

Priprava i karakterizacija 9a-makrozona izvedenih iz 4-aminobenzojeve kiseline i derivata salicilaldehida

Divjak, Leda

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:524412>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Leda Divjak

**PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA 9a-
MAKROZONA IZVEDENIH IZ 4-
AMINOBENZOJEVE KISELINE I
DERIVATA SALICILALDEHIDA**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistra kemije

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za Analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Predraga Novaka i komentorstvom dr. sc. Kristine Smokrović

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom Makrozoni, novi konjugati makrolidnih antibiotika: Dizajn, priprava i interakcije (IP-2018-01-8098).

Zahvale

Prije svega bi htjela zahvaliti mentoru prof. dr. sc. Predragu Novaku na prenesenom znanju, povjerenju, svim pruženim prilikama i iskustvima, a pogotovo na pomoći tijekom rada na projektu i izrade ovog diplomskog rada.

Također bi htjela zahvaliti komentorici dr. sc. Kristini Smokrović za puno truda, prenesenog znanja, strpljenja i pomoći tijekom izrade rada.

Hvala kolegici Moniki na svom vremenu provedenom zajedno u labosu, bez tebe ne bi bilo toliko lijepo.

Hvala mojoj Hani na potpori i svakom razgovoru, hvala što si uvijek bila uz mene!

Hvala kolegicama Kristini, Petri, Laviniji, Adriani, Anđeli i drugima na podršci tijekom studija. Hvala Matiji za vjetar u leđa.

Najveće hvala obitelji na svojoj podršci, vjeri i razumijevanju, bez vas ne bi bila tu gdje jesam.

Sadržaj

SAŽETAK	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Antibiotici	3
2.2. Makrolidi	5
2.2.1. <i>Podjela i struktura</i>	5
2.2.2. <i>Mehanizam djelovanja</i>	7
2.2.3. <i>Mehanizam rezistencije</i>	8
2.3. Tiosemikarbazoni	12
2.4. Metode za proučavanje strukture makrolida	14
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. Instrumenti i kemikalije	16
3.2. Priprava etil 4-[(aminokarbamotiol)amino]benzoata, S1	17
3.3. Priprava prekursora tiosemikarbazona uz pomoć derivata salicilaldehida i estera tiosemikarbazida, S2	17
3.4. Priprava tiosemikarbazona, S3	18
3.5. Priprava makrozona, S4	18
3.6. Priprava kompleksa makrozona s bakrom(II) i niklom(II)	18
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. Priprava tiosemikarbazona	19
4.1.1. <i>Priprava etil 4-[(aminokarbamotiol)amino]benzoata, S1</i>	19
4.1.2. <i>Priprava estera tiosemikarbazona, S2</i>	21
4.1.3. <i>Priprava tiosemikarbazona, S3</i>	27
4.2. Priprava makrozona	31
4.2.1. <i>Karakterizacija 9a-O-(3-aminopropil)azitromicina (9a)</i>	31
4.2.2. <i>Priprava i asignacija makrozona, S4</i>	36
4.3. Biološka aktivnost	55
§ 5. ZAKLJUČAK	57
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	58
§ 7. LITERATURNI IZVORI	XV
§ 8. ŽIVOTOPIS	XVII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA 9A-MAKROZONA IZVEDENIH IZ 4-AMINOBENZOJEVE KISELINE I DERIVATA SALICILALDEHIDA

Leda Divjak

Prekomjerna uporaba antibiotika dovela je do naglog razvijanja rezistencije na antibiotike te je potreban razvoj novih. Jedan od najčešće korištenih antibiotika je azitromicin, antibiotik koji pripada skupini makrolidnih antibiotika. Makrozoni su spojevi koji nastaju reakcijom makrolida, tj. azitromicina i tiosemikarbazona. Tiosemikarbazoni mogu djelovati antibakterijski i antiupalno, a njihovi kompleksi s prijelaznim metalima poput bakra ili nikla dodatno povećavaju biološku aktivnost. U ovom radu pripremljeni su tiosemikarbazoni iz 4-aminobenzojeve kiseline i derivata salicilaldehida. Zatim su pripremljeni odgovarajući makrozoni reakcijom 9a-aminopropilnog derivata azitromicina i prethodno pripremljenih tiosemikarbazona. Pripremljeni su kompleksi makrozona s niklom(II) i bakrom(II). Spojevi sintetizirani u svakom koraku karakterizirani su spektroskopijom NMR te je ispitana njihova biološka aktivnost.

(58 stranica, 38 slika, 11 tablica, 29 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: azitromicin, makrolid, makrozon, spektroskopija NMR, tiosemikarbazon

Mentor: prof. dr. sc. Predrag Novak

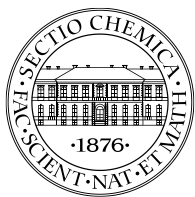
Komentor: dr. sc. Kristina Smokrović

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Predrag Novak
2. izv. prof. dr. sc. Đani Škalamera
3. izv. prof. dr. sc. Jana Pisk

Zamjena: izv. prof. dr. sc. Tomislav Jednačak

Datum diplomskog ispita: 8. srpnja 2024.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF A 9A-MACROZONE DERIVED FROM 4-AMINO BENZOIC ACID AND SALICYLALDEHYDE DERIVATIVES

Leda Divjak

Excessive use of antibiotics has led to bacterial resistance to antibiotics, and the development of new ones is urgently needed. One of the most commonly used antibiotics is azithromycin, an antibiotic that belongs to the group of macrolide class. Macrozones are compounds formed by the reaction of macrolides, i.e. azithromycin and thiosemicarbazones. Thiosemicarbazones can have antibacterial and anti-inflammatory effects and their complexes with transition metals such as copper or nickel further increase biological activity. In this thesis, thiosemicarbazones were prepared from 4-aminobenzoic acid and salicylaldehyde derivatives. Subsequently, the corresponding macrozones were prepared by the reaction of the 9a-aminopropyl derivative of azithromycin and previously prepared thiosemicarbazones. Finally, macrozone complexes with nickel(II) and copper(II) were prepared. The compounds synthesized in each step were characterized by NMR spectroscopy and their biological activities were evaluated.

(58 pages, 38 figures, 11 tables, 29 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: azithromycin, macrolide, macrozone, NMR spectroscopy, thiosemicarbazone

Mentor: Dr. Predrag Novak, Full Professor with tenure

Comentor: Dr. Kristina Smokrović, dr. sc.

Reviewers:

1. Dr. Predrag Novak, Full Professor with tenure
2. Dr. Đani Škalamera, Associate Professor
3. Dr. Jana Pisk, Associate Profesor

Substitute: Dr. Tomislav Jednačak, Associate Profesor

Date of exam: July 8th 2024.

§ 1. UVOD

Otkriće penicilina i daljnji razvoj u 1930-ima doveo je do sustavnog istraživanja mikroba. Takva istraživanja dovela su do razvoja novih antibiotika te je započelo zlatno doba antibiotika koje se odvijalo od 1940-ih do 1960-ih.¹ Sve veća upotreba antibiotika dovela je do razvoja rezistencije na antibiotike kod određenih sojeva bakterija. Jedno od istraživanja provedeno na svjetskoj razini pokazalo je da je rezistencija na antibiotike izravno pridonijela oko 1,27 milijuna smrti u 2019.²

Jedna od najčešće korištenih klasa antibiotika su makrolidi. Makrolidi pokazuju antimikrobno djelovanje tako što se vežu za bakterijske 50S ribosomske podjedinice i inhibiraju translaciju mRNA.³ Kemijski, makrolidi se sastoje 14-, 15- ili 16-članih laktonskih prstena koji nose jedan ili više šećera te makrolidi sadrže različite dodatne skupine saharida povezane s različitim mjestima laktonskog prstena. Eritromicin A, makrolid je s 14-članim prstenom i bio je prvi klinički korišteni makrolid. Problemi do kojih je dolazilo korištenjem eritromicina A potaknuli su dizajn novih makrolida. Povećana kiselinska stabilnost, kao i povećanje raspona antimikrobnog djelovanja karakterizira drugu generaciju makrolida, koja uključuje lijekove s 14-članim prstenom, kao što su klaritromicin i roksitromicin kao i azitromicin koji ima 15-član prsten. Osim toga, makrolidi sa 16-članim prstenom kao što su tilozin, karbomicin A i spiramicin i drugi također su pokazali značajnu antimikrobnu aktivnost, za koju se izvorno mislilo da će biti odgovor na rastuću pojavu infekcija otpornih na eritromicin.⁴ Ipak, dugotrajna uporaba makrolida povećava rizik od antimikrobne rezistencije za sve klase.³

Tiosemikarbazoni su klasa organskih spojeva koja je zanimljiva za istraživanje zahvaljujući raznolikim kemijskim svojstvima i širokoj primjeni. Reaktivnost tiosemikarbazona iskorištena je za sintetiziranje različitih spojeva od kojih su najzanimljiviji bioaktivne molekule i kompleksi metala. Ovi spojevi pokazuju širok spektar bioaktivnosti. Kompleksi s prijelaznim metalima poput bakra ili nikla igraju ključnu ulogu u raznim biološkim procesima pa se stoga koriste za dizajn novih lijekova. Ovi spojevi mogu djelovati antikancerogeno, antifungalno, antimalarično, protuupalno, antioksidativno i antibakterijski.⁵

Makrozoni su spojevi koji nastaju reakcijom azitromicina i tiosemikarbazona.⁶ Oni imaju mogućnost aktivnosti i na rezistentne sojeve bakterija, jer posjeduju više veznih mjesta na bakterijskom ribosomu.

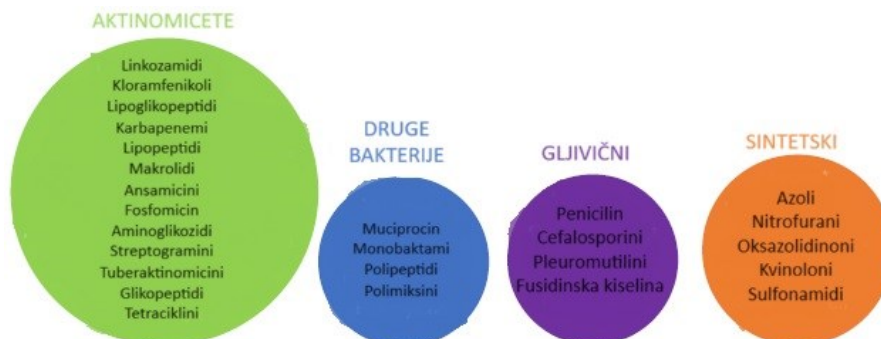
Ovaj rad fokusira se na sintezu makrozona iz 9a-aminopropilnog derivata azitromicina i tiosemikarbazona sintetiziranog iz 4-aminobenzojeve kiseline i derivata salicilaldehida. Struktura produkata iz svakog koraka bit će provjerena uz primjenu spektroskopije NMR te će biološka aktivnost biti ispitana.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Antibiotici

Antibiotici su lijekovi koji se koriste u borbi protiv bakterijskih infekcija.⁷ Djeluju na različite načine kako bi spriječili rast bakterija. Najčešće pripadaju u jednu od sljedećih klasa: penicilini, fluorokinoloni, cefalosporini, makrolidi, beta-laktami s povećanim djelovanjem, tetraciklini, trimetoprim-sulfametoksazol, linkozamid i sl.⁸

Salvarsan, prvi antibiotik, uveden je u upotrebu 1910. U nešto više od 100 godina, upotreba antibiotika drastično je promijenila suvremenu medicinu i produžila prosječni ljudski vijek za 23 godine.⁹ Otkrićem penicilina 1928. započelo je zlatno doba otkrića antibiotika iz prirodnih izvora koje je doseglo vrhunac sredinom 1950-ih (Slika 1). Od tada, usporeno otkrivanje novih antibiotika te razvoj i evolucija rezistencije na antibiotike kod mnogih ljudskih patogena dovela je do trenutnog stanja bakterijske rezistencije na antibiotike.⁹



Slika 1. Klinički najvažnije klase antibiotika nastale iz prirodnih izvora (preuzeto i prilagođeno iz ref.10).

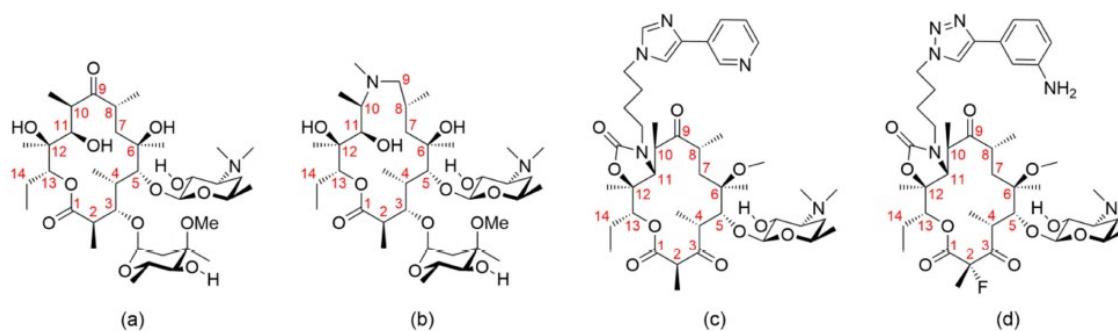
Upotreba mikroba koji proizvode antibiotike za sprječavanje bolesti se proteže tisućljećima unatrag, s tradicionalnom upotrebom pljesnivog kruha za liječenje otvorenih rana u Kini, Grčkoj i Egiptu prije više od 2000 godina. Od svih antibiotika otkrivenih između 1945. i 1978., 55% dolazi iz roda *Streptomyces*. Predloženo je nekoliko teorija koje objašnjavaju zašto mikrobi iz tla stvaraju toliko bioaktivnih prirodnih produkata. Najvjerojatnije objašnjenje je da imaju više funkcija te djeluju kao kemijsko oružje za ubijanje suparnika u tlu u svrhu zaštite ili

predacije i kao signalne molekule koje posreduju u interakcijama s eukariotskim domaćinima kao što su kukci i biljke.¹⁰

2.2. Makrolidi

2.2.1. Podjela i struktura

Proučavanje makrolida tijekom posljednjih nekoliko desetljeća dovelo je do otkrića raznolike skupine molekula s nizom struktura i funkcija.¹¹ Makrolidi se sastoje od makrocikličkog laktonskog prstena različitih veličina na koji se veže šećer.¹² Makrolidi se mogu rasporediti u pet klasa ovisno o porijeklu: toksini, antibiotici, antivirusni/ antiparazitski makrolidi, antifungicidi i imunosupresivi.¹¹ Makrolidni antibiotici se mogu podijeliti u četiri generacije, od kojih svaka ima različite strukturne značajke (Slika 2).¹³ Ovi antibiotici pokazuju bakteriostatsko i baktericidno djelovanje protiv raznih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Zbog male toksičnosti, makrolidni antibiotici često se biraju kao najsigurnija opcija za antibakterijsko liječenje. Ova prednost je uvećana zbog činjenice da su alergijske reakcije na makrolidne antibiotike rijetke.¹¹ Prvi makrolidni antibiotik izoliran je iz soja roda *Streptomyces* 1950. i nazvan je pikromicin zbog karakterističnog gorkog okusa. Glavna kemijska karakteristika pikromicina koja je zajednička svim kasnije izoliranim makrolidima je prisutnost makrocikličkog laktonskog prstena od čega potječe naziv makrolidi koji je predložio Woodward 1950. godine. Makrolidni antibiotici su klasificirani prema veličini makrocikličkog laktonskog prstena kao makrolidi koji sadrže 12-, 14-, 15- ili 16-člani prsten. Većina makrolida sadrži amino šećere i/ili neutralne šećerne dijelovi povezane s laktonskim prstenom preko glikozidne veze. Metimicin je glavni predstavnik 12-članih makrolida. Eritromicin je najpoznatiji član 14-člane skupine i izoliran je iz *Streptomyces erythraeus* ili *Arthrobacter*. Zadnju skupinu čine 16-člani makrolidi, od kojih je najvažniji tilozin. Osim veličine laktona, makrolidi se međusobno razlikuju po tome sadrže li disaharid ili monosaharid na laktonskom prstenu. Gotovo sve prirodne makrolide proizvode sojevi *Streptomyces*.¹²



Slika 2. Predstavnici četiri generacije makrolidnih antibiotika: (a) eritromicin A, (b) azitromicin, (c) telitromicin, (d) solitromicin. Atomi u makrolaktonskom prstenu su označeni brojevima (preuzeto i prilagođeno iz ref. 13).

Eritromicin je izoliran iz aktinomiceta u uzorku tla iz Filipina te je pročišćen i klinički korišten od 1952. Eritromicin se sastoji od 14-članog prstena vezanog za amino-šećer, dezozamin, i neutralni šećer, kladinozu. Ima široki spektar djelovanja protiv mnogih bakterijski patogena.¹³ Izvorno, eritromicin je proizveden kao alternativa penicilinu zbog svoje aktivnosti protiv Gram-pozitivnih bakterija kao što su stafilokoki, pneumokoki i streptokoki.¹⁴ Kasnije se njegova klinička uporaba proširila na rodove među kojima su *Mycoplasma*, *Legionella*, *Campylobacter* i druge.¹⁵

Postoji nekoliko faktora koji ograničavaju upotrebu eritromicina. Prvo, antimikrobni spektar eritromicina je ograničen na Gram-pozitivne bakterije i organizme koji uzrokuju atipičnu upalu pluća. Eritromicin ima vrlo kratko vrijeme poluraspada, što zahtijeva doziranje tri ili četiri puta dnevno. Uz sve to, glavno ograničenje su štetni učinci na gastrointestinalni sustav koji često uzrokuju prekid terapije.¹⁶ Kako bi se prevladale sve ove prepreke upotrebe eritromicina, proizveden je azitromicin. Ovaj analog eritromicina osim što ima veći spektar djelovanja i manje negativne učinke na gastrointestinalni sustav pacijenta odupire se ciklizaciji kataliziranoj kiselinom modificiranjem makrolidnog prstena eritromicina prevođenjem karbonilne skupine Beckmanovom pregradnjom i redukcijom u ternarni amin što otežava reakciju razgradnje makrolidnog prstena.¹⁵ Jedna od kemijskih značajki koja razlikuje azitromicin od eritromicina je povećana stabilnost pri kiselom pH. Azitromicin se razlikuje od eritromicina i farmakokinetički, a važna značajka je sposobnost azitromicina da postigne visoke koncentracije u tkivu, pri čemu se antibiotik dostavlja na mjesto infekcije izravnim unosom i ciljanom dostavom putem fagocita. Visoke koncentracije u tkivima održavaju se tijekom duljeg

razdoblja zbog dugog poluživota azitromicina, zbog čega se doziranje svodi na jednom dnevno tijekom 3 ili 5 dana.¹⁷

Naziv azitromicina prema IUPAC-ovoj nomenklaturi je 9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin.¹⁸ Izveden je iz eritromicina A zamjenom 9a karbonila u aglikonskom prstenu s metil-supstituiranim dušikom, čime se prsten povećava na 15 članova. Ova strukturna razlika blokira unutarnju reakciju formiranja poluketala, ostavljajući kiselu hidrolizu esterske veze neutralnog šećera kladinoze kao glavni put razgradnje. U otopini na 37 °C i pH 2 s ionskom jakošću 0,02 mol/dm³, za razgradnju 10% početne količine azitromicina potrebno je 20,1 min, dok je za isti stupanj razgradnje eritromicina potrebno samo 3,7 sekundi. Energija aktivacije za hidrolizu esterske veze koja povezuje kladinozu s azitromicinom je 25,3 kcal/mol. Nasuprot tome, reakcija unutarnje dehidracije eritromicina ima aktivacijsku energiju od 15,6 kcal/mol. Općenito, ovi rezultati ukazuju na 300 puta veću kiselinsku stabilnost azitromicina u usporedbi s eritromicinom u fiziološkim uvjetima želučanog soka.¹⁷

Azitromicin se apsorbira kada se daje oralno što rezultira niskim koncentracijama u serumu, ali vrlo visokim koncentracijama u tkivu koje se održavaju nekoliko dana.¹⁹

Inhibira veliki broj Gram-pozitivnih aerobnih i anaerobnih vrsta te mnogo intracelularnih patogena od velike važnosti. Također inhibira niz aerobnih i anaerobnih Gram-negativnih bakterija povezane s raznim infekcijama.²⁰

2.2.2. Mehanizam djelovanja

Način djelovanja makrolida proučava se od 1959. Svi ovi spojevi vežu se za 50S podjedinicu prokariotskih ribosoma sa specifičnim ciljem u 23S podjedinici ribosoma. Prema najranijem istraživanju o mehanizmu djelovanja ovih molekula, 14- i 16-člani makrolidi imaju različite inhibitorne učinke na elongacijsku fazu sinteze proteina u bakterijama. 16-člani spojevi inhibiraju reakcije peptidil transferaze, a 14-člani spojevi inhibiraju translokaciju peptidil-tRNA.¹⁸ Visoki afinitet makrolida za bakterijske ribosome te visoko očuvana struktura ribosoma u gotovo svim bakterijskim vrstama rezultira širokim spektrom djelovanja makrolida.¹²

Jedan od glavnih mehanizama antibakterijskog djelovanja makrolida je interferencija sinteze proteina unutar bakterijskih stanica. Svi makrolidni antibiotici pokazuju slično vezanje na 50S ribosomsku podjedinicu u bakterijama. Istraživanja predlažu da je vezanje specifično za 23S ribosomalnu RNA unutar 50S ribosomske podjedinice. Dokazano je da se laktonski prsten

makrolida veže za stijenku izlaznog tunela peptida koji nastaje u ribosomu kroz hidrofobne interakcije. Izlazni tunel je vrlo bitna strukturna komponenta ribosoma kroz koju se novosintetizirani proteini puštaju. Kada se makrolidni antibiotici vežu za izlazni tunel, otpuštanje peptida koji nastaje, a time i translacija su inhibirani. Kako se inhibicija nastavlja, slobodne tRNA iz stanice se troše, a translacija se na kraju zaustavlja. Iako se svi makrolidni antibiotici vežu na isto ribosomsko mjesto, postoje razlike u njihovim mehanizmima djelovanja. Makrolidi s kraćim lancem na atomu C5 ne prekidaju peptidnu vezu nego inhibiraju elongaciju duljih peptida kroz steričku smetnju. Duži C5 bočni lanci mogu se proširiti u centar peptidil transferaze kako bi izravno zaustavili stvaranje peptidne veze.¹¹

Infekcija određenim bakterijama u plućima, može dovesti do stvaranja biofilma u malim dijelovima dišnih puteva i pogoršanja infekcije. Biofilm omogućava bakterijama da izbjegnu fagocitozu. Makrolidni antibiotici, uključujući eritromicin i klaritromicin, učinkoviti su u liječenju ovakvih infekcija. Glavni mehanizmi oštećenja biofilma su smanjenje izlučivanja sluzi pomoću blokade transporta kloridnih iona i time osmoze prema dišnim putovima i inhibicija proizvodnje glikokaliksa od strane bakterijskih stanica. Broj članova u laktoskom prstenu mogao bi utjecati na sposobnost makrolida za inhibiciju stvaranja biofilma.¹¹

2.2.3. Mehanizam rezistencije

Dva najčešća mehanizma rezistencije kod bakterijskih patogena su smanjeni afinitet vezanja lijeka zbog modifikacije bakterijskog ribosoma ili molekule antibiotika i izbacivanje makrolida iz bakterijske stanice do kojeg dolazi zbog promijene propusnosti membrane ili ekspresije pumpe koja izbacuje molekule antibiotika iz stanice. Proteini koji služe za transport molekula antibiotika iz stanice pripadaju uglavnom obitelji Mef ili Mrs, a mehanizmi modifikacije ribosoma uključuju ili ribosomsku 23S rRNA ili proteine velike ribosomske podjedinice, dok mehanizmi inaktivacije lijekova uključuju fosforilaciju 2'-hidroksil šećera fosfotransferazama i hidrolizom makrocikličkog laktona esterazama.¹²

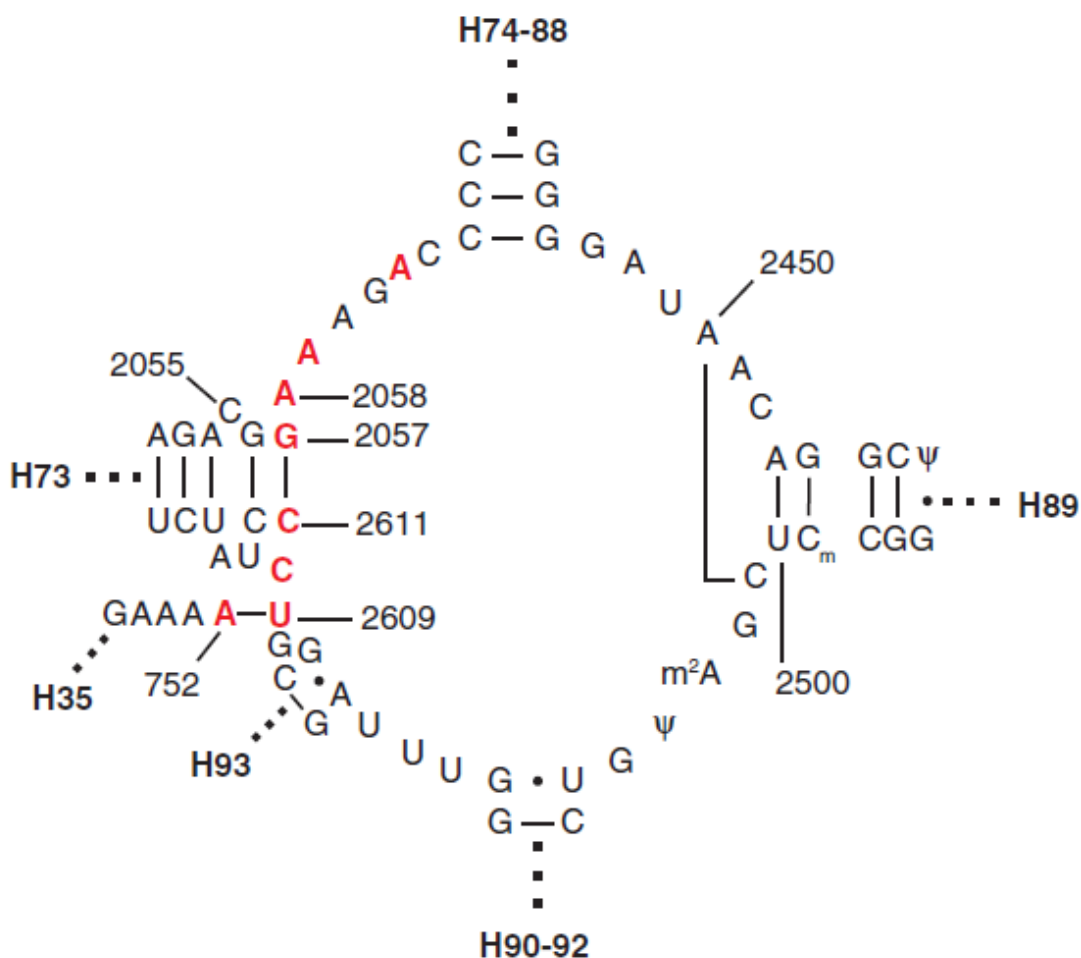
Ubrzo nakon uvođenja eritromicina kao terapije 1950-ih, uočena je rezistencija bakterijskih patogena na lijek. Također je otkriveno da neki sojevi koji su rezistentni na eritromicin mogu biti unakrsno rezistentni ne samo na sve druge makrolide nego i na kemijski nepovezane lijekove. Ovaj fenomen je prvi put uočen kod bakterijskog soja *Staphylococcus aureus* i nazvan je makrolid-linkozamid-streptogramin B (MLS_B) fenotip rezistencije na antibiotike. Kod ovih sojeva, MLS_B rezistencija može se izazvati izlaganjem niskim koncentracijama eritromicina,

što dovodi do ekspresije enzima metiltransferaze (ErmC). ErmC metilira 23S rRNA na N-6 poziciji adenzina 2058, što je ključni nukleotid za vezanje MLS_B antibiotika. Nakon toga je identificirano nekoliko desetaka gena erm metiltransferaza.²¹ Mutanti koji su otporni na jedan ili više MLS_B antibiotika zbog supstitucija baza u domeni V ili na zavojnici 35 u domeni II 23S rRNA ili u ribosomskim proteinima L4 ili L22, daju nam dokaz da ti antibiotici ostvaruju interakciju s ribosomom (Slika 3).²²

Od otkrića gena *erm*, identificiran je još jedan način rezistencije. Ovaj način uključuje promjenu strukture rRNA. U laboratorijskim uvjetima, supstitucija jedne baze u rRNA uzrokuje otpornost na makrolide. Ovaj oblik otpora prvi put je uočen u jednom rRNA (*rrn*) operonu mitohondrija kvasca, koji je mutiran na poziciji A2058 u velikoj podjedinici rRNA.²¹

Općenito, patogeni koji razvijaju otpornost na makrolide kroz mutacije na A2058 (ili susjednim nukleotidima) posjeduju samo jedan ili dva *rrn* operona, kao što je u slučaju *Helicobacter pylori* i *Mycobacterium*. Otpornost kod bakterija s višestrukim *rrn* operonima, kao što su *Enterococcus*, *Streptococcus* i *Staphylococcus* vrste, općenito se dobije Erm metilacijom A2058.²¹

Mjesto nastanka peptidne veze na velikoj podjedinici ribosoma (centar peptidil transferaze) povezano je sa središnjom petljom u domeni V 23S rRNA. Makrolidi sa 16-članim prstenom ostvaruju više interakcija u ovoj rRNA regiji od 14-člane-prstenastih makrolida (Slika 2), što je nedvojbeno povezano s odgovarajućim načinom na koji lijekovi interferiraju sa sintezom proteina.²¹



Slika 3. Sekundarna struktura regije 30 domene V 23S rRNA. Nukleotidi u crvenoj boji ukazuju na mutacije koje mogu dovesti do rezistencije na 14/15-člane makrolide, 16-člane makrolide i/ili ketolide. Zavojnice rRNA koje potječu iz ove regije označene su točkastim linijama (preuzeto i prilagođeno iz ref. 22).

Kod Gram-negativnih bakterija, kromosomski kodirane pumpe doprinose intrinzičkoj otpornosti na hidrofobne spojeve kao što su makrolidi. Crpke često pripadaju obitelji proteina koji se sastoje od 12 regija koje se protežu kroz membranu. Kod Gram-pozitivnih bakterija, stjecanje otpornosti na makrolide aktivnim efluksom uzrokuju dvije klase pumpi, članovi ABC superfamilije transportera i MFS superfamilije. Do danas, jedini efluksni proteini koji daju otpornost na makrolid karakterizirana je za *Staphylococcus* vrste. Ti proteini dio su ABC superfamilije te su kodirani plazmidnim *msr(A)* genima. *msr(A)* determinanta otpornosti prvo je otkrivena u *Staphylococcus epidermidis*. Naknadno, pronađena je kod raznih vrsta

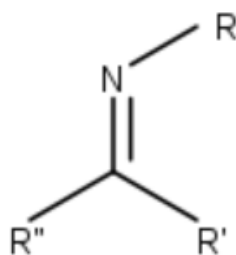
stafilokoka, uključujući *S. aureus*. ABC transporteri zahtijevaju ATP za funkcioniranje i obično se formiraju uz pomoć kanala koji se sastoji od dvije membranske domene i dvije ATP-vezne domene smještene na citosolnoj površini membrane.

Gen *msr(A)* kodira protein s dvije ATP-vezne domene što je karakteristika ABC transportera. Sustav efluksa je višekomponentan te uključuje *msr(A)* i kromosomske gene za konstruiranje potpuno operativne pumpe koja je specifična za 14- i 15-člane makrolide.²²

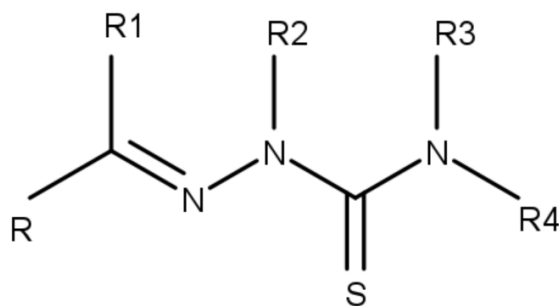
Mef pumpe su proteini koji su članovi velike superfamilije koja se sastoji od 12 transmembranskih domena povezane hidrofilnim petljama. Mef pumpe rade kao antiporteri, izmjenjujući vezani makrolid s protonom. *Mef* geni se nalaze u Gram-pozitivim bakterijama, ali su zabilježeni i kod nekih Gram-negativnih bakterija. Postoje dvije glavne potklase *mef* gena, *mef(A)* i *mef(E)*. Iako postoji viši od 80% homologije, nalaze se na različitim genetskim elementima. Oba gena daju otpornost na 14- i 15-člane, ali ne na 16-člane makrolide.¹²

2.3. Tiosemikarbazoni

Schiffove baze su važni organski ligandi koji mogu stvarati komplekse s prijelaznim metalima (Slika 4). Tiosemikarbazoni su dobro poznata skupina Schiffovih baza (Slika 5).²³



Slika 4. Struktura Schiffove baze.



Slika 5. Struktura tiosemikarbazida.

Tiosemikarbazoni se proučavaju dugi niz godina zbog svojih zanimljivih bioloških svojstava. Prva istraživanja započela su početkom dvadesetog stoljeća, a u medicini su se počeli primjenjivati pedesetih godina prošlog stoljeća, uglavnom kao terapija protiv tuberkuloze.²⁴ Tiosemikarbazoni se sintetiziraju reakcijom kondenzacije između aldehida ili ketona s tiosemikarbazidom.²⁵

Trenutno najvažnija istraživanja vezana za tiosemikarbazonu uključuju ispitivanje njihove antibakterijske aktivnosti koja posebno dolazi do izražaja kod metalnih kompleksa

tiosemikarbazona (Shema 1).²⁶ Mogu se koordinirati kao neutralne (keto oblik) molekule ili nakon deprotonacije kao anionski (enolni oblik) ligandi i te se koordinirati s raznim metalnim ionima na različite načine. Heterociklički tiosemikarbazoni imaju sposobnost difuzije kroz polupropusne membrane stanica.²⁷



Shema 1. Koordinacija metalnog iona na tiosemikarbazon.

Kada tiosemikarbazoni stupaju u interakciju s nabijenim ionom metala, ulazak metalnog kompleksa u staničnu membranu praćen je izlaganjem hidrofobnog dijela molekule što rezultira povećanjem cjelokupne aktivnosti molekule.²⁶

Glavni načini antibakterijskog djelovanja su inhibicija sinteze peptidoglikana, promjena citoplazmatske membrane mikroba, promjena translacije i inhibicija replikacije nukleinske kiseline blokiranjem topoizomeraza te inhibicija transkripcije.²⁸

2.4. Metode za proučavanje strukture makrolida

Struktura i interakcije makrolidnih antibiotika mogu se proučavati različitim eksperimentalnim i teorijskim metodama. Najčešće korištene su kristalografija, kriogena elektronska mikroskopija (Cryo-EM) i spektroskopija NMR.¹³

Cilj rendgenske kristalografije je dobiti trodimenzionalnu molekularnu strukturu iz kristala. Pročišćeni uzorak se kristalizira i kristali su podvrgnuti rentgenskom zračenju. Dobiveni uzorci se zatim obrađuju. Prvo se dobiju informacije o jediničnoj ćeliji. Daljnjom obradom podataka se dobivaju položaji atoma u asimetričnoj jedinici. Zatim se eksperimentalno određena struktura optimizira kako bi usvojila termodinamički poželjnu konformaciju i bila pogodna za korištenje u molekulskim simulacijama.²⁹ Kristalografska analiza ribosoma rezultirala je relevantnim modelima makrolid-ribosomskih kompleksa za vrlo ograničen broj bakterijskih vrsta. Glavni nedostatak jest što se ipak radi o strukturi u čvrstom stanju, koja se obično razlikuje od konformacije molekule u otopini. Difrakcija rendgenskih zraka također je korištena za određivanje apsolutne konfiguracije nekoliko 12-, 14- i 16-članih makrolidnih spojeva izoliranih iz različitih vrsta gljivica.¹³

Cryo-EM omogućuje snimanje bioloških makromolekula i njihovih kompleksa u potpuno solvatiranom stanju pri visokoj rezoluciji.²⁹ Cryo-EM metode mogu se podijeliti u dvije glavne skupine: jednočestična analiza (SPA) i kriogena elektronska tomografija (cryo-ET). SPA se temelji na poravnavanju mnogo tisuća slika izoliranih makromolekula i kompleksa *in vitro*, nakon čega slijedi rekonstrukcija trodimenzionalnih mapa pri rezoluciji blizu atomske. Strukturne informacije u SPA prikupljaju se iz više razdvojenih kopija iste strukture. S druge strane, cryo-ET snimanje se provodi na jednom području uzorka, ali iz različitih kutova. Kod obje metode nailazimo na slične probleme: priprema uzorka, trajanje metode te cijena.¹³

Spektroskopija NMR vrlo je važna metoda za razjašnjavanje trodimenzionalne strukture molekula te za ispitivanje njihovih interakcija s biološkim receptorima u otopini. Postoje razne jednodimenzijske i dvodimenzijske metode koje se mogu koristiti za dobivanje korisnih informacija u ovakvim istraživanjima. Pomoću NMR titracije može se otkriti vezanje liganda, što se očituje širenjem linije i razlikama u kemijskim pomacima liganda. Difuzijski koeficijenti slobodnih i vezanih liganada mogu se mjeriti pomoću DOSY tehnike NMR spektroskopije. Najčešće korištene NMR metode temeljene na prijenosu polarizacije NOE su STD i trNOESY. Metode koje se koriste za identificiranje vezanih epitopa liganada

određivanje konformacije slobodnog i vezanog liganda su STD, odnosno trNOESY. Ove tehnike također mogu biti korisne za ispitivanje biološke aktivnosti.¹³

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Instrumenti i kemikalije

Instrumenti korišteni u pripravi uzoraka i provedbi sinteze te uređaji korišteni za karakterizacije svih dobivenih spojeva navedeni su u Tablici 1.

Tablica 1. Nazivi instrumenata korištenih u radu i njihova primjena.

<i>Instrument</i>	<i>Primjena</i>
Mettler AT261 DeltaRange	Vaganje
Rotavapor Buchi R-100	Uparavanje
Bruker Avance III HD 400 MHz/54 mm Ascend	Spektroskopija NMR

U Tablici 2 ispisane su kemikalije potrebne za izvođenje pokusa, njihove molarne mase, postotak čistoće te naziv proizvođača.

Tablica 2. Naziv kemikalije, molarne mase, čistoća te naziv proizvođača kemikalija korištenih u eksperimentalnom dijelu.

<i>Kemikalija</i>	<i>Molarna masa / g mol⁻¹</i>	<i>Čistoća</i>	<i>Proizvođač</i>
4-(etoksikarbonil)fenil-izotiocijanat	207,25	97 %	Thermo Fisher Scientific
Hidrazin monohidrat	50,06	98 %	Sigma-Aldrich
Diklormetan	84,93	99,9 %	Carlo Erba Reagents
Tetrahidrofuran (THF)	72,11	99,8 %	Merck Chemical
Natrijev hidroksid (NaOH)	p.a.	98 %	Kemika
Ledena octena kiselina	p.a.	60,05	Gram Mol
Salicilaldehid	122,12	98 %	Sigma-Aldrich
2-hidroksi-3-metoksibenzaldehid	152,15	98 %	Sigma-Aldrich
2,4-dihidroksibenzaldehid	138,12	98 %	Sigma-Aldrich
Litijev karbonat	73,89		Sigma-Aldrich

Metanol	99,9 %	32,04	Merck Chemical
Etil acetat	p.a.	88,11	Gram Mol
Niklov(II) acetat tetrahidrat	98%	248,86	Alfa Aesar
Bakrov(II) klorid dihidrat	98%	170,48	Sigma-Aldrich
1-[bis(dimetilamino)metilen-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]piridinijev-3-oksidoheksafluorofosfat (HATU)	97%	380,23	Acros Organics
<i>N,N</i> -dimetilformamidimetilacetal (DIPEA)	97 %	129,24	Acros Organic
9 <i>a</i> - <i>O</i> -(3-aminopropil)azitromicin			
Kalijev karbonat	99,5%	138,21	Fisher Chemical
Amonijak	p.a.	17,031	Kemika
Deuterirani DMSO	99,9 %	84,17	Eurisotop
Deuterirani acetonitril	99,8%		Sigma-Aldrich

3.2. Priprava etil 4-[(aminokarbamotil)amino]benzoata, S1

U okruglu tikvicu od 100 mL otopi se 1,00 g etil-4-izotiocijanatobenzoata u 40 mL diklormetana. U reakcijsku smjesu doda se jedan ekvivalent hidrazin monohidrata (0,25 mL, $\rho=1,032$ g/mL). Reakcijska smjesa miješa se magnetskom miješalicom jedan sat. Nakon toga, smjesa se upari pri sniženom tlaku pomoću rotavapora. Mala količina produkta S1 se izdvoji i otopi u 500 μ L deuteriranog DMSO-a te se snimi ^1H NMR spektar.

3.3. Priprava prekursora tiosemikarbazona uz pomoć derivata salicilaldehida i estera tiosemikarbazida, S2

Produkt S1 dobiven nakon uparavanja podijeli se na tri dijela te se svakom doda 10 ml metanola i po jedan ekvivalent odgovarajućeg aldehida: salicilaldehid ($\rho=1,17$ g/mL), 2-hidroksi-3-metoksibenzaldehid i 2,4-dihidroksibenzaldehid. Reakcijske smjese miješaju se 30 minuta te se otapalo upari na rotavaporu. Mala količina dobivenih produkata S2 se izdvoji i otopi u 500 μ L deuteriranog DMSO-a te se snimi ^1H NMR spektar.

3.4. Priprava tiosemikarbazona, S3

U tri okrugle tikvica od 100 mL koje sadržavaju produkte S2 doda se deset ekvivalenata litijevog karbonata (2,00 g), 21 mL tetrahidrofurana i 1 mL destilirane vode. Nakon 24 sata miješanja, smjese se filtriraju preko Büchnerova lijevka vakuumskom filtracijom. Filtratima se dodaju 2 kapi ledene octene kiseline nakon čega se otapalo upari na rotavaporu. Mala količina produkata S3 otopi se u 500 μ L deuteriranog DMSO-a te se snimi ^1H NMR spektar.

3.5. Priprava makrozona, S4

U tri okrugle tikvice pomiješa se 36 mg dobivenog produkta S3 (1 ekvivalent), 20 mL kloroforma, 1,16 ekvivalenta 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinijev-3-oksid heksafluorofosfata (HATU, $m=42$ mg) i 1,1 ekvivalent *N,N*-dimetilformamid-dimetilacetala (DIPEA, $V=40$ μ L). Nakon što se otope svi reaktanti doda se 1 ekvivalent ($m=79,2$ mg) 9*a*-aminopropilnog derivata azitromicina. Reakcijske smjese se miješaju preko noći, nakon čega se otapalo upari. Doda se 15 ml etil-acetata. Zatim se otopina ekstrahira s tri obroka od 10 mL vode. Organski sloj sakupljen nakon ekstrakcije osuši se uz kalijev karbonat te se doda 3 mL diklormetana. Smjesa se filtrira uz lijevak i vatru, filtrat se upari na rotavaporu. Male količine produkata S4 otope se u deuteriranom acetonitrilu te se snime ^1H NMR, COSY, HSQC i HMBC spektri. Kako bi se olakšala karakterizacija, snime se i ^1H NMR, COSY, HSQC i HMBC spektri 9*a*-aminopropilnog derivata azitromicina.

3.6. Priprava kompleksa makrozona s bakrom(II) i niklom(II)

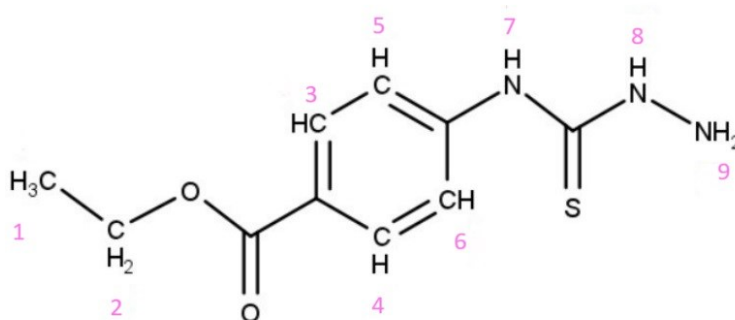
U 1 mL acetonitrila otopi se po 15 mg pojedinog makrozona i 3,00 mg niklova(II) acetata tetrahidrata. U reakcijsku smjesu doda se kap amonijaka. Otopine se ostave da se upare na zraku pri sobnoj temperaturi. Isti postupak ponovi se s bakrovim(II) kloridom dihidratom koji se pomiješa s makrozonima u omjeru 1:1 u acetonitrilu. Nakon uparavanja, dobiveni kompleksi makrozona biološki se testiraju.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

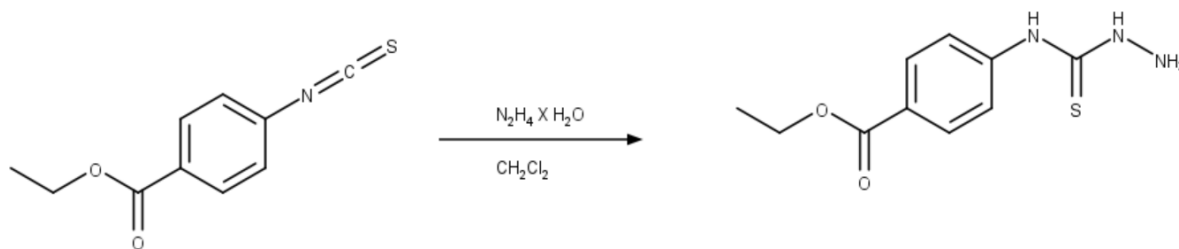
4.1. Priprava tiosemikarbazona

4.1.1. Priprava etil 4-[(aminokarbamotiol)amino]benzoata, S1

Tiosemikarbazid etil 4-[(aminokarbamotiol)amino]benzoat (S1) (Slika 6) nastaje nukleofilnom adicijom hidrazin monohidrata na 4-(etoksikarbonil)fenil izotiocijanat (Shema 2).

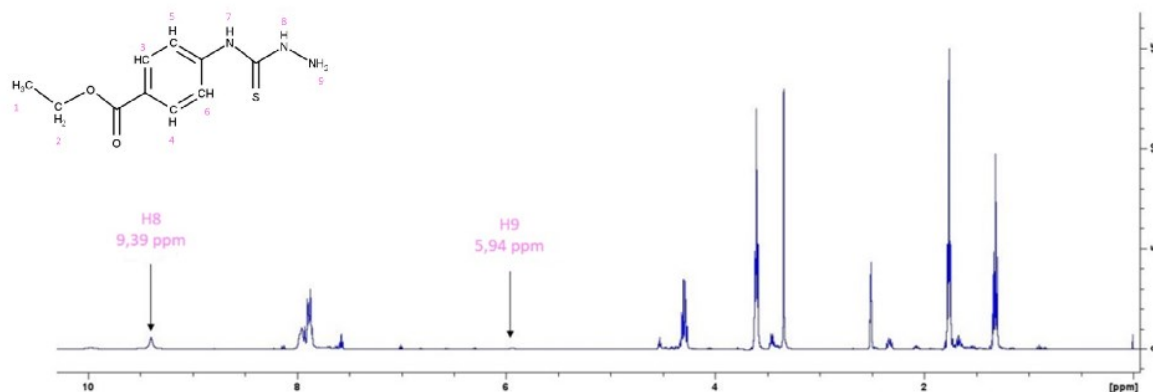


Slika 6. Struktura spoja S1 s označenim protonima. Protoni označeni brojevima 3, 4, 5 i 6 predstavljaju ekvivalentne protone.



Shema 2. Sinteza spoja S1 iz 4-(etoksikarbonil)fenil izotiocijanata i hidrazin monohidrata u diklormetanu pri 298K.

Dobiveni tiosemikarbazid S1 karakteriziran je spektroskopijom NMR, a korištena je ^1H NMR tehnika. Spektar dobivenog spoja prikazan je na Slici 7, a kemijski pomaci protona ispisani su u Tablici 3.



Slika 7. ^1H NMR spektar spoja S1 snimljen u deuteriranom DMSO-u pri 298K uz označene signale protona H8 i H9 i prikazanu strukturu spoja s označenim H atomima.

Tablica 3. Asignacija kemijskih pomaka ^1H NMR spoja S1

H-atom	δ / ppm
1	1,66
2	4,29
3,4	7,87
5, 6	7,61
7	9,97
8	9,39
9	5,94

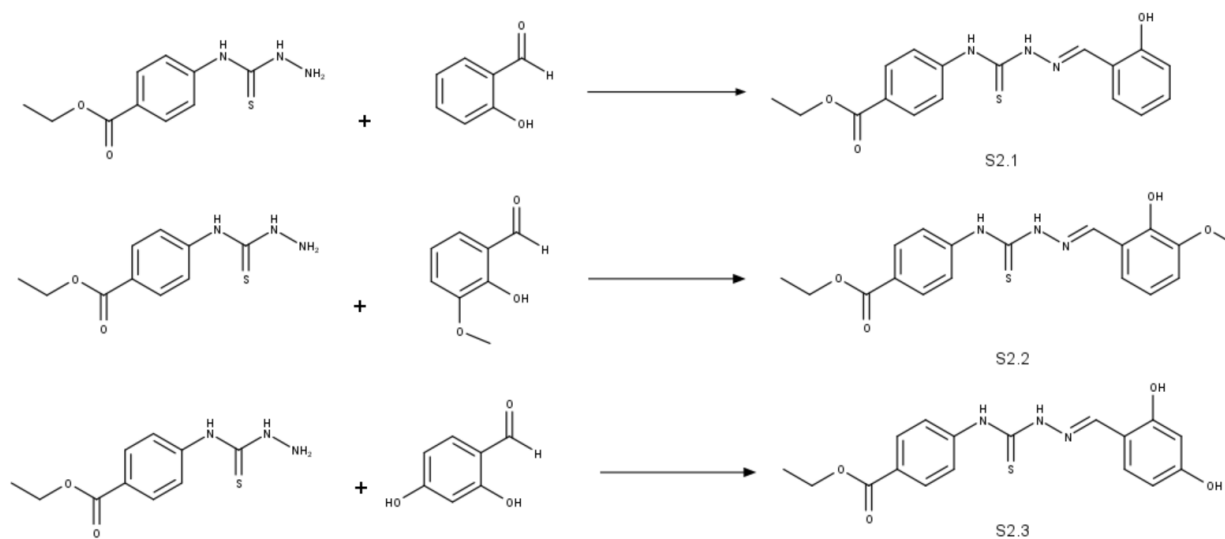
Nastanak tiosemikarbazida može se prepoznati pomoću signala kemijskih pomaka protona H8 i H9. Oba signala potiču od hidrazina, ali se razlikuju vrijednosti pomaka tih signala. Razlika u pomacima posljedica je stvaranja veze između ugljika tiocijanatne skupine i dušika koji na sebi ima vezan proton H8. Kemijski pomak protona H8 je 9,39 ppm, a protona H9 je 5,94 ppm.

U spektru na Slici 7. također se uočavaju signali otapala i reaktanata. Pri 5,58 ppm nalazi se singlet koji pripada protonima iz diklormetana koji je korišten kao otapalo u reakciji. Pri 2,50 ppm nalazi se signal koji je karakterističan za DMSO koji je korišten kao otapalo za snimanje

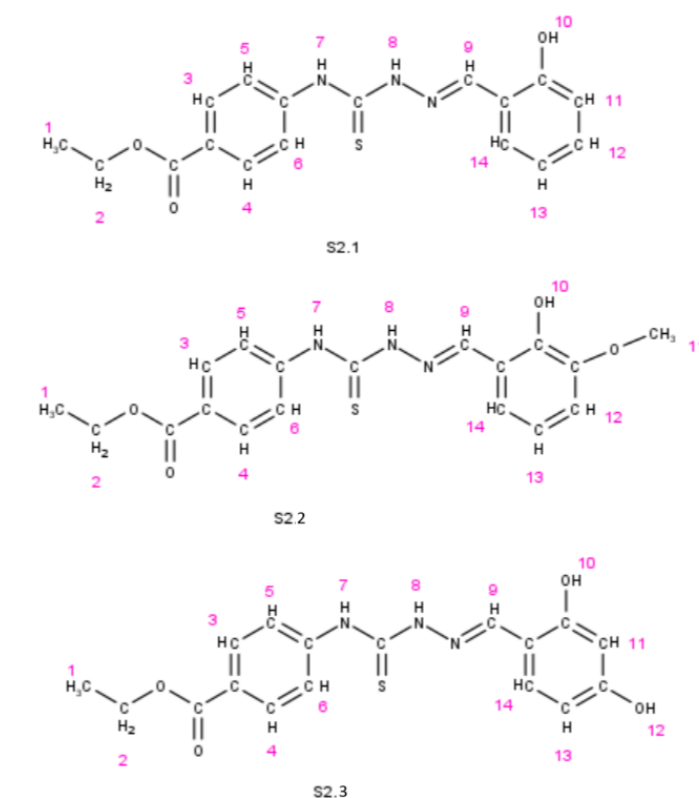
NMR-a te je korišten u deuteriranom obliku. Zbog higroskopsnosti DMSO-a dolazi do vezanja vode iz zraka stoga je vidljiv signal pri 3,33 ppm.

4.1.2. Priprava estera tiosemikarbazona, S2

Esteri tiosemikarbazona S2 (Slika 8) nastaju reakcijom kondenzacije između amino skupine tiosemikarbazida S1 i karbonilne skupine odgovarajućeg aldehida (Shema 3). Struktura Schiffove baze koja nastaje u reakciji i imino veza potvrđene su analizom spektra ^1H NMR. Spektri dobivenih spojeva prikazani su na Slici 9, Slici 11 i Slici 13, a kemijski pomaci protona ispisani su u Tablicama 4-6.



Shema 3. Sinteza spojeva S2 iz S1 i odgovarajućih aldehida u metanolu. Korišteni aldehidi su salicilaldehid (S2.1), 2-hidroksi-3-metoksibenzaldehid (S2.2) i 2,4-dihidroksibenzaldehid (S2.3).

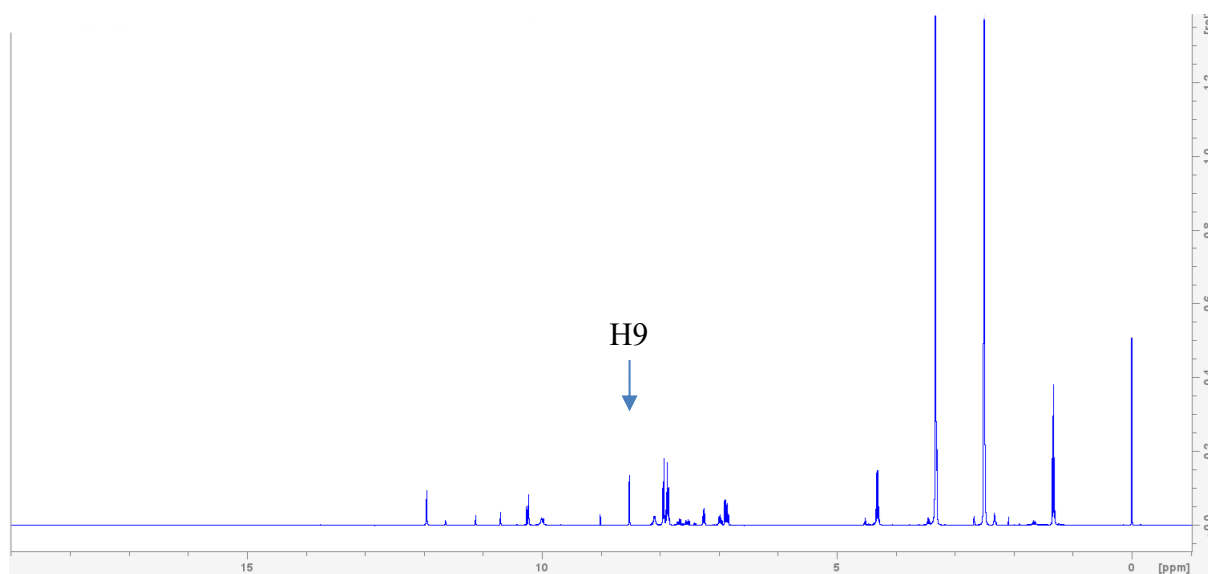


Slika 8. Strukture spojeva S2 s označenim protonima. Protoni H3, H4 i H5, H6 kemijski su ekvivalentni u svim prikazanim spojevima.

Tablica 4. Asignacija kemijskih pomaka ^1H NMR spoja S2.1.

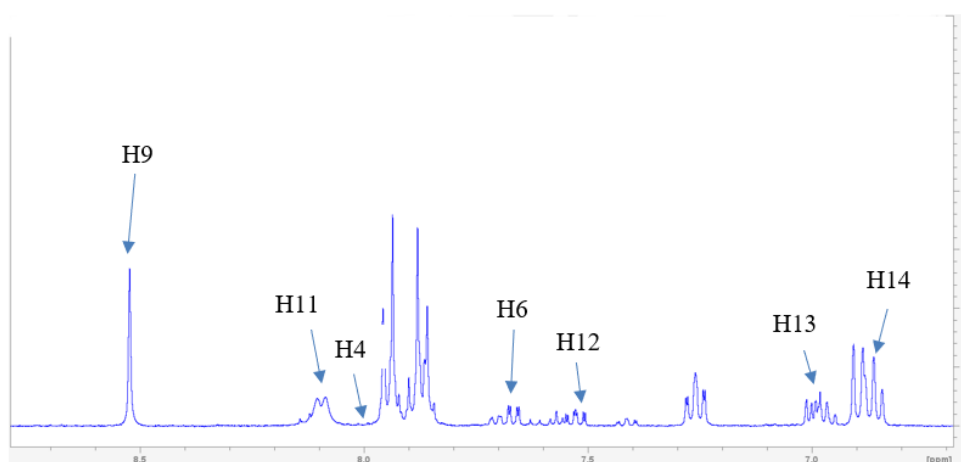
H-atom	δ / ppm
1	1,19
2	3,45
3, 4	8,03
5, 6	7,87
7	2,50
8	3,36
9	8,43
10	-
11	8,24
12	7,57

13	7,02
14	6,97



Slika 9. Spektar ^1H NMR spoja S2.1 snimljen u deuteriranom DMSO-u pri 298K s označenim signalom H9.

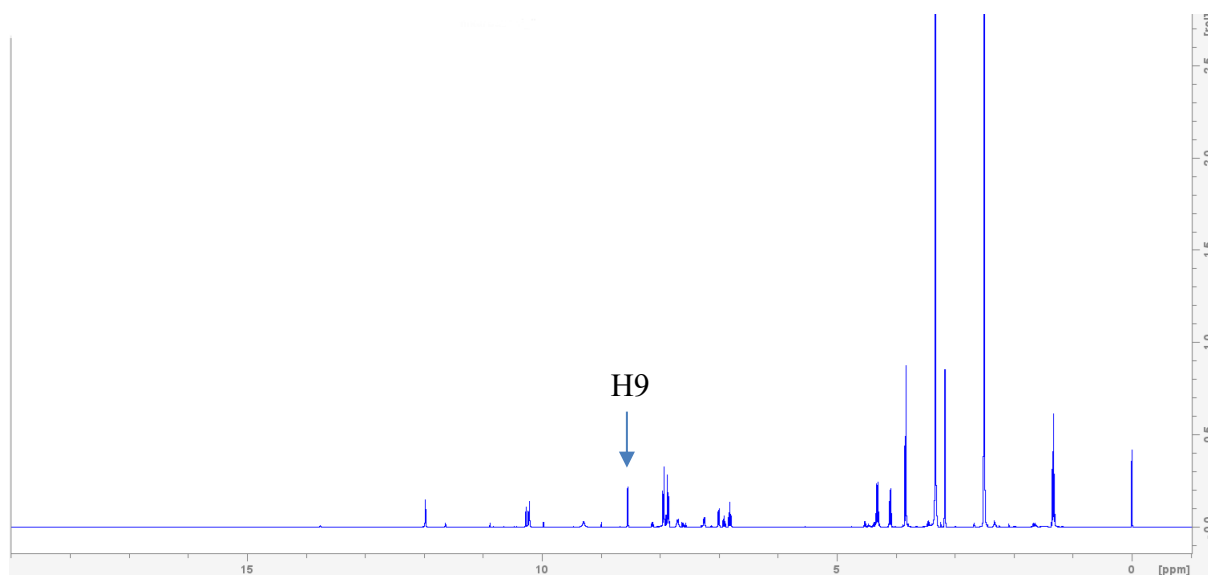
U spektru na Slici 9 izostaje signal amino skupine koji je u tiosemikarbazidu (S1) bio označen s H9, što upućuje na to da je došlo do promjene u strukturi. Spomenuti dušik tvori imino vezu s karbonilnim ugljikom, a na njega je u tiosemikarbazonu vezan proton H9 koji ima singlet pri 8,43 ppm. Spektar je sniman u deuteriranom DMSO-u.



Slika 10. Spektar ^1H NMR spoja S2.1 u području 6,80-8,60 ppm uz prikaz područja koja odgovaraju pojedinim signalima.

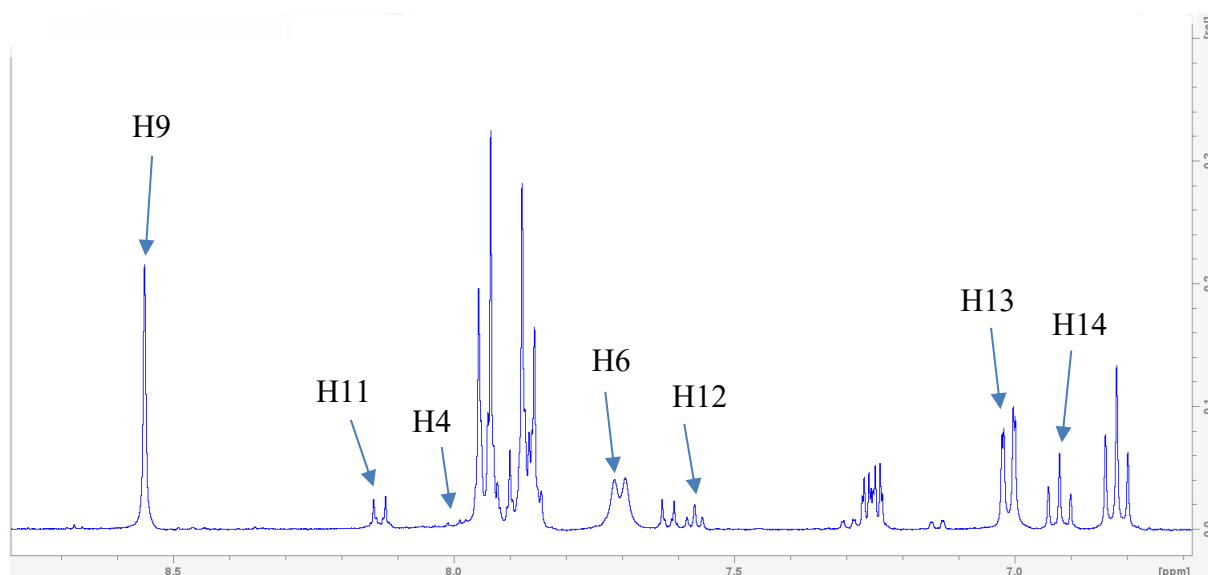
Tablica 5. Asignacija kemijskih pomaka ^1H NMR spoja S2.2.

H-atom	δ / ppm
1	1,33
2	3,15
3,4	7,95
5,6	7,84
7	2,50
8	3,36
9	8,55
10	-
11	3,83
12	7,61
13	7,02
14	6,99



Slika 11. Spektar ^1H NMR spoja S2.2 snimljen u deuteriranom DMSO-u pri 298K s označenim signalom H9.

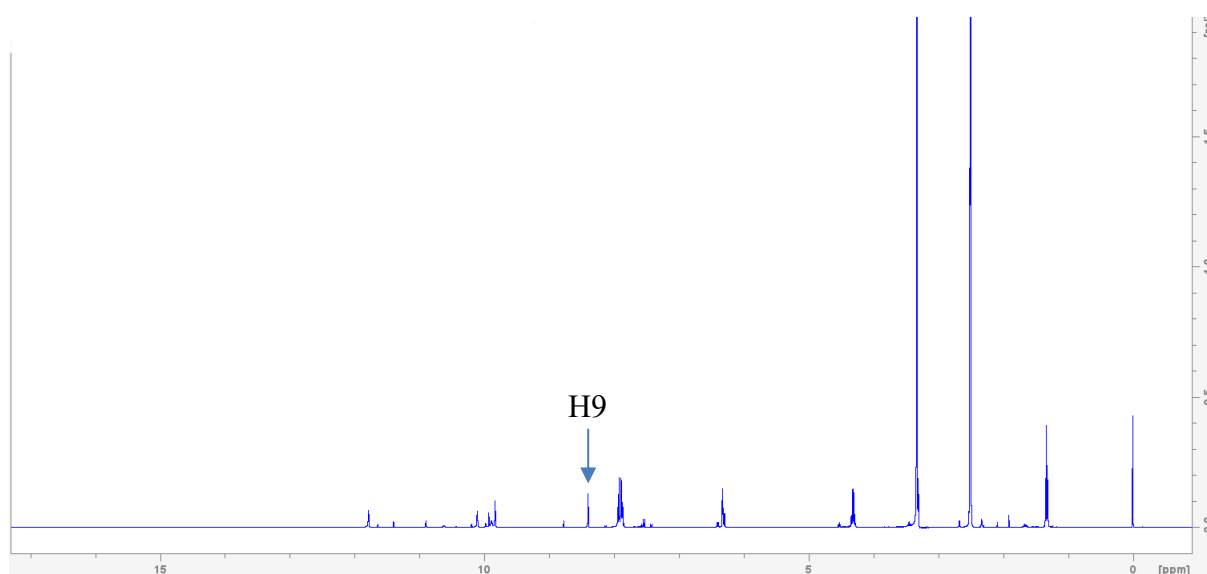
U spektru na Slici 11 izostaje signal amino skupine koji je u tiosemikarbazidu (S1) bio označen s H9, što upućuje na to da se dogodila promjena u strukturi kao i u prethodnom spoju. Dušik na koji je vezan H9 tvori imino vezu s karbonilnim ugljikom, u tiosemikarbazonu je na njega vezan proton H9 koji ima singlet pri 8,55 ppm. Spektar je sniman u deuteriranom DMSO-u.



Slika 12. Spektar ^1H NMR spoja S2.1 u području 6,80-8,60 ppm uz prikaz područja koja odgovaraju pojedinim signalima.

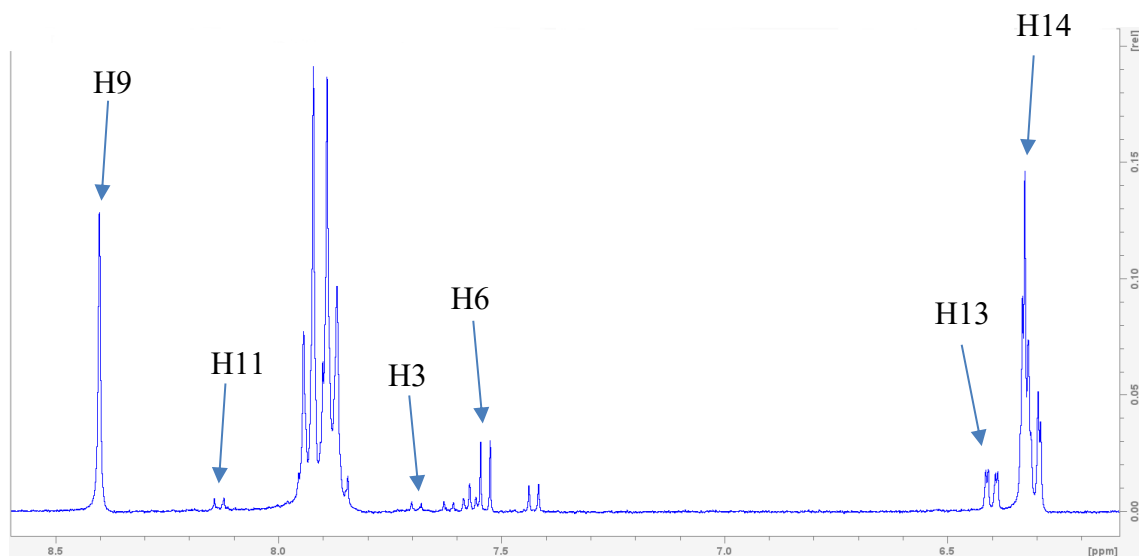
Tablica 6. Asignacija kemijskih pomaka ^1H NMR spoja S2.3.

H-atom	δ / ppm
1	1,33
2	3,44
3, 4	7,69
5, 6	7,58
7	2,50
8	3,36
9	8,43
10	-
11	8,14
12	2,31
13	6,39
14	6,31

Slika 13. Spektar ^1H NMR spoja S2.2 snimljen u deuteriranom DMSO-u pri 298K s označenim signalom H9.

U spektru na Slici 13 također izostaje signal amino skupine koji je u tiosemikarbazidu (S1) bio označen s H9 te se i u ovom slučaju dogodila promjena u strukturi. Dušik na koji je vezan H9

tvori iminsku vezu s karbonilnim ugljikom, u tiosemikarbazonu je na njega vezan proton H9 koji ima singlet pri 8,55 ppm. U spektru se može uočiti singlet na 2,31 koji je karakterističan za H11 proton OH skupine. Spektar je sniman u deuteriranom DMSO-u.

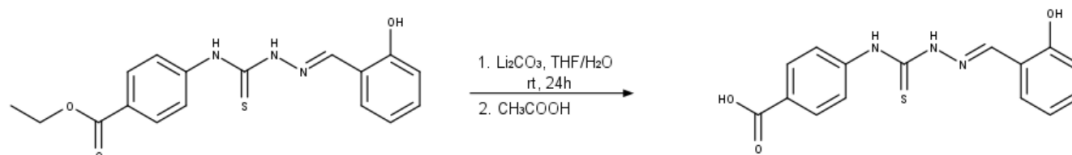


Slika 14. Spektar ^1H NMR spoja S2.3 u području 6,80-8,60 ppm uz prikaz područja koja odgovaraju pojedinim signalima.

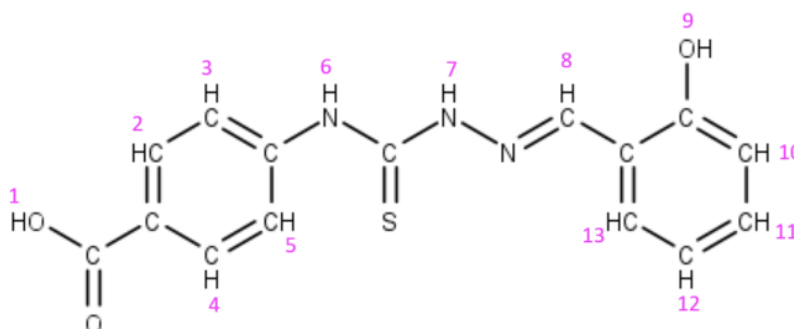
4.1.3. Priprava tiosemikarbazona, S3

Reakcija tiosemikarbazona s derivatima makrolida moguća je samo ako tiosemikarbazon ima karboksilnu skupinu u svojoj strukturi. Stoga je potrebno produkt S2 hidrolizirati kako bi se na taj način esterska skupina koja je prisutna u S2 prevela u karboksilnu skupinu da bi se dobio produkt S3 (Shema 4). Kako bi to proveli, upotrijebljen je litijev karbonat u otopini tetrahidrofurana i vode (21:1). Litijev karbonat dodan je u velikom suvišku u funkciji heterogenog katalizatora. Međuprodukt koji nastaje je litijeva sol spoja S2. Smjesa je prvo uparena na rotavaporu kako bi se uklonilo otapalo, u ovom slučaju THF, a zatim se smjesa filtrirala uz sniženi tlak. Karbonat je tijekom filtracije zaostao u talogu, a litijev karboksilat je zadržan u filtratu. U sljedećem koraku, otopina se zakiseljava ledenom octenom kiselinom kako bi se pH smanjio na ispod 7 da bi došlo do hidrolize litijeve soli spoja S2. Pri pH koji je manji

od 7 događa se protonacija karboksilne skupine te se dobije željeni tiosemikarbazon. Spektar dobivenog spoja prikazan je na Slici 16, a kemijski pomaci protona ispisani su u Tablici 7.



Shema 4. Priprava tiosemikarbazona S3 koristeći spoj S2.1, litijev karbonat i ledenu octenu kiselinu u tetrahidrfuranu i vodi pri sobnoj temperaturi.

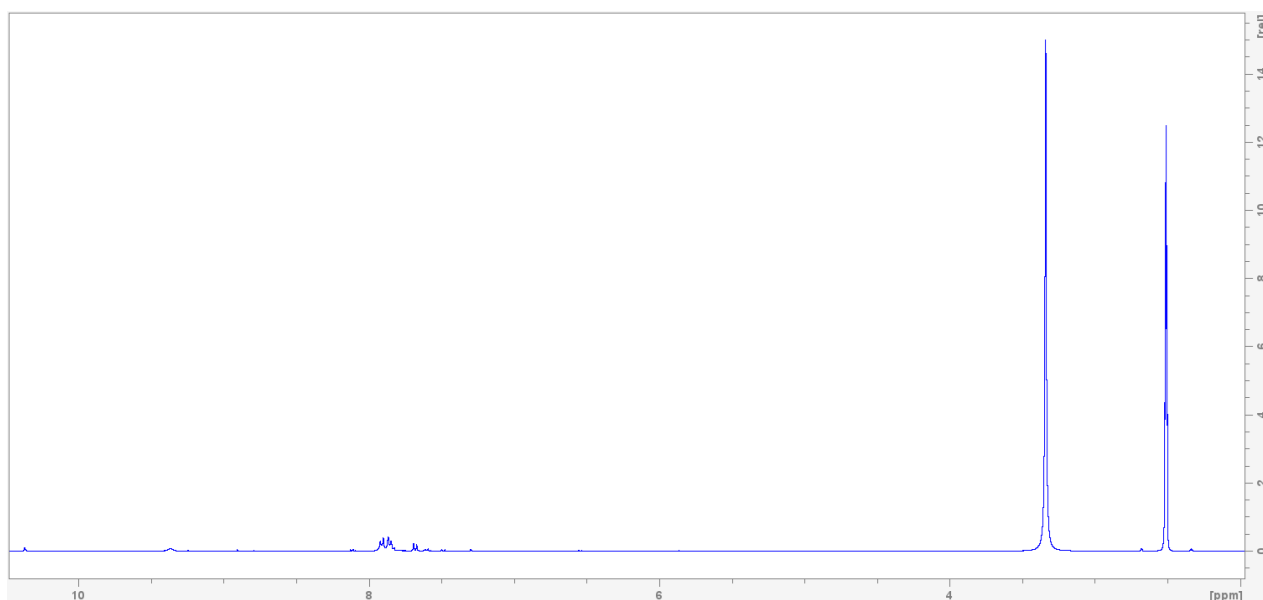


Slika 15. Strukturna spoja S3 s označenim protonima.

Tablica 7. Asignacija kemijskih pomaka ^1H NMR spoja S2.3.

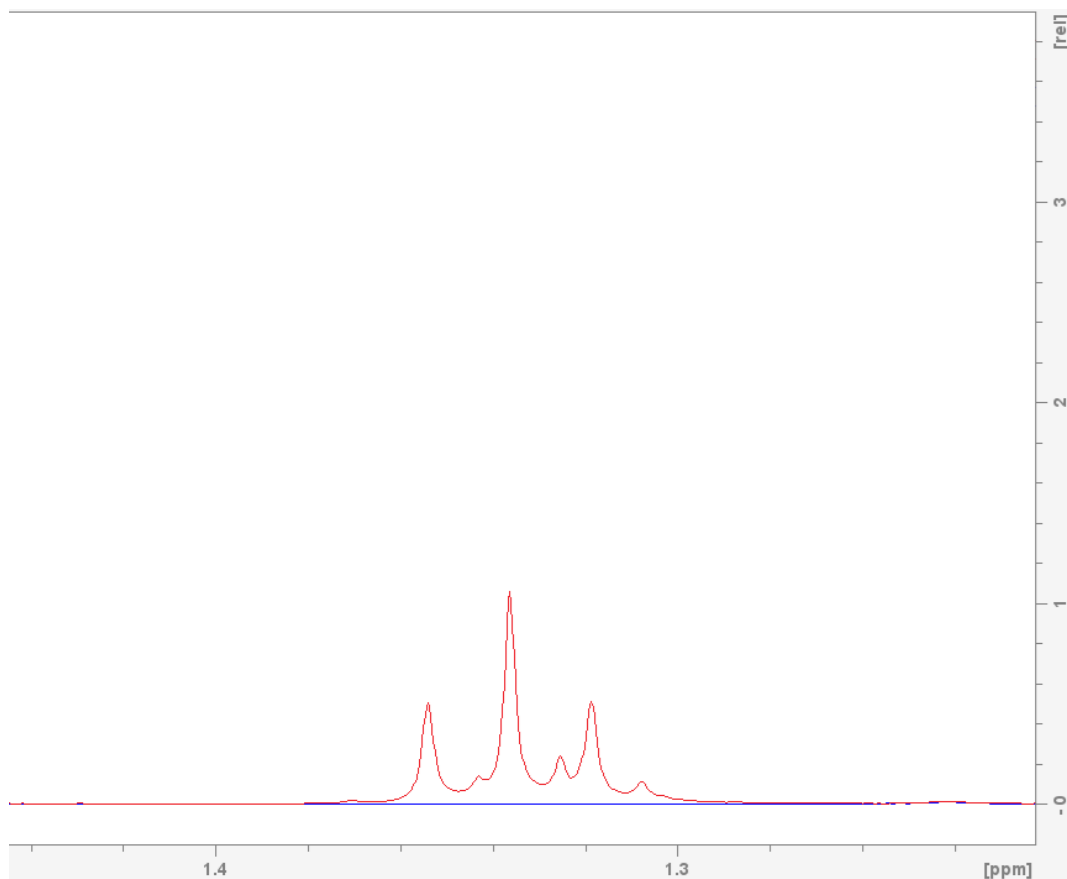
H-atom	δ / ppm
1	-
2	7,91
3	6,65
4	7,84
5	7,69

6	8,89
7	9,24
8	-
9	10,37
10	8,1
11	7,49
12	7,3
13	5,86



Slika 16. Spektar ^1H NMR spoja S3 snimljen u deuteriranom DMSO-u.

Činjenica koja pokazuje da je nastao tiosemikarbazon s karboksilnom, a ne esterskom skupinom vidljiva je u spektru ^1H NMR u području između 1,4 ppm i 1,1 ppm (Slika 17). Usporedbom spektara tiosemikarbazon s esterskom skupinom, S2.1, i tiosemikarbazona s karboksilnom skupinom, S3, vidljivo je da u spektru S3 (plavo) ne postoji signal metilne skupine $-\text{CH}_3$ pri 1,19 ppm koja je prisutna u spektru S2.1 (crveno) kao triplet.



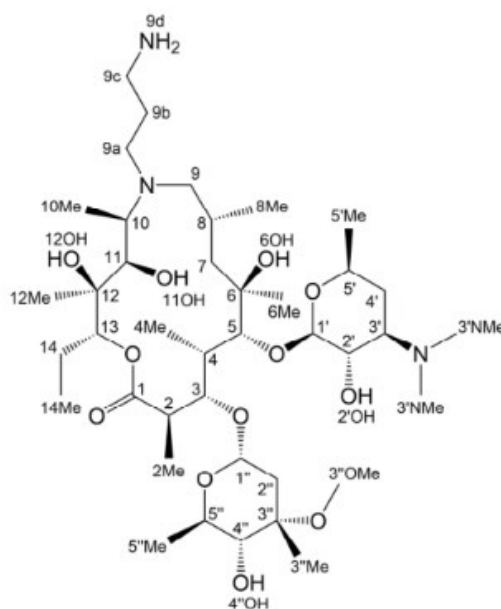
Slika 17. Preklopljeni spektri ^1H NMR spojeva S2.1 (crveno) i S3 (plavo) u rasponu 1,1-1,4 ppm te označenim protonima metilne skupine spoja S2.1. Spektri spojeva S2.1 i S3 snimljeni su u deuteriranom DMSO-u.

Također, u spektru ^1H NMR (Slika 16) uočena su 2 signala pri 10,37 ppm i 3,30 ppm. Oni pripadaju protonima H9, koji su dio hidroksilne skupine vezane na aromat, i protonu vode iz otapala. Širina ovih signala posljedica je brze izmjene protona iz spoja i protona iz otapala. Protoni H6 i H7 vezani su za dušik i svrstavaju u izmjenjive protone. Zbog izmjene protona, signali protona H6 i H7 nisu vidljivi. S obzirom na to da signal za proton H9 ima veći kemijski pomak, možemo zaključiti da nastaje intramolekulska vodikova veza između vodika hidroksilne skupine i iminskog dušika. Kako bi ta vodikova veza nastala, proton-donor i proton-akceptor moraju biti u prostornoj orijentaciji koja je povoljna za nastanak vodikove veze. U ovom slučaju, za nastanak vodikove veze, hidroksilna i imino skupina moraju biti u sin-položaju s obzirom na kemijsku vezu između imino i benzenskog ugljika.

4.2. Priprava makrozona

4.2.1. Karakterizacija 9a-O-(3-aminopropil)azitromicina (9a)

Tijekom izrade ovog rada nije pripremljen 9a-aminopropilni derivat azitromicina, već je korišten prethodno sintetiziran produkt.³⁰ Kako bi se lakše karakterizirali sintetizirani makrozoni, analizirani su njegovi spektri ¹H NMR (slika 19) i COSY (slika 20). Na slici 18 prikazana je struktura spoja M9a koji se sastoji od azitromicina i aminopropila vezanog na dušik.

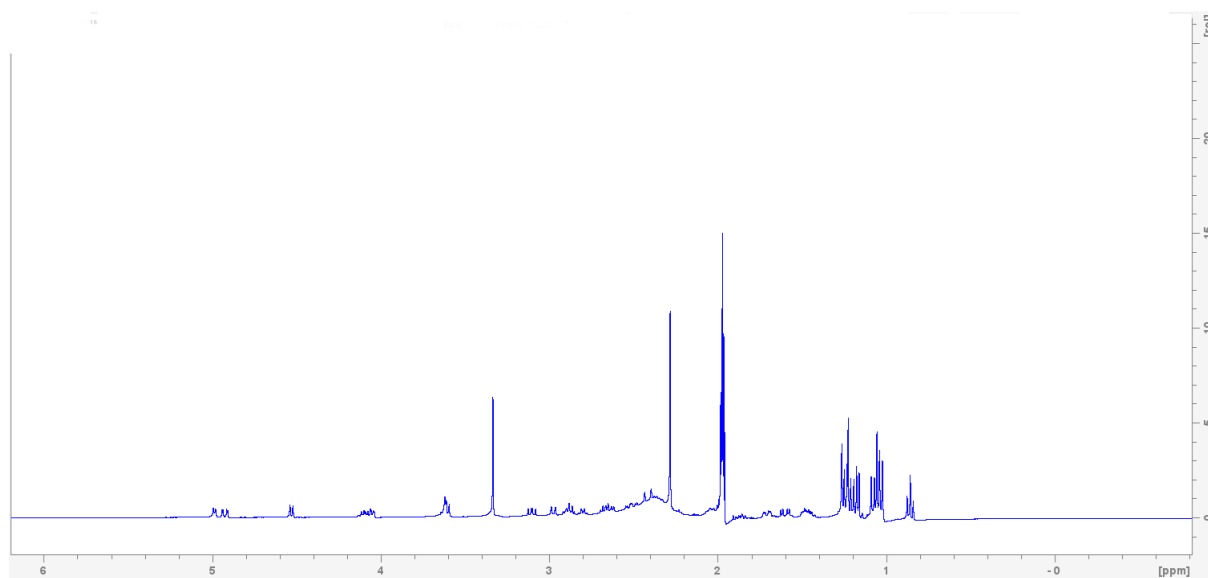


Slika 18. Struktura spoja M9a s označenim protonima.

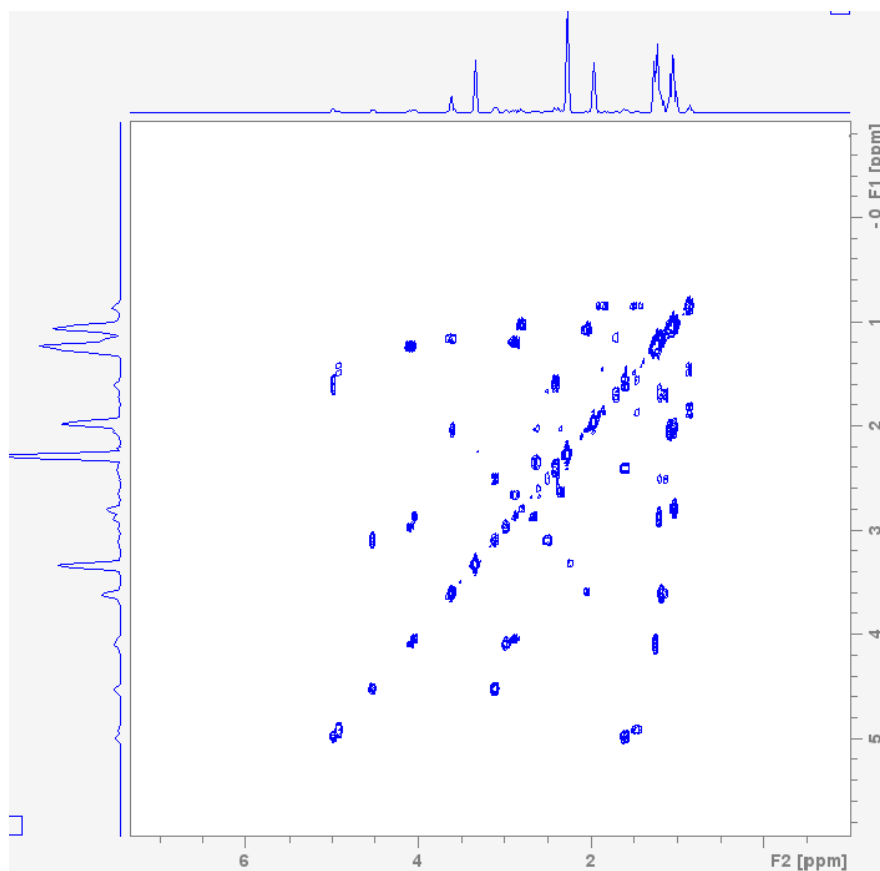
Tablica 8. Asignacija kemijskih pomaka u ¹H NMR spektru 9a-aminopropilnog derivata azitromicina.

H-atom	δ / ppm	H-atom	δ / ppm
2	2,98	1'	4,53
2CH3	-	2'	3,08
3	4,25	2'OH	-

4	1,42	3'	2,40
4CH3	1,05	3'CH3	2,88
5	4,54	4'	1,85-2,20
6CH3	1,17	5'	3,58
6OH	-	5'CH3	1,09
7	2,97	1"	-
8	1,72	2"	1,3-1,8
8CH3	0,85	3"CH3	1,47
9	2,88	3"OCH3	3,12
9a	1,88	4"	3,0
9b	1,57	4"OH	-
9c	1,61	5"	4,06
9d	2,41	5"CH3	1,14
10	3,59		
10CH3	1,16		
11	4,04		
11OH	-		
12CH3	1,02		
12OH	-		
13	4,91		
14	1,53-2,30		
14CH3	1,26		

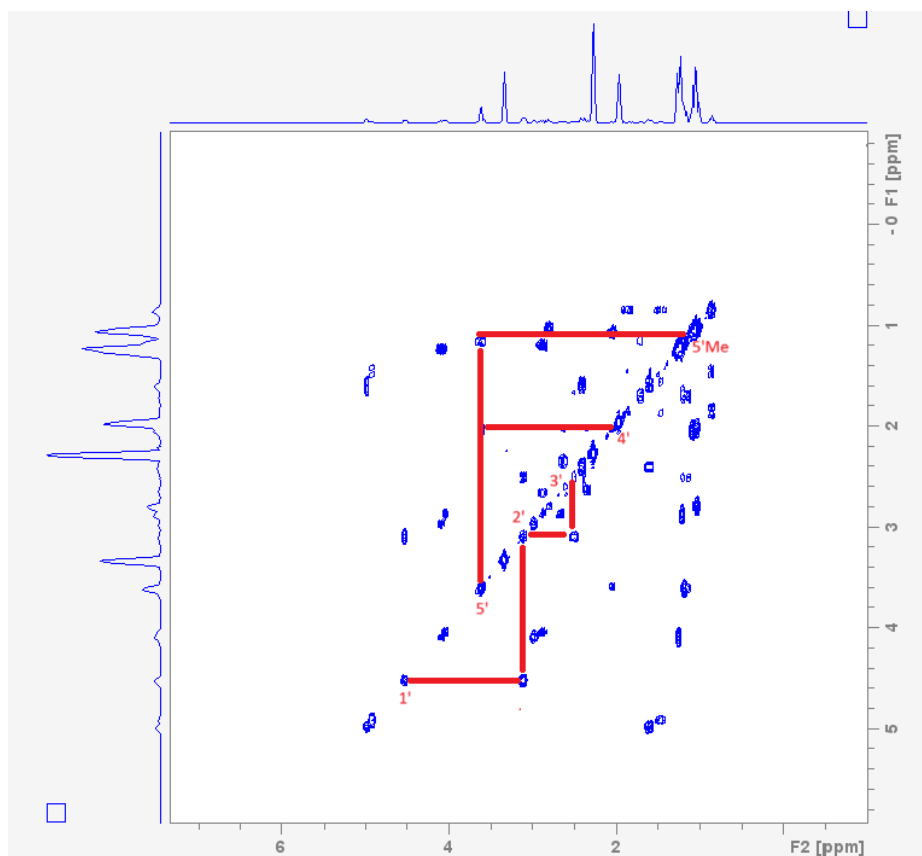


Slika 19. Spektar ^1H NMR spoja M9a snimljen u deuteriranom acetonitrilu.



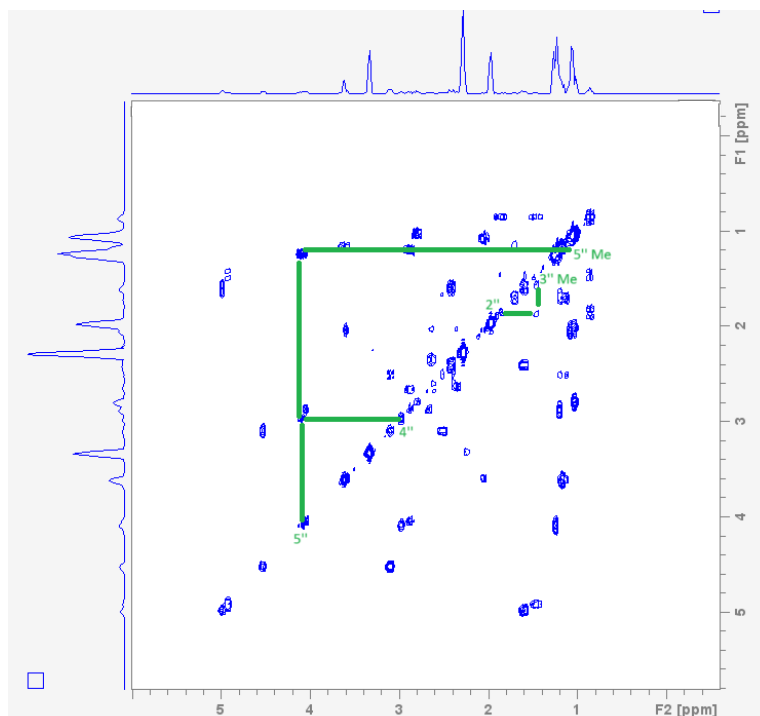
Slika 20. Spektar COSY spoja M9a snimljen u deuteriranom acetonitrilu.

Analizom korelacijskih signala u spektru COSY potvrđeno je koji protoni pripadaju pojedinom šećeru vezanom na petnaesteročlani prsten azitromicina (slika 21). Prvi prsten koje je obrađen je šesteročlani prsten vezan preko kisika na peti ugljikov atom makrolida. Sastoji se od jednog spinskog sustava koji sadrži sve protone osim dvije metilne skupine vezane na 3' amin. Signal hidroksilne skupine vezane na 2' C atom nije pronađen u spektru ^1H NMR (slika 19) jer je riječ o izmjenjivom protonu.



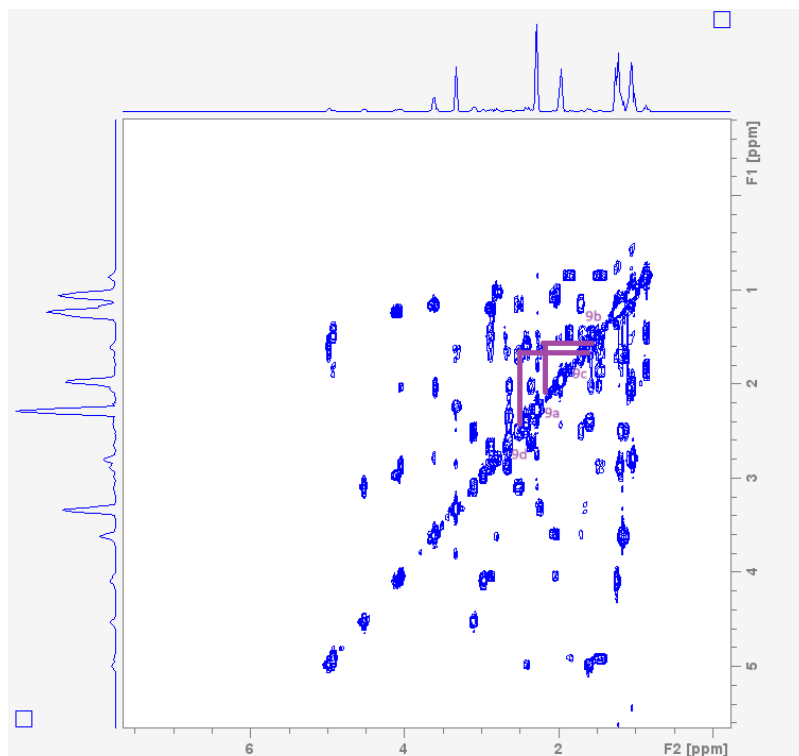
Slika 21. Uvećani prikaz spektra COSY spoja M9a u deuteriranom acetonitrilu. Crvenom bojom označen je spinski sustav u desozaminu vezanom na atom 5C spoja M9a.

Korelacije drugog spinskog sustava kladinoze vezane na atom 3C makrolida prikazane su na slici 22.



Slika 22. Uvećani prikaz spektra COSY spoja M9a u deuteriranom acetonitrilu. Zelenom bojom označen je spinski sustav u kladinozi vezanoj na atom 3C spoja M9a prikazanog na vrhu slike.

Na temelju međusobnog sprezanja protona koji čine aminopropilni supstituent, asignirani su i njihovi kemijski pomaci (slika 23). Na amino skupinu će se, u sljedećem koraku, vezati pripremljeni tiosemikarbazon.

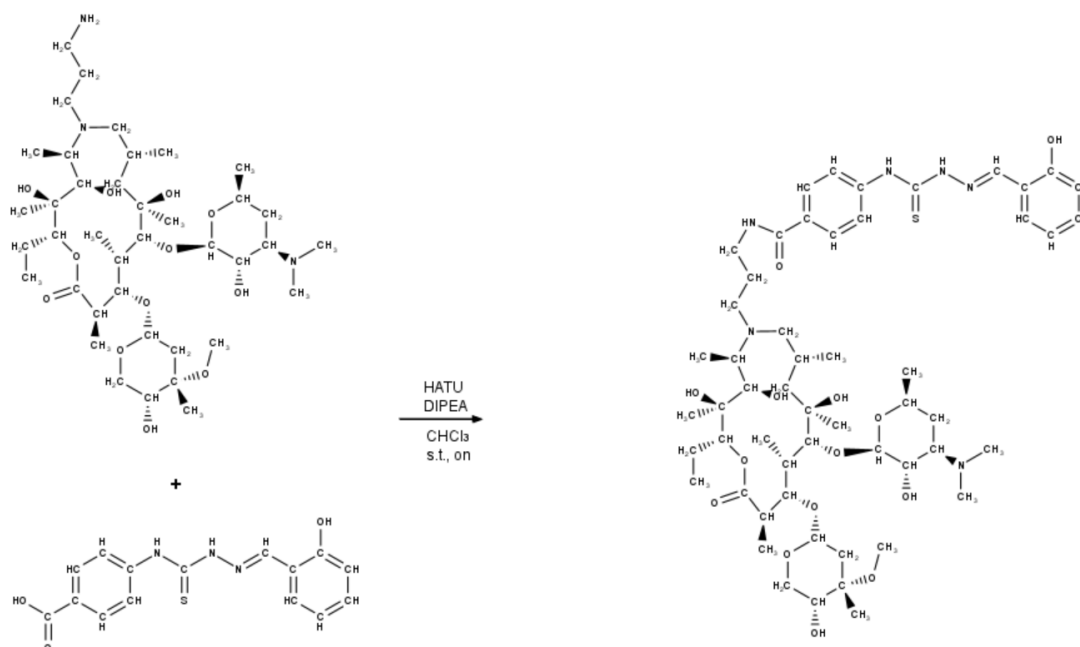


Slika 23. Uvećani dio spektra COSY spoja M9a snimljen u deuteriranom acetonitrilu pri s označenim korelacijskim signalima između protona H9a, H9b, H9c i H9d.

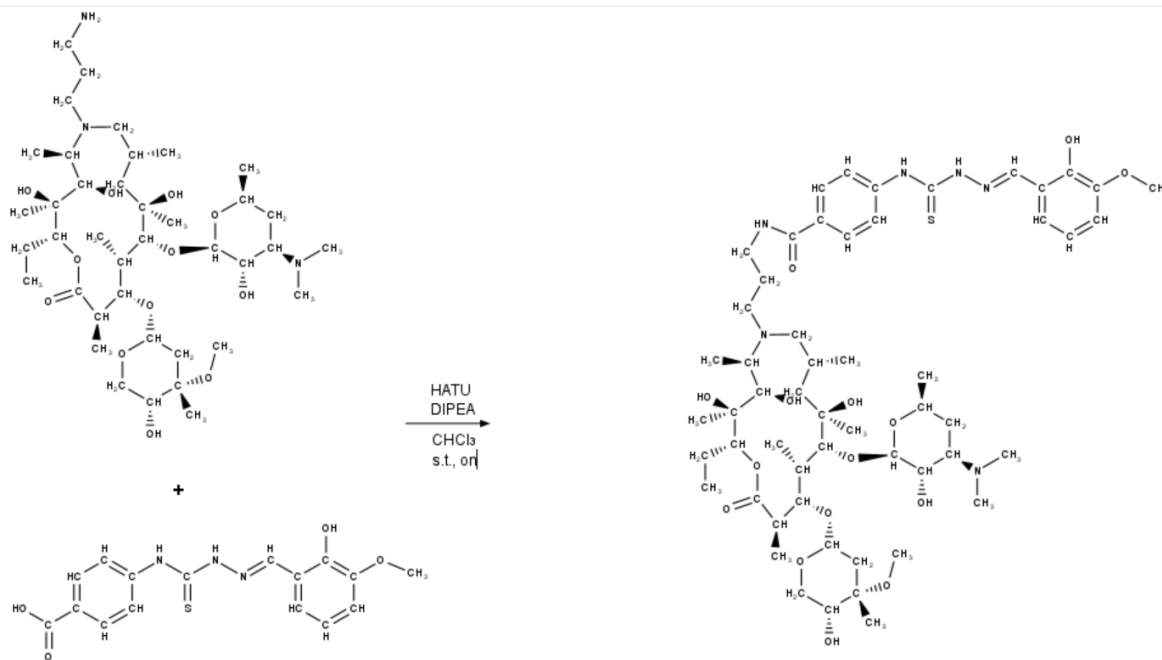
4.2.2. Priprava i asignacija makrozona, S4

Kako bi proveli reakciju esterifikacije makrolida M9a i tiosemikarbazona S3, moramo aktivirati estersku skupinu S3. U tu svrhu koristi se reagens DIPEA koji deprotonira karboksilnu skupinu spoja S3. Produkti reakcije su karboksilatni anion i diizopropiletilamonijeva sol. Nakon toga koristi se HATU kako bi došlo do elektrofilnog napada na karboksilatni anion i stvaranja aktivnog estera. Nakon 30 minuta, dodan je 9a-azitromicin, čija se amino skupina nukleofilnim napadom veže za karboksilnu skupinu tiosemikarbazona S3 (shema 4, shema 5, shema 6). Dobiveni makrozoni S4 karakterizirani su

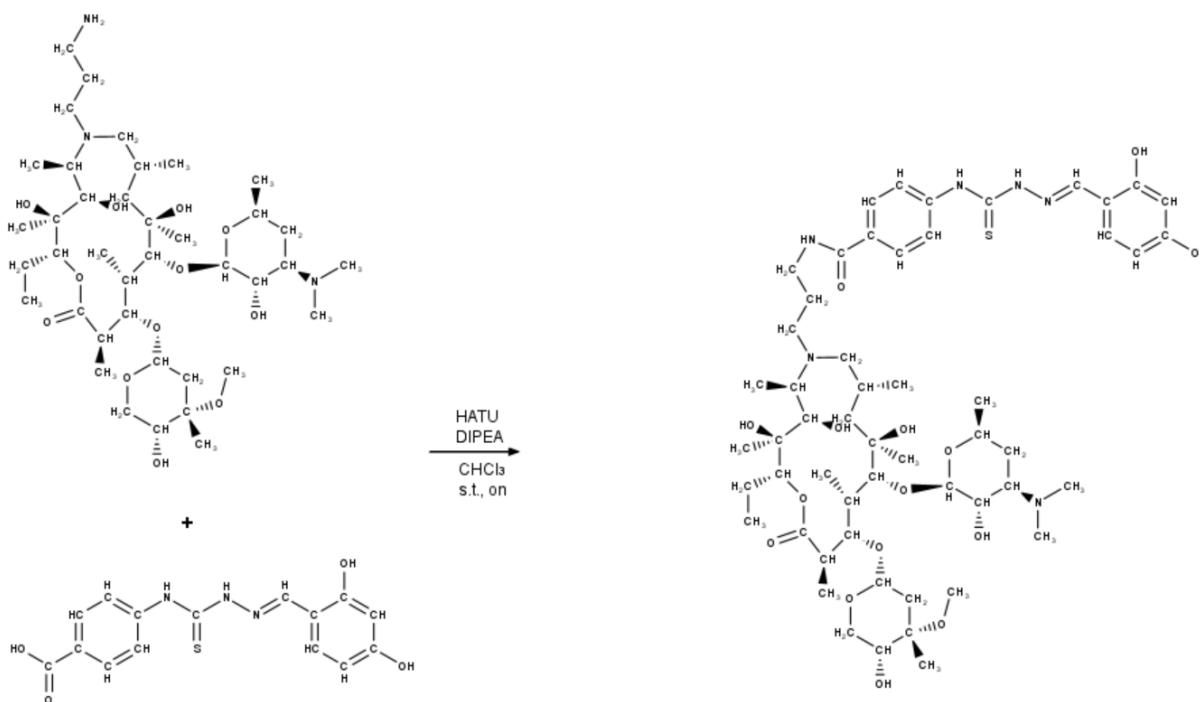
jednodimenzijском i dvodimenzijском spektroskopijом NMR. Povezanost protona i ugljikovih atoma kroz jednu ili više veza dobiveni su analizom HSQC i HMBC spektara.



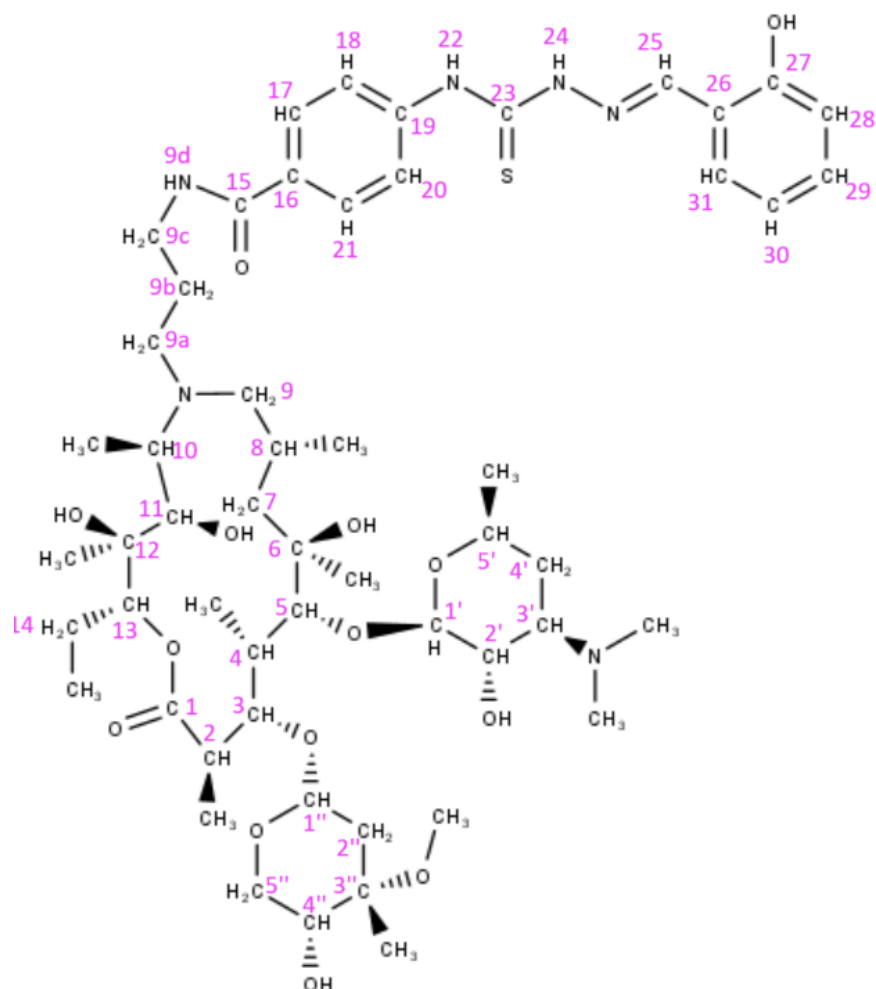
Shema 4. Kemijska priprava spoja S4.1 iz 9a-aminopropilnog derivata azitromicina i S3.1 uz HATU, DIPEA u kloroformu.



Shema 5. Kemijska priprava spoja S4.2 iz 9a-aminopropilnog derivata azitromicina i S3.2 uz HATU, DIPEA u kloroformu.



Shema 6. Kemijska priprava spoja S4.3 iz 9a-aminopropilnog derivata azitromicina i S3.3 uz HATU, DIPEA u kloroformu.

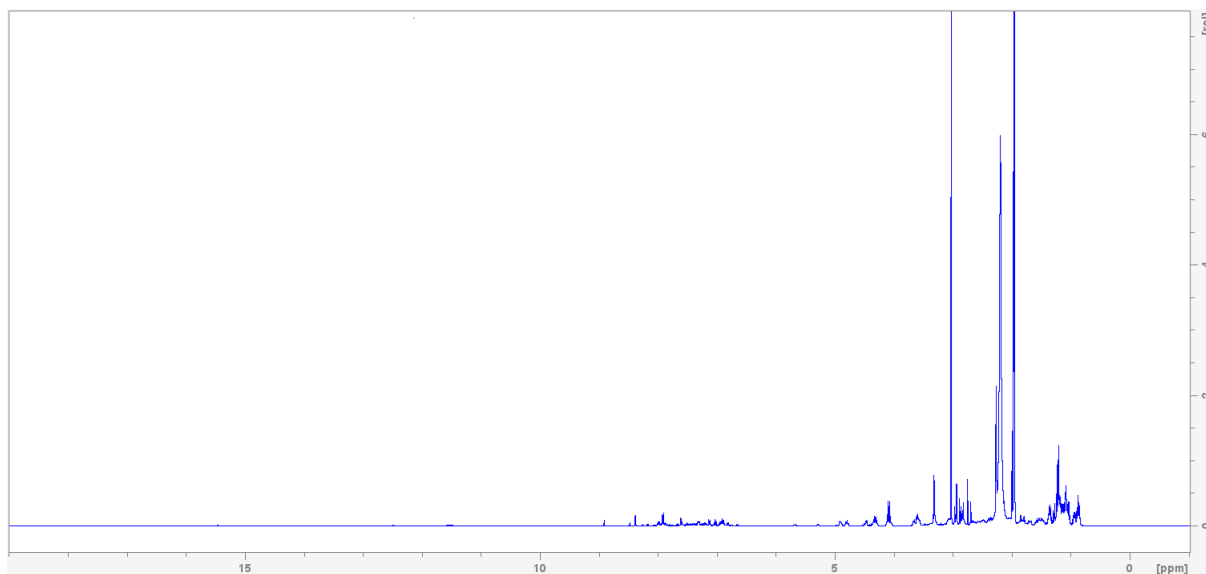


Slika 22. Strukturna spoja S4.1 s označenim protonima.

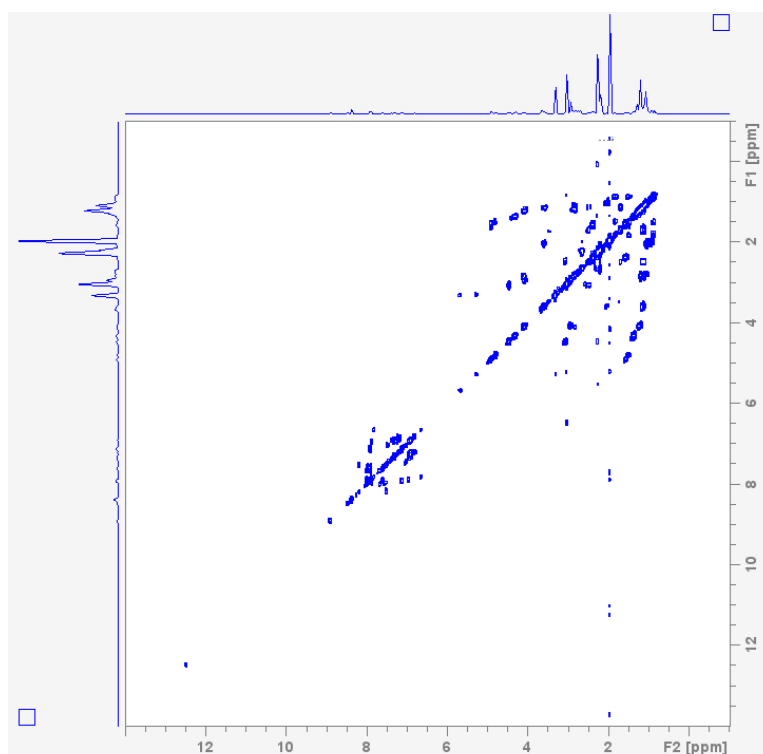
Tablica 9. Asignacija kemijskih pomaka ^1H NMR i ^{13}C NMR spoja S4.1.

Atom	δ (^1H)/ ppm	δ (^{13}C)/ ppm	Atom	δ (^1H)/ ppm	δ (^{13}C)/ ppm
1	-	178,10	1'	4,53	102,8
2	2,98	42,98	2'	3,08	70,47
2CH ₃	0,96	10,84	2'OH	-	-
3	4,32	72,79	3'	2,40	40,65
4	1,37	29,04	3'CH ₃	2,88	40,30

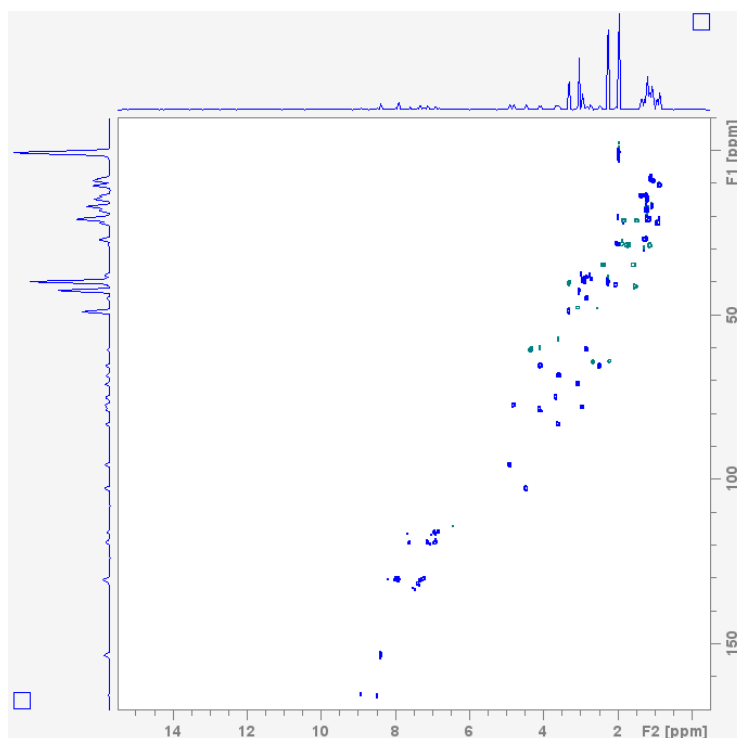
4CH3	1,02	17,42	4'	1,85-2,20	34,60
5	4,49	77,82	5'	3,58	83,30
6	-	73,18	5'CH3	1,09	21,70
6CH3	1,17	28,65	1"	-	76,66
6OH	-	-	2"	1,3-1,8	21,4
7	2,98	37,56	3"CH3	1,47	29,81
8	1,97	26,72	3"OCH3	3,12	49,56
8CH3	0,87	22,04	4"	3,0	76,70
9	2,94	77,44	4"OH	-	-
9a	1,85	40,65	5"	4,06	65,4
9b	1,79	30,2	5"CH3	1,14	21,5
9c	1,84	36,78	16		169,97
9d	6,80	-	17	7,90	-
10	3,59	68,14	18	7,61	131,25
10CH3	1,21	20,91	19	-	161,6
11	4,08	77,82	20	7,64	129,3
11OH	-	-	21	7,93	130,01
12	-	73,56	22	-	-
12CH3	1,04	17,81	24	-	-
12OH	-	-	25		-
13	4,93	-	26	8,37	-
14	1,53-2,30	33,68	27		145,19
14CH3	1,26	15,10	28	-	-
			28OH	-	-
			29	8,17	-
			30	7,34	130,03
			31	7,13	117,70



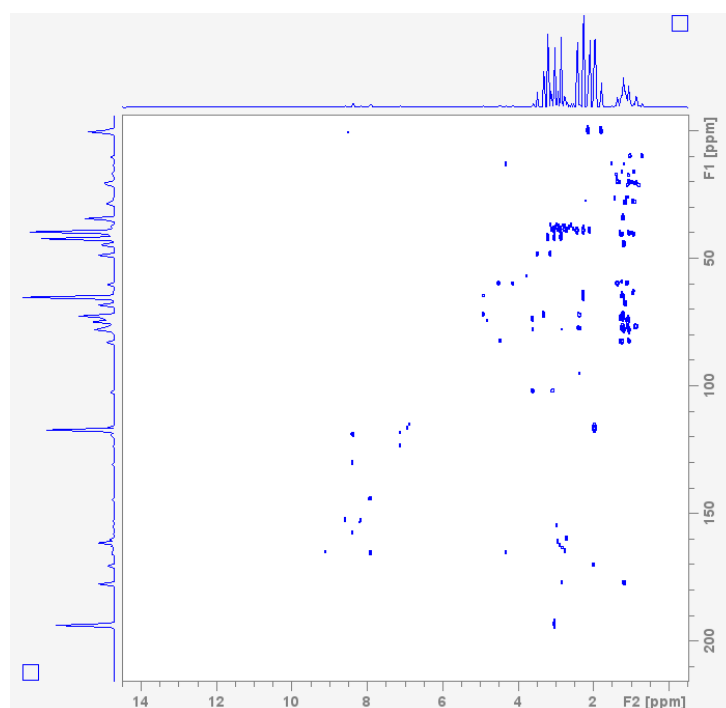
Slika 23. Spektar ^1H NMR spoja S4.1 snimljen u deuteriranom acetonitrilu.



Slika 24. Spektar COSY spoja S4.1 snimljen u deuteriranom acetonitrilu.

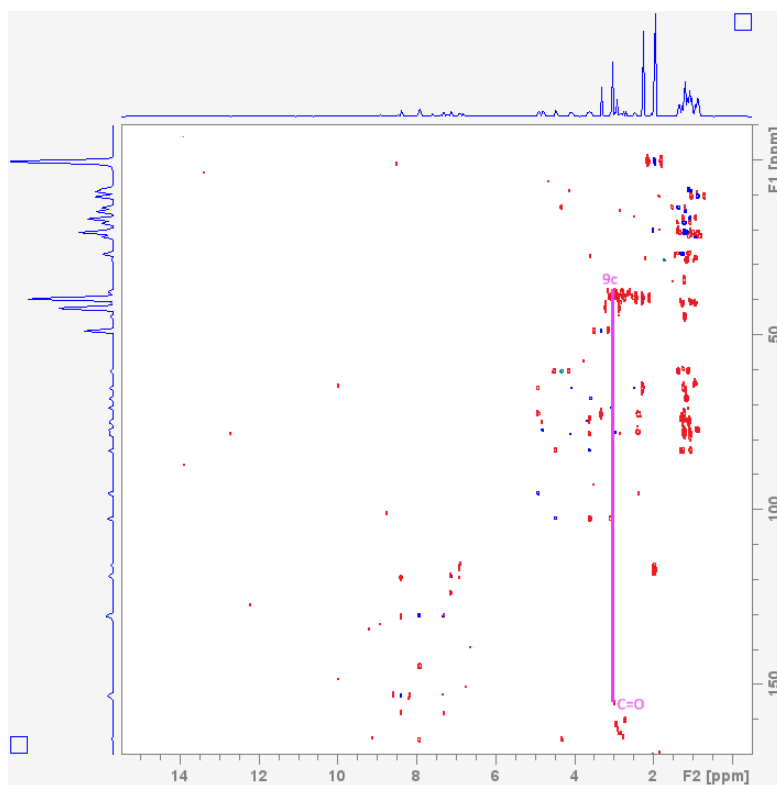


Slika 25. Spektar HSQC spoja S4.1 snimljen u deuteriranom acetonitrilu.

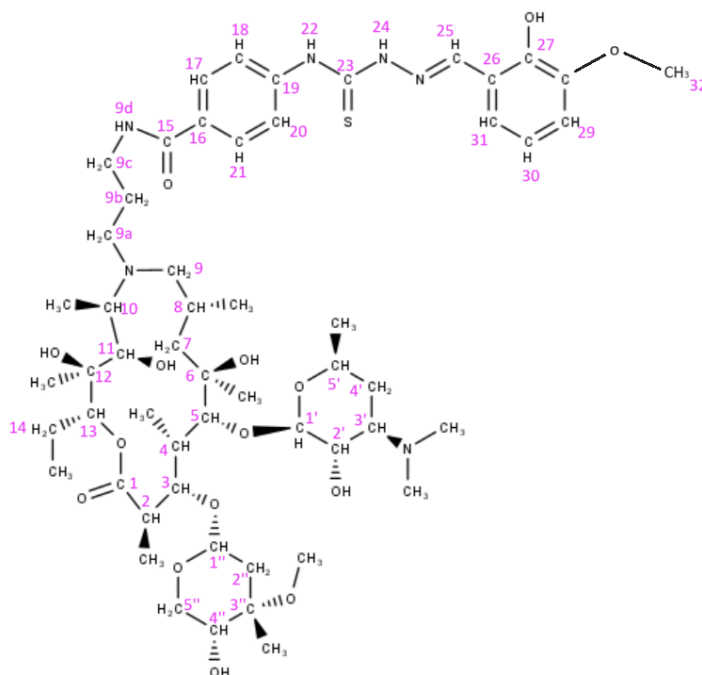


Slika 26. Spektar HMBC spoja S4.1 snimljen u deuteriranom acetonitrilu.

Prvi pokazatelj koji govori da je došlo do vezanja makrolida M9a i tiosemikarbazona S3.1 je izostajanje signala u spektru ^1H NMR makrozona za karboksilnu kiselinu. Ne postoji signal pri 11,9 ppm, što upućuje na prisutnost protona iz karboksilne skupine, kao što je pronađeno u spektru ^1H tiosemikarbazona S3. Potvrda nastale esterske veze prikazana je u preklopljenim spektrima HSQC i HMBC, gdje je pronađen korelacijski signal između protona H9c i karbonilnog ugljikovog atoma (slika 27).



Slika 27. Preklopljeni spektri HSQC (plavo) HMBC (crveno) spoja S4.1 snimljeni u deuteriranom acetonitrilu s označenim korelacijskim signalima između protona H9c i karbonilne skupine (C=O).

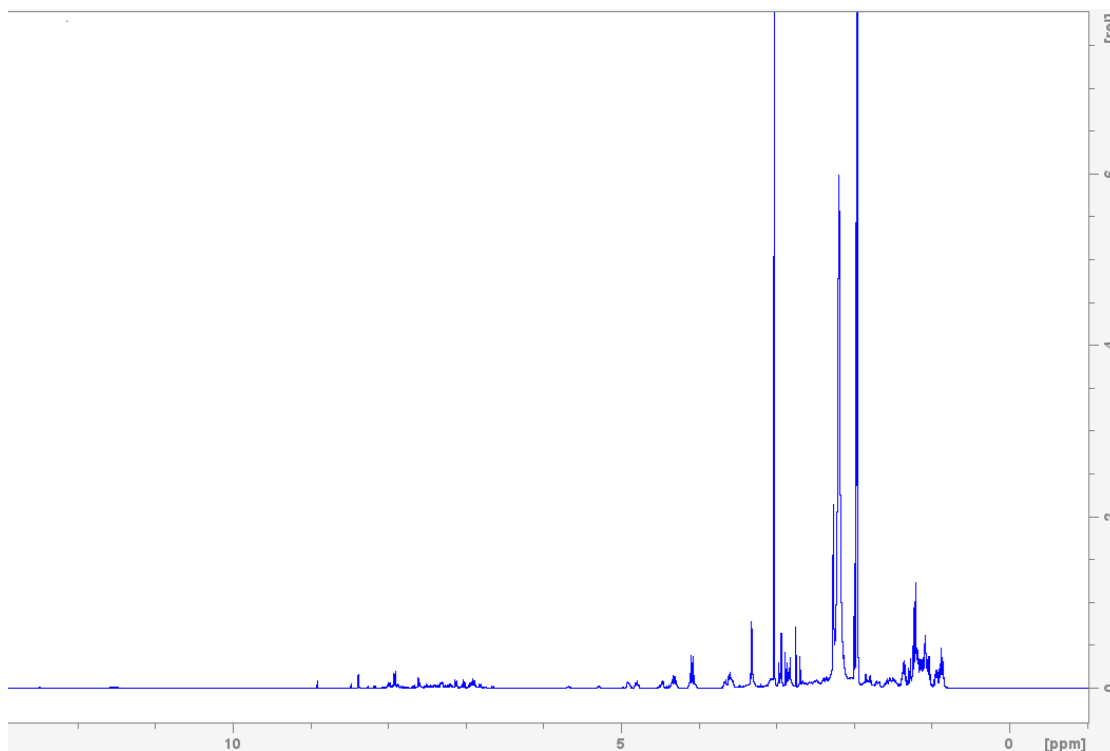


Slika 28. Strukturna spoja S4.2 s označenim protonima.

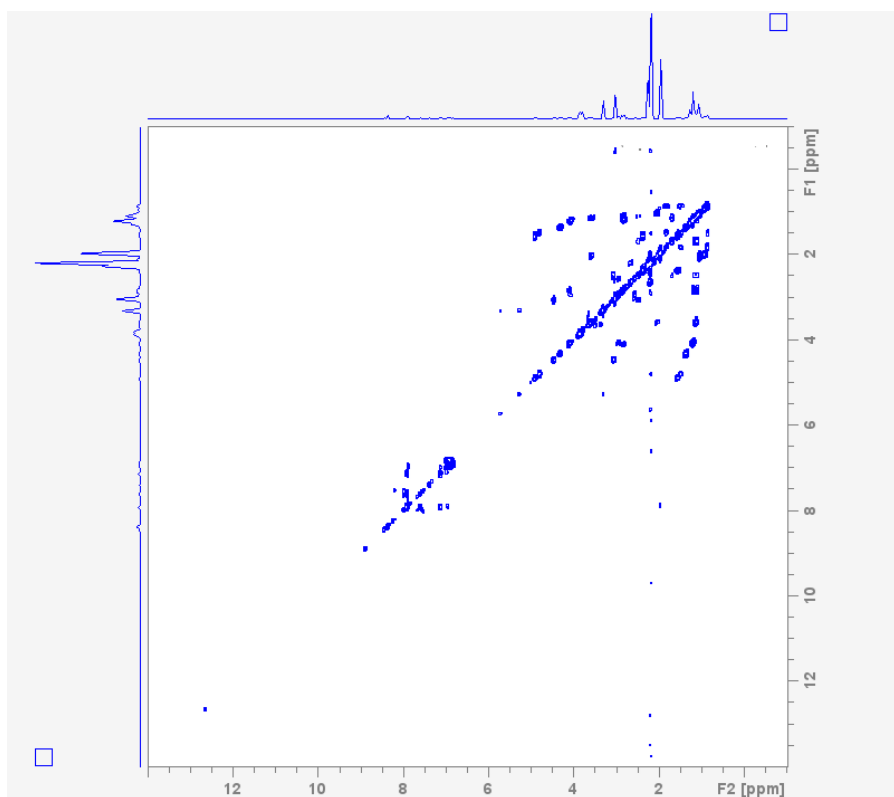
Tablica 10. Asignacija kemijskih pomaka ^1H NMR i ^{13}C NMR spoja S4.2.

Atom	δ (^1H)/ ppm	δ (^{13}C)/ ppm	Atom	δ (^1H)/ ppm	δ (^{13}C)/ ppm
1	-	178,10	1'	4,53	102,8
2	2,98	42,98	2'	3,08	70,47
2CH3	0,96	10,84	2'OH	-	-
3	4,32	72,79	3'	2,40	40,65
4	1,37	29,04	3'CH3	2,88	40,30
4CH3	1,02	17,42	4'	1,85-2,20	34,60
5	4,49	77,82	5'	3,58	83,30
6	-	73,18	5'CH3	1,09	21,70
6CH3	1,17	28,65	1''	-	76,66
6OH	-	-	2''	1,3-1,8	21,4
7	2,98	37,56	3''CH3	1,47	29,81
8	1,97	26,72	3''OCH3	3,12	49,56
8CH3	0,87	22,04	4''	3,0	76,70

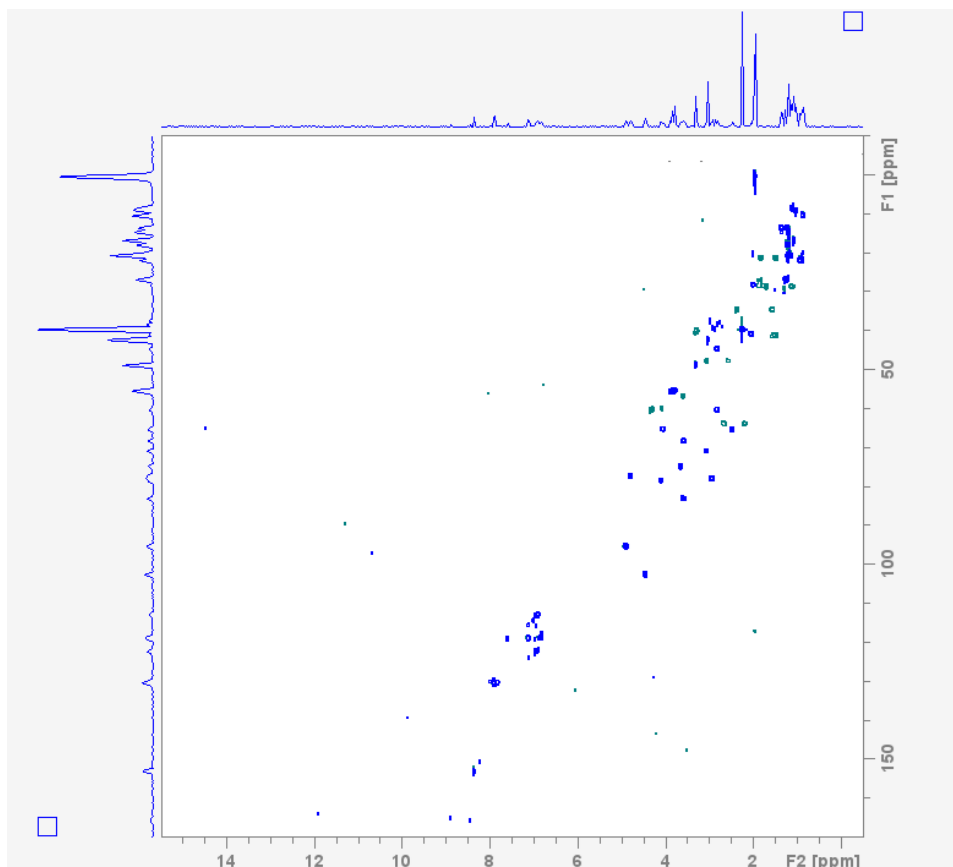
9	2,94	77,44	4"OH	-	-
9a	1,85	40,65	5"	4,06	65,4
9b	1,79	30,2	5"CH3	1,14	21,5
9c	1,84	36,78	16		169,97
9d	6,80	-	17	7,90	-
10	3,59	68,14	18	7,61	131,25
10CH3	1,21	20,91	19	-	161,6
11	4,08	77,82	20	7,64	129,3
11OH	-	-	21	7,93	130,01
12	-	73,56	22	-	-
12CH3	1,04	17,81	24	-	-
12OH	-	-	25		-
13	4,93	-	26	8,37	-
14	1,53-2,30	33,68	27		145,19
14CH3	1,26	15,10	28	-	-
			28OH	-	-
			29	8,17	-
			30	7,34	130,03
			31	7,13	117,70
			32	3,32	



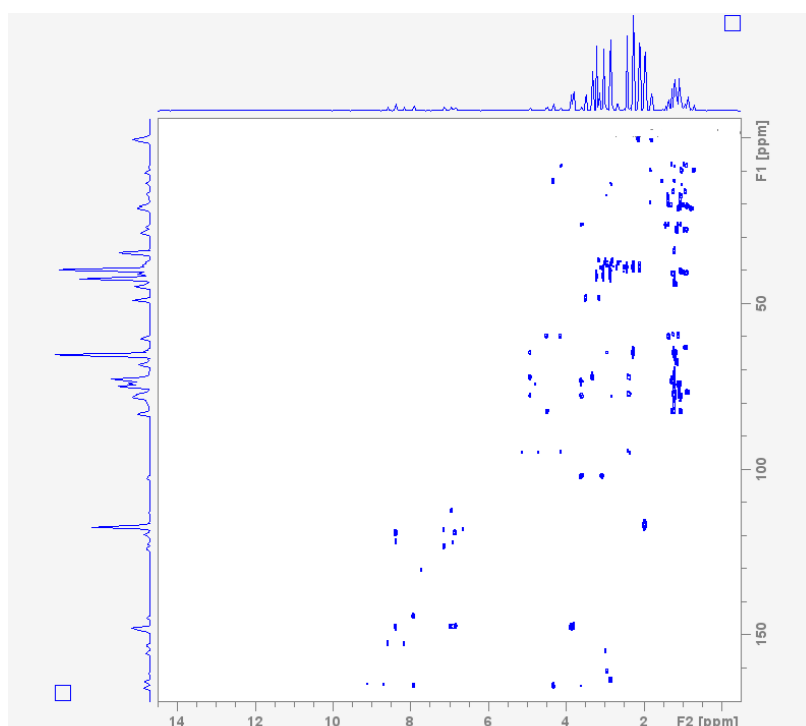
Slika 29. Spektar ^1H NMR spoja S4.2 snimljen u deuteriranom acetonitrilu.



Slika 30. Spektar COSY spoja S4.2 snimljen u deuteriranom acetonitrilu.

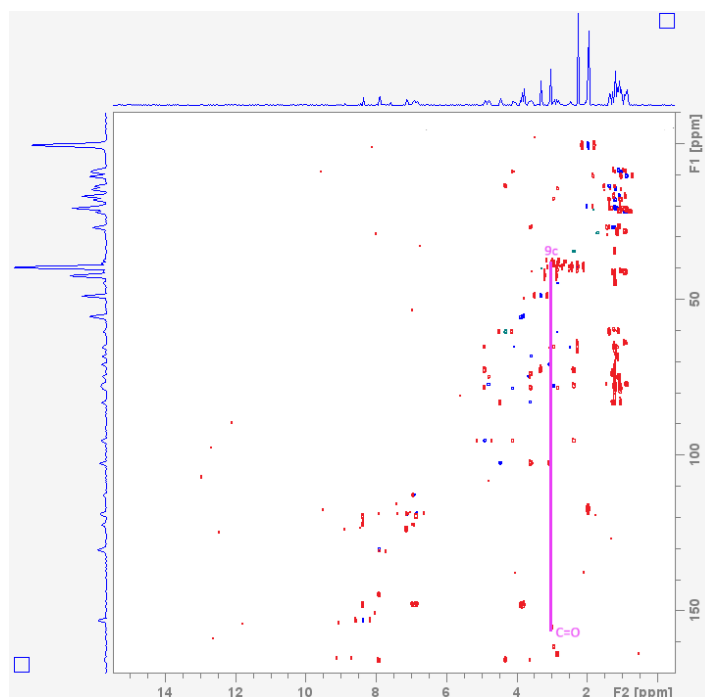


Slika 31. Spektar HSQC spoja S4.2 snimljen u deuteriranom acetonitrilu.

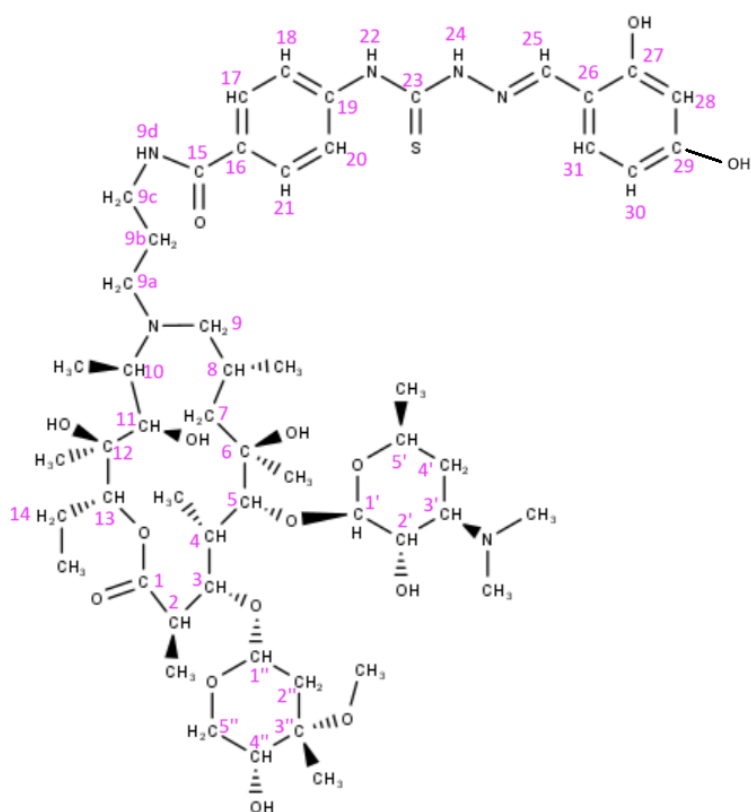


Slika 32. Spektar HMBC spoja S4.2 snimljen u deuteriranom acetonitrilu.

Prvi pokazatelj koji govori da je došlo do vezanja makrolida M9a i tiosemikarbazona S3.2 je izostajanje signala u spektru ^1H NMR makrozona za karboksilnu kiselinu. Ne postoji signal pri 11,9 ppm, što upućuje na prisutnost protona iz karboksilne skupine, kao što je pronađeno u spektru ^1H tiosemikarbazona S3. Potvrda nastale esterske veze prikazana je u preklopljenim spektrima HSQC i HMBC, gdje je pronađen korelacijski signal između protona H9c i karbonilnog ugljikovog atoma (slika 33).



Slika 33. Preklopljeni spektri HSQC (plavo) HMBC (crveno) spoja S4.2 snimljeni u deuteriranom acetonitrilu s označenim korelacijskim signalima između protona H9c i karbonilne skupine (C=O).

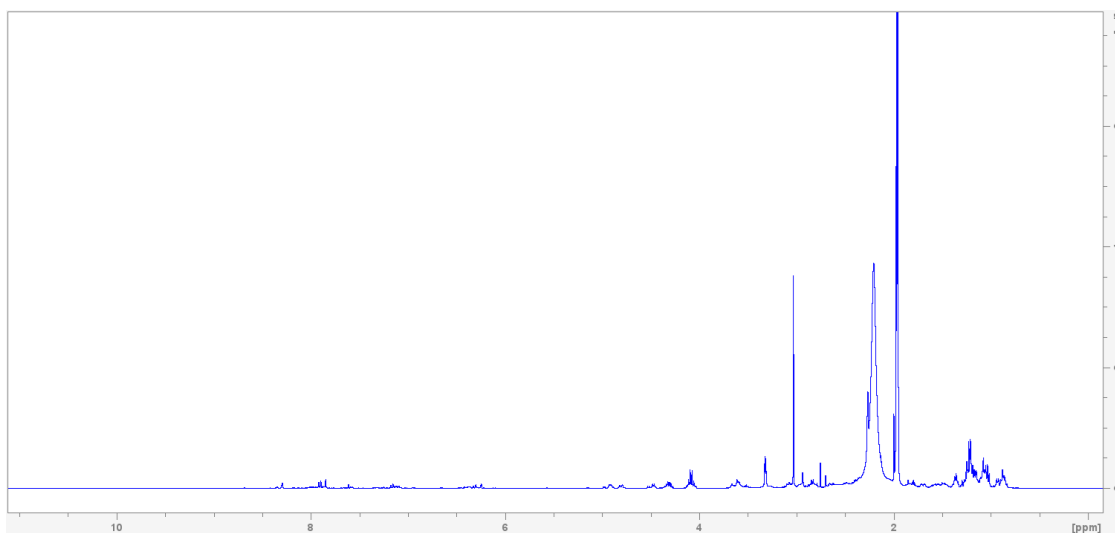


Slika 34. Strukturna spoja S4.3 s označenim protonima.

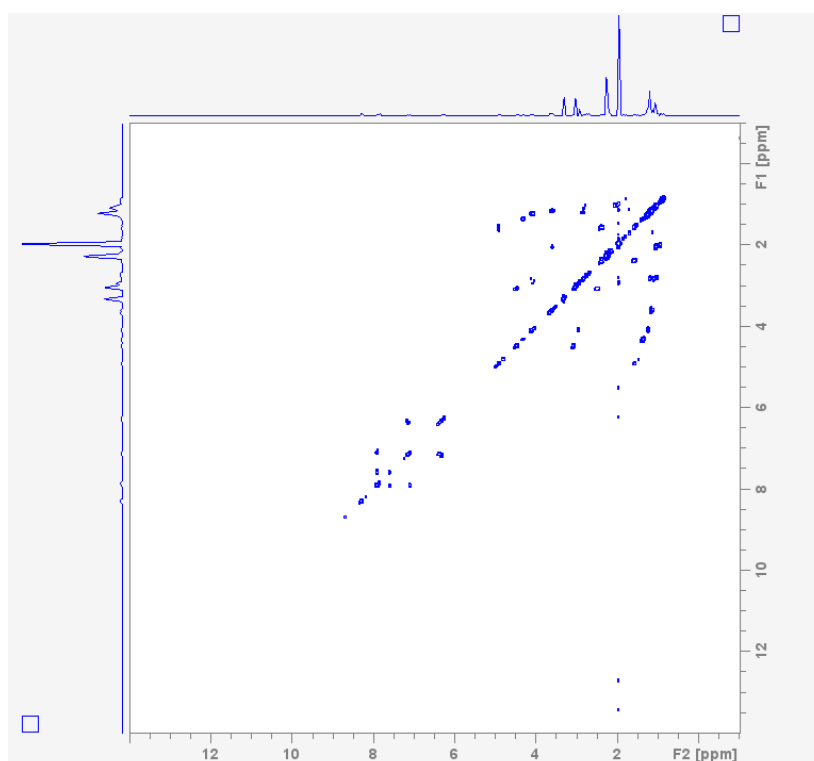
Tablica 10. Asignacija kemijskih pomaka ^1H NMR i ^{13}C NMR spoja S4.3.

Atom	δ (^1H)/ ppm	δ (^{13}C)/ ppm	Atom	δ (^1H)/ ppm	δ (^{13}C)/ ppm
1	-	178,10	1'	4,53	102,8
2	2,98	42,98	2'	3,08	70,47
2CH3	0,96	10,84	2'OH	-	-
3	4,32	72,79	3'	2,40	40,65
4	1,37	29,04	3'CH3	2,88	40,30
4CH3	1,02	17,42	4'	1,85-2,20	34,60
5	4,49	77,82	5'	3,58	83,30
6	-	73,18	5'CH3	1,09	21,70
6CH3	1,17	28,65	1''	-	76,66
6OH	-	-	2''	1,3-1,8	21,4
7	2,98	37,56	3''CH3	1,47	29,81

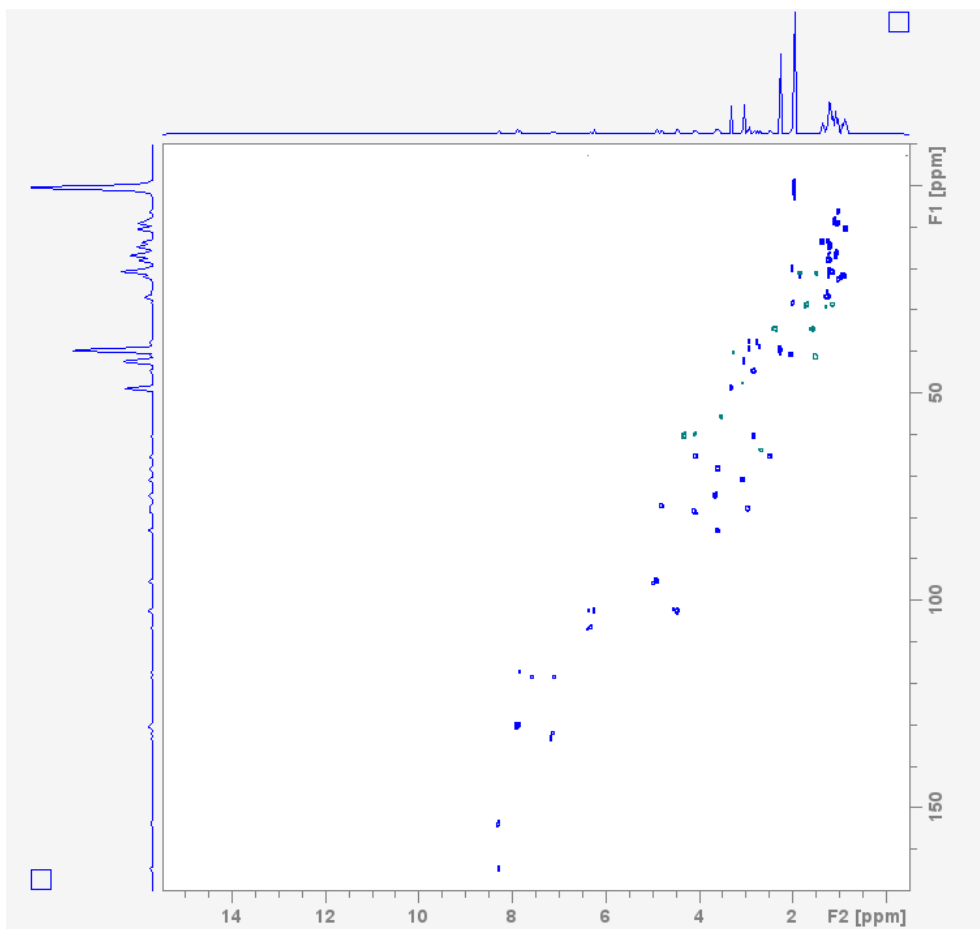
8	1,97	26,72	3"OCH3	3,12	49,56
8CH3	0,87	22,04	4"	3,0	76,70
9	2,94	77,44	4"OH	-	-
9a	1,85	40,65	5"	4,06	65,4
9b	1,79	30,2	5"CH3	1,14	21,5
9c	1,84	36,78	16		169,97
9d	6,80	-	17	7,90	-
10	3,59	68,14	18	7,61	131,25
10CH3	1,21	20,91	19	-	161,6
11	4,08	77,82	20	7,64	129,3
11OH	-	-	21	7,93	130,01
12	-	73,56	22	-	-
12CH3	1,04	17,81	24	-	-
12OH	-	-	25		-
13	4,93	-	26	8,37	-
14	1,53-2,30	33,68	27		145,19
14CH3	1,26	15,10	28	-	-
			28OH	-	-
			29	8,17	-
			29OH	2,75	-
			30	7,34	130,03
			31	7,13	117,70



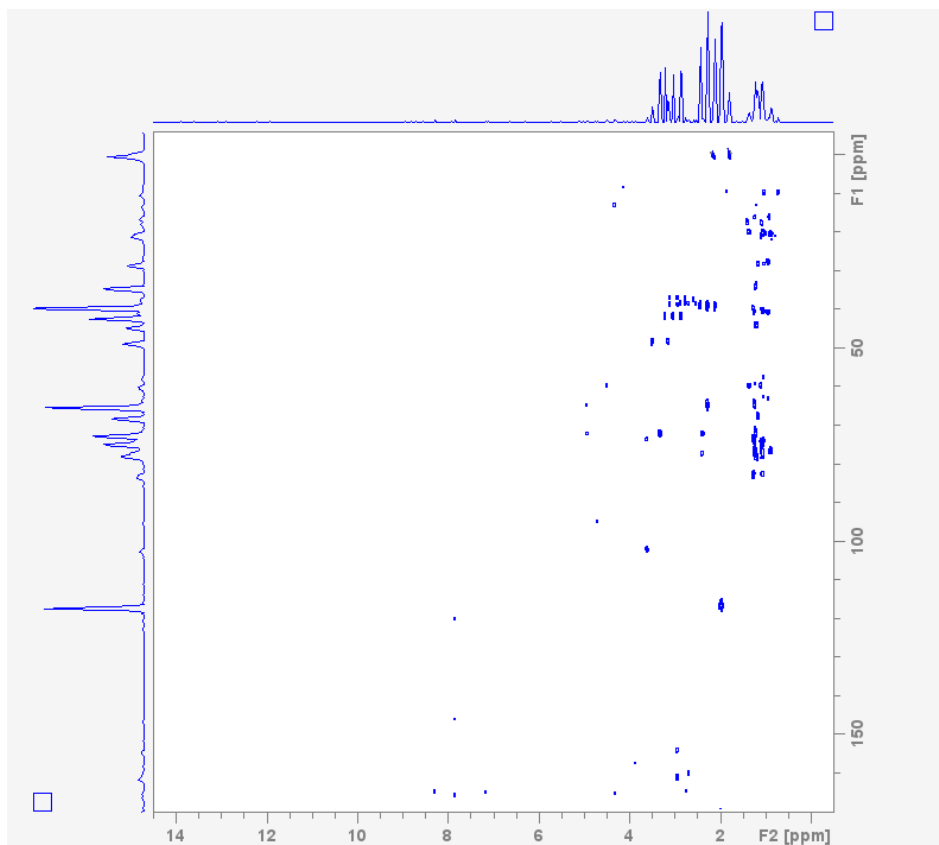
Slika 35. Spektar ^1H NMR spoja S4.3 snimljen u deuteriranom acetonitrilu.



Slika 36. Spektar COSY spoja S4.3 snimljen u deuteriranom acetonitrilu.

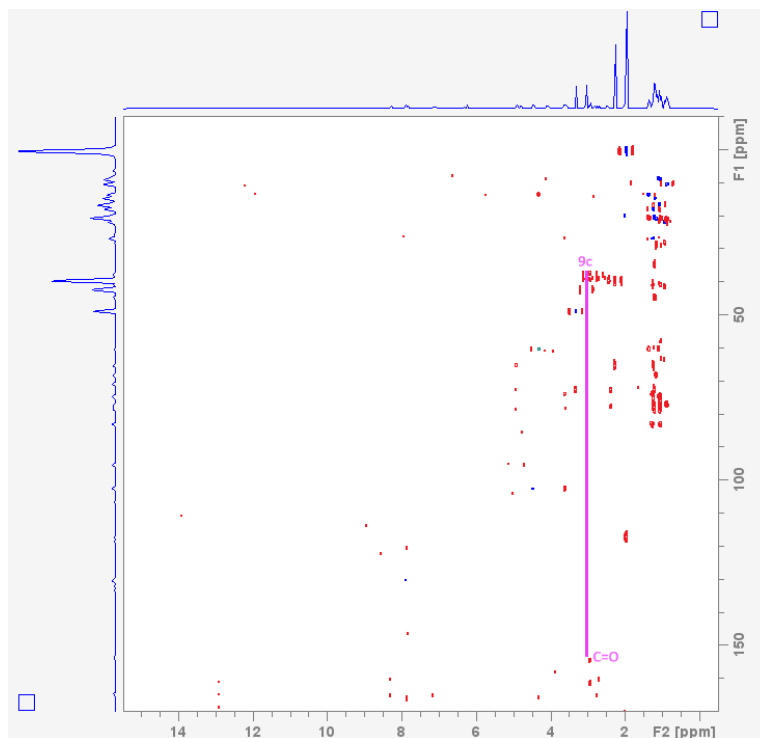


Slika 36. Spektar HSQC spoja S4.3 snimljen u deuteriranom acetonitrilu.



Slika 37. Spektar HMBC spoja S4.3 snimljen u deuteriranom acetonitrilu.

Prvi pokazatelj koji govori da je došlo do vezanja makrolida M9a i tiosemikarbazona S3.3 je izostajanje signala u spektru ^1H NMR makrozona za karboksilnu kiselinu. Ne postoji signal pri 11,9 ppm, što upućuje na prisutnost protona iz karboksilne skupine, kao što je pronađeno u spektru ^1H tiosemikarbazona S3. Potvrda nastale esterske veze prikazana je u preklopljenim spektrima HSQC i HMBC, gdje je pronađen korelacijski signal između protona H9c i karbonilnog ugljikovog atoma (slika 38).



Slika 38. Preklopljeni spektri HSQC (plavo) HMBC (crveno) spoja S4.3 snimljeni u deuteriranom acetonitrilu s označenim korelacijskim signalima između protona H9c i karbonilne skupine (C=O).

4.3. Biološka aktivnost

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) određena je prema standardnim protokolima (CLSI, engl. Clinical Laboratory Standards Institute) te je dobivena antibakterijska aktivnost in vitro za novo pripravljene makrozona i njihove komplekse s bakrom(II) i niklom(II). Biološka aktivnost makrozona napravljena je na nekoliko rezistentnih i susceptibilnih sojeva bakterija koje uzrokuju različite infekcije u organizmu.

Poput azitromicina, svi testirani spojevi nisu pokazali aktivnost na sojeve *S. pneumoniae* B0633 i *S. pyogenes* B0544. Kompleksi s bakrom imaju poboljšanu aktivnost na soju *M. catarrhalis* ATCC 23246, a komplekski s niklom na sojeve *S. aureus* B0331 i *S. aureus* B0330. Vrlo dobra biološka aktivnost (1-16 µg/mL) svih spojeva dobivena je za sojeve *S. aureus* ATCC 29213 i *M. catarrhalis* ATCC 23246. Najbolja antibakterijska aktivnost (MIK ≤0.125 µg/mL) opažena je za soj *S. pneumoniae* B0652.

U Tablici 11. prikazane su minimalne inhibitorne koncentracije pripremljenih makrozona i njihovih kompleksa s niklom(II) i bakrom(II) te antibiotika azitromicina i ciprofloksacina. Za rezistentne sojeve bakterija naznačene su skraćenice mehanizma kojim pokazuju otpornost na antibiotike (M – efluks rezistencija na makrolide; cMLS – konstitutivna rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogramine). Skraćenica eryS označava osjetljivost na eritromicin.

Tablica 11. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) sintetiziranih makrozona i njihovih kompleksa s niklom(II) i bakrom(II) te antibiotika azitromicina i ciprofloksacina na različite Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije.

	G+	G+	G+	G+	G+	G+	G+	G+	G+	G-
	<i>S. pneumoniae</i> B0652	<i>S. pneumoniae</i> B0326	<i>S. pneumoniae</i> B0633	<i>S. pyogenes</i> B0542	<i>S. pyogenes</i> B0544	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. aureus</i> B0331	<i>S. aureus</i> B0330	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>M. catarrhalis</i> ATCC 23246
	eryS	M	cMLS	eryS	cMLS	eryS	M	cMLS		
makrozon										
S4.1	≤0.125	32	>64	1	>64	8	>64	>64	32	8
S4.2	0,25	32	>64	1	>64	16	>64	>64	32	8
S4.3	≤0.125	32	>64	0,5	>64	8	>64	>64	32	4
S4.1-Cu	0,25	64	>64	0,5	>64	8	>64	>64	64	2
S4.2-Cu	≤0.125	32	>64	0,25	>64	8	>64	>64	32	0,5
S4.3-Cu	0,25	64	>64	1	>64	16	>64	>64	64	1
S4.1-Ni	≤0.125	32	>64	0,5	>64	8	32	32	32	8
S4.2-Ni	≤0.125	32	>64	0,5	>64	8	64	64	16	4
S4.3-Ni	≤0.125	32	>64	0,5	>64	16	32	32	32	4
azitromicin	≤0.125	8	>64	≤0.125	>64	1	>64	>64	8	≤0.125
ciprofloksacin	2	1	0,5	2	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5	≤0.125

§ 5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu uspješno je provedena sinteza makrozona 9a pomoću derivata azitromicina 9a i tiosemikarbazona izvedenih iz 4-aminobenzojeve kiseline te odgovarajućih aldehida. Prvim korakom koji uključuje reakciju između etil 4-izotiocijanatobenzoata i hidrazin monohidrata sintetiziran je 4- [(aminokarbamotiol)amino]benzoat. Njegovom reakcijom s odgovarajućim aldehydima dobiveni su tiosemikarbazoni esteri, prekursori tiosemikarbazona s karboksilnom skupinom. Hidroliza tiosemikarbazona estera uspješno je provedena uz litijev karbonat i octenu kiselinu, a reakcijom su dobiveni već spomenuti tiosemikarbazoni s karboksilnom skupinom. Dobiveni tiosemikarbazoni vezani su na 9a-aminopropilni derivat azitromicina uz dodatak HATU i DIPEA. Spojevi su karakterizirani spektroskopijom NMR.

Svi dobiveni makrozoni i njihovi kompleksi s niklom(II) i bakrom(II) pokazuju vrlo dobru biološku aktivnost za sojeve *S. aureus* ATCC 29213 i *M. catarrhalis* ATCC 23246. Kod rezistentnih sojeva *S. aureus* poboljšanu aktivnost imaju kompleksi s niklom(II), a kod soja *M. catarrhalis* ATCC 23246 kompleksi s bakrom(II). Najbolja antibakterijska aktivnost opažena je za soj *S. pneumoniae* B0652.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ATP – adenzin trifosfat

COSY – korelacijska spektroskopija

CLSI – engl. Clinical Laboratory Standards Institute

DIPEA – N,N-diizopropiletilamin

DMSO – dimetil sulfoksid

DOSY – engl. diffusion-ordered spectroscopy

HATU – 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinijev-3-oksidi

heksafluorofosfat

HMBC – engl. heteronuclear multiple bond correlation

HSQC – engl. heteronuclear single quantum coherence

IUPAC – engl. Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

mRNA – engl. messenger ribonukleinska kiselina

NOE – nuklearni Overhauserov efekt

NMR – nuklearna magnetna rezonancija

RNA – engl. ribonukleinska kiselina

rRNA – engl. ribosomska ribonukleinska kiselina

STD – engl. saturation transfer difference

THF – tetrahidrofur

tRNA – engl. transfer ribonukleinska kiselina

trNOESY – engl. two-dimensional proton transfer nuclear Overhauser spectroscopy

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. P. Barathe, K. Kaur, S. Reddy, V. Shriram, V. Kumar, *J. Hazard. Mater. Lett.* **5** (2024) 1-11
2. W. Xu, Z. Pan, Y. Wu, X. An, W. Wang, B. Adamovich, Y. Zhu, J. Su, Q. Huang, *Sci. Data* **11** (2024) 1-9
3. H. Ohnishi, T. Otani, Y. Kanemitsu, T. Nagano, J. Hara, M. Eitoku, *Allergology International* (2024) 1-8
4. M. Gaynor, A. S. Mankin, *Front. Med. Chem.* **2** (2005) 21-35
5. D. Khurana, B. Kumar, J. Devi, N. Antil, R. B. Patil, K. Singh, Y. Singh, *Heliyon* **10** (2024) 1-14
6. T. Jednačak, I. Mikulandra, K. Smokrović, A. Hloušek-Kasun, M. Kapustić, K. Delaš, I. Piantanida, M. Jurković, B. Bertoša, K. Zangger, P. Novak, *Bioorg. Chem.* **147** (2024) 107338
7. <https://www.medlineplus.gov/antibiotics.html> (datum pristupa 19. prosinca 2023.)
8. <https://www.arpssp.cdc.gov/profile/antibiotic-use/all-classes> (datum pristupa 23. prosinca 2023.)
9. B. Spellberg, *Critical Care* **18** (2014) 1-7
10. M. Hutchings, A.W. Truman, B. Wilkinson, *Curr. Opin. Microbiol.* **51** (2019) 72-80
11. K. D. Lenz, K. E. Klosterman, H. Mukundan, J. Z. Kubicek-Sutherland, *Toxins* **13** (2021) 347-374
12. G. P. Dinos, *Br. J. Pharmacol.* **174** (2017) 2967–2983
13. T. Jednačak, I. Mikulandra, P. Novak, *Int. J. Mol. Sci.* **21** (2020) 1-26
14. S. M. Catnach, P. D. Fairclough, *Gut* **33** (1992) 397-401
15. M. S. Whitman, A. R. Tunkel, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **12** (1992) 357-368
16. C. H. Ballou, G. W. Amsden, *Ann. Pharmacother.* **26** (1992) 1253-1261
17. H. Lode, K. Borner, P. Koeppe, T. Schaberg, *J. Antimicrob. Chemother.* **37** (1996) 1-8
18. M. Heidary, A. E. Samangani, A. Kargari, A. K. Nejad, I. Yashmi, M. Motahar, E. Taki, S. Khoshnood, *J. Clin. Lab. Anal.* **36** (2022) 1-16
- M. J. Parnhama, V. Eraković Haberb, E. J. Giamarellos-Bourboulisc, G. Perlettid, G.M. Verledene, R. Vos, *Pharmacol. Ther.* **143** (2014) 225-245

19. H. C. Neu, *Am. J. Med.* **91** (1991) 1-7
20. T. Mazzei, E. Mini, A. Noveffi, P. Periti, *J. Antimicrob. Chemother.* **31** (1993) 1-9
21. B. Vester, S. Douthwaite, *Antimicrob. Agents Chemother.* **45** (2001) 1-12
22. C. Fyfe, T. H. Grossman, K. Kerstein, J. Sutcliffe, *Cold Spring Harb Perspect Med* **6** (2016) 1-37
23. S. E. Jamal, A. Iqbal, K. A. Rahman, K. Tahmeena, *J. Drug Delivery Ther.* **9** (2019) 689-703
24. R. Leclercq, *Antimicrob. Resist.* **34** (2002) 482-492
25. G. Pelosi, *Open Crystallogr. J.* **3** (2010) 16-28
26. N. P. Prajapati, H. D. Patel, *Synth. Commun.* **49** (2019) 2767-2804
27. J. Shim, N. Rama Jyothi, N.A. Mohammad Farook, *Asian J. Chem.* **25** (2013) 5838-5840
28. M. S. Smyth, J. H. J. Martin, *J. Clin. Pathol.:Mol. Pathol.* **53** (2000) 8-14
29. J. P. Renaud, A. Chari, C. Ciferri, W. Liu, H. W. Rémigy, H. Stark, C. Wiesmann, *Nat. Rev. Drug Discovery* **17** (2018) 471-492
30. I. Mikulandra, T. Jednačak, B. Bertoša, J. Parlov Vuković, I. Kušec, P. Novak, *Materials* **14** (2021) 1-10

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Leda Divjak

Datum rođenja: 25. svibnja 1998.

Mjesto rođenja: Osijek

Obrazovanje

2005.-2013. Osnovna škola Jabukovac, Zagreb

2013.-2017. Isusovačka klasična gimnazija s pravom javnosti u Osijeku

2017.-2021. Preddiplomski studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet Zagreb

2021.-2024. Diplomski studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet Zagreb

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2018., 2019., 2023. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka PMF-a (Dan i noć na PMF-u)

2022. Volonterski rad, MMCE Conference, Primošten, Hrvatska

2023. Volonterski rad, Adriatic NMR Conference, Mali Ston, Hrvatska

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. Monika Galić, Leda Divjak, Kristina Smokrović Predrag Novak, Synthesis and characterization of a macrozone 4" derivative of azithromycin derived from 4-aminobenzoic acid and salicylaldehyde and its complex with nickel(II) and copper(II), Adriatic NMR 2023, Mali Ston 2023; Knjiga sažetaka str. 59