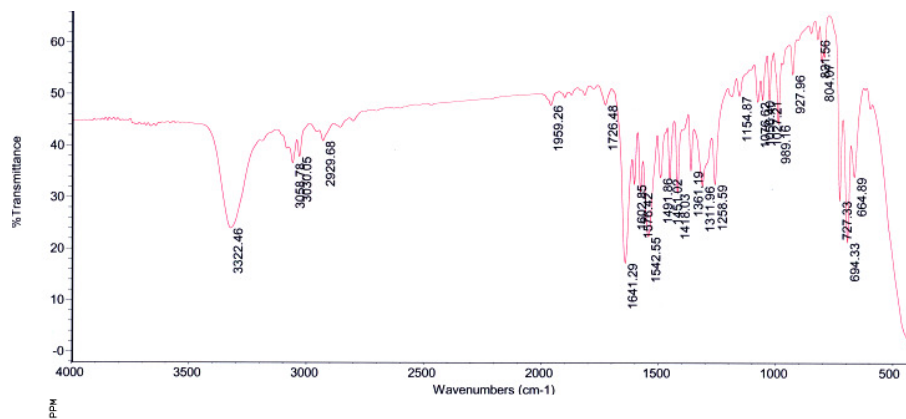
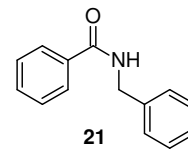
IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja 19



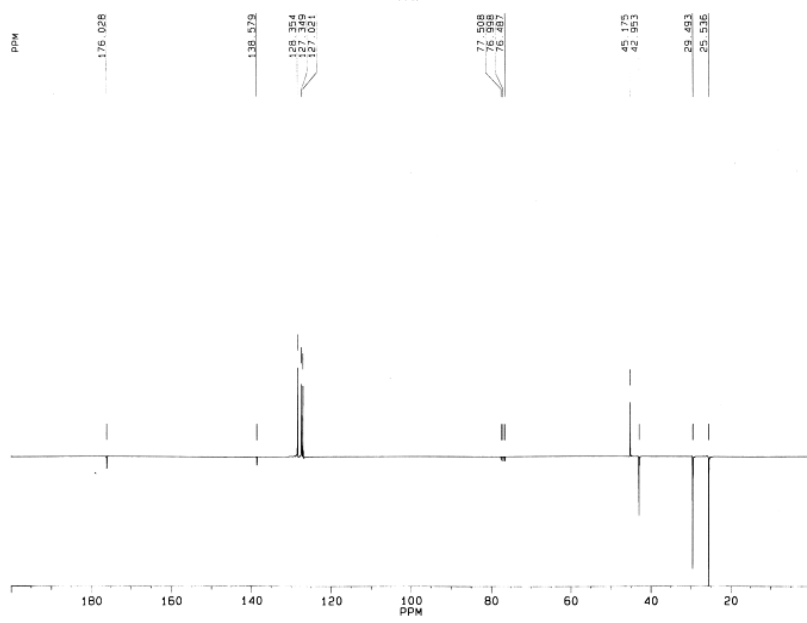
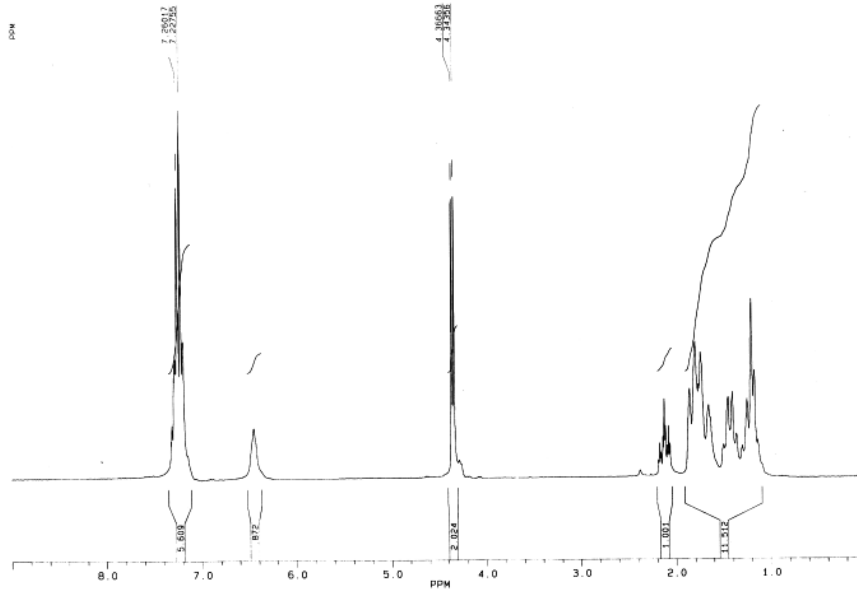
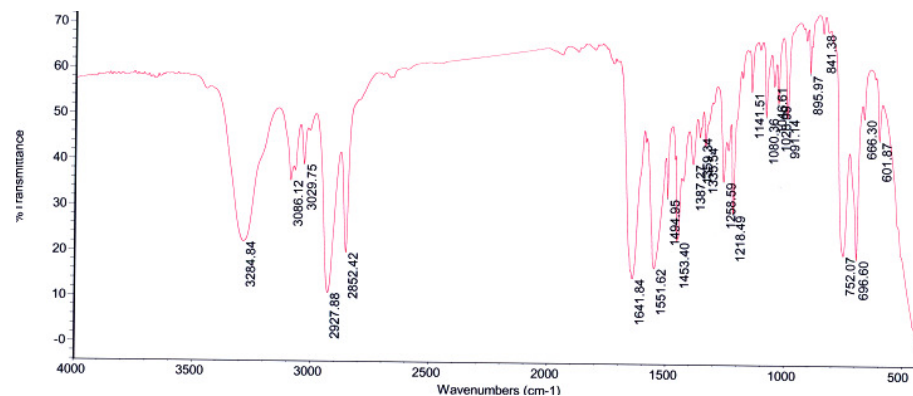
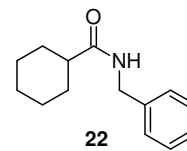
IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektar jedinjenja 20



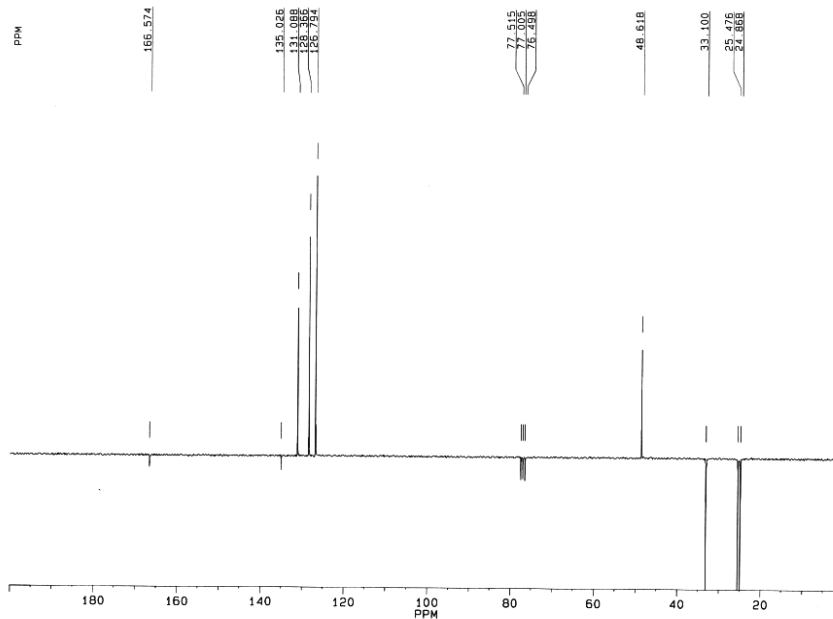
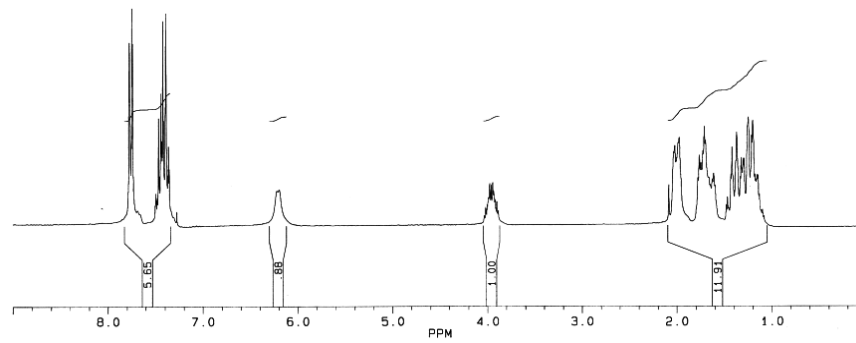
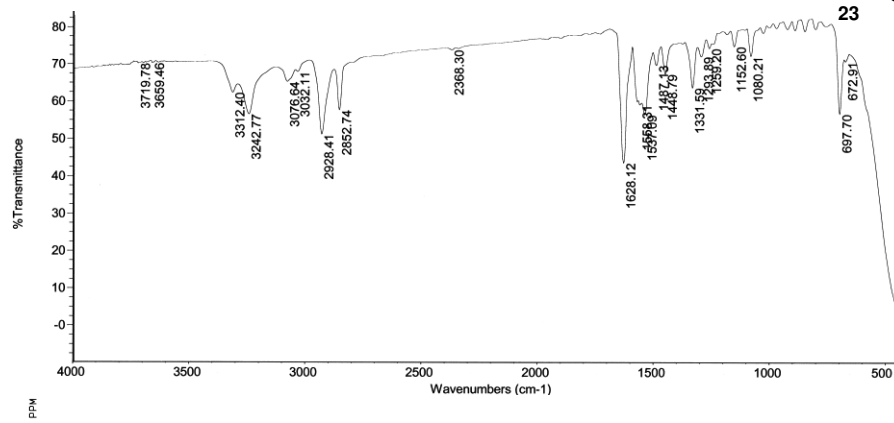
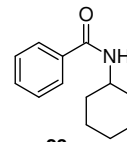
IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektar jedinjenja 21



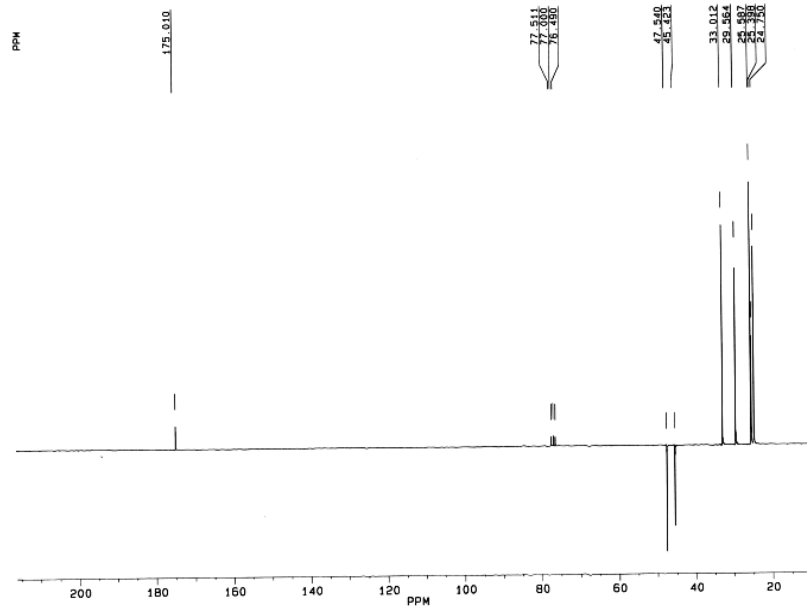
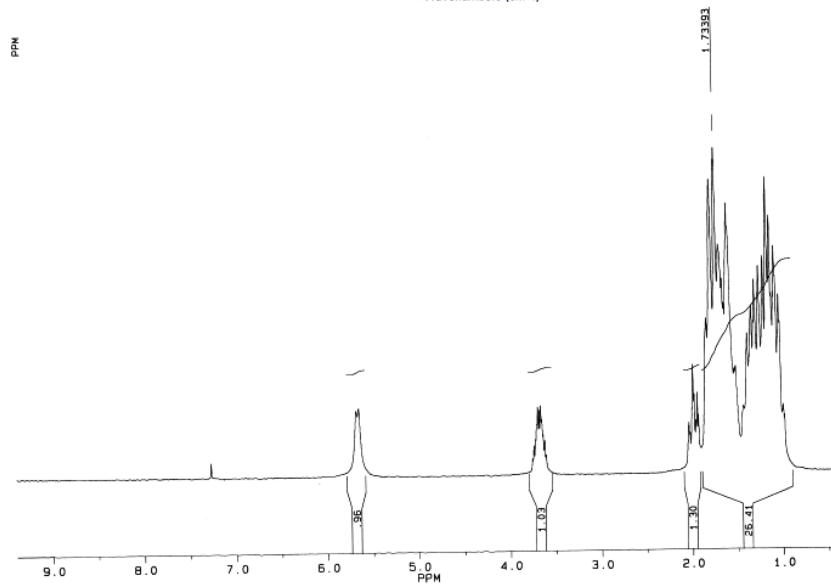
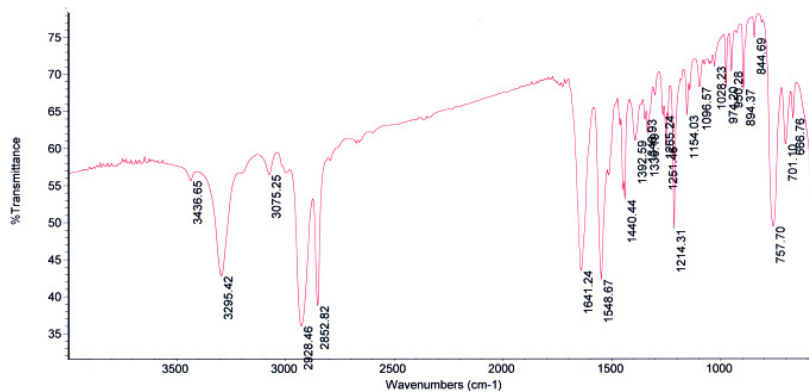
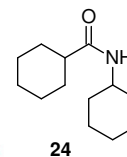
IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektar jedinjenja 22



IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektar jedinjenja **23**



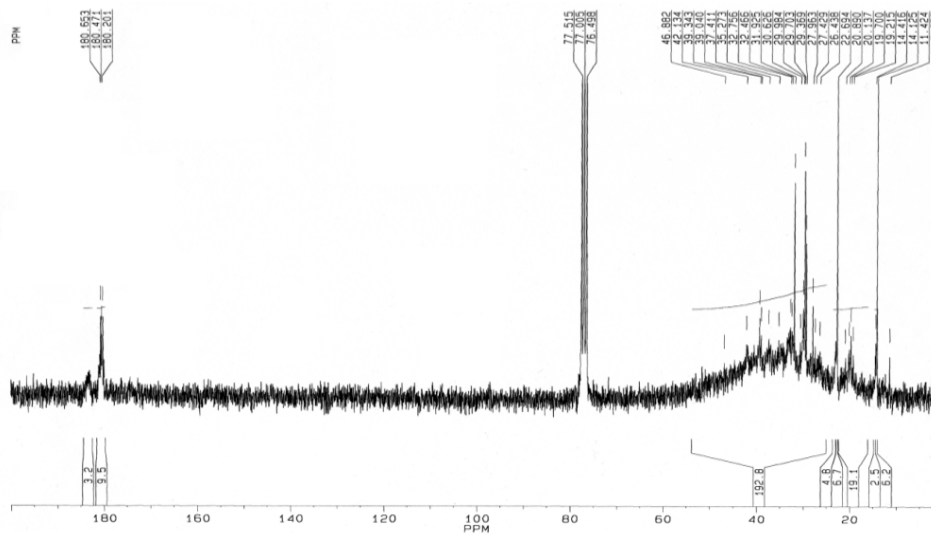
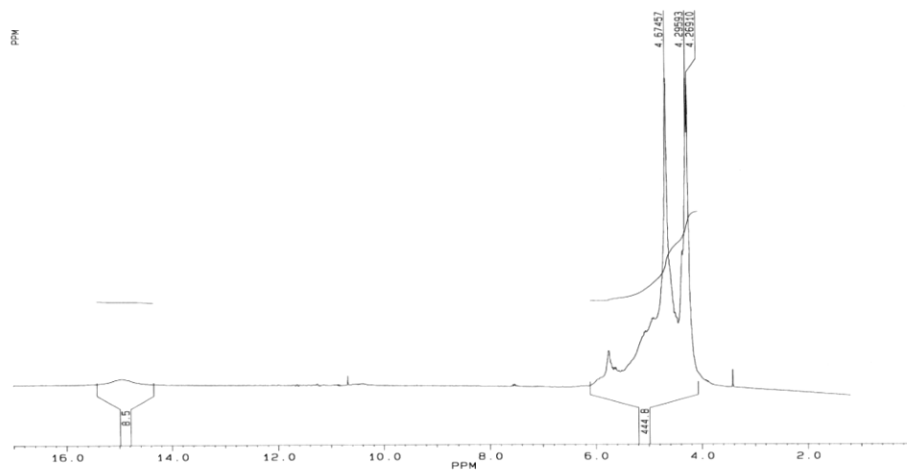
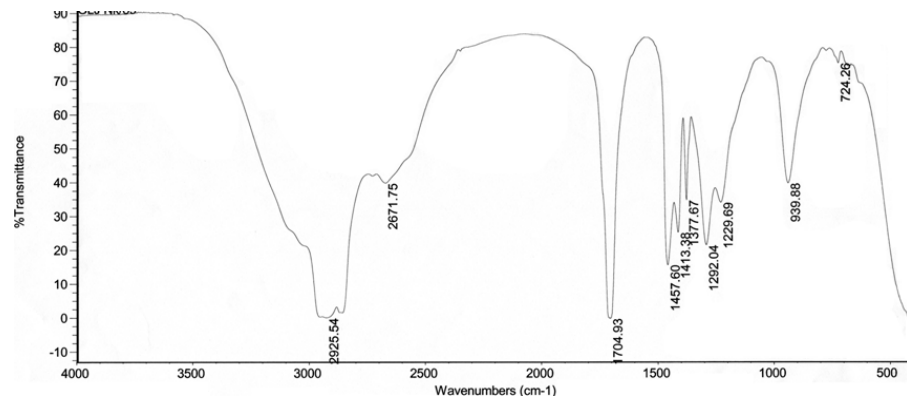
IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri jedinjenja 24



IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektar jedinjenja **25**

RCOOH (Velebit n.k.)

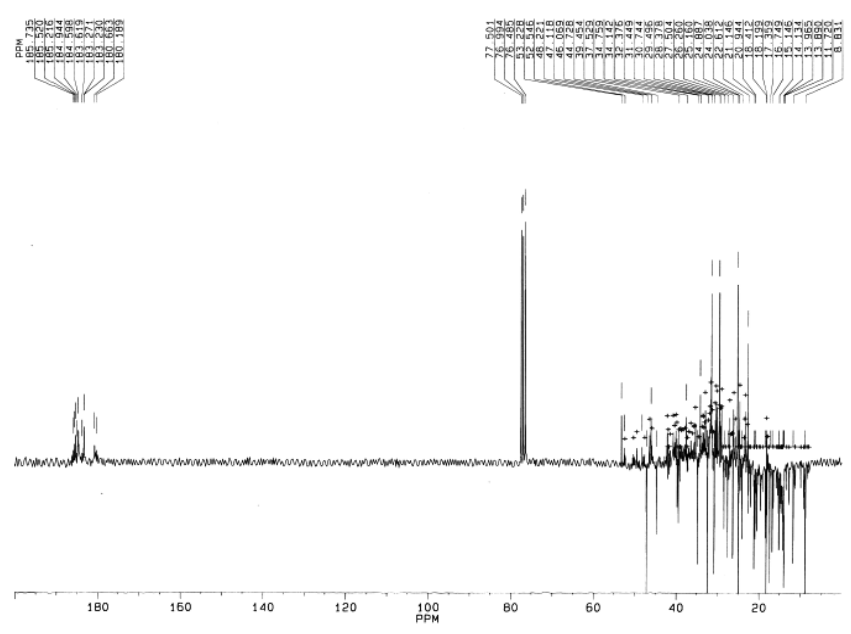
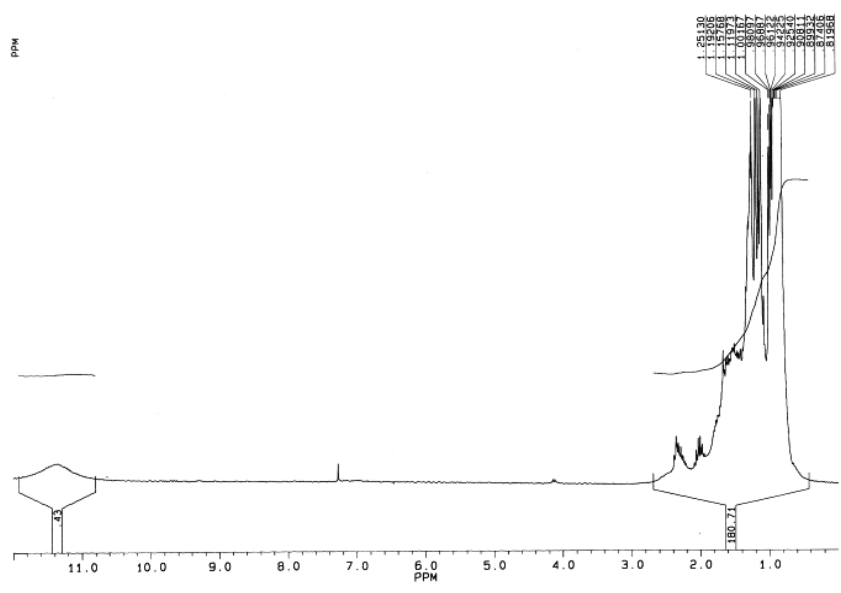
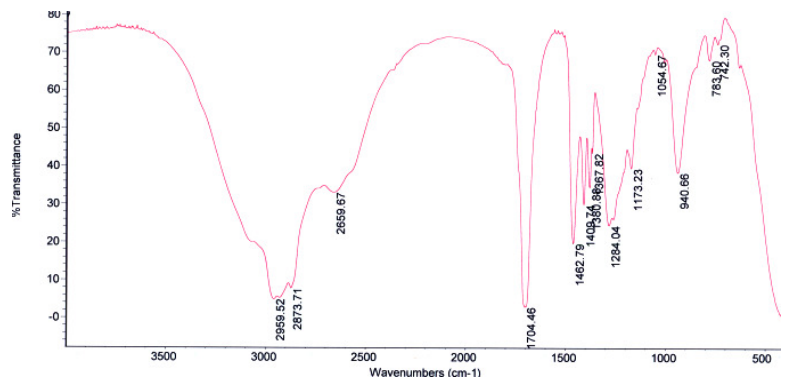
**25**



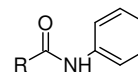


IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektar jedinjenja 26

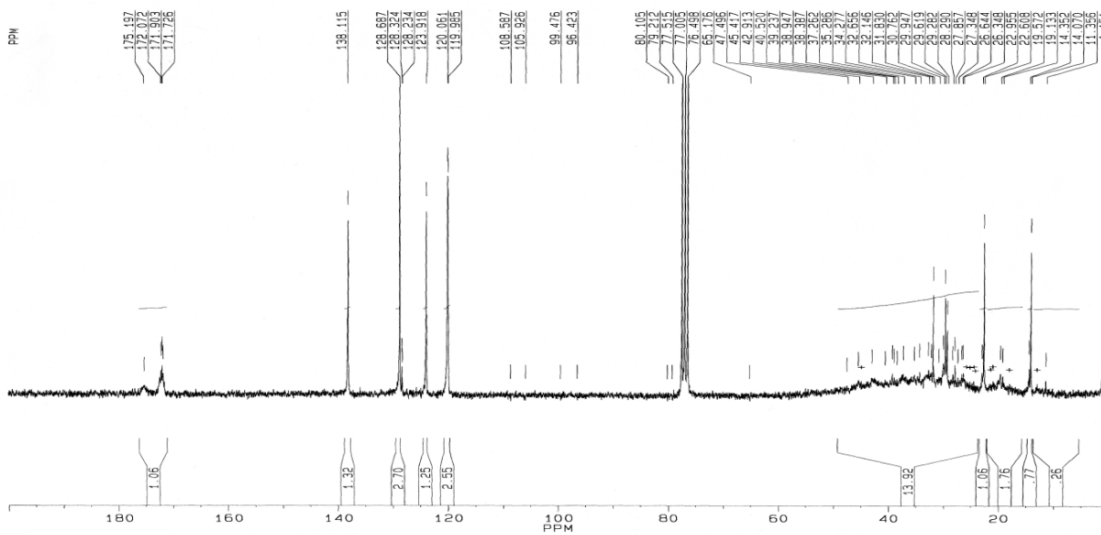
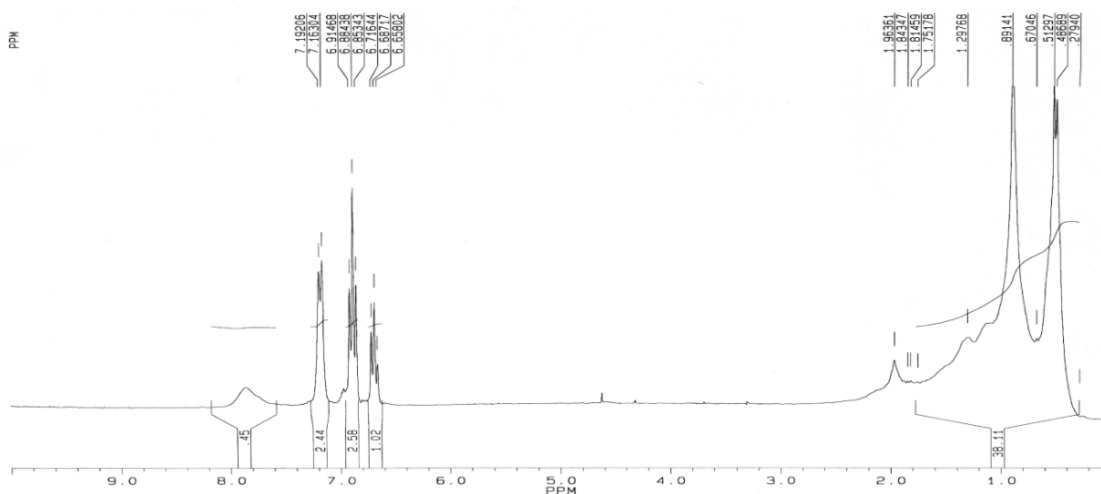
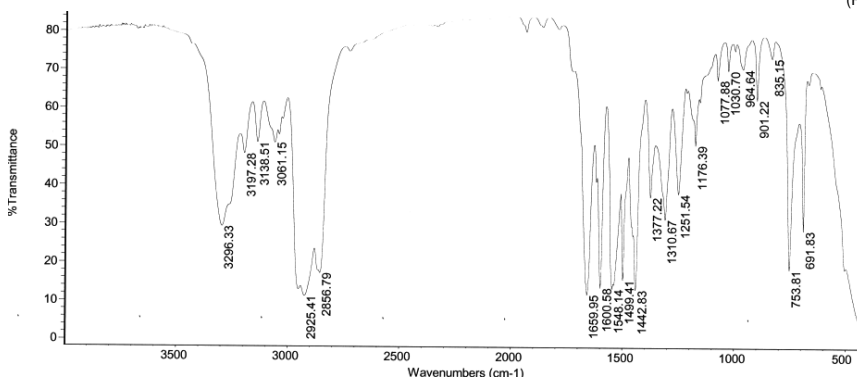
RCOOH (Aldrich n.k.)  
26



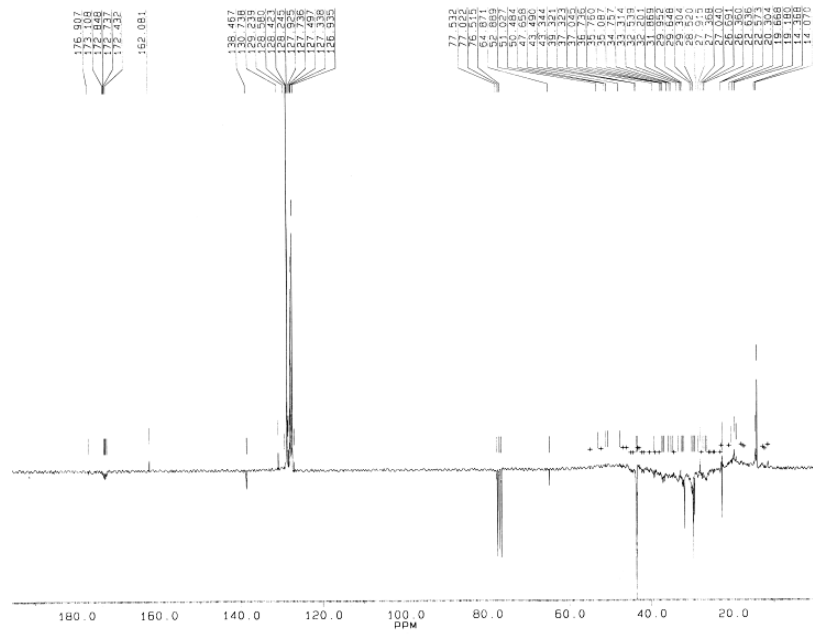
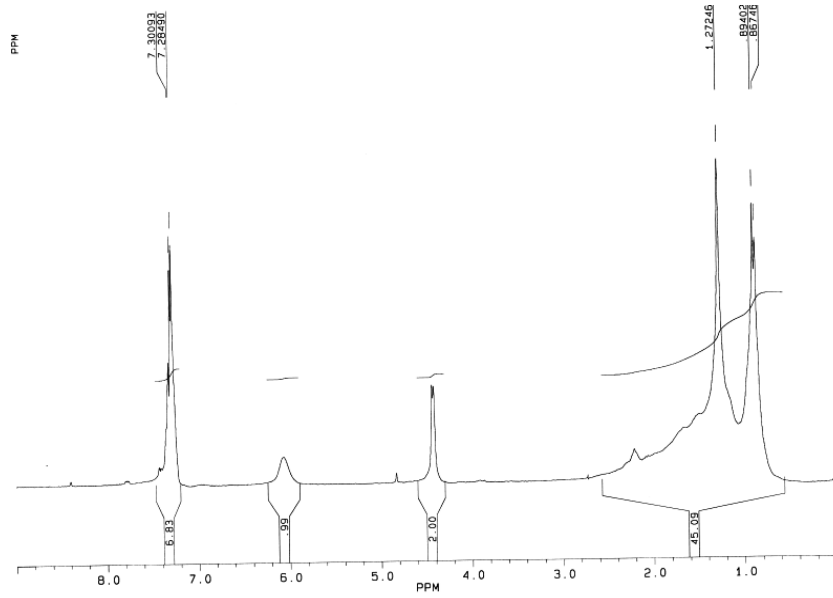
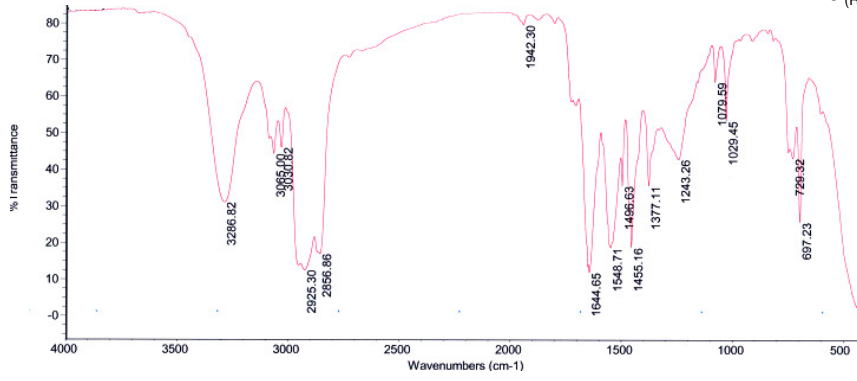
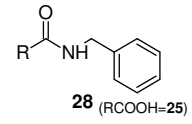
IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektar jedinjenja 27



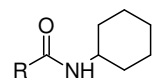
27 (RCOOH=25)



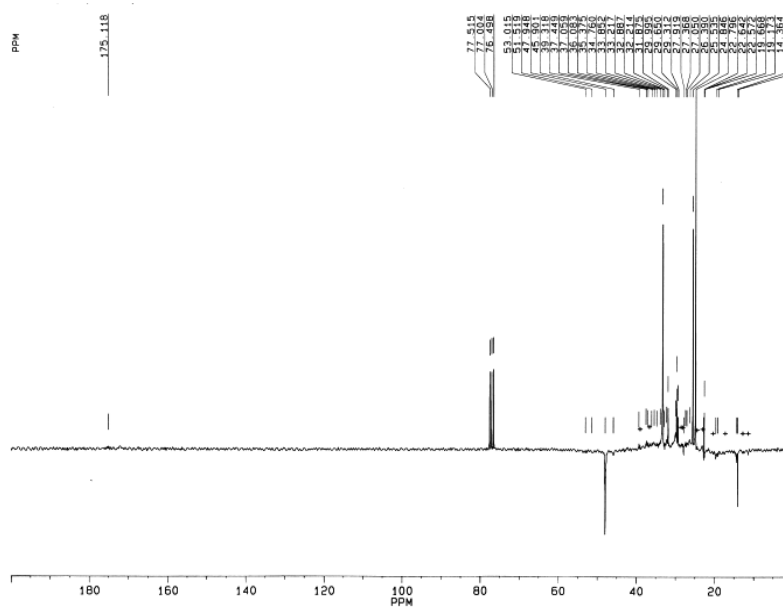
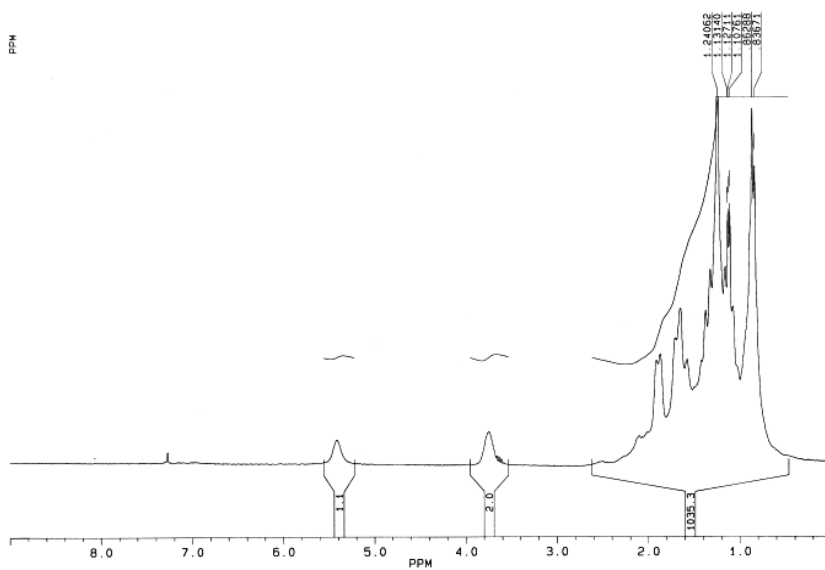
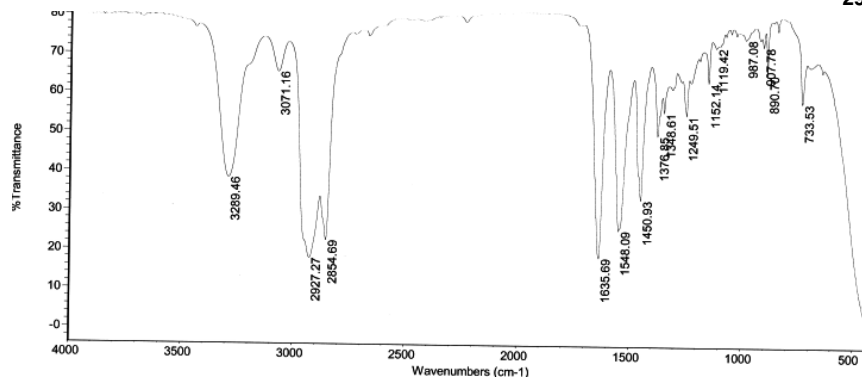
IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektar jedinjenja **28**



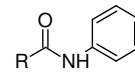
IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri jedinjenja **29**



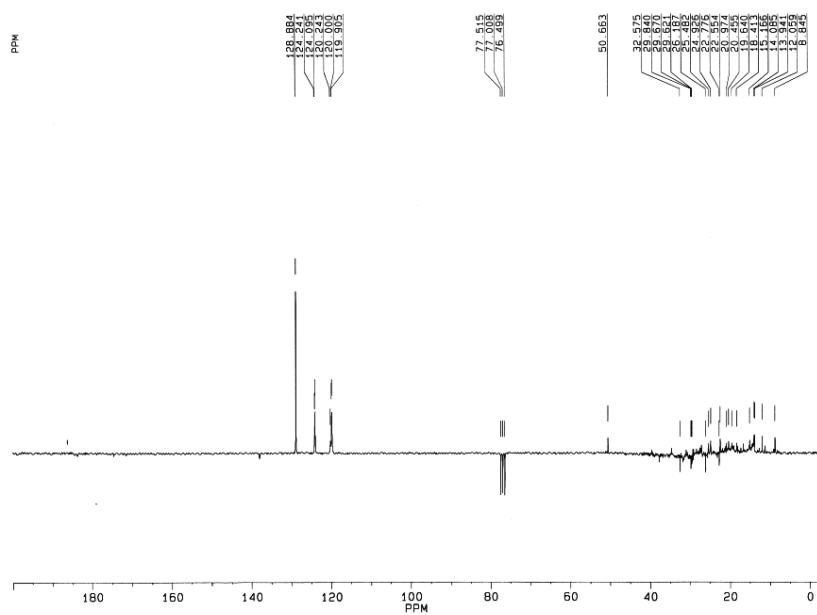
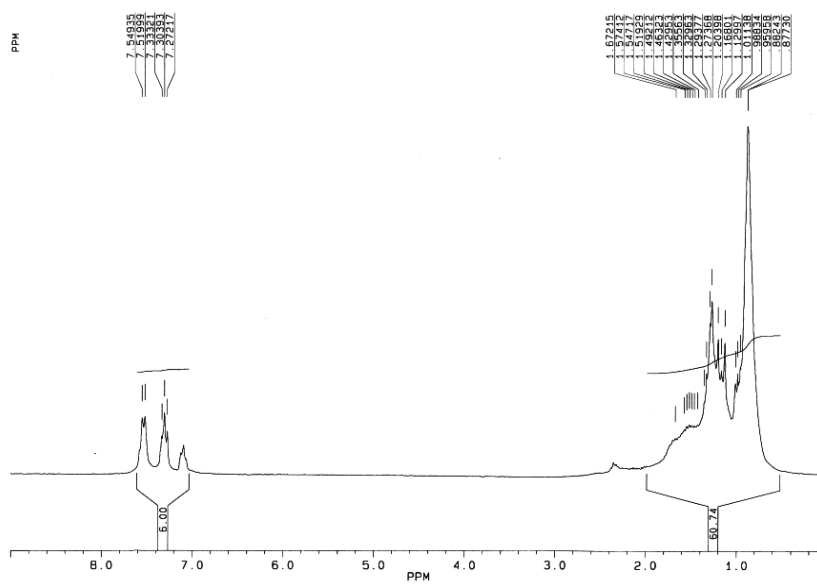
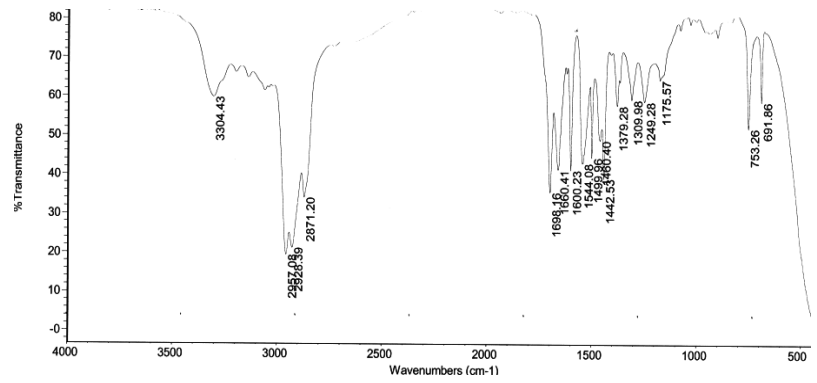
**29** (RCOOH=25)



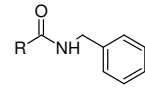
IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektar jedinjenja 30



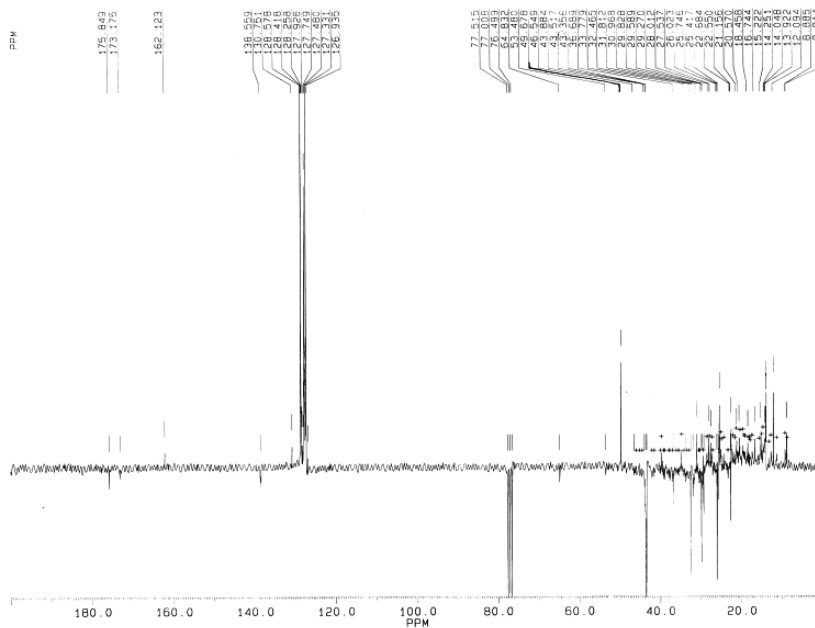
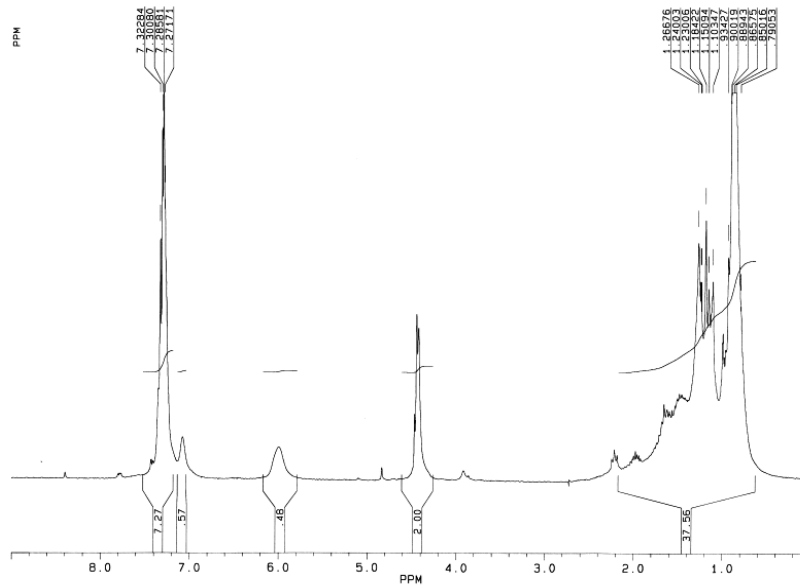
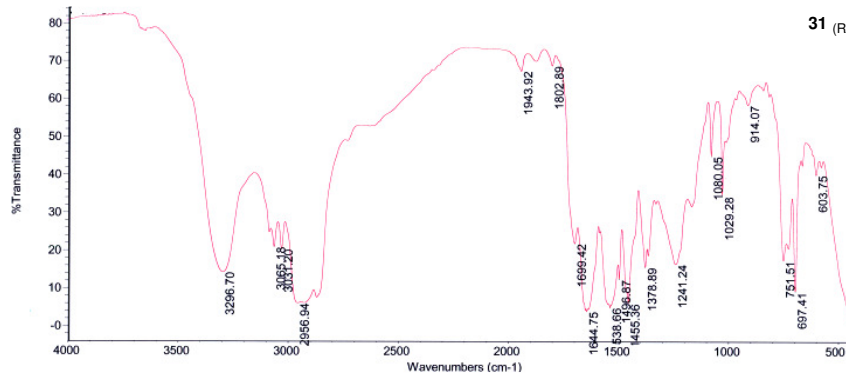
30 (RCOOH=26)



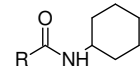
IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja **31**



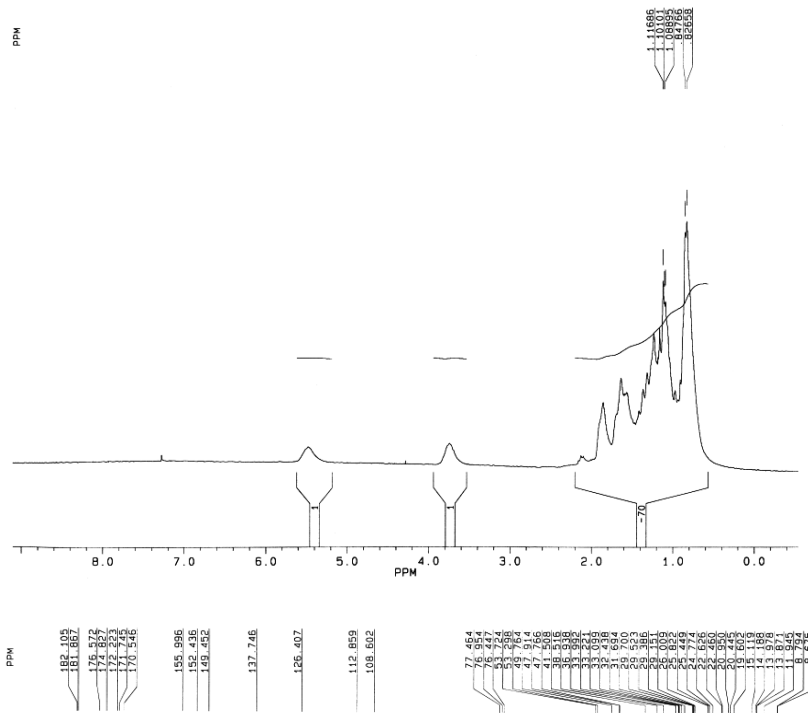
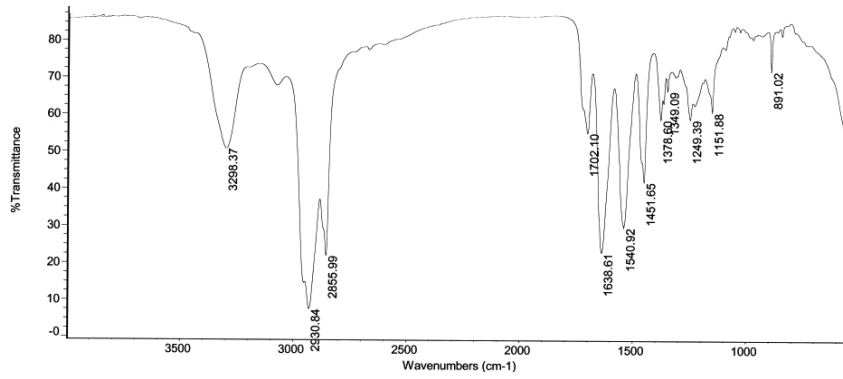
**31** (RCOOH=26)



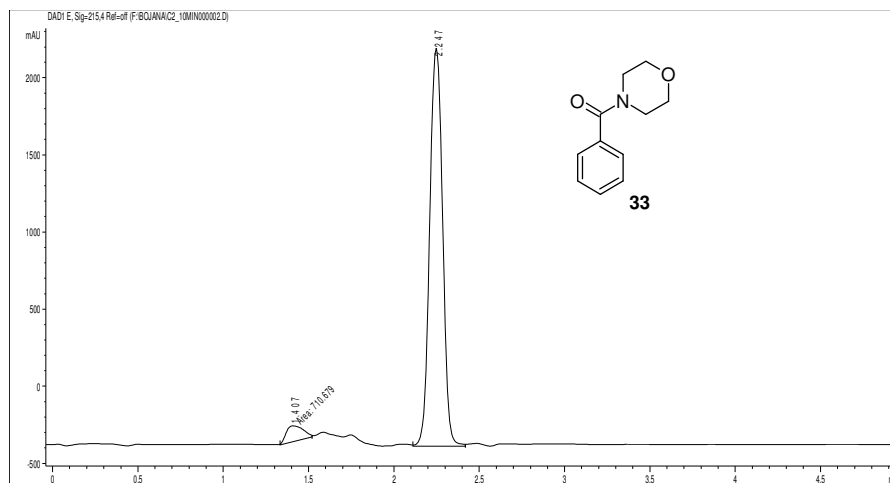
IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektar jedinjenja 32



32 (RCOOH-26)

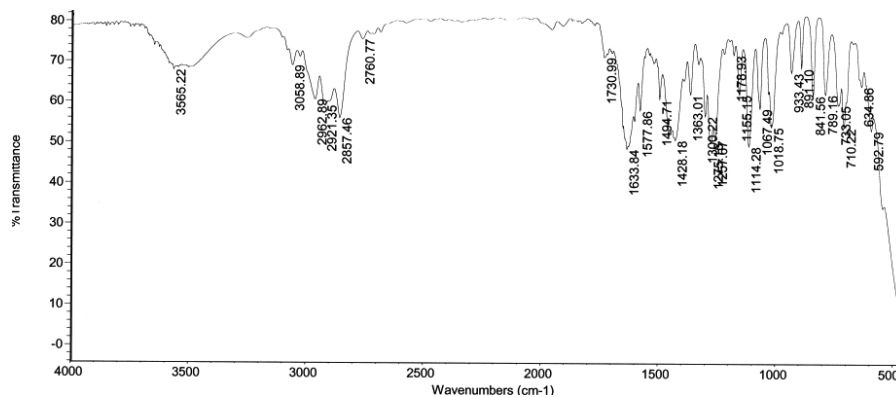


# HPLC chromatogram, IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektri jedinjenja 33

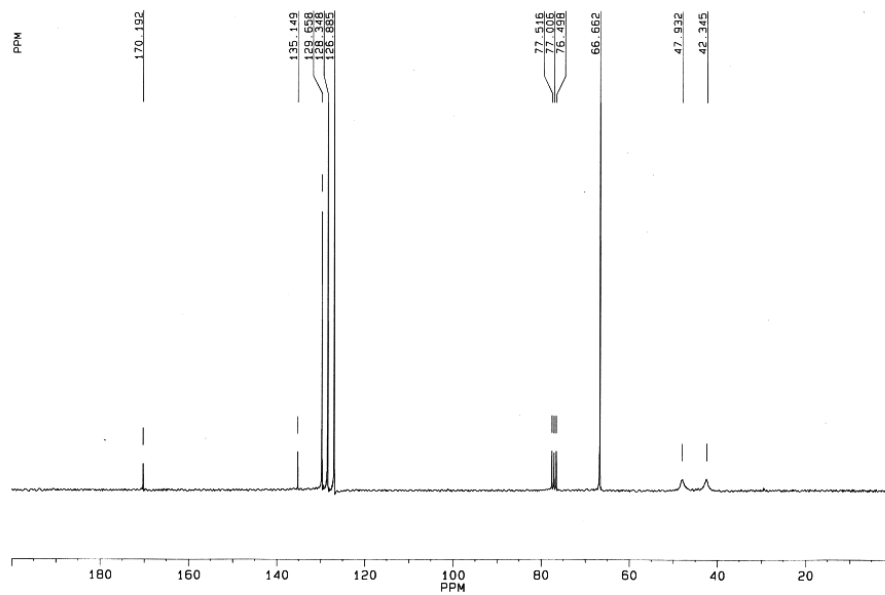
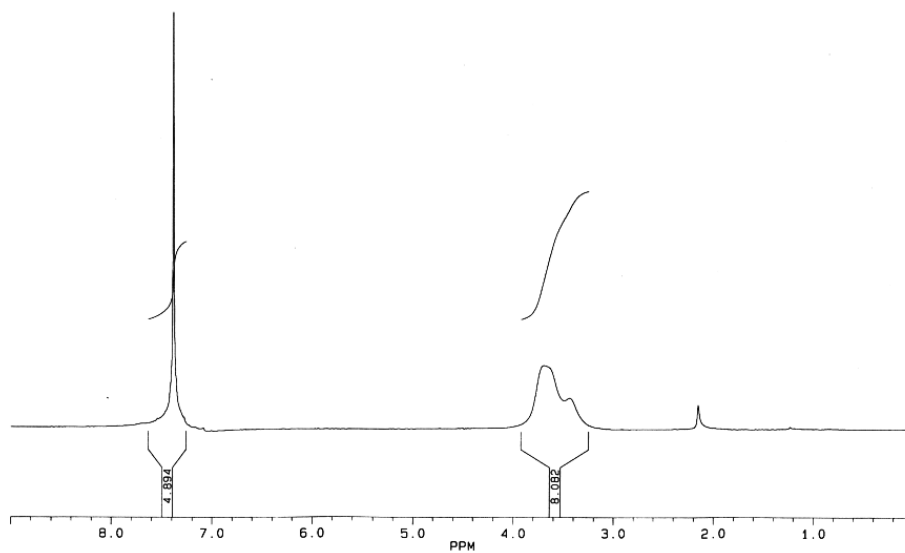


Signal 1: DAD1 E, Sig=215,4 Ref=off

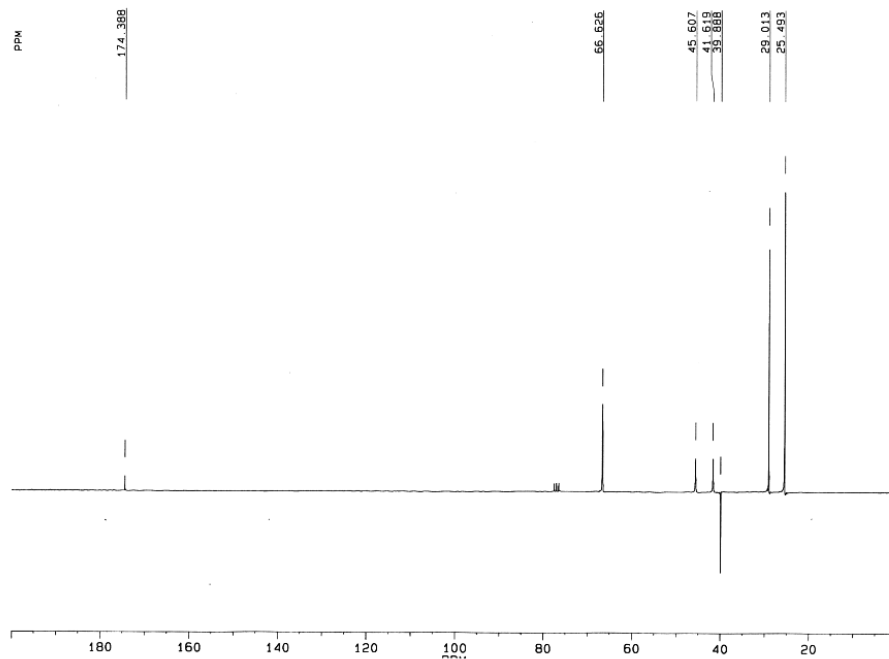
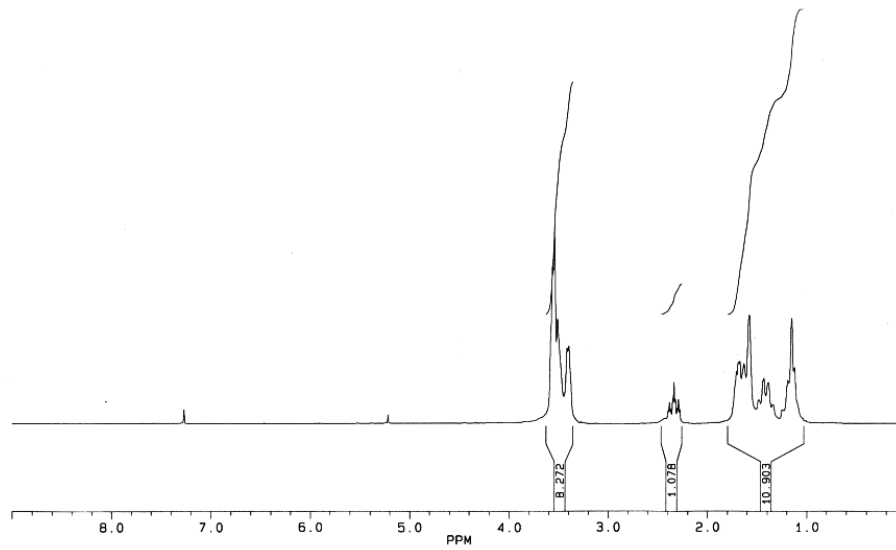
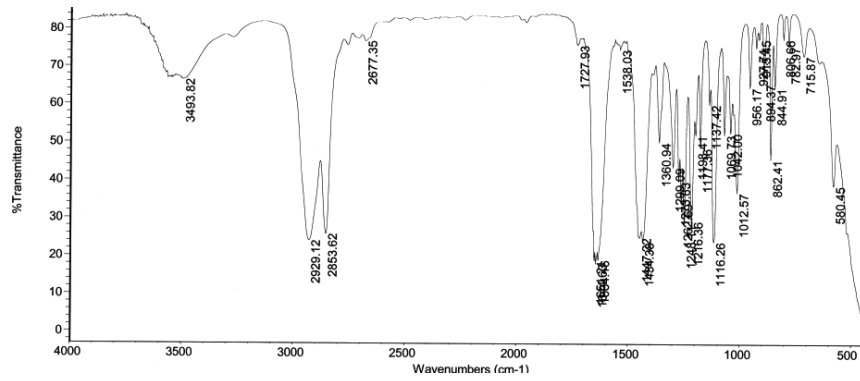
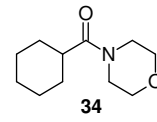
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %
1	1.407	MM	0.1118	665.44104	4.6871
2	2.247	VV	0.0832	1.35320e4	95.3129



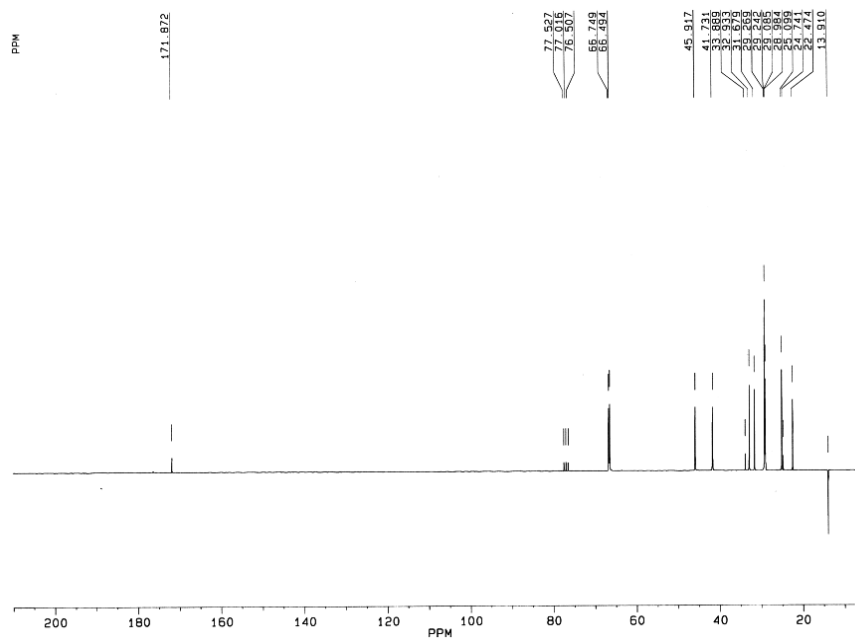
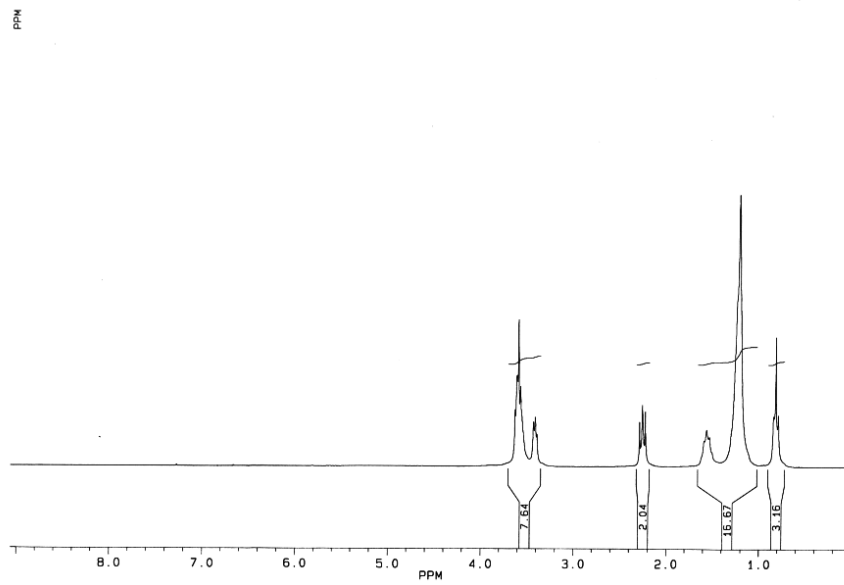
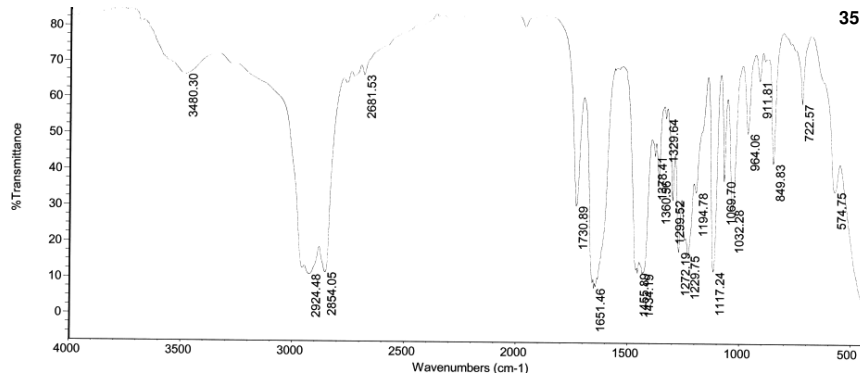
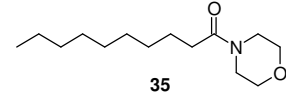




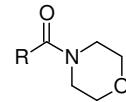
IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja **34**



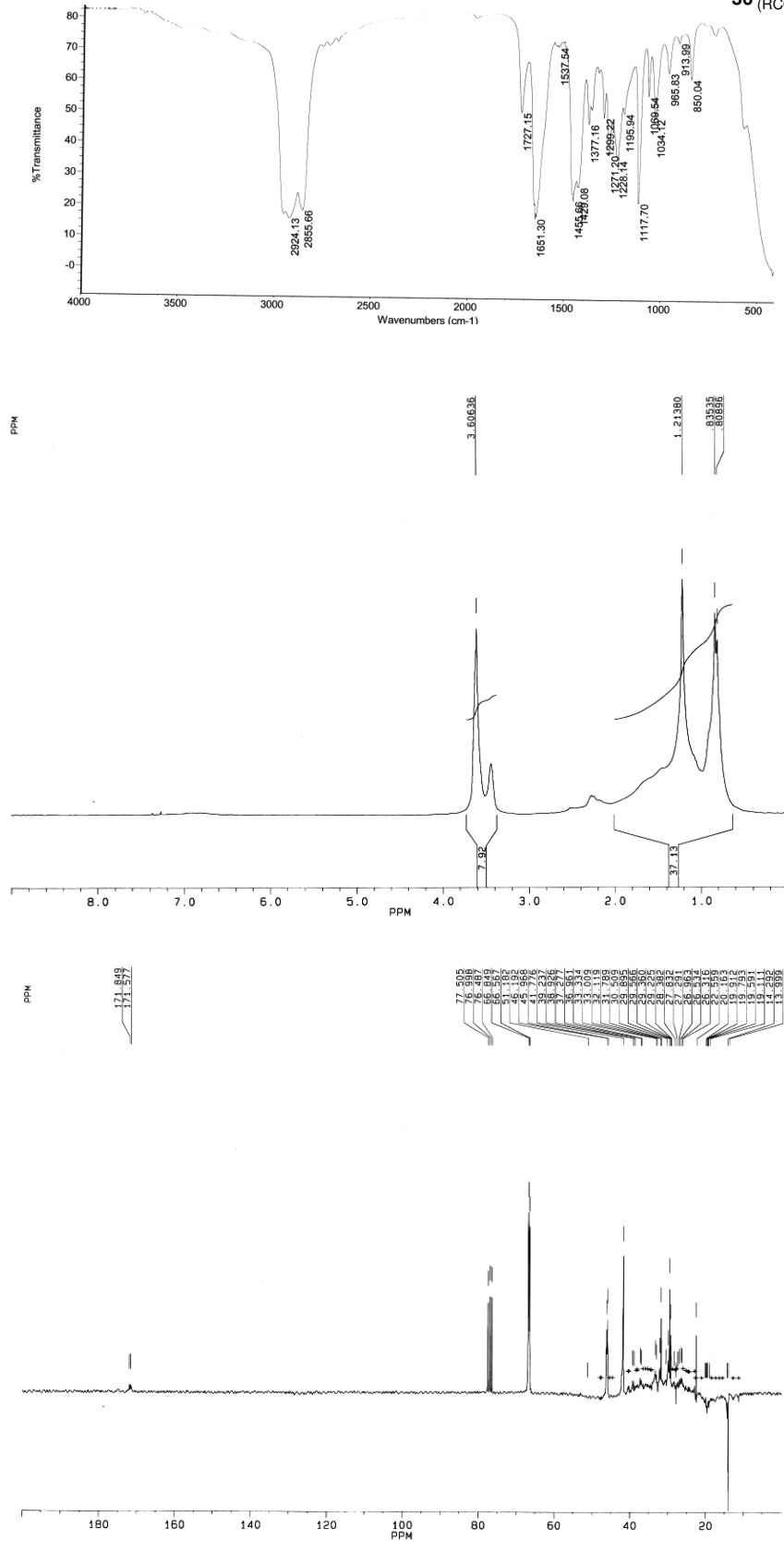
IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja **35**



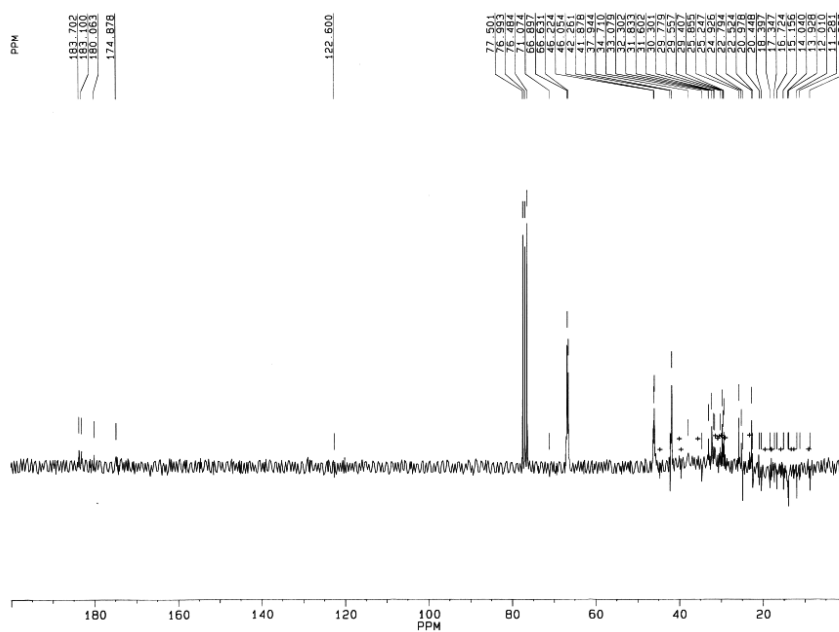
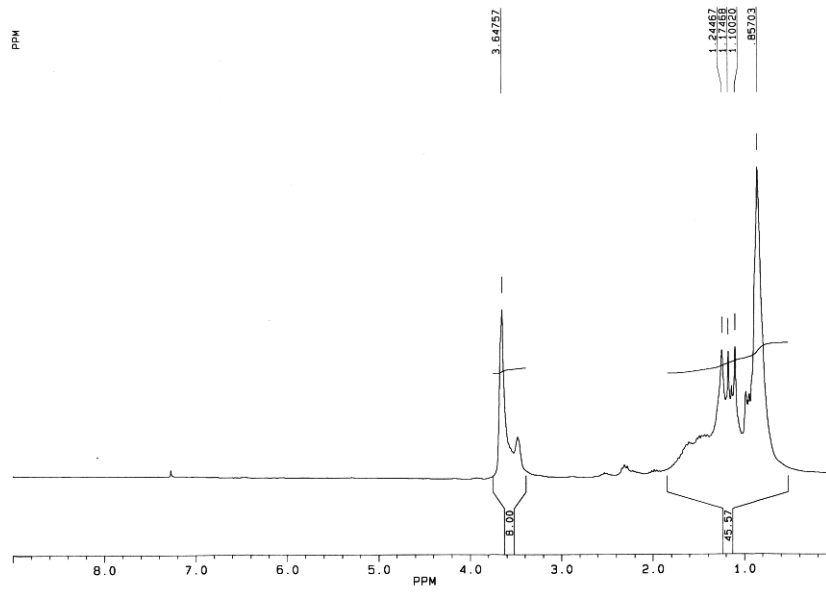
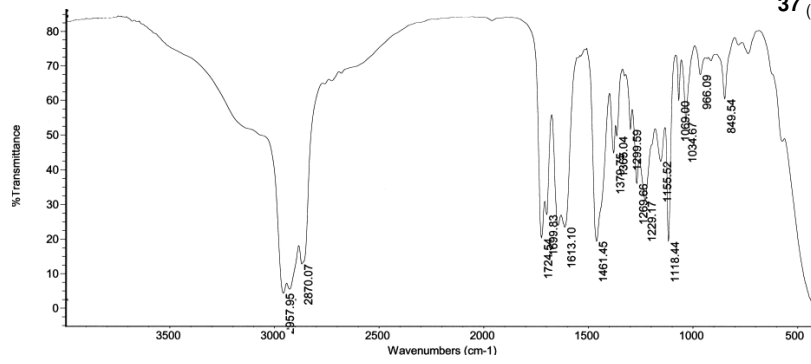
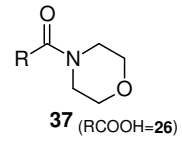
IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja **36**



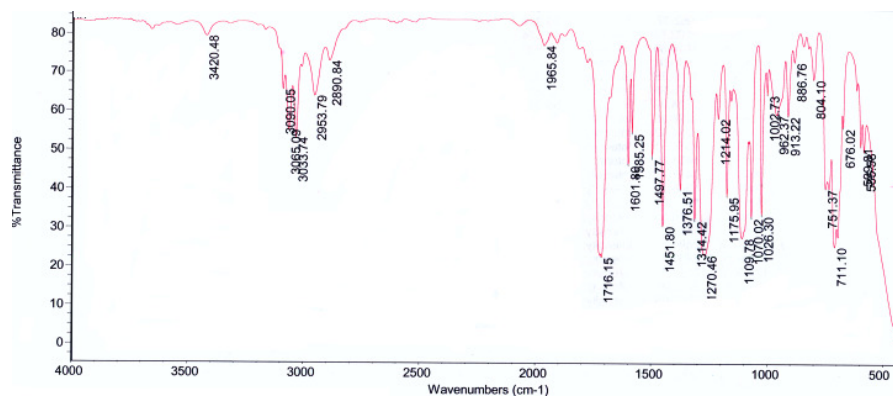
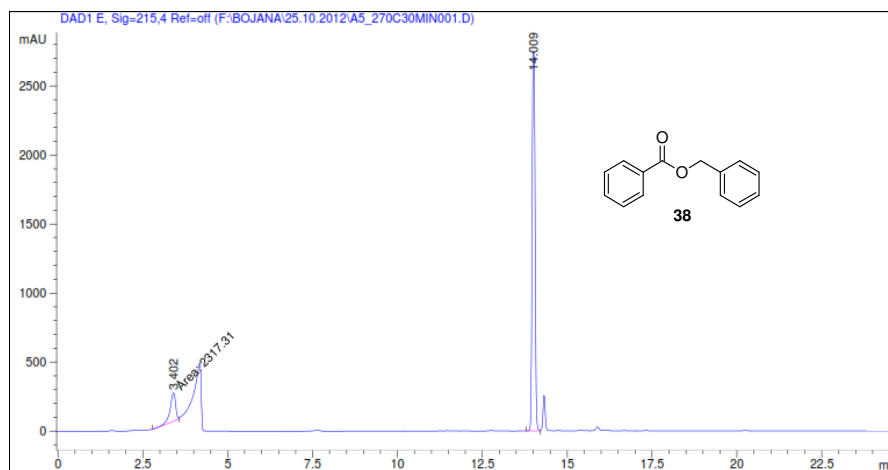
**36** (RCOOH=25)

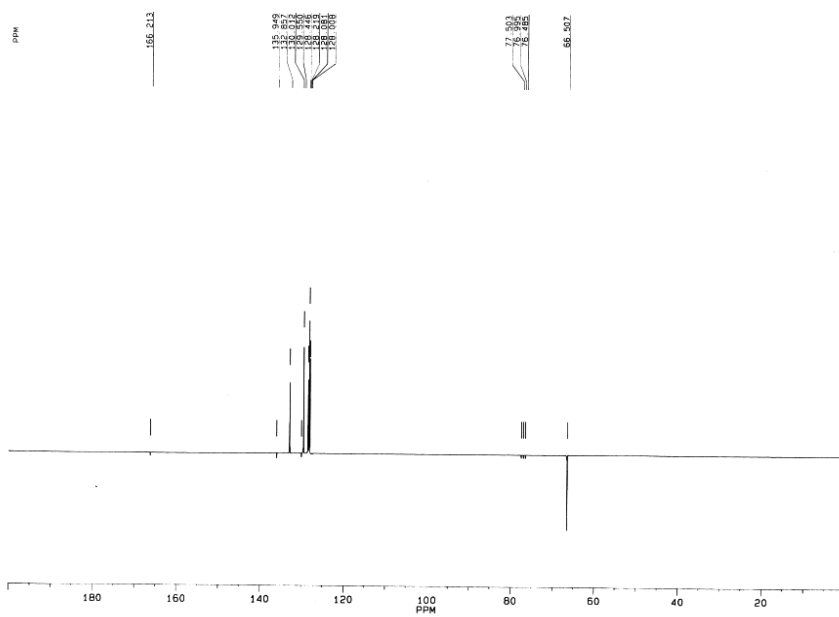
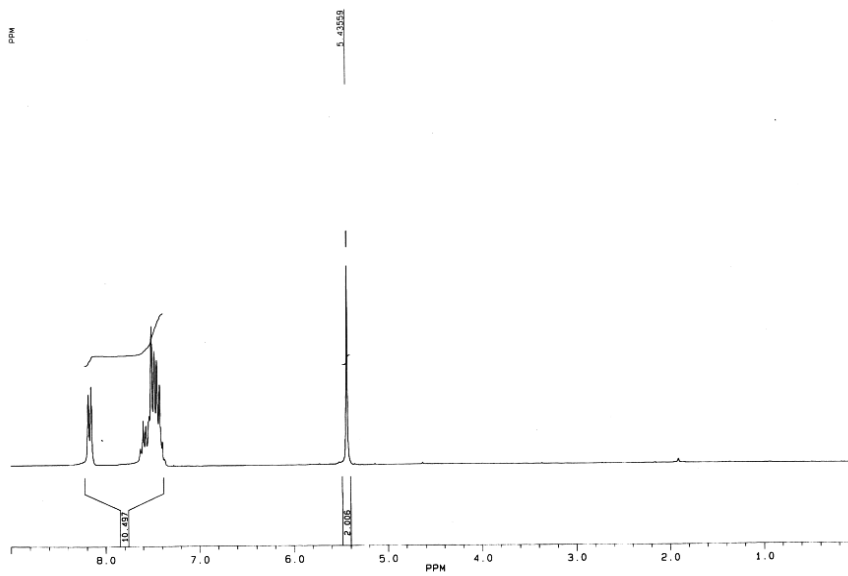


IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja **37**

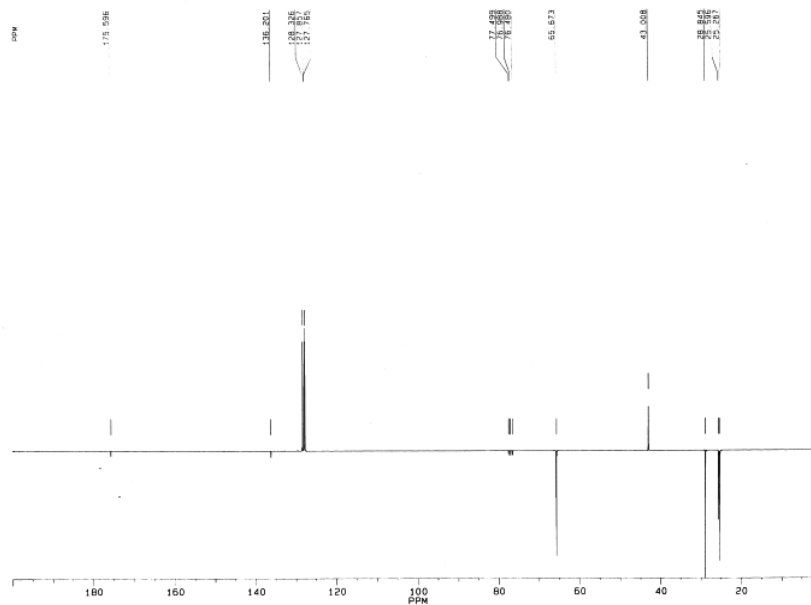
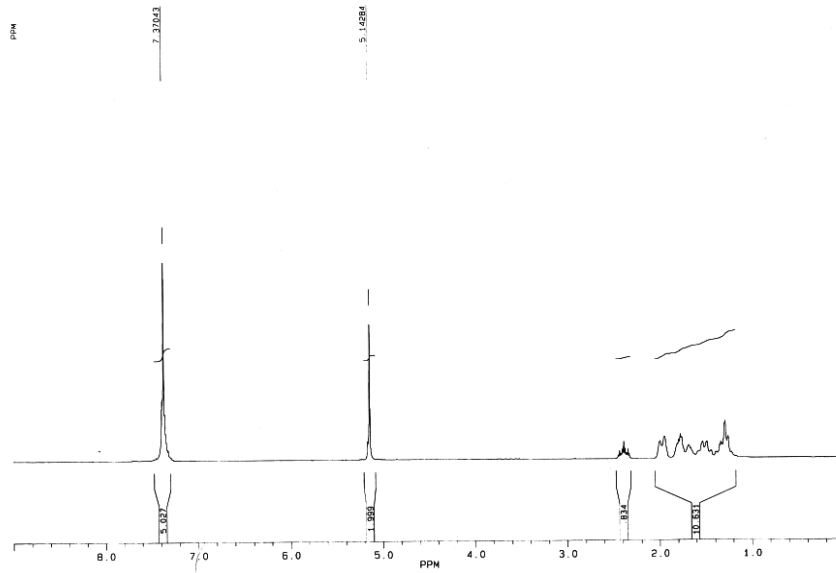
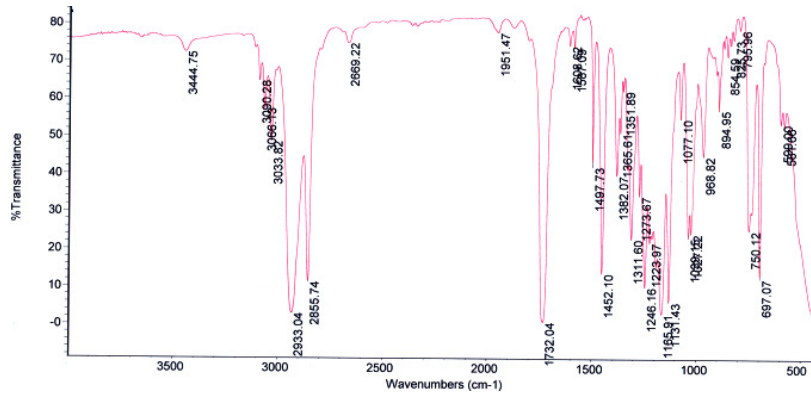
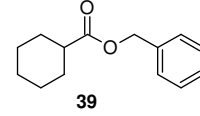


HPLC chromatogram, IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja **38**





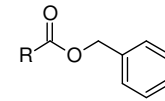
IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja 39



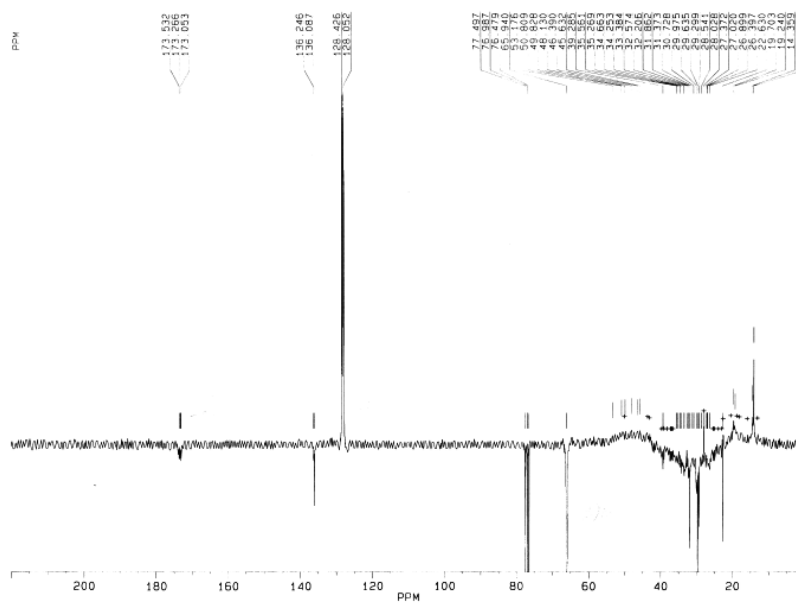
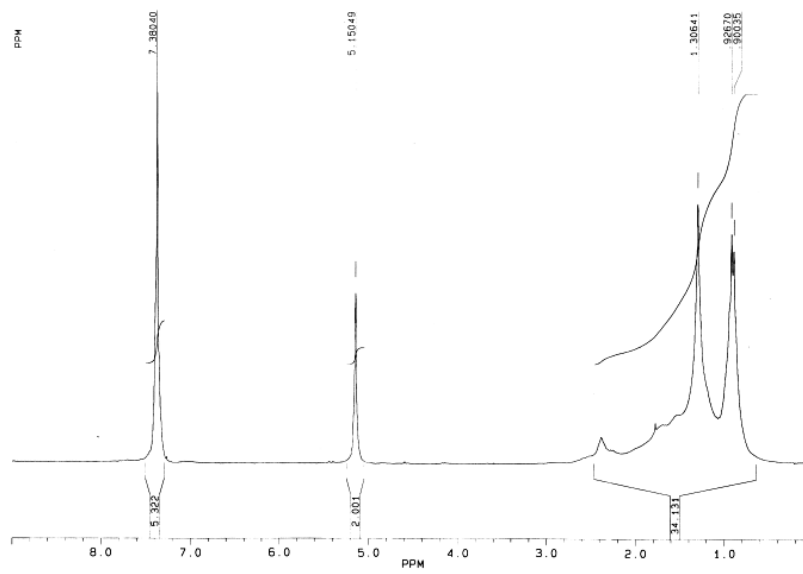
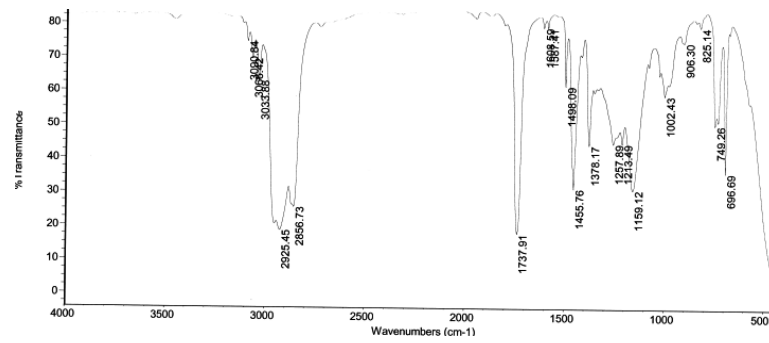




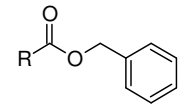
IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja 41



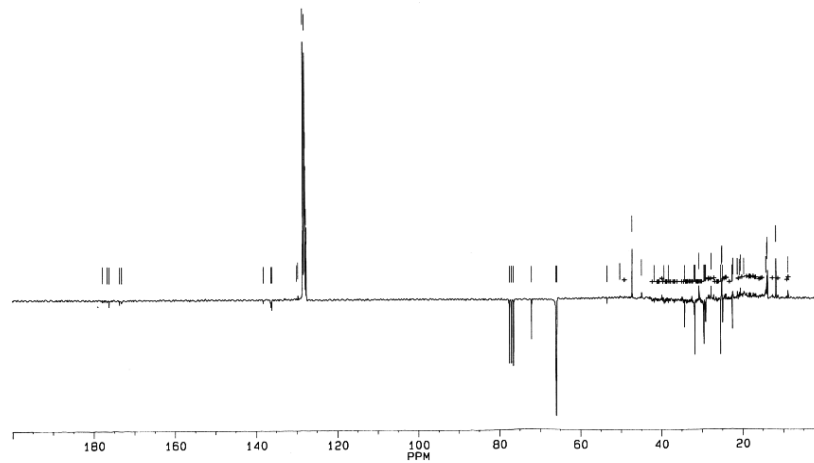
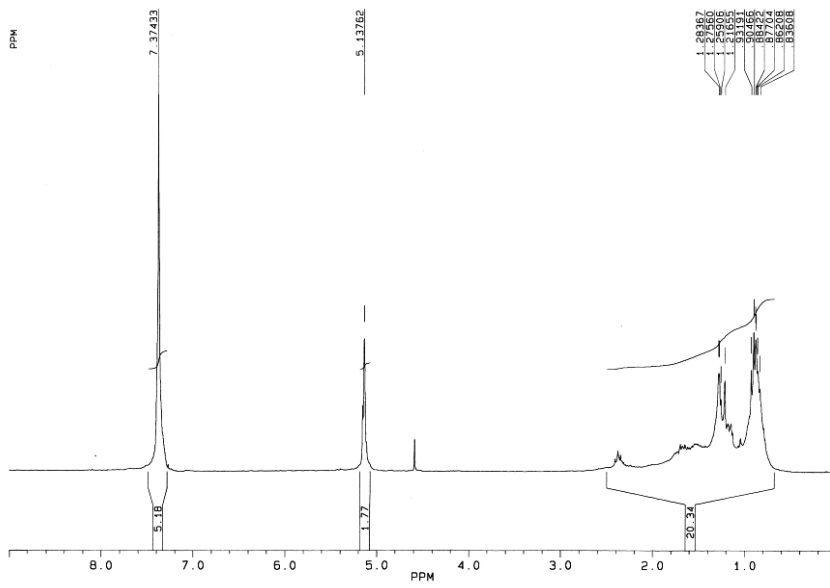
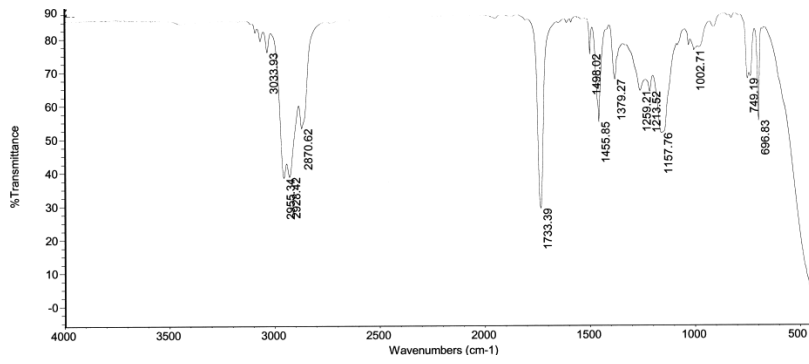
41 (RCOOH=25)



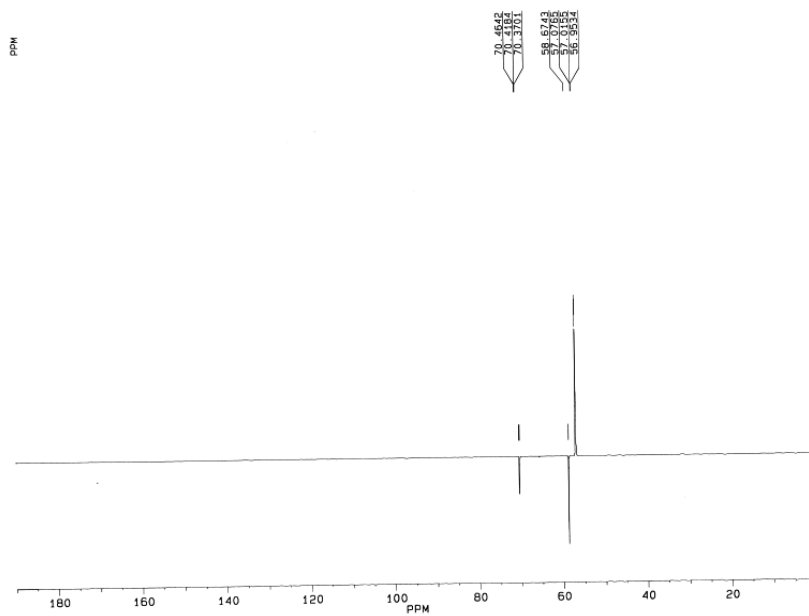
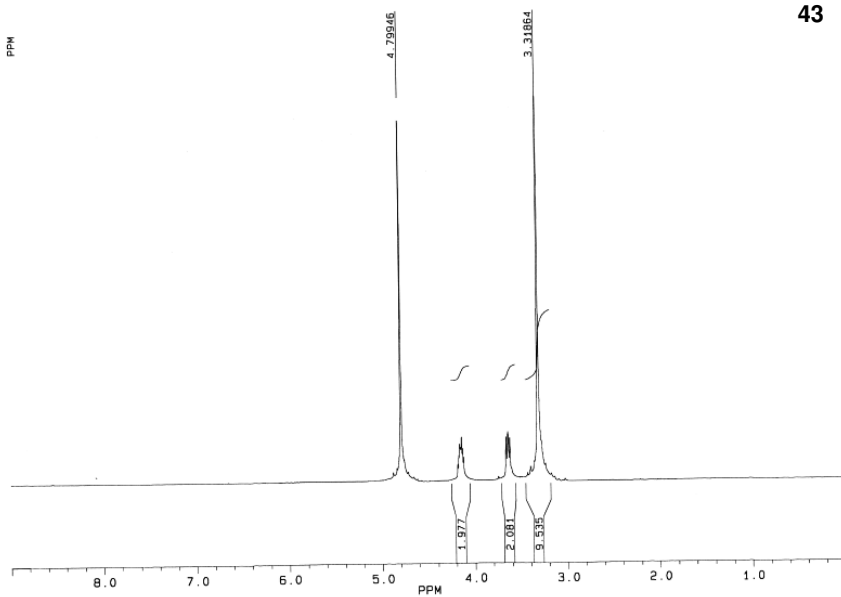
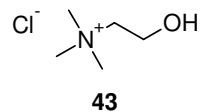
IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja 42



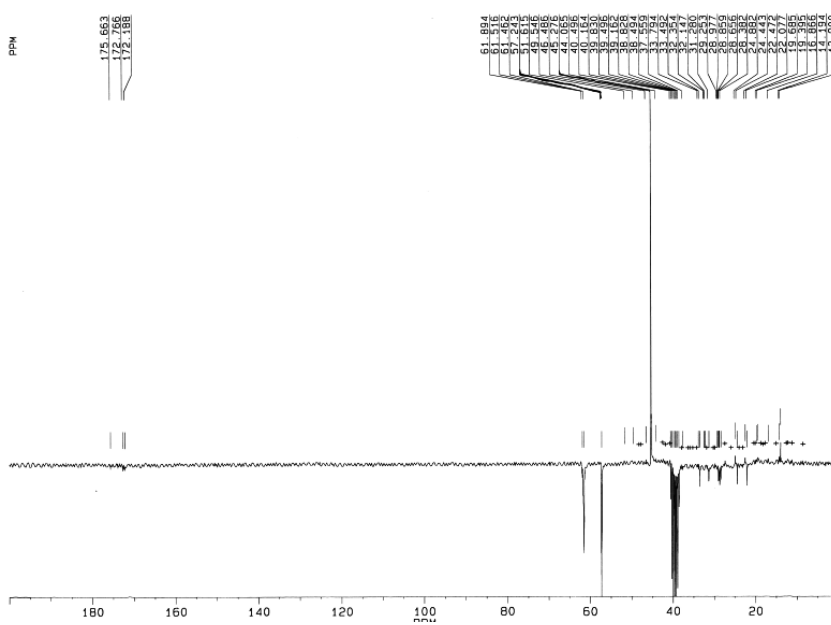
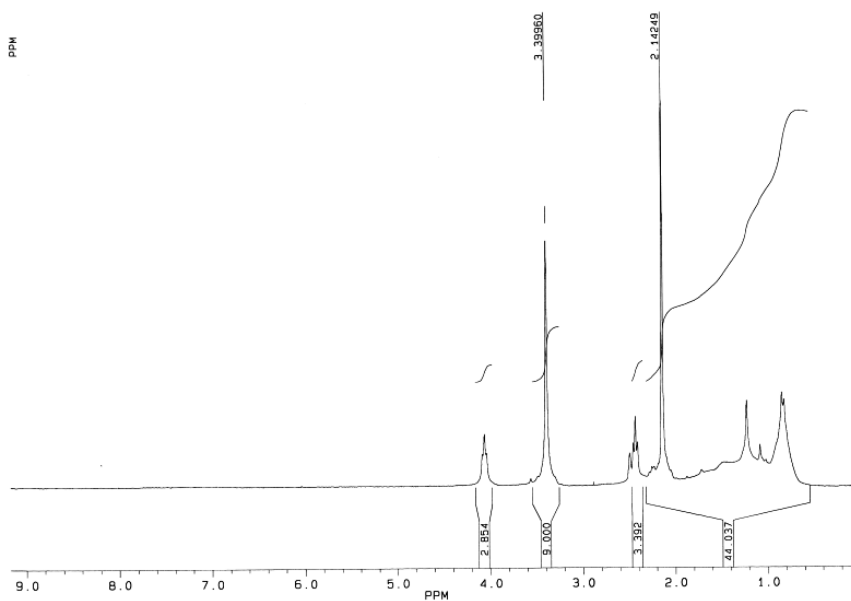
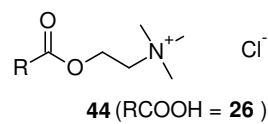
42 (RCOOH=26)



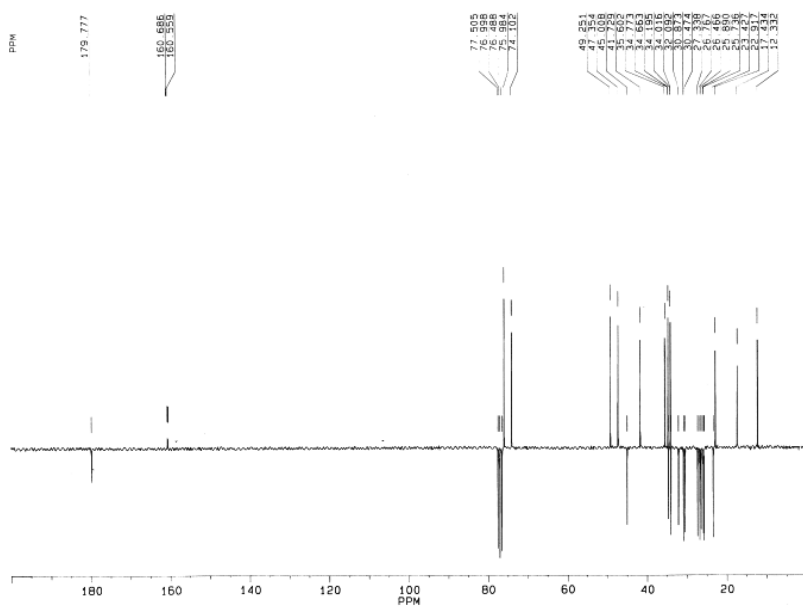
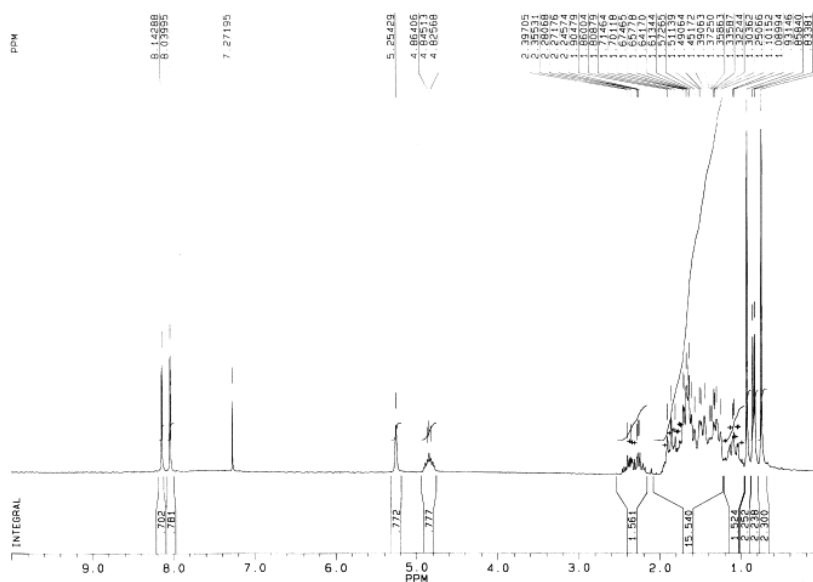
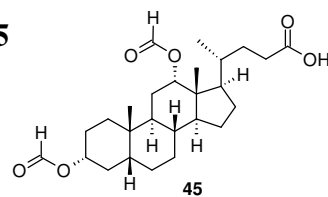
$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja **43**



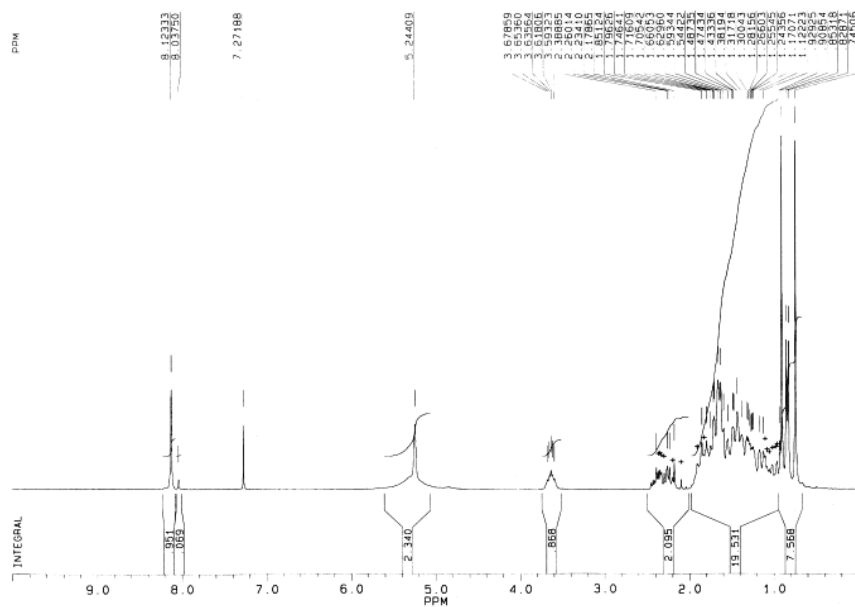
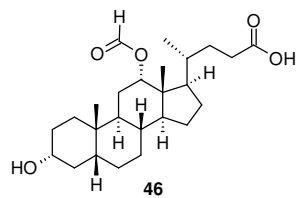
$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri jedinjenja **44**



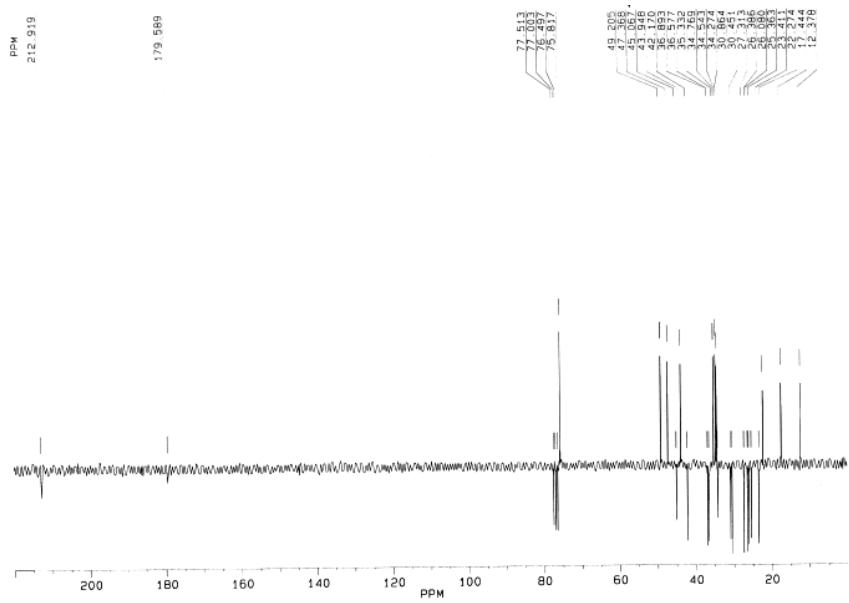
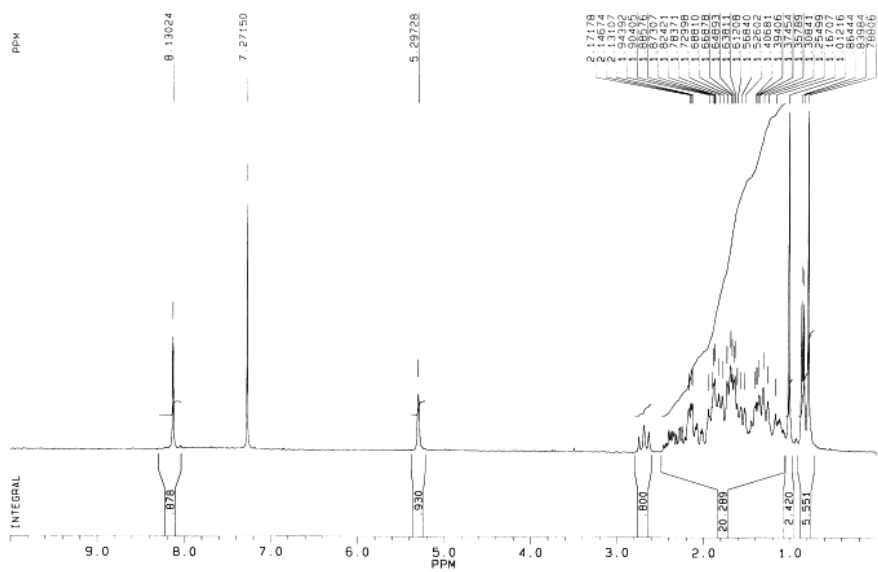
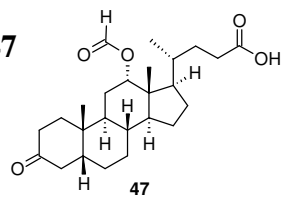
$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri jedinjenja 45



<sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja 46

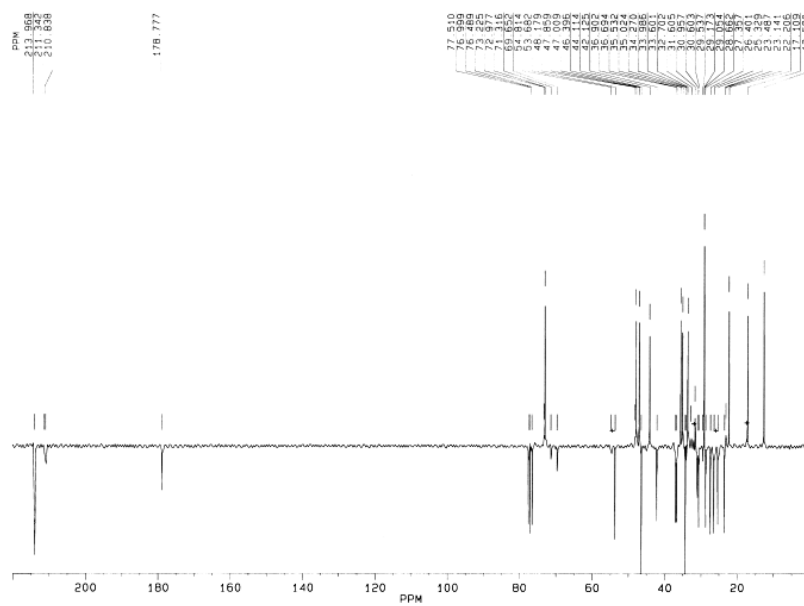
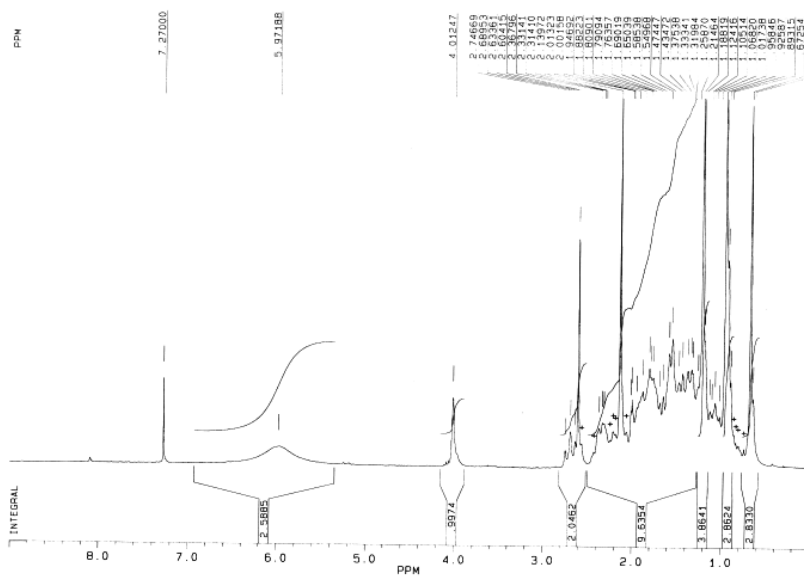
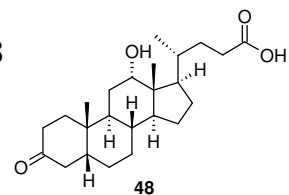


$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja 47

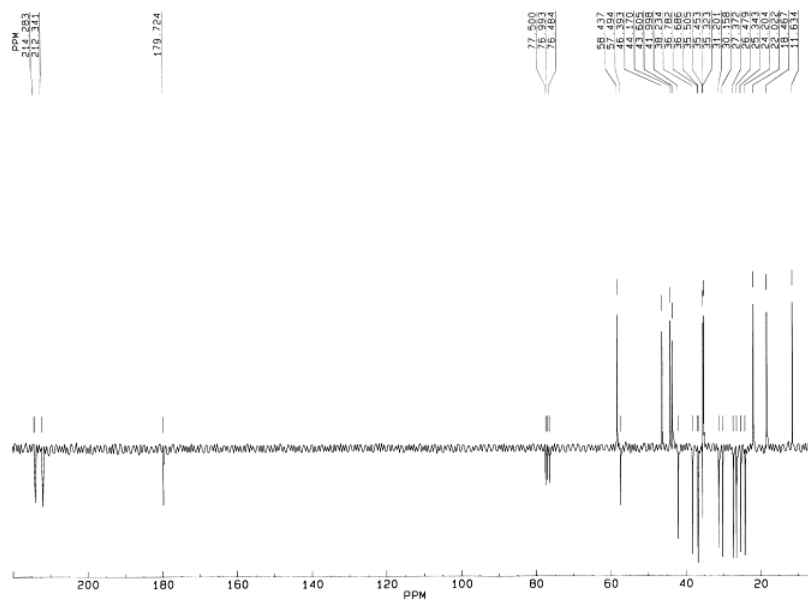
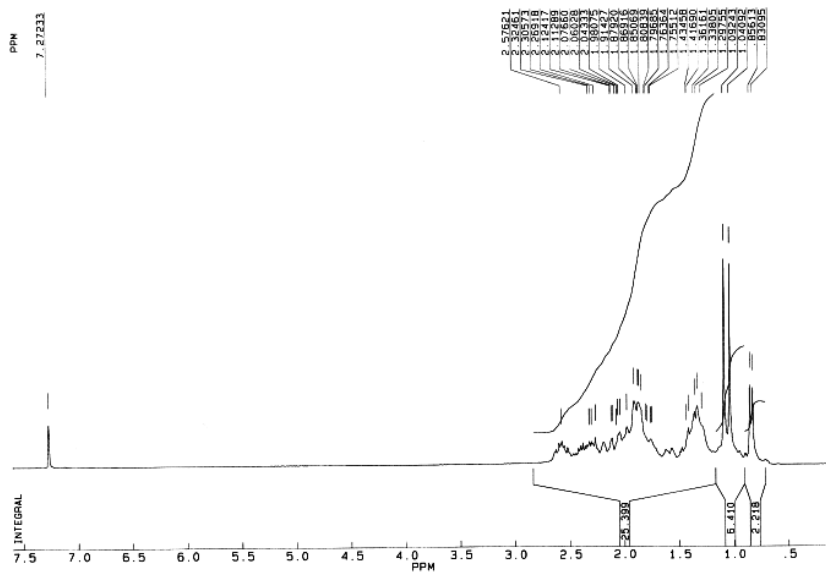
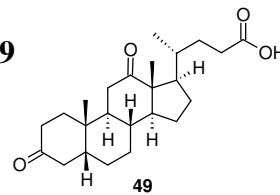




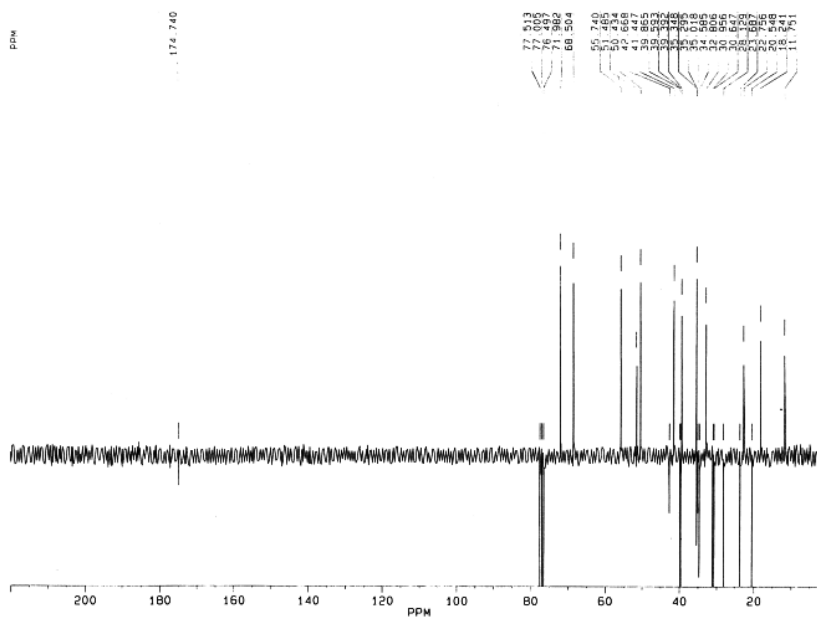
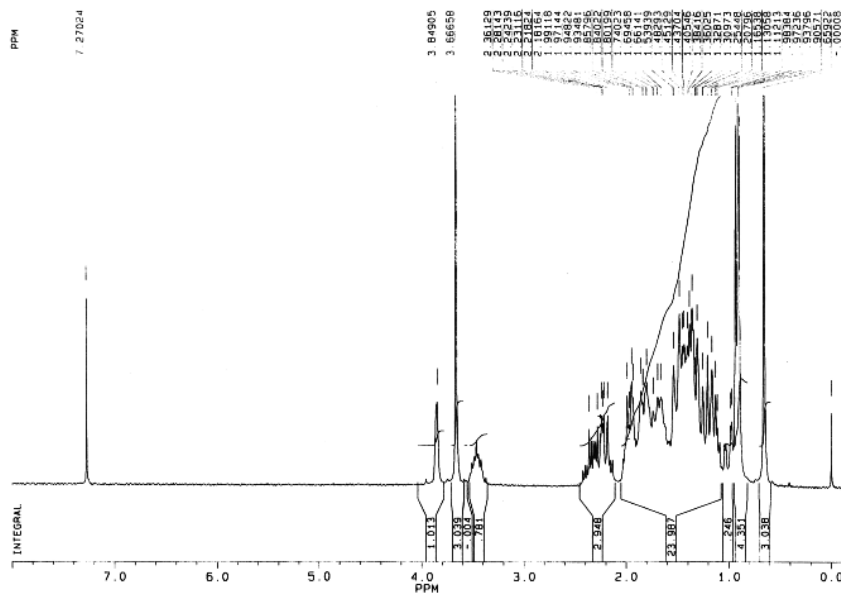
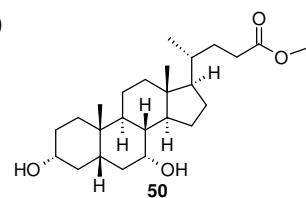
$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja 48



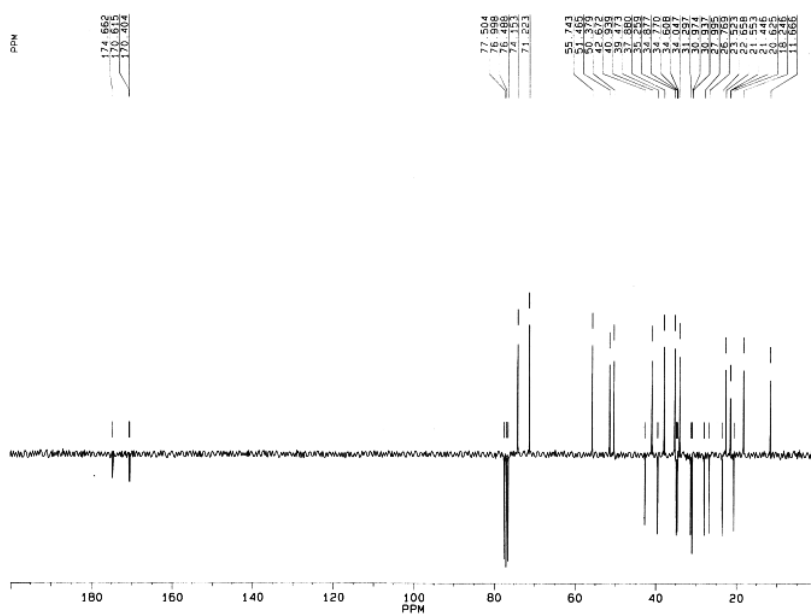
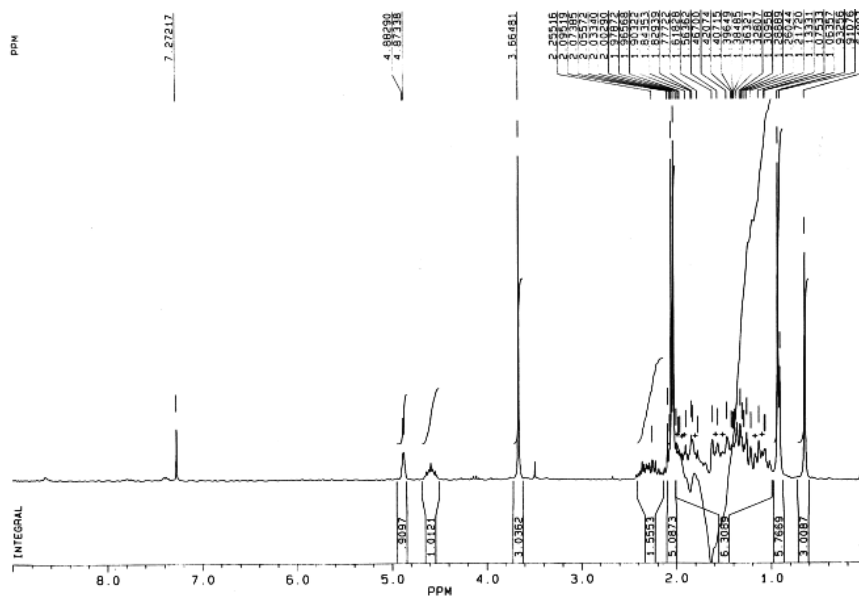
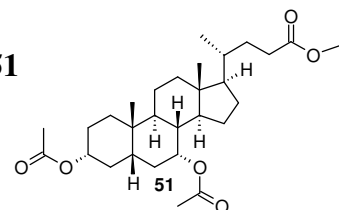
$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja 49



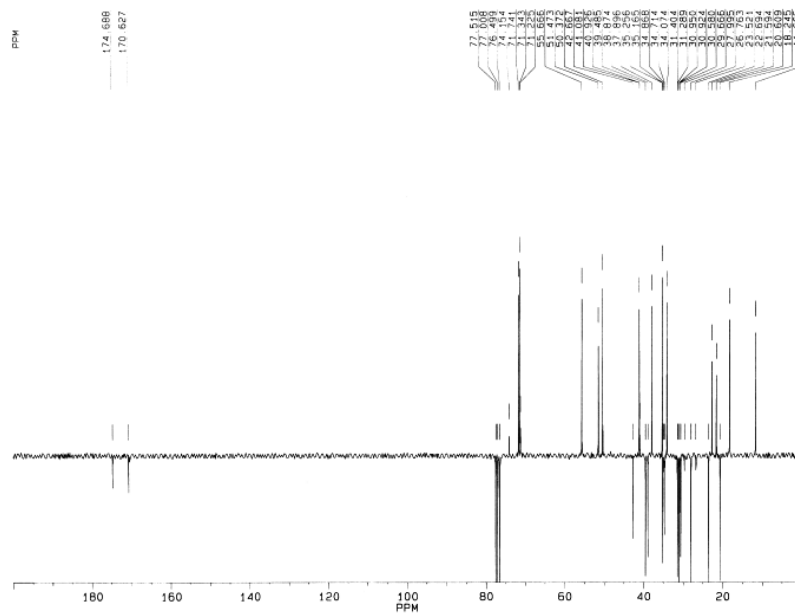
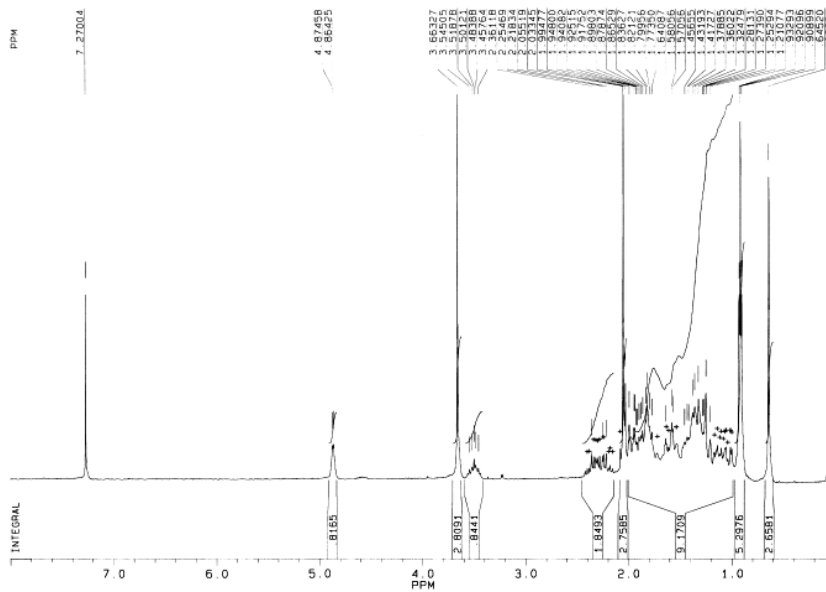
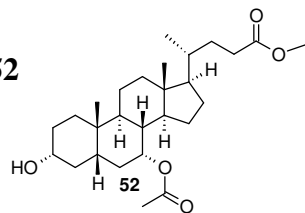
$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja **50**



$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja 51

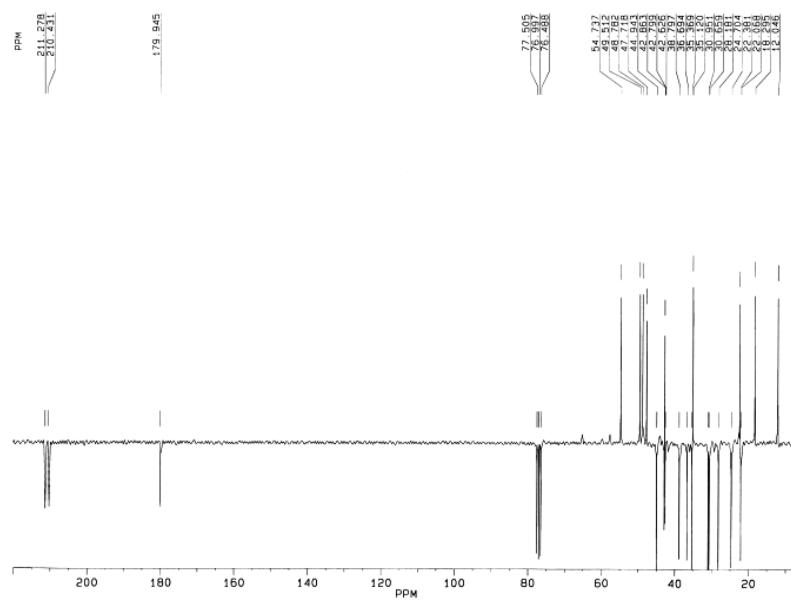
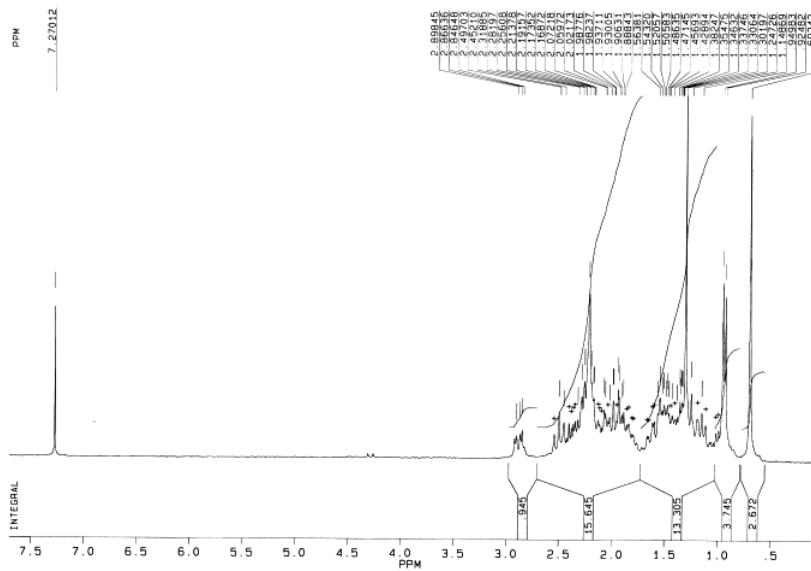
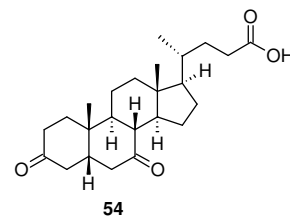


$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja 52

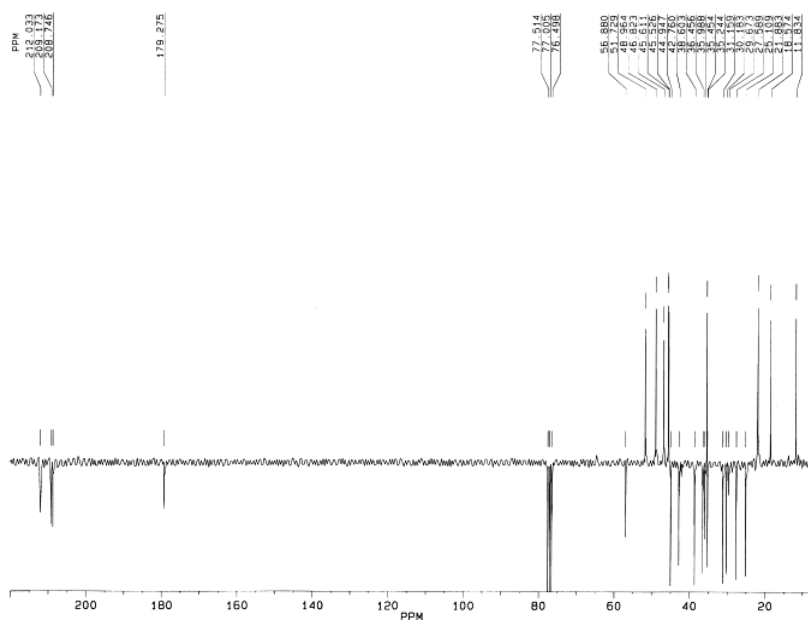
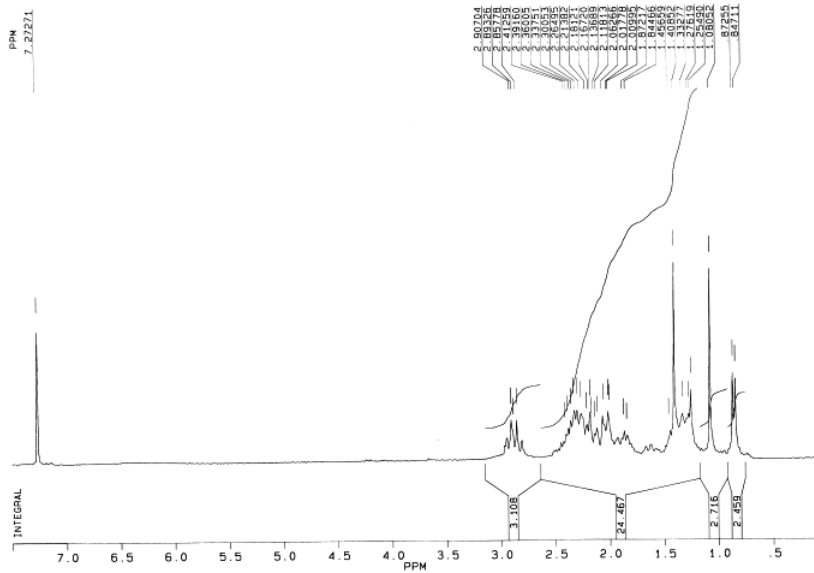
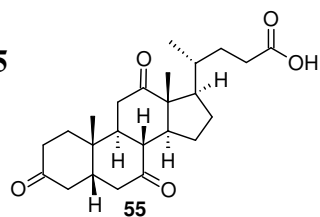




$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja **54**

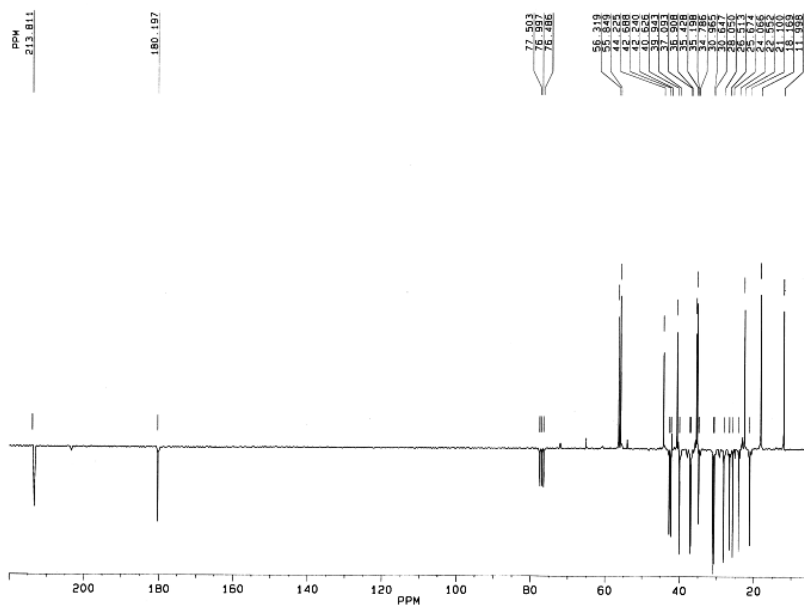
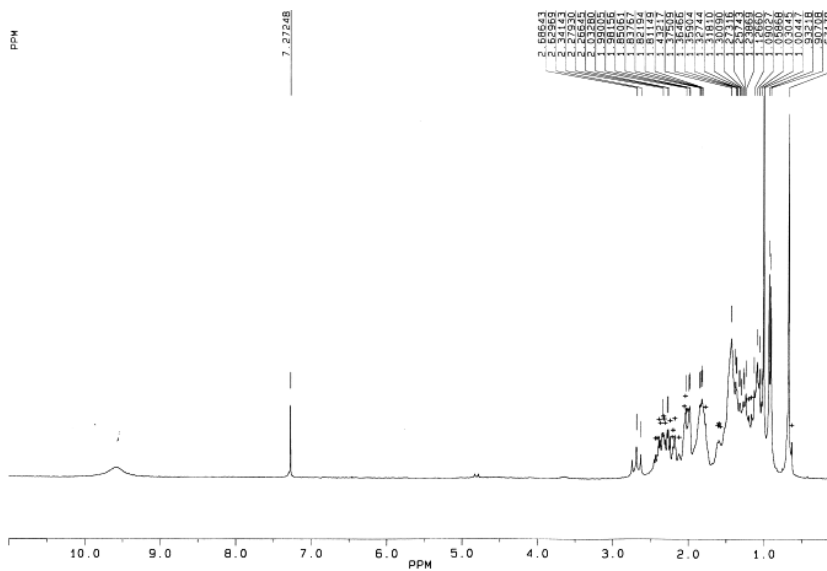
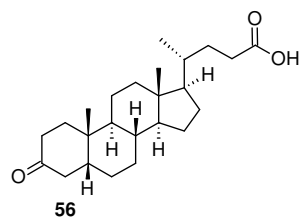


$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja **55**

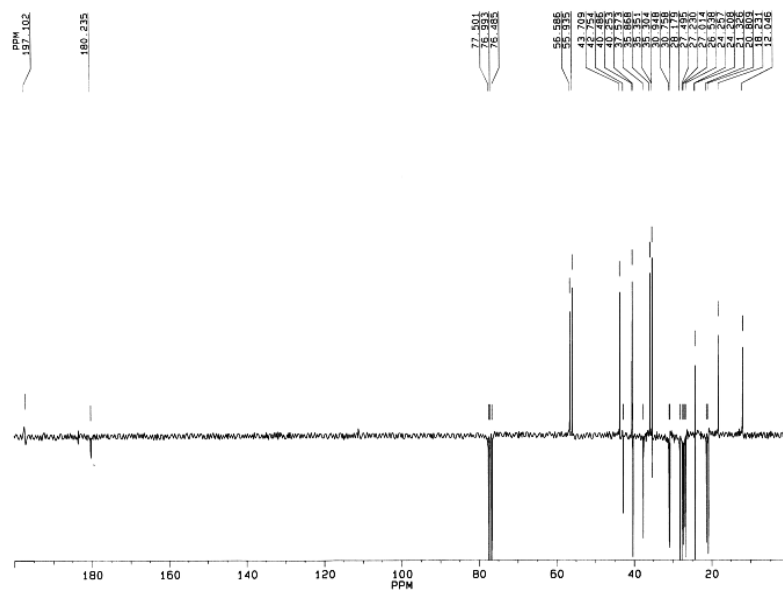
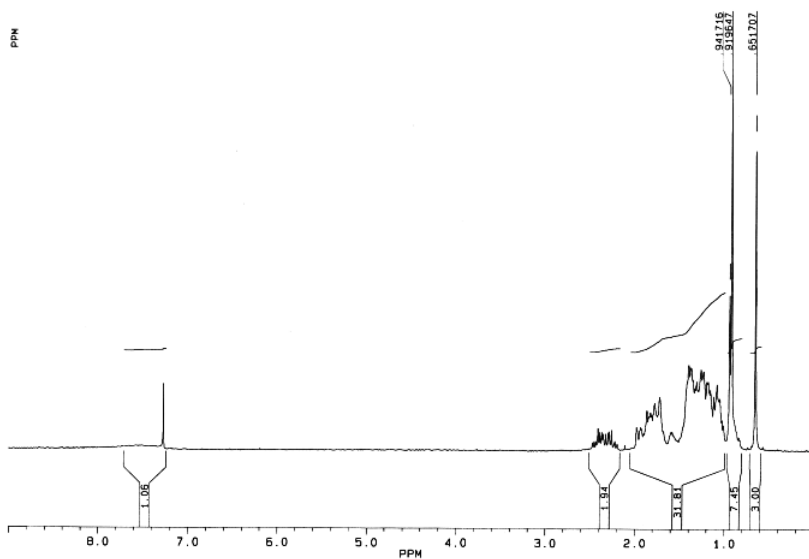
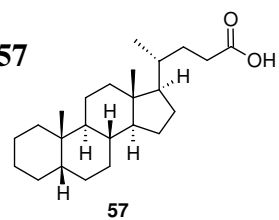




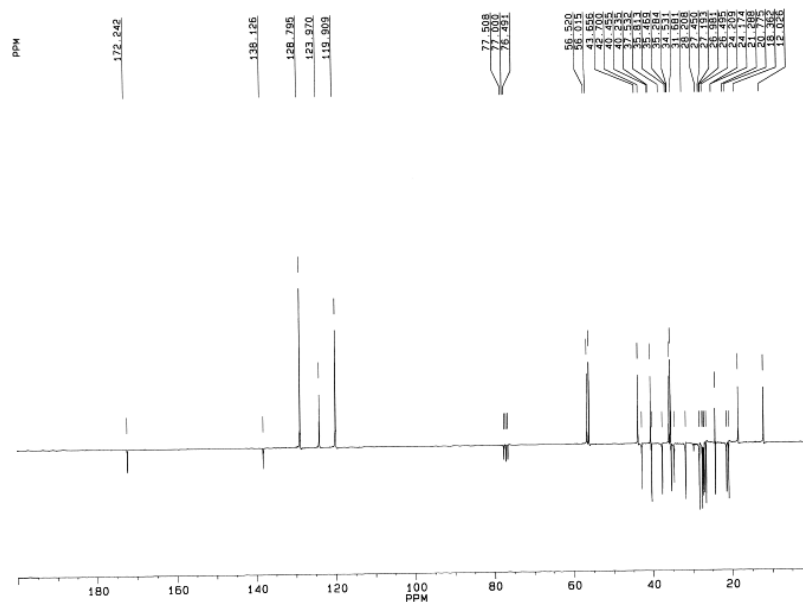
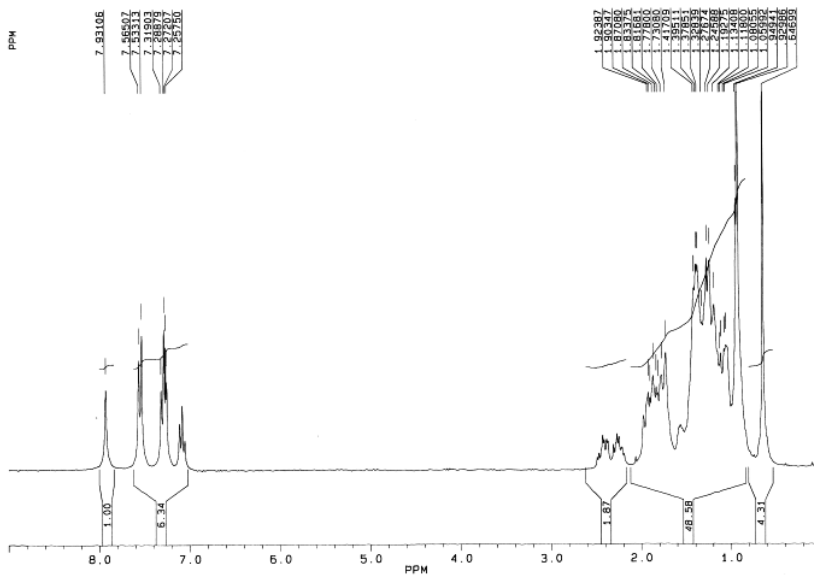
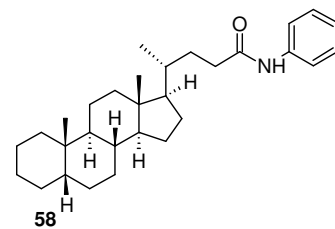
$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja **56**



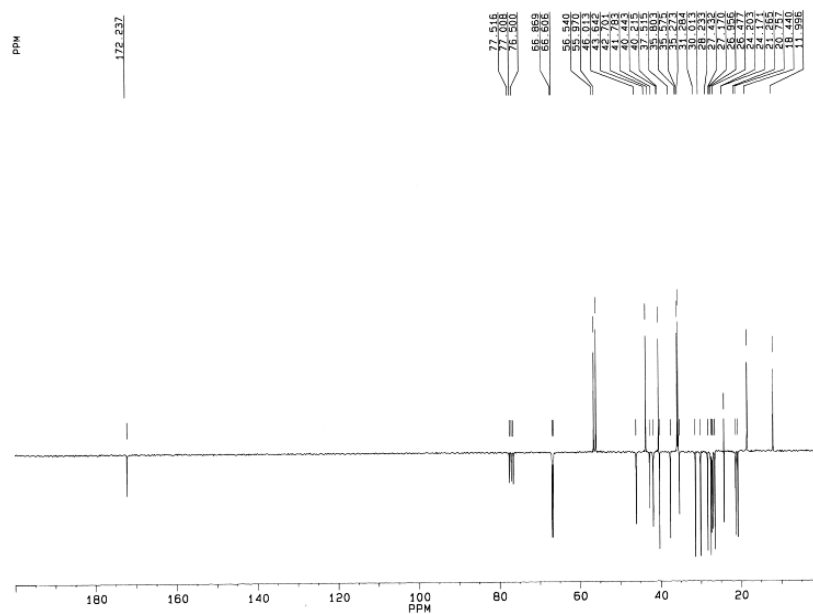
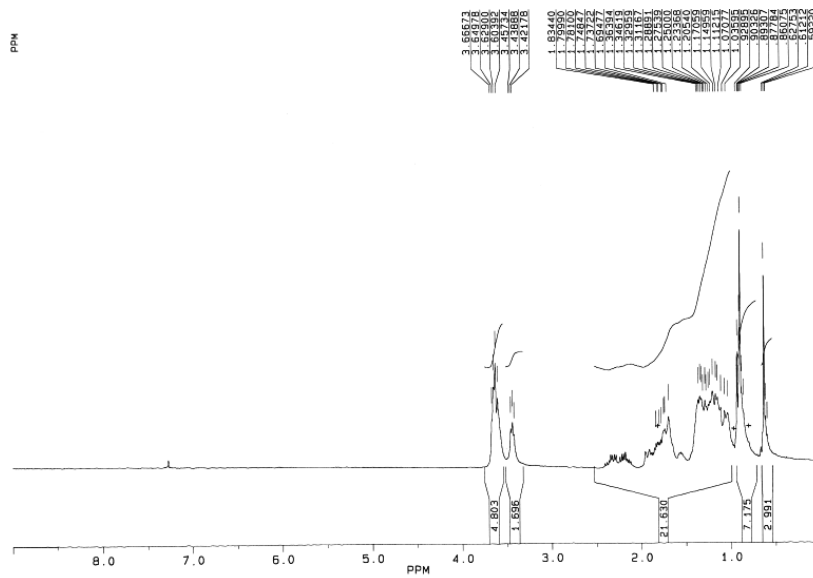
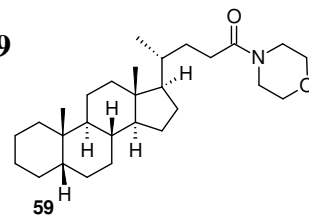
$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja **57**



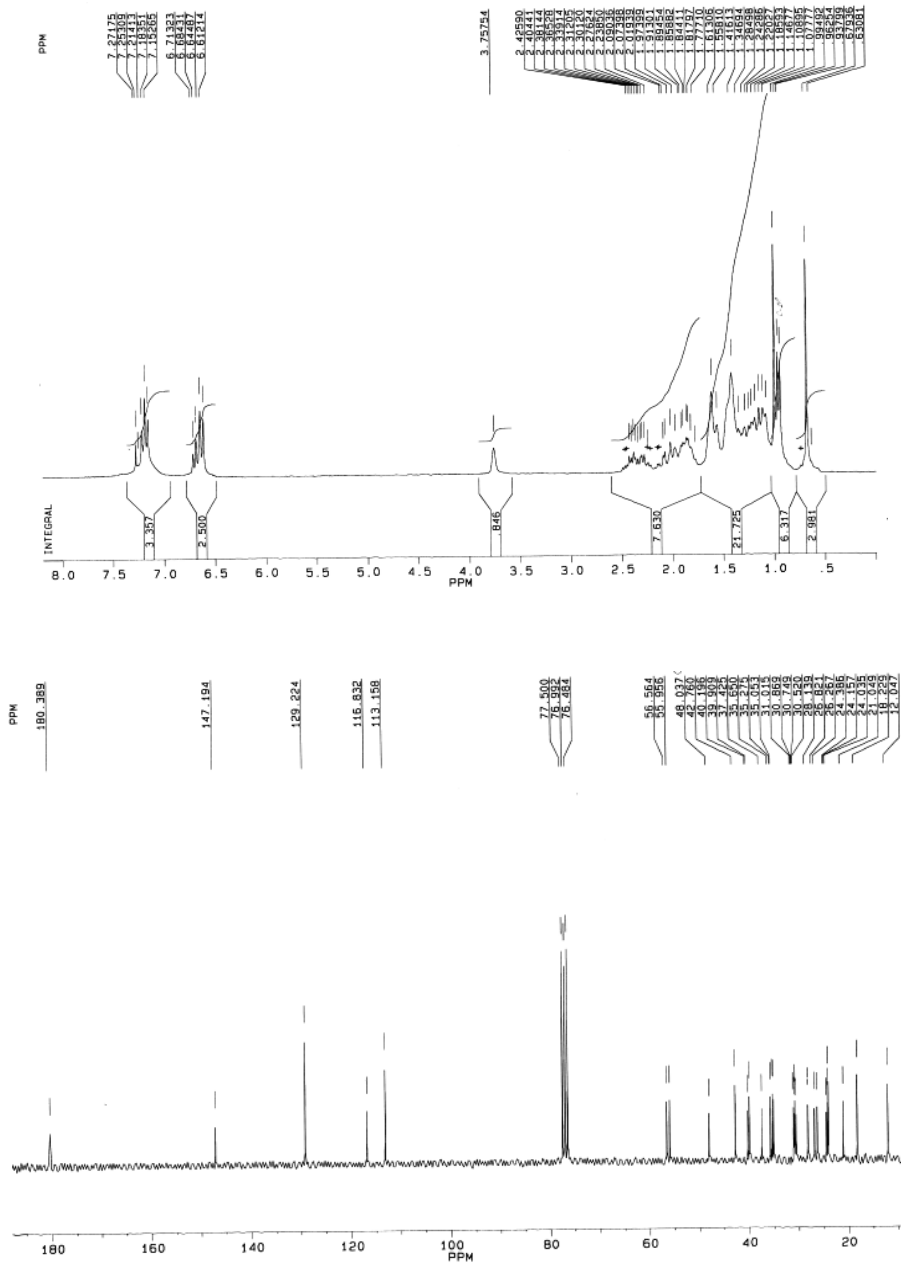
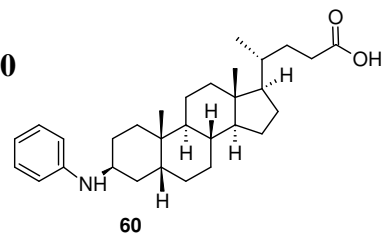
$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja **58**



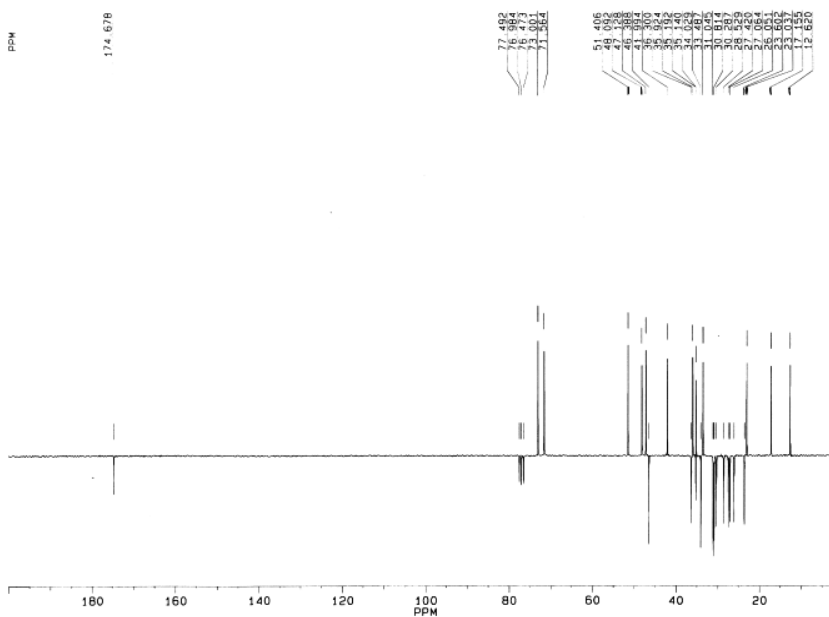
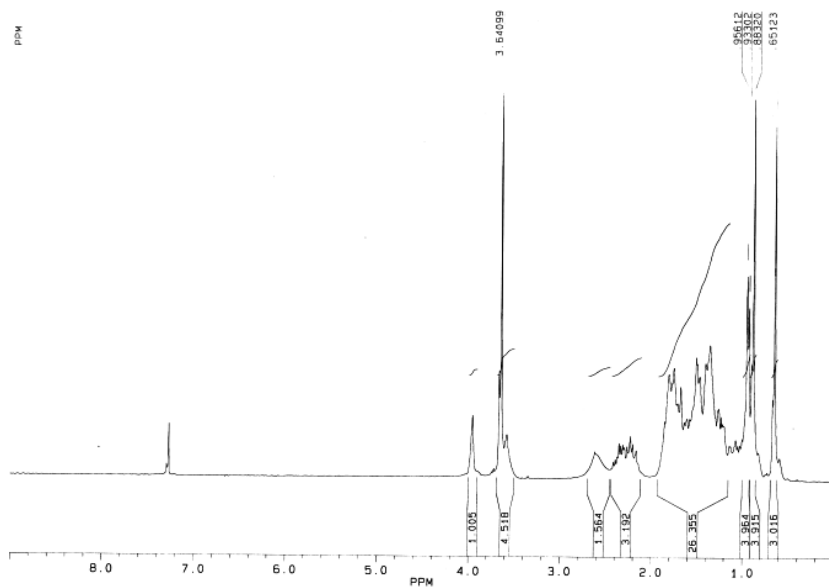
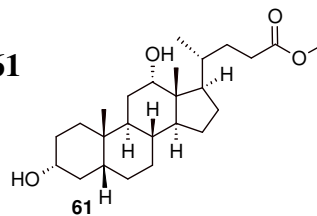
$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja **59**



$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja **60**



$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja **61**





$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja **63**

