

# Priprava i karakterizacija kompleksa nikla(II) s makrozonskim 4'' derivatom azitromicina izvedenim iz 4-formilbenzojeve kiseline

---

Hošnjak, Ema

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:217:840933>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijски odsjek

Ema Hošnjak

**PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA  
KOMPLEKSA NIKLA(II) S MAKROZONSKIM  
4'' DERIVATOM AZITROMICINA IZVEDENIM  
IZ 4-FORMILBENZOJEVE KISELINE**

**Diplomski rad**

predložen Kemijском odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2022.

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

*Prvenstveno se zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Predragu Novaku na pruženoj prilici da budem dio ovog projekta i prije izrade Diplomskog rada. Hvala Vam na svim konstruktivnim savjetima i pomoći prilikom izrade ovog rada i hvala Vam što ste mi omogućili da se usavršavam i širim svoje znanje kroz praktičan rad.*

*Hvala komentorici dr. sc. Kristini Smokrović na velikom strpljenju, susretljivosti, trudu, nesebičnoj pomoći i prenesenom znanju tijekom izrade ovog rada.*

*Cijeloj bivšoj i sadašnjoj ekipi "mojih" Znanstvenih čarolija, hvala Vam što ste bili dio ovog prekrasnog projekta kojeg ću definitivno pratiti kao najsvjetliju točku ovog studija. Ono na čemu sam najviše zahvalna u Znanstvenim čarolijama je to što sam upoznala tri predivne prijateljice. Jano, Pero i Manenice, HVALA VAM za svaku skriptu!/, za one petke uz bicikle, hvala vam što ste uvijek imale strpljenja za one moje: "cure trebam savjet", hvala što ste uvijek prave prijateljice..*

*Mojim dečkima iz Drinjačke kao i njenim pridošlicama, hvala Vam za sva učenja zajedno, za sve spačke, šalice i pošalice koje su definitivno spašavale rokove.*

*Neizmjerne sam zahvalna mojim curama, Josipi, Kristini, Nikolini, Lauri i Petri, što sam baš s Vama koračala ovim krivudavim putevima do diplome. Hvala Vam za sate provedene u NSB-u, za sva iščekivanja i potporu.*

*Veliko Hvala mojim "stogodišnjim" prijateljima, Antoneli, Ivi, Dei, Albi, Sandri, Bebi, Pilji i Budi. Hvala što ste iako kilometrima udaljeni, uvijek bili spremni slušati.*

*Osobi kojoj s jednim Hvala ne mogu iskazati dovoljnu zahvalnost, mojem Manuelu. Hvala za onu šetnju u Botaničkom, hvala što si uvijek tu uz mene, što svaki moj uspjeh i neuspjeh doživljavaš kao svoj, hvala za razgovore pune razumijevanja i ohrabrenja. Da te nema, trebalo bi te izmisliti! ✿*

*Zadnje i najveće hvala, **mami, tati i bratu**, bez kojih ništa ovo ne bi bilo moguće. Hvala Vam što ste uvijek bili moja najveća podrška i najbolji uzori. Hvala što ste me uvijek poticali da budem bolja i da nikad ne odustanem, hvala što ste vjerovali u mene i onda kada ja nisam.*



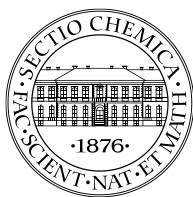


# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>X</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Makrolidi .....</b>	<b>2</b>
2.1.1. Podjela i struktura makrolida .....	2
2.1.2. Mehanizam djelovanja makrolida.....	4
2.1.3. Mehanizmi rezistencije bakterija na makrolide .....	6
<b>2.2. Tiosemikarbazoni.....</b>	<b>9</b>
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. Kemikalije i instrumenti.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2. Priprava kompleksa tiosemikarbazona s niklom(II) .....</b>	<b>17</b>
3.2.1. Priprava N-benzilhidrazin-karbotioamida (T6) .....	17
3.2.2. Priprava 4-((2-(benzilkarbamotioil)hidrazono)metil)benzojeve kiseline, (P6) .....	17
3.2.3. Priprava kompleksa tiosemikarbazona s Niklom(II), (Ni(II)-PX).....	17
<b>3.3. Priprava 4''-aminopropil derivata azitromicina (M4'') .....</b>	<b>20</b>
<b>3.4. Priprava trietilamonijevog bis{N-benzil-N'-[(4- karboksilatofenil)metiliden]karbamohidrazonotioato}nikal(II) acetonitril solvata, [Et<sub>3</sub>NH]<sub>2</sub>(NiP<sub>6_2</sub>) x CH<sub>3</sub>CN), M4''-Ni(II)-P6.....</b>	<b>22</b>
<b>3.5. Određivanje biološke aktivnosti .....</b>	<b>22</b>
<b>3.6. Karakterizacija pripremljenih spojeva .....</b>	<b>23</b>
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1. Priprava i karakterizacija kompleksa tiosemikarbazona s niklom(II) .....</b>	<b>24</b>
4.1.1. Priprava tiosemikarbazona.....	24
<b>4.2. Priprava i karakterizacija 4''-aminopropil derivata azitromicina (M4'') .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3. Priprava i karakterizacija kompleksa makrozona M4''-Ni(II)-P6.....</b>	<b>47</b>
<b>4.4. Biološka aktivnost .....</b>	<b>53</b>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>55</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI) .....</b>	<b>56</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>57</b>
<b>§ 8. DODATAK.....</b>	<b>XV</b>
<b>§ 9. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>XXII</b>







Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA KOMPLEKSA NIKLA(II) S MAKROZONSKIM 4" DERIVATOM AZITROMICINA IZVEDENIM IZ 4-FORMILBENZOJEVE KISELINE

Ema Hošnjak

Makrozoni su novi konjugati azitromicina i derivata tiosemikarbazona koji pokazuju izvrsno antibakterijsko djelovanje *in vitro* na odabrane Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. Zbog sve većeg razvoja bakterijske rezistencije na dosadašnje antibiotike cilj mnogih istraživanja u medicinskoj i farmaceutskoj kemiji je razvoj novih spojeva s poboljšanom biološkom aktivnošću. Nikal je element u tragovima bitan za bakterije, biljke životinje i ljude i kao kofaktor ima važnu ulogu u mnogim enzimima. U nizu slučajeva su kompleksi nikla s tiosemikarbazonom pokazali veću biološku aktivnost od nekompleksiranih liganada. U ovom je radu uspješno pripremljen kompleks nikla(II) s makrozonskim 4" derivatom azitromicina, koji je dobiven konjugacijom 4"-aminopropilnog derivata azitromicina i kompleksa nikla(II) s tiosemikarbazonom. Pripremljeni spoj okarakteriziran je spektroskopijom NMR. Također je određena biološka aktivnost spoja *in vitro* na susceptibilne i rezistentne sojeve bakterija.

(60 stranica, 39 slika, 9 tablica, 56 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, biološka aktivnost, kompleksi nikla(II), makrolidi, spektroskopija NMR

Mentor: prof. dr. sc. Predrag Novak

Komentor: dr. sc. Kristina Smokrović

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Predrag Novak
  2. doc. dr. sc. Đani Škalamera
  3. izv. prof. dr. sc. Ivica Đilović
- Zamjena: doc. dr. sc. Tomislav Jednačak

Datum diplomskog ispita: 9. rujan 2022.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NICKEL(II) COORDINATION COMPOUNDS WITH MACROZONE 4" AZYTHROMICIN DERIVATIVE DERIVED FROM 4-FORMYLBENZOIC ACID

Ema Hošnjak

Macrozones are new conjugates of azithromycin and thiosemicarbazones that possess excellent *in vitro* antibacterial activity against selected Gram-positive and Gram-negative bacteria. Due to the increasing number of macrolide-resistant bacteria, the aim of many studies in medicinal and pharmaceutical chemistry is development of new compounds with improved biological activity. Nickel is a trace element essential for bacteria, plants, animals and humans. In multiple cases, nickel complexes with thiosemicarbazones showed increased biological activity than uncomplexed ones. In this study successful synthesis and structural characterisation of nickel(II) coordination compounds with macrozone 4" derivative of azithromycin have been performed using NMR spectroscopy. *In vitro* biological activity of the compound against susceptible and resistant bacterial strains was also determined and discussed.

(60 pages, 39 figures, 9 tables, 56 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, biological activity, macrolides, nickel(II) complexes, spectroscopy NMR

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, Assistant Professor
3. Dr. Ivica Đilović, Associate Professor

Substitute: Dr. Tomislav Jednačak, Assistant Professor

Date of exam: September 9th 2022.



## § 1. UVOD

Desetljećima nakon što su se prvi pacijenti uspješno liječili antibioticima, bakterijske infekcije sve češće uzrokuju rast broja smrtnih slučajeva. Brza pojava rezistentnih bakterija predstavlja globalni problem koji se nastoji prevladati razvojem novih i poboljšanjem postojećih antibiotika.<sup>1</sup>

Najznačajniju biološku aktivnost pokazali su makrolidni spojevi čija se struktura sastoji od makrolaktonskog prstena (aglikona) na koji su vezane jedna ili više deoksišećernih skupina.<sup>2</sup> S obzirom na strukturne karakteristike, biološku aktivnost i veličinu aglikonskog prstena, makrolidne antibiotike dijelimo u četiri generacije. Kao najznačajniji makrolidi pokazali su se eritromicin A koji je predstavnik prve generacije te azitromicin kao predstavnik druge generacije. Makrolidni antibiotici koriste se za liječenje akutnih i kroničnih infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama.<sup>3,4</sup>

Tiosemikarbazoni su mali organski spojevi koji također pokazuju farmakološka svojstva, uključujući antibakterijsko, antivirusno, antimalarijsko i antitumorsko djelovanje.<sup>5-10</sup> Njihova se biološka aktivnost može povećati povezivanjem s metalnim ionima poput željeza, nikla, bakra i cinka.<sup>11,12</sup> Vežanje tiosemikarbazona ili kompleksa tiosemikarbazon-metalni ion s makrolidima mogu se pripremiti novi bioaktivni konjugati koje nazivamo makrozoni.

Posljednjih je godina cilj mnogih istraživanja priprava i karakterizacija novih biološki aktivnih spojeva, pri čemu je naglasak na razvoju antibiotika za sojeve bakterija koje su postale rezistentne na već postojeće antibiotike.

Cilj ovog diplomskog rada je pripremiti, strukturno okarakterizirati i istražiti biološku aktivnost kompleksa nikla(II) s makrozonskim 4"-derivatom azitromicina. U tu su svrhu korištene metode sintetske kemije, te metode karakterizacije i identifikacije spojeva: spektroskopija IR i NMR, difrakcija rentgenskog zračenja na jediničnom kristalu i mikrobiološki testovi.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Makrolidi

Makrolidi su vrsta antibiotika širokog spektra djelovanja<sup>13</sup> koji se upotrebljavaju u terapiji raznih bakterijskih infekcija već više od 70 godina. Termin *makrolid* izvorno je predložio R.B.Woodward 1957. godine, kao skraćenicu od makrolakton glikozid, a odnosilo se na strukturu koja se sastojala od 12-, 14-, 16-eročlanog makrolaktonskog prstena (aglikona) supstituiranog polarnim ili nepolarnim skupinama, na kojima su vezane dvije ili više saharidnih jedinica.<sup>2,14,15</sup>

Koriste se za liječenje infekcija uzrokovanih nekim Gram-negativnim bakterijama (*Moraxella catarrhalis*, *Legionella pneumophila*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bordetella pertusis* i *Haemophilus influenzae*), aerobnim Gram-pozitivnim bakterijama (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* i *Streptococcus pyogenes*) i unutarstaničnim organizmima (*Chlamydia pneumoniae* i *Coxiella burnetti*).<sup>16,17</sup>

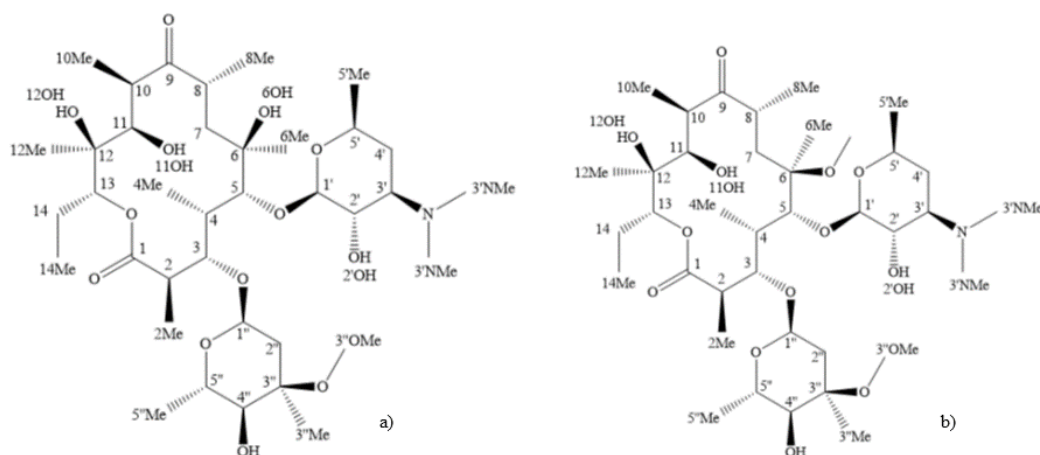
#### 2.1.1. Podjela i struktura makrolida

Makrolidi se dijele u kategorije na temelju kemijske strukture.<sup>18</sup> Postoje četiri generacije makrolidnih antibiotika, eritromicin A (Slika 1a.) predstavnik je prve generacije makrolida a prvi puta je izoliran 1952. godine iz mikroorganizma *Saccharopolysporam erythraea*.<sup>19</sup> Sastoji se od četrnaesteročlanog laktoskog prstena koji na položaju C3 ima vezanu kladinozu, a na položaju C5 desozamin.

Iako uspješan kod liječenja bakterijskih infekcija, eritromicin A zbog nedostatne kemijske stabilnosti u organizmu pri kiselim uvjetima pokazuje slabu bioraspoloživost.<sup>17,19</sup> Istraživanjem je dokazano kako u želučanim kiselim uvjetima reakcijom dviju hidroksilnih skupina (6-OH i 12-OH) i karbonilne skupine (C9) dolazi do intramolekulske ciklizacije. Ta promjena konformacije uzrokuje smanjenje afiniteta vezanja eritromicina na ribosom, što u konačnici dovodi do smanjenja ili izostanka biološke aktivnosti.<sup>20</sup>

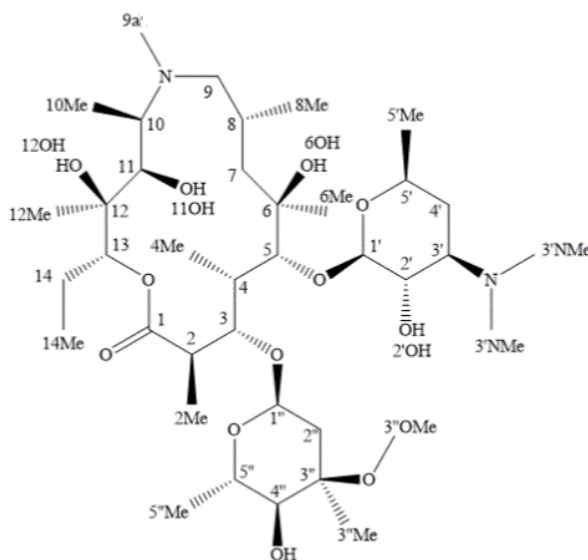
Iz navedenih se razloga pribjeglo pripravi novog spoja alkiliranjem hidroksilne skupine na položaju C6, pri čemu je onemogućena intramolekulska ciklizacija, a samim time je dobiven

kemijski stabilniji spoj, klaritromicin (Slika 1b.).<sup>20</sup> Navedeni spoj smatra se predstavnikom prve generacije polusintetskih antibiotika koji su pokazali bolju antibakterijsku aktivnost.



Slika 1. Struktura: **a)** eritromicina A i **b)** klaritromicina

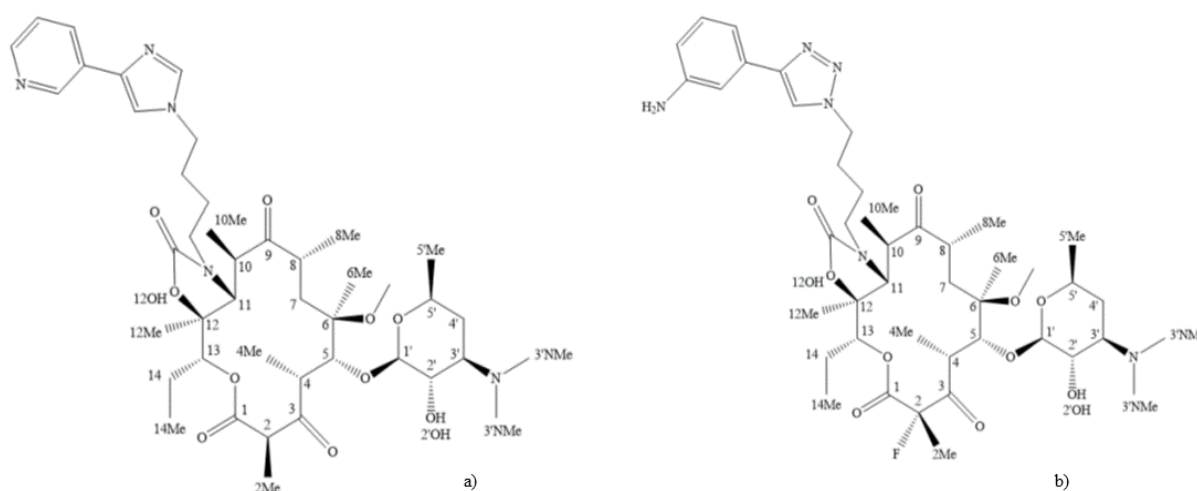
Daljnijm istraživanjem makrolidnih antibiotika razvijena je druga generacija makrolida, azalidi. Azalidi su polusintetski derivati eritromicina A s petnaesteročlanim prstenom dobivenim uvođenjem dušikova atoma u aglikonski prsten. Predstavnik druge generacije makrolidnih antibiotika je azitromicin<sup>21</sup> (Slika 2.) koji pokazuje poboljšana farmakokinetička svojstva te neznatne nuspojave u odnosu na svoje prethodnike.<sup>18</sup>



Slika 2. Struktura azitromicina.

Budući da razvoj bakterijske rezistencije zahtjeva kontinuirano istraživanje antibiotika s poboljšanom biološkom aktivnosti, tako je pripravljena treća generacija makrolida – ketolidi. Oni na položaju C3 umjesto kladinoze imaju keto skupinu, a na položaju C12 imaju vezan alkil-heteroaril. Predstavnik ketolida je telitromicin (Slika 3a.), koji je zbog izazivanja niza nuspojava (slabljenje vida, gastrointestinalnih smetnji, hepatoksičnosti, sinkopa itd.)<sup>22</sup> brzo nakon početka uporabe povučen s tržišta.<sup>4</sup>

U tijeku je i razvoj četvrte generacije makrolida – fluoroketolidi, čiji je predstavnik solitromicin. Solitromicin (Slika 3b.) na C2 položaju ima vezan atom fluora, a na položaju C12 ima vezan bočni lanac 1,2,3-tiazol-aminofenila. Zbog velike sličnosti u strukturi s telitromicinom te zbog opreza da bi mogao izazvati slične nuspojave, solitromicin i dalje nije odobren od strane FDA (engl. *Food and Drug Administration*).



Slika 3. Strukture ketolida: **a)** telitromicina, **b)** solitromicina.

### 2.1.2. Mehanizam djelovanja makrolida

Makrolidni antibiotici su makrociklički spojevi koji inhibicijom biosinteze proteina zaustavljaju rast i razvoj bakterijskih stanica.<sup>14,18,20</sup> Istraživanjem mehanizma kojim se makrolidi vežu na ribosom moguće je razviti nove lijekove s boljom biološkom aktivnošću.<sup>23</sup>

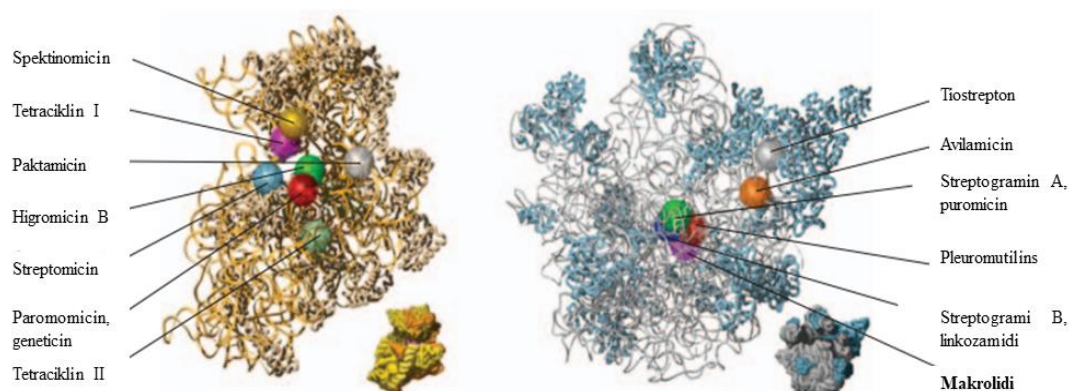
Ribosomi su stanične strukture građene od proteina i ribonukleinske kiseline u kojima se odvija sinteza proteina u stanici. Sastoje se od veće – 50S i manje – 30S podjedinice. Velika podjedinica sadrži dvije molekule rRNA (5S i 23S) i proteine zbog čega je ona zadužena za sintezu peptidne veze dok je uloga male podjedinice gensko dekodiranje. Sama sinteza proteina odvija se na dva vezna mjesta na ribosomu, prvo vezno mjesto za tRNA je



aminoacilno (A – mjesto), a drugo je peptidilno (P – mjesto) na kojem započinje i inicijacija sinteze peptida.

Antibiotici se mogu podijeliti u tri skupine ovisno o mjestu vezanja na ribosomu, stoga razlikujemo: antibiotike koji se vežu na veliku podjedinicu, antibiotike koji se vežu na malu podjedinicu te antibiotike koji se vežu na cijeli ribosom. Istraživanja su dokazala kako se makrolidni antibiotici vežu na 23S rRNA u domeni V ili u blizini centra peptidil transferaze u 50S podjedinici bakterijskog ribosoma i tako sterički blokiraju sintezu peptida u različitim fazama translacijskog procesa.<sup>4,24-25</sup> Makrolidi se na ribosom vežu u izlaznom tunelu za polipeptidni lanac. Izlazni tunel širine je između 10-20 Å a vezanjem makrolida, širina tunela se smanjuje na približno 10 Å, čime se blokira prolaz polipeptida većih od 10 aminokiselina.<sup>4,23</sup>

Na Sliku 4. prikazana su vezna mjesta različitih antibiotika na ribosomu.



Slika 4. Vezna mjesta različitih antibiotika na maloj podjedinici 30S (lijevo) i velikoj podjedinici 50S (desno) ribosoma.<sup>25</sup>

Makrolidi prilikom vezanja poprimaju konformaciju takvu da je jedna strana molekule hidrofobna, a druga strana hidrofilna.<sup>26</sup> Između makrolida i ribosoma uspostavljaju se hidrofobne interakcije te kovalentne i vodikove veze.

Način vezanja makrolida ovisi o funkcijskim skupinama makrolida, veličini saharida vezanih na položaje C3 i C5 te o proučavanoj bakteriji.<sup>22</sup> Bez obzira na različitost vezanja četrnaesteročlanih, petnaesteročlanih i šesnaesteročlanih makrolida, zajedničko im je stvaranje vodikove veze između 2'OH skupine aminosaharida i nukleobaze ribosoma.<sup>27</sup> Ukoliko dođe do metilacije dušikovih atoma nukleotidnih baza ribosoma neće moći doći do

formiranja vodikove veze te će se smanjiti afinitet vezanja makrolida za ribosom. Mehanizam rezistencije bakterija objašnjen je nemogućnošću stvaranja upravo te veze.

Četrnaesteročlani makrolidi, poput eritromicina A pozicioniraju aglikonski prsten okomito na os tunela pri čemu je takva konformacija stabilizirana intermolekulskim vodikovim vezama između hidroksilne skupine 6OH makrolida i amino skupine iz 23S rRNA.

Iako sadrže aldehidnu skupinu koja uzrokuje odbijanje amino skupine iz 23S rRNA i metilne skupine na položaju 6Me azitromicina, petnaesteročlanim makrolidima pogodnije vezanje omogućuju šećeri: kladinoza i dezozamin. Kladinoza se pozicionira u blizini nukleotida (G2540) smještenog blizu P – mjesta na ribosomu, dok se dezozamin orijentira duž osi tunela.

Za razliku od četrnaesteročlanih i petnaesteročlanih makrolida, šesnaesteročlani makrolidi poput spiramicina se za bakterijski ribosom vežu kovalentno tvoreći pritom reverzibilnu vezu između aldehidne skupine makrolida i amino skupine iz 23S rRNA. Takav način vezanja omogućuje im vezanje u blizini proteinskih jedinica L4 i L37E. Disaharidni ogranak spiramicina orijentiran je duž osi tunela što omogućuje zaustavljanje translacije već nakon stvaranja druge ili treće peptidne veze.<sup>14,22,27-33</sup>

Izuzev interakcija s ribosomskim podjedinicama, makrolidi interagiraju i s ligandima koji sudjeluju u sintezi proteina te s citokromom P450. Iz tog razloga, zaustavljanje bakterijske sinteze ovisi o peptidnom slijedu.<sup>22</sup>

### 2.1.3. Mehanizmi rezistencije bakterija na makrolide

Budući da su se antibiotici godinama pripisivali u nepravilnim količinama i u krive svrhe, istraživanja su pokazala da se u SAD-u na više od 70% bakterijskih infekcija javlja rezistencija na barem jedan antibiotik. Iz navedenih je razloga 2017. godine svjetska zdravstvena organizacija objavila listu "prioritetnih patogena" otpornih na antibiotike kako bi usmjerila i potaknula razvoj novih antibiotika s poboljšanom biološkom aktivnošću. U popisu je posebno naglašena opasnost od Gram-negativnih bakterija koje su otporne na više antibiotika.

Na temelju potrebe za novim antibioticima svjetska zdravstvena organizacija je listu podijelila na tri skupine: kritičnog, visokog i srednjeg prioriteta. U skupinu kritičnog prioriteta svrstane su bakterije (*Acinetobacter*, *Pseudomonas* i razne *Enterobacteriaceae* uključujući *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia* i *Proteus*) koje predstavljaju posebnu prijetnju u bolnicama te

prema pacijentima čija skrb zahtjeva upotrebu uređaja kao što su respiratori. U drugu i treću skupinu uključene su bakterije (visoki prioritet: *E. faecium*, *S. aureus*, *H. pylori*, *Campylobacter spp*, *Salmonellae*, *N. gonorrhoeae*; srednji prioritet: *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *Shigella spp*) koje izazivaju učestale bolesti poput gonoreje i trovanja hranom.<sup>34</sup>

Postoji nekoliko mehanizama rezistencije:<sup>22</sup>

- Modifikacija mete djelovanja antibiotika
- Kemijska modifikacija nukleobaza ribosoma
- Izbacivanje antibiotika iz stanice (efluks)
- Inaktivacija antibiotika
- Stvaranje "lažnih" meta za antibiotike i vezanje antibiotika na substancične strukture

Jedan od najčešćih mehanizama rezistencije patogenih bakterija jest rezistencija *erm*. Temelji se na modifikaciji aktivnog mjesta u ribosomu metilacijom ili dimetilacijom dušika na nukleotidu A2058 23S rRNA koji je ključan za vezanje makrolida na ribosom. Gen *erm* sadrži kodirajuću sekvencu za enzim *N*-metil-transferazu koji uzrokuje metiliranje na 50S ribosomskoj podjedinici te na taj način dolazi do steričkog blokiranja vezanja makrolida na ribosom. *N*-Metiltransferaza odgovorna je za nastanak rezistencije bakterija na makrolide, linkozamide i streptogramine (MLS rezistencija). Takva rezistencija može biti inducibilna (iMLS) i konstitutivna (cMLS). Kod konstitutivne rezistencije je metilazna aktivnost neovisna o prisutnosti makrolida u domaćinu dok je kod inducibilne rezistencije metilazna aktivnost inducirana prisutnošću antibiotika. Bakterije koje sadrže konstitutivne gene *erm* su rezistentne na sve četrnaesteročlane i šesnaesteročlane makrolidne antibiotike. S druge strane, domaćini s inducibilnom rezistencijom, ne pokazuju rezistenciju na šesnaesteročlane makrolide i ketolide ali su rezistentni na eritromicin i njegove derivate druge generacije, azitromicin i telitromicin.<sup>35-</sup>

37

Drugi važan mehanizam rezistencije je učestaliji kod Gram-negativnih bakterija, a karakteriziraju ga energijski ovisne pumpe, takozvane efluks pumpe. MefA su skupine transportnih proteina (pumpi) kodiranih genom *mefA* zbog kojih dolazi do smanjenja nakupljanja antibiotika u stanici. Ta pumpa izbacuje makrolide iz bakterijske stanice prije no što oni dospiju do ribosoma. Energija za efluks dobiva se iz energije pohranjene unošenjem protona u stanicu.<sup>35,36</sup>

Mogućnost strukturnih promjena kod proteina jedan je od načina razvoja bakterijske rezistencije na makrolide. Poznato je da delecija tripleta Met82-Lys83-Arg84 u proteinu L22 (važan protein 50S podjedinice ribosoma koji intreragira sa svim domenama 23S rRNA) u *E. coli* dovodi do rezistencije bakterije na eritromicin.<sup>38</sup>

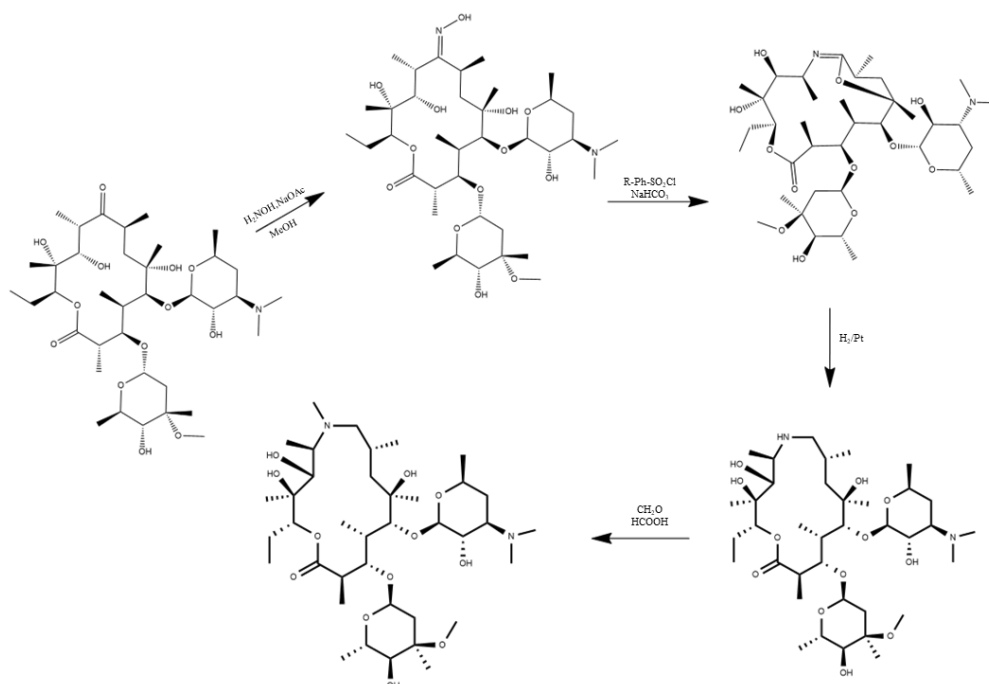
Najrjeđi mehanizam rezistencije jest inaktivacija makrolidnog antibiotika. Postoje dva enzima koji vode inaktivaciji: esteraze i fosfotransferaze. Geni koji kodiraju esteraze nazivaju se *ere*, a mehanizam se temelji na hidrolitičkoj inaktivaciji četrnaesteročlanih i petnaesteročlanih makrolida. S druge strane, fosfotransferaza je kodirana genom *mph* čija ekspresija može biti konstitutivna ili inducirana. Fosfotransferaza inaktivira 14-, 15- i 16-člane makrolide tako da prenosi fosfatnu skupinu nukleozid-trifosfata na 2'OH skupinu, budući da 2'OH skupina tvori interakciju s A2058 nukleotidom 23S rRNA.<sup>39</sup>

Do rezistencije također dolazi mutacijama uslijed promjene konformacije ribosoma.<sup>39</sup>

#### 2.1.4. Azitromicin

Azitromicin je polusintetski derivat eritromicina A i predstavnik je druge generacije petnaesteročlanih makrolida, azalida.<sup>40</sup> Prvi put sintetiziran je u Plivi 1980. godine te se kao aktivna tvar u lijeku *Sumamed*<sup>®</sup> koristio za liječenje infekcija respiratornog trakta uzrokovanih Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama. Iako pokazuje iznimnu farmakokinetičku i metaboličku stabilnost, zbog porasta broja rezistentnih sojeva smanjen mu je spektar antibakterijskog djelovanja.

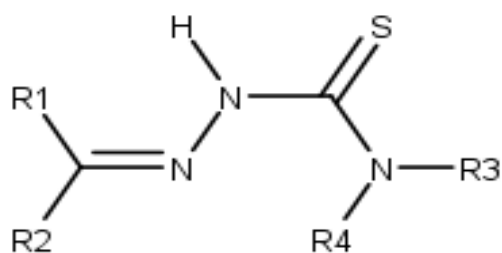
Priprava azitromicina uključuje četiri sintetska koraka.<sup>41</sup> Prvi korak obuhvaća reakciju eritromicina i hidroksilamina pri čemu nastaje oksim. U drugom koraku oksim eritromicina A se acilira uz benzensulfonil-klorid u smjesi acetona i vode uz natrijev hidrogenkarbonat. Navedenom reakcijom dolazi do Beckmannove pregradnje oksima u iminoeter.<sup>42</sup> Treći korak obuhvaća hidrogeniranje iminoetera pri čemu nastaje 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin a metiliranje dušika dovodi do formiranja konačnog produkta, azitromicina (Shema 1.).<sup>43</sup>



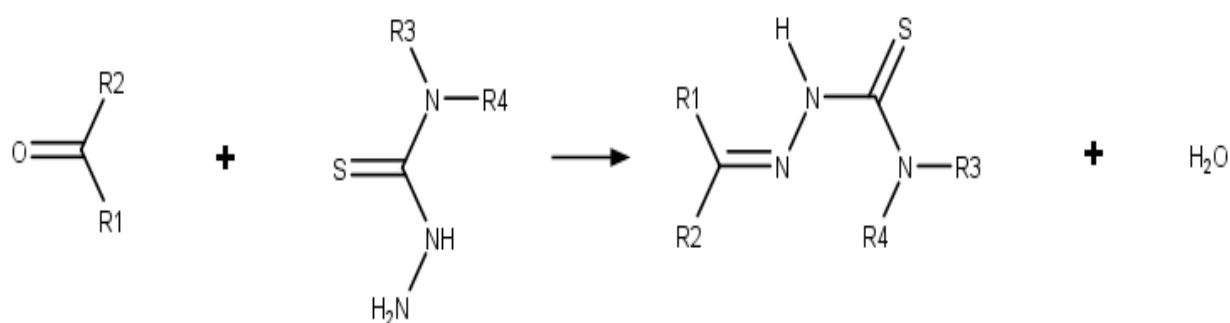
Shema 1. Prikaz sinteze azitromicina.

## 2.2. Tiosemikarbazoni

Tiosemikarbazoni (Slika 5.) su Schiffove baze koje pripadaju skupini derivata tiouree, opće formule  $R_1R_2C=N-NH-(C=S)-NR_3R_4$ . Dobivaju se kondenzacijom tiosemikarbazida (hidrazinkarbotioamida) uz odgovarajuće aldehide i ketone (Shema 2.).<sup>44</sup>

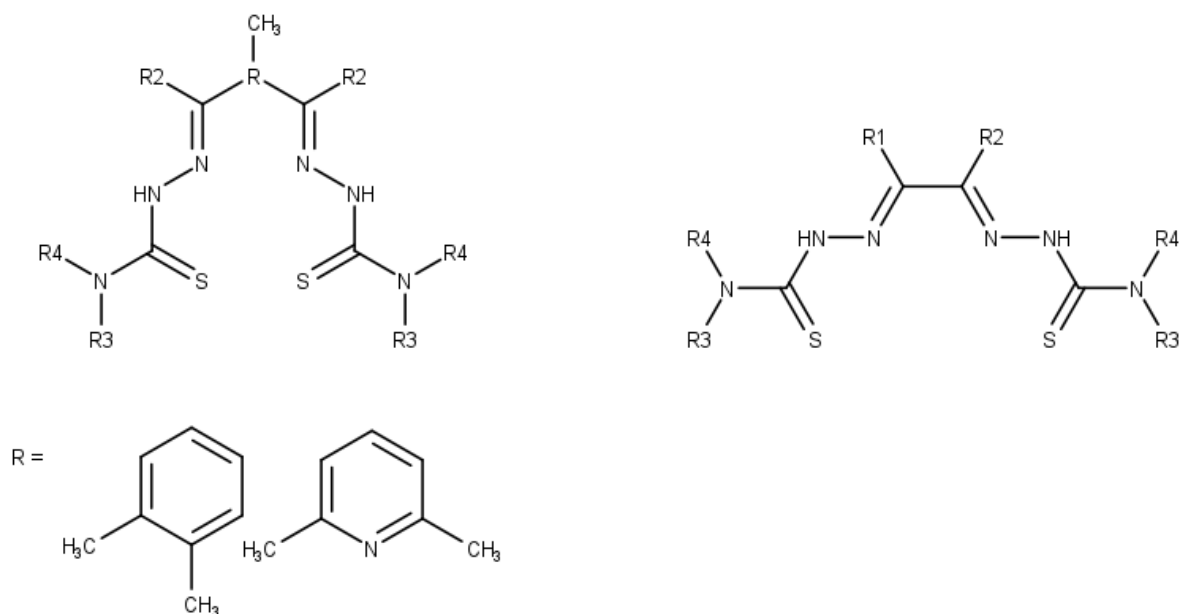


Slika 5. Molekulska strukturalna formula tiosemikarbazona.  $R_1, R_2, R_3, R_4$  = vodik, alkilna, arilna ili heterociklička skupina.



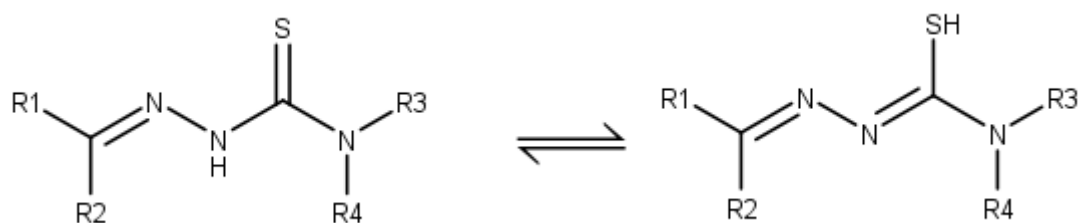
Shema 2. Prikaz reakcije dobivanja tiosemikarbazona.  $R_1, R_2, R_3, R_4$  = vodik, alkilna, arilna ili heterociklička skupina.

Općenito se tiosemikarbazoni dijele na monotiosemikarbazone i bistiosemikarbazone. Bistiosemikarbazoni sadrže dva tiosemikarbazona lanca koja su međusobno povezana prstenom ili jednostrukom C–C vezom (Shema 3.).<sup>44</sup>



Shema 3. Prikaz strukture bistiosemikarbazona.

Zbog intramolekulskog prijenosa protona tiosemikarbazoni mogu postojati u dva tautomerna oblika, tionskom i tiolnom (Shema 4.).<sup>45</sup>



Shema 4. Tautomerni oblici tiosemikarbazona, tionski (lijevo) i tiolni (desno).

Iako tiosemikarbazoni pokazuju dobru biološku aktivnost u borbi protiv bakterijskih i virusnih infekcija, istraživanja su pokazala da kompleksi tiosemikarbazona s kationima prijelaznih metala pokazuju širi spektar biološke aktivnosti<sup>46</sup>; antitumorsko, antibakterijsko, antivirusno te djelovanje na središnji živčani sustav.<sup>47</sup>

### 2.2.1. Metalni kompleksi tiosemikarbazona

Tiosemikarbazone u njihovoj strukturi karakterizira prisutnost dušika i sumpora kao dobrih donorskih atoma za formiranje koordinacijske veze s metalnim kationima. Svojstvo koordinacije na metalni centar *in vitro* uzrok je dobre biološke aktivnosti tiosemikarbazona.

U mnogim je slučajevima pokazano kako kompleksi prijelaznih metala poput bakra(II) i nikla(II) s tiosemikarbazonom pokazuju bolja farmakološka svojstva od nekompleksiranih liganada.<sup>48</sup> Također, formiranjem kompleksnog spoja dolazi do promjene lipofilnosti koja kontrolira brzinu ulaska agensa u stanicu i djeluje na način koji nije karakterističan za slobodni ligand.

Nikal je prijelazni metal sa značajnim afinitetom prema kisikovim, dušikovim i sumporovim atomima. Poznato je da nikal kao kofaktor ima značajnu ulogu u velikom broju enzima<sup>49</sup>, poput ureaze, [NiFe] hidrogenaze, acetil-CoA sintaze, superoksid dismutaze koje sadrže nikal.<sup>50</sup> Istraživanja su pokazala kako je okosnica nekompleksiranih tiosemikarbazona i semikarbazona gotovo uvijek planarna s kisikovim i sumporovim atomima u trans položaju u odnosu na azometinski dušik.<sup>51</sup> S druge strane, kompleksiranjem nikla s tiosemikarbazonom nastaju brojni spojevi koji mogu biti monomerni, dimerni i trimerni. Ligandi mogu biti neutralni, jednostruko ili dvostruko negativno nabijeni bidentatni ili tridentatni, a premošćuju se preko kisikovih i sumporovih atoma. Ovisno o vrsti liganda nastaju kompleksi s kvadratno-planarnom, oktaedarskom, distorziranom kvadratno planarnom geometrijom i trigonsko bipiramidalnom geometrijom.<sup>44</sup>

Postoji nekoliko mogućih mehanizama djelovanja kompleksa tiosemikarbazona:

- Inhibicija ribonukleotid reduktaze
- Generiranje reaktivnih kisikovih radikala
- Inhibicija topoizomeraze II
- Inhibicija MDR1 proteina

Prvi izvještaj o antileukemijskom učinku 2-formilpiridin tiosemikarbazona obavljen je 1956., a deset godina kasnije formulirana je prva hipoteza o načinu djelovanja tiosemikarbazona na ribonukleotid reduktazu. Ta se hipoteza temeljila na visokoj konstanti formiranja kompleksa koja im omogućuje izdvajanje željeza iz stanične okoline. Nešto razumniji mehanizam dokazao je Thelader sa suradnicima, tako što su ribonukleotid reduktazu izložili kompleksima tiosemikarbazona.<sup>53</sup> Meta kompleksa je tirozilni slobodni radikal, te se njegovim uništenjem inhibira aktivnost enzima. Taj mehanizam zahtjeva kisik i isključuje ulogu tiosemikarbazona kao kelatora željeza. Ostala su istraživanja uključivala promjenu liganada, metala i naboja metala međutim vrijedno je napomenuti kako u svim spojevima nakon koordinacije metalni ion orijentira ligande s lipofilnim i aromatskim dijelovima van prema otapalu što objašnjava oskudnu topljivost kompleksa u vodi. Također, kompleksi liganada s prijelaznim metalima djeluju kao lipofilni nosači koji olakšavaju unutarstaničnu dostavu liganda i metalnog iona nakon disocijacije.<sup>52</sup>

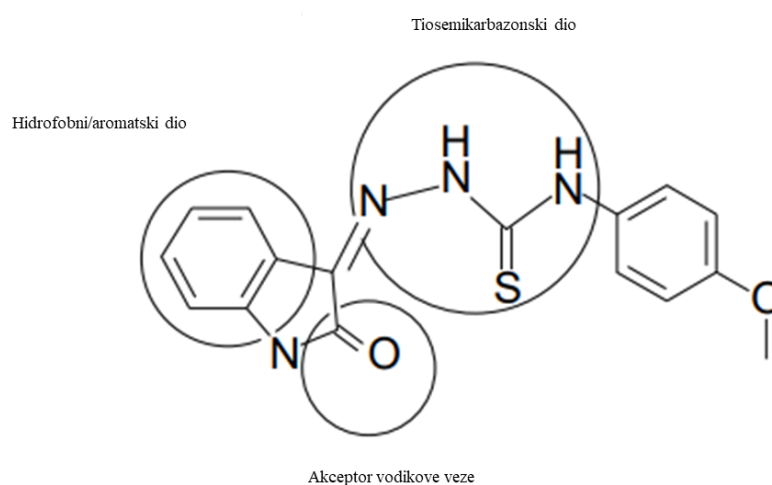
Utjecaj kisikovih radikala istražen je pomoću moćnog inhibitora ribonukleotid reduktaze, triapin (3-aminopiridin-2-karboksialdehid tiosemikarbazona), 3-AP i njegovog kompleksa s željezom(II). Korištenjem *spin-trapping* tehnike i EPR spektroskopije ustanovljeno je da Fe(II)-(3-AP) ali ne i triapin aktivira kisik, dajući reaktivne vrste kisika. Testovima na aktivnost *in vitro* ribonukleotid reduktaze dokazano je kako je upravo Fe(II)-(3-AP) značajno aktivniji inhibitor od slobodnog triapina. Pretpostavlja se da nastali radikali koji uzrokuju oksidativno oštećenje DNA, proteina i lipida potpomažu inhibiciji enzima.<sup>53</sup>

Metalni kompleksi tiosemikarbazona imaju destabilizirajući efekt na aktivnost topoizomeraze II. Metalni kompleksi mogu koordinirati topoizomerazu II i stabilizirati kompleks topoizomeraza II-DNA i pritom intereagirati s DNA formirajući poprečne veze u uzvojnici.<sup>54</sup>

MDR1 proteini (engl. *multidrug resistance protein*) spadaju u skupinu adenozin trifosfat vezujućih proteina od kojih su neki uključeni u fenotip rezistencije na antibiotike u



tumorima. Protein ABCB1[MDR1/P-glikoprotein (P-gp)] potiskuje djelovanje mnogih vrsta lijekove iz stanica raka. Pokušaji prevladavanja otpornosti na lijekove posredovane P-gp korištenjem specifičnih inhibitora P-gp ima ograničen uspjeh. Kao alternativa u pristupu korištenju inhibitora P-gp, karakterizirani su derivat tiosemikarbazona. Tiosemikarbazoni pokazuju selektivnu toksičnost u stanicama raka koje eksprimiraju P-gp. To se događa dvama usko povezanim mehanizmima. Prvo, toksičnost tiosemikarbazona izravno je proporcionalan razinama funkcijskog P-gp. U drugom se mehanizmu smanjuje ekspresija P-gp u stanicama tretiranim s tiosemikarbazonima, što stanice čini osjetljivima na same supstrate P-gp kojima su prethodno pokazivali otpor.<sup>55</sup> Također je dokazano kako su za aktivnost tiosemikarbazona zaslužni određeni dijelovi molekule, atom koji je akceptor vodikove veze, hidrofobni/aromatski dio na hidrazinskom dijelu tiosemikarbazona (Slika 6.). Molekule kojima nedostaje bilo koja od navedenih značajki, akceptorsko mjesto, hidrofobno mjesto, aromatični prsten ili tiosemikarbazoni fragment su inaktivne.<sup>53</sup>



Slika 6. Strukturna formula isatin-β-tiosemikarbazona s označenim ključnim dijelovima molekule zaslužnim za njegovu biološku aktivnost.<sup>54</sup>

U istraživanjima tiosemikarbazona koji pokazuju antitumorsko djelovanje posebno se ističu derivati α-N-heterocikličkih tiosemikarbazona gdje je tiosemikarbazoni lanac u α-položaju u odnosu na heterociklički dušik. Ti derivati pokazali su se kao djelotvorni

inhibitori ribonukleotid reduktaze (RR) kod širokog spektra tumorskih stanica *in vitro* i *in vivo*.<sup>56</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Kemikalije i instrumenti

U Tablici 1. navedene su kemikalije korištene za izradu ovog rada te njihova čistoća, molarna masa i proizvođač.

Tablica 1. Popis kemikalija korištenih prilikom izrade rada.

Kemikalija	Čistoća	$M / g \text{ mol}^{-1}$	Proizvođač
Acetonitril (ACN)	99,9%	41,05	Fisher Chemical
Akronitril	99%	53,06	TCI America
Amonijak, 25%		17,031	Alkaloid Skopje
Anhidrid octene kiseline	97%	102,09	Carlo Erba Reagents
Benzil izotiocijanat	98%	149,21	Acros Organic
Cezijev karbonat	99,5%	325,82	Acros Organic
Dietil-eter		74,12	Lach-Ner, s. r. o.
Diklormetan	99,9%	84,93	Carlo Erba Reagents
DMSO-d <sub>6</sub>	99,9%	84,17	Eurisotop
Etanol (EtOH)	p.a.	46,07	Gram Mol
Etil acetat	p.a.	88,11	Gram Mol
Hidrazin monohidrat	98%	50,06	Sigma-Aldrich
Kalijev karbonat	99,5%	138,21	Fisher Chemical
Kloroform (CHCl <sub>3</sub> )	99,2%		VWR Chemicals
Klorovodična kiselina	p.a.	36,46	Kemika
Ledena octena kiselina	p.a.	60,05	Gram Mol
Metanol (MeOH)		32,04	Merck Chemical
<i>N,N</i> -dimetilformamid-dimetilacetal	97%	129,24	Acros Organic
Natrijev hidrogenkarbonat	p.a.	84,01	Gram Mol
Natrijev hidroksid	p.a.	39,997	Kemika
Niklov(II) acetat tetrahidrat		248,86	

Niklov(II) klorid heksahidrat		237,70	
Platina(IV) oksid		227,08	Sigma-Aldrich
Sumporna kiselina, 96%	p.a.	98,08	Carlo Erba Reagents
<i>t</i> -Butanol	99,5%	74,12	Carlo Erba Reagents
Trietilamin		101,19	
Toluen	p.a.	92,14	Gram Mol
4-formilbenzojeva kiselina	97%	150,13	Sigma-Aldrich
1-[bis(dimetilamino)metilen]-1 <i>H</i> - 1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i> ]piridinijev-3- oksid heksafluorofosfat (HATU)	97%	380,23	Acros Organic

Instrumenti korišteni za strukturnu karakterizaciju i analizu pripremljenih spojeva navedeni su u Tablici 2.

Tablica 2. Popis instrumenata korištenih prilikom izrade rada.

<b>Instrument</b>	<b>Metoda</b>
Rotavapor Buchi R-100	Uparavanje
Mettler AT261 DeltaRange	Vaganje
Bruker Avance III HD 400 MHz/54mm Ascend	Spektroskopija NMR
Perkin-Elmer Spectrum Two	Spektroskopija ATR
Oxford XtaLAB Synergy Dualtex s HyPiy detektorom, CuK <sub>α</sub> zračenje	Difrakcija rentgenskog zračenja na jediničnom kristalu

### 3.2. Priprava kompleksa tiosemikarbazona s niklom(II)

#### 3.2.1. Priprava *N*-benzilhidrazin-karbotioamida (**T6**)

U 40 mL metanola otopljen je benzil izotiocijanat (2 mmol; 273  $\mu$ L) i hidrazin monohidrat (2,06 mmol; 100  $\mu$ L). Reakcijska smjesa miješana je na magnetskoj miješalici jedan sat na sobnoj temperaturi. Nastali talog profiltriran je preko Büchnerovog lijevka sa sinteriranom pločicom. Produkt je karakteriziran spektroskopijom NMR. Osnovni kristalografski podaci za **T6** navedeni su u Tablici 4.

#### 3.2.2. Priprava 4-((2-(benzilkarbamotioil)hidrazono)metil)benzojeve kiseline, (**P6**)

Tiosemikarbazon **P6** nastaje reakcijom **T6** (353,50 mg) i 4-formilbenzojeve kiseline (292,76 mg) uz ledenu octenu kiselinu (11,15  $\mu$ L) u metanolu (20 mL) miješanjem 24h na sobnoj temperaturi. Nastali talog profiltriran je preko Büchnerovog lijevka.

#### 3.2.3. Priprava kompleksa tiosemikarbazona s niklom(II), (**Ni(II)-PX**).

Kompleksi tiosemikarbazona(**PX**) s niklom(II) pripremljeni su miješanjem niklova(II) acetata tetrahidrata (12,443 mg) odnosno niklova(II) klorida heksahidrata (11,885 mg) s tiosemikarbazonima i (1-benzil-3-[(*E*)-(fenilmetiliden)amino]tiourea (**B6**) uz trietilamin (100/200  $\mu$ L) u acetonitrilu. Reakcijska je smjesa miješana 24h na sobnoj temperaturi. Mase i volumeni polaznih reaktanata navedeni su u Tablici 3.

Tablica 3. Mase i volumeni polaznih reaktanata u sintezi kompleksa s niklom(II).

Ime tiosemikarbazona	<i>m</i> (tiosemikarbazon) / mg	<i>m</i> ( <b>B6</b> )/ mg	<i>V</i> (acetonitril) / mL
4-[( <i>E</i> )-{(2-feniletil)karbamotioil}hidrazono}metil]benzojeva kiseline ( <b>P1</b> )	32,7402	/	15
4-[( <i>E</i> )-{(piridin-2-il)karbamotioil}amino}imino}metil]benzojeva kiseline ( <b>P2</b> )	15,017	13,42	15
4-[( <i>E</i> )-{(3,5-dimetil-1,2-oksazol-4-			

il)karbamotioil]amino }imino)metil]benzojeva kiselina (P3)	15,918	13,42	10
4-[(E)- ([(fenilformamido)metanetioil]amino }imino)metil]benzojeva kiselina (P4)	16,37	13,42	10
4-[(E)-({[(naftalen-1-il)karbamotioil]amino }imino)metil]benzojeva kiselina (P5)	17,47	13,42	10
4-((2-(benzilkarbamotioil)hidrazono)metil)benzojeva kiselina (P6)	15,669	13,42	10
4-[(E)-({[2-(metoksikarbonil)tiofen-3-il]karbamotioil }amino)imino]metil]benzojeva kiselina (P7)	18,17	13,42	10
4-[(E)-({[4-(trifluorometoksi)fenil]karbamotioil }amino)imino]metil]benzojeva kiselina (P8)	19,17	13,42	10
4-[(E)-({[3-fenilpropil]karbamotioil]amino }imino)metil]benzojeva kiselina (P9)	17,07	13,42	5
4-[(E)-({[4-(piperidin-1-sulfonil)fenil]karbamotioil }amino)imino]metil]benzojeva kiselina (P10)	22,327	13,42	10
4-[(E)-({[3-(trifluorometil)fenil]karbamotioil }amino)imino]metil]benzojeva kiselina (P11)	18,367	13,42	10
4-[(E)-({[(2H-1,3-benzodioxol-5-yl)carbamothioyl]amino }imino)methyl]benzoic acid (P12)	17,17	13,42	10
4-[(E)- ([(etoksikarboyl]amino]metanetioil }amino)imino]metil]benzojeva kiselina (P13)	14,77	13,42	10

4-[( <i>E</i> )-[({[(furan-3-il)metil]karbamotioil}amino)imino]metil]benzojeva kiselina ( <b>P14</b> )	15,17	13,42	10
4-[( <i>E</i> )-({[(ciklopentilmetil)karbamotioil]amino}imino)metil]benzojeva kiselina ( <b>P16</b> )	15,27	13,42	10

Tablica 4. Osnovni kristalografski podaci za **T6** i **Ni(II)-P6**.

Spoj	<b>T6</b>	<b>Ni(P6)<sub>2</sub>·MeOH</b>
Empirijska formula	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> S	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> N <sub>6</sub> NiO <sub>5</sub> S <sub>2</sub>
Relativna molekulska masa / <i>M<sub>r</sub></i>	181,26	701,45
<i>T</i> /K	169,99(10)	169,98(10)
Kristalni sustav	monoklinski	triklinski
Prostorna grupa	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> / <i>c</i>	<i>P</i> $\bar{1}$
<i>a</i> /Å	18,4398(4)	9,8638(4)
<i>b</i> /Å	5,59390(10)	13,3486(4)
<i>c</i> /Å	9,0490(2)	14,8115(3)
$\alpha$ /°	90	112,451(3)
$\beta$ /°	102,166(2)	105,564(3)
$\gamma$ /°	90	94,120(3)
<i>V</i> /Å <sup>3</sup>	912,44(3)	1702,69(10)
<i>Z</i>	4	2
$\rho_{\text{calc}} / \text{g cm}^{-3}$	1,319	1,368
$\mu / \text{mm}^{-1}$	2,725	2,367
<i>F</i> (000)	384,0	728,0
Valna duljina	Cu K $\alpha$ ( $\lambda = 1,54184$ )	Cu K $\alpha$ ( $\lambda = 1,54184$ )
2 $\Theta$ raspon/°	9,814 do 156,112	6,818 to 153,964
Raspon	$-23 \leq h \leq 23, -7 \leq k \leq 6, -11 \leq l \leq 11$	$-12 \leq h \leq 12, -16 \leq k \leq 16, -18 \leq l \leq 18$
Broj prikupljenih refleksa	23370	24259
Broj neovisnih refleksa	1923 [ <i>R</i> <sub>int</sub> = 0,0839, <i>R</i> <sub>sigma</sub> = 0,0319]	7085 [ <i>R</i> <sub>int</sub> = 0,0503, <i>R</i> <sub>sigma</sub> = 0,0472]
Br. podataka/ograničenja/parametara	1923/0/126	7085/218/489
GooF	1,069	1,060
<i>R</i> [ <i>I</i> ≥ 2 $\sigma$ ( <i>I</i> )]	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0,0341, <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0,0918	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0,0725, <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0,2331
<i>R</i> [svi podatci]	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0,0351, <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0,0928	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0,0814, <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0,2487
Min/maks. u diferentnoj mapi elektronske gustoće / e Å <sup>-3</sup>	0,35/-0,20	2,06/-0,62

### 3.3. Priprava 4''-aminopropil derivata azitromicina (M4'')

3.3.1. Priprava (3aR,4R,7R,8S,9S,10R,11R,13R,16R,16aR)-2-(dimetilamino)-10-  
{[(2S,3R,4S,6R)-4-(dimetilamino)-3-hidroksi-6-metiloksan-2-il]oksi}-4-etil-11-  
hidroksi-8-{[(2R,4R,5S,6S)-5-hidroksi-metoksi-4,6-dimetiloksan-2-il]oksi}-  
3a,7,9,11,13,15,16-heptametil-tetradekahidro-2H-[1,3]dioksolo[4,5-c]1-oksa-6-  
azaciklopentadekan-6-on, (S1)

U okrugloj tikvici od 10 mL otopljen je azitromicin (1,00 g, 1,335 mmol) u toluenu (10 mL), te je dodan *N,N*-dimetilformamid-dimetilacetala (5 ekvivalenta, 886  $\mu$ L). Reakcijska smjesa miješana je 24 sata na magnetnoj mješalici pri temperaturi od 60 °C. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC). Za razvijanje TLC pločice upotrebljena je mobilna faza sastava: diklormetan, metanol i amonijak (25 %) u omjeru 90:15:1,5. Vizualizacija reaktanata i produkata provodila se prskanjem pločice s 10 %-tnom otopinom sumporne kiseline u etalolu. Uparavanjem otapala na rotacijskom uparivaču dobiven je produkt **S1** (1,257 g).

3.3.2. Priprava (2S,3R,4S,6R)-2-{[(3aR,4R,7R,8S,9S,10R,11R,13R,16R,16aR)-2-  
(dimetilamino)-4-etil-11-hidroksi-8-{[(2R,4R,5S,6S)-5-hidroksi-4-metoksi-4,6-  
dimetiloksan-2-il]oksi}-3a,7,9,11,13,15,16-heptametil-6-okso-tetradekahidro-2H-  
[1,3]dioksolo[4,5-c]1-oksa-6-azaciklopentadekan-10-il]oksi}-4-(dimetilamino)-6-  
metiloksan-3-il acetat, (S2)

Produkt **S1** (1,257 g, 1,563 mmol) otopljen je u etil-acetatu (12,67 mL) te je reakcijska smjesa ohlađena na 0 °C. U tikvicu je zatim postepeno dodavan acetanhidrid (1 ekvivalent, 147  $\mu$ L, 1,563 mmol). Reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 5 sati i potom isprana sa zasićenom otopinom natrijeva hidrogen karbonata (2 x 12 mL) i posušena na bezvodnom kalijevom karbonatu. Dobiveni produkt **S2** (0,76551 g) suspendiran je pri 0 °C u dietil-eteru, profiltriran preko Büchnerovog lijevka i osušen 15 minuta pri 45 °C. Prije trećeg koraka sinteze produkt **S2** je ponovno suspendiran u smjesi otapala kloroform, metanol u omjeru 1:1. Smjesa otapala je uparena i produkt je osušen 15 minuta na 45 °C.



3.3.3. *Priprava* (2S,3R,4S,6R)-2- $\{[(3aR,4R,7R,8S,9S,10R,11R,13R,16R,16aR)$ -8- $\{[(2R,4R,5S,6S)$ -5-(2-cianoetoksi)-4-metoksi-4,6-dimetiloksan-2-il]oksi}-2-(dimetilamino)-4-etil-11-hidroksi-3a,7,9,11,13,15,16-heptametil-6-okso-tetradekahidro-2H-[1,3]dioksolo[4,5-c]1-oksa-6-azaciklopentadekan-10-il]oksi}-4-(dimetilamino)-6-metiloksan-3-il acetat, (**S3**)

U tikvicu od 50 mL dodan je *t*-butanol (20 mL), produkt **S2** (0,76551 g, 0,905 mmol) i cezijev karbonat (300 mg, 0,921 mmol). Nakon nekoliko minuta u reakcijsku smjesu je dodan akrilonitril (40 ekvivalenata; 4,8 mL, 36,188 mmol). Smjesa je miješana 48 sati pri 27 °C. Dobivena je smjesa profiltrirana preko celita na sinter-lijevku. Filtrat je ispran pomoću zasićene otopine natrijeva hidrogen karbonata (2 x 12 mL) i posušen na bezvodnom kalijevom karbonatu. Produkt **S3** (0,7166 g) dobiven je uparavanjem filtrata.

3.3.4. *Priprava* (3aR,4R,7R,8S,9S,10R,11R,13R,16R,16aR)-8- $\{[(2R,4R,5S,6S)$ -5-(3-aminopropoksi)-4-metoksi-4,6-dimetiloksan-2-il]oksi}-10- $\{[(2S,3R,4S,6R)$ -4-(dimetilamino)-3-hidroksi-6-metiloksan-2-il]oksi}-4-etil-11-hidroksi-3a,7,9,11,13,15,16-heptametil-2-(propan-2-il)-tetradekahidro-2H-[1,3]dioksolo[4,5-c]1-oksa-6-azaciklopentadekan-6-on, (**S4**)

Produkt **S3** (0,7166 g, 0,797 mmol) otopljen je u ledenoj octenoj kiselini (6,5 mL) i dodan je katalizator platinin(IV) oksid, PtO<sub>2</sub> (45,51 mg, 0,200 mmol). Hidrogeniranje je provedeno pri tlaku od 3,5 bara kroz 24 sata. Kako bi se uklonio katalizator dobivena smjesa je profiltrirana preko Büchnerovog lijevka i filtrat je uparen na rotacijskom uparivaču. Osušenom uzorku dodan je diklormetan (7 mL) i voda (13 mL) te je provedena gradijentna ekstrakcija pri pH vrijednostima: 4,2, 6,5 i 8,15. Navedene pH vrijednosti otopine postizale su se dodavanjem HCl (0,5 M), odnosno dodavanjem NaOH (0,5 M). Produkt **S4** dobiven je uparavanjem organskih ekstrakata pri pH ~ 7 i pH ~ 8.

3.3.5. *Priprava* (2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-13- $\{[(2R,4R,5S,6S)$ -5-(3-aminopropoksi)-4-metoksi-4,6-dimetiloksan-2-il]oksi}-11- $\{[(2S,3R,4S,6R)$ -4-(dimetilamino)-3-hidroksi-6-metiloksan-2-il]oksi}-2-etil-3,4,10-trihidroksi-3,5,6,8,10,12,14-heptametil-1-oksa-6-azaciklopentadekan-15-on, (**M4''**)

U petom, ujedno i posljednjem sintetskom koraku produkt **S4** miješan je u metanolu (30 mL) pri temperaturi od 45 °C kroz 24 sata dajući produkt **M4''** (0,41841 g, 41,84 %).

Karakterizacija pojedinih produkata sinteze **M4''** kao i konačnog produkta, opisana je u poglavlju 4..

### 3.4. Priprava trietilamonijevog bis{N-benzil-N'-[(4-karboksilatofenil)metiliden]karbamohidrazonotioato}nikal(II) acetonitril solvata, $[\text{Et}_3\text{NH}]_2(\text{NiP}_6\text{-2}) \times \text{CH}_3\text{CN}$ , **M4''-Ni(II)-P6**

U okrugloj tikvici od 100 mL otopljen je  $\text{Ni}(\text{OAc})_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  (1 ekvivalent, 24,886 mg) u diklormetanu (10 mL). U tikvicu je potom dodana otopina 4-((2-(benzilkarbamotioil)hidrazono)metil)benzojeve kiseline (2 ekvivalenta, 62,676 mg) u diklormetanu (10mL) uz dodatak trietilamina (100  $\mu\text{L}$ ) te je smjesa miješana pomoću magnetne miješalice 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon 30 minuta dodan je HATU (1,1 ekvivalent, 41,825 g), a nakon sat vremena dodan je **M4''** (80,61 mg) te se reakcijska smjesa nastavila miješati 24 sata na sobnoj temperaturi.

### 3.5. Određivanje biološke aktivnosti

Biološka aktivnost *In vitro* novo sintetiziranog kompleksa 4''-Ni(II)-P6 određena je u Centru za translacijska i klinička istraživanja u sklopu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Aktivnost je određivana na pet Gram-pozitivnih bakterija: *S. pneumoniae* B0652, *S. pneumoniae* B0326, *S. pneumoniae* B0633, *S. pyogenes* B0542, *S. pyogenes* B0545, *S. pyogenes* B0544, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* B0331, *S. aureus* B0330, *E. faecalis* ATCC 29212; i na dvije Gram-negativne bakterije: *M.catarrhalis* ATCC 23246, *E. coli* ATCC 25922, pivski kvasac - *S. cerevisiae* ATCC 7752.

Vrijednosti dobivene minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za pripravljeni kompleks uspoređene su s onima za azitromicin na gore navedene sojeve.

### 3.6. Karakterizacija pripremljenih spojeva

Strukture tiosemikarbazona i međuprodukta sinteze 4"-aminopropilnog derivata azitromicina potvrđene su infracrvenom spektroskopijom uz prigušenu totalnu refleksiju (ATR). Spektri su snimani u rasponu od 4000 do 40  $\text{cm}^{-1}$ . Podatci su obrađeni programskim paketom SpectraGryph 1.2.

Strukture nastalih produkata u sintezi 4"-aminopropilnog derivata azitromicina potvrđene su spektroskopijom NMR. Uzorci za snimanje spektara  $^1\text{H}$  NMR su pripremljeni otapanjem produkta (1-5mg) u 550  $\mu\text{L}$  deuteriranog otapala, dok je za snimanje dvodimenzijskih spektara koncentracija spojeva bila 50 mM. Kao otapalo upotrebljeni su dimetil-sulfoksid ( $\text{DMSO-d}_6$ ) i kloroform-d ( $\text{CDCl}_3$ ). Snimljeni su jednodimenzijski ( $^1\text{H}$  i DEPT-Q NMR) i dvodimenzijski (HMQC, HSQC, HMBC, COSY) spektri NMR na spektrometru NMR *Bruker Avance III HD 400 MHz/54mm Ascend*. Kao referentni signal korišten je tetrametilsilan.

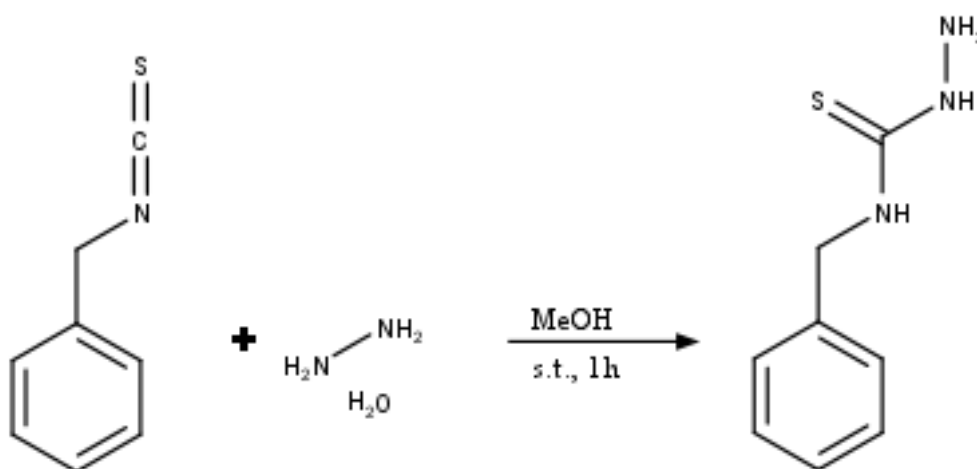
Struktura kompleksa nikla(II) s tiosemikarbazonom **P6** određena je pomoću difrakcije rentgenskog zračenja na jediničnom kristalu.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Priprava i karakterizacija kompleksa tiosemikarbazona s niklom(II)

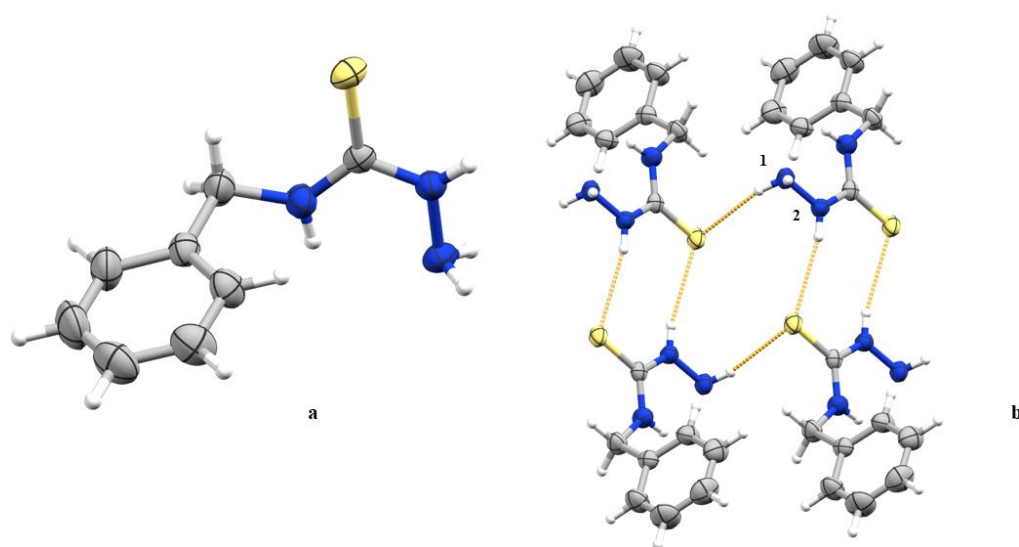
#### 4.1.1. Priprava tiosemikarbazida

Tiosemikarbazid **T6** nastaje nukleofilnom adicijom hidrazin monohidrata na benzil izotiocijanat prema (Shema 5.).



Shema 5. Priprava *N*-benzilhidrazin-karbotioamida, (**T6**)

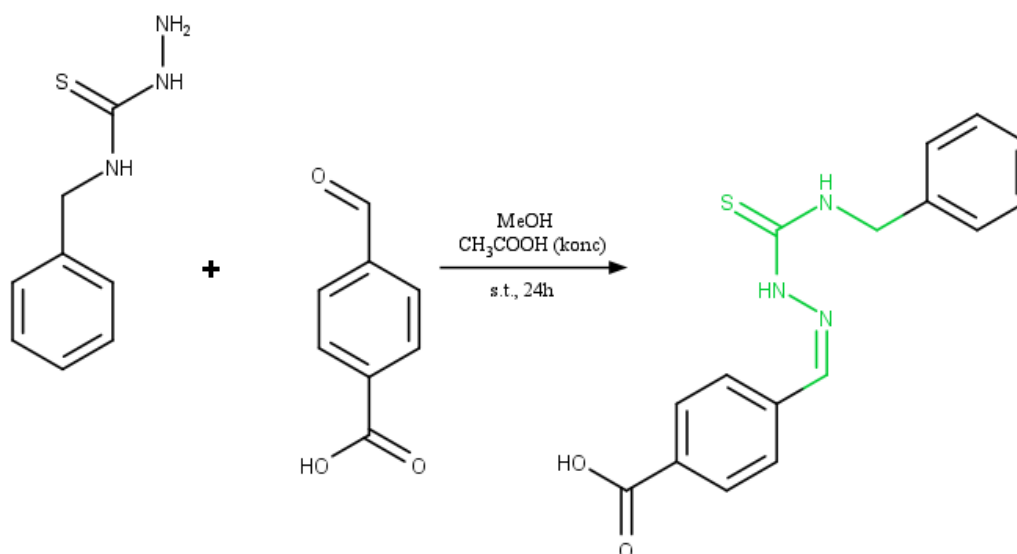
Struktura **T6** potvrđena je difrakcijom rentgenskog zračenja na jediničnom kristalu i prikazana je na Slici 7a.. Tiosemikarbazidi **T6** se međusobno povezuju u lance vodikovim vezama preko dušika(2), dok se dušik(1) vodikovom vezom povezuje sa sumporom tiosemikarbazona, prilikom čega tvore ciklički motiv (Slika 7b.).



Slika 7. Kristalna struktura tiosemikarbazida **T6** (a). Međumolekulske interakcije tiosemikarbazida **T6** (b).

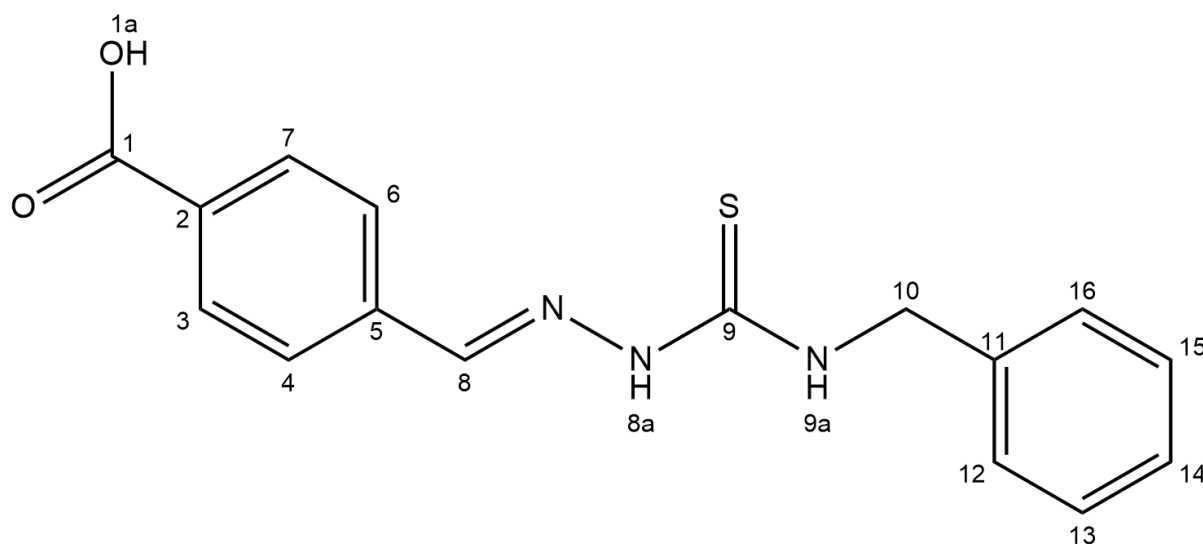
#### 4.1.2. Priprava 4-((2-(benzilkarbamotioil)hidrazono)metil)benzojeve kiseline, (**P6**)

Tiosemikarbazon **P6** nastaje reakcijom pripravljenog tiosemikarbazida **T6** i 4-formilbenzojeve kiseline uz ledenu octenu kiselinu u metanolu (Shema 6.).

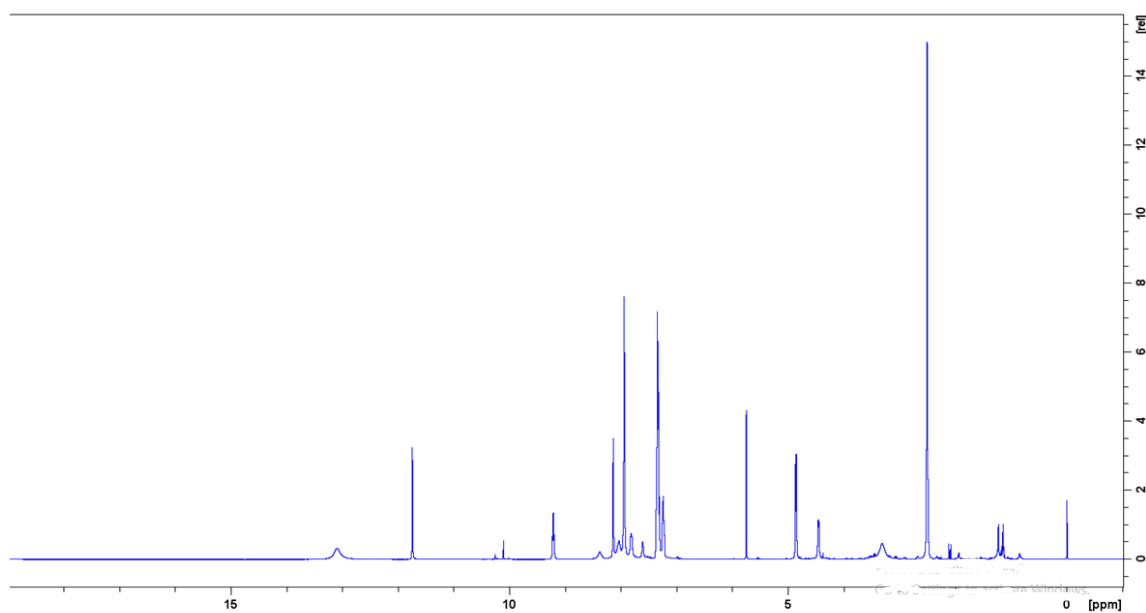


Shema 6. Priprava 4-((2-(benzilkarbamotioil)hidrazono)metil)benzojeve kiseline, (**P6**).

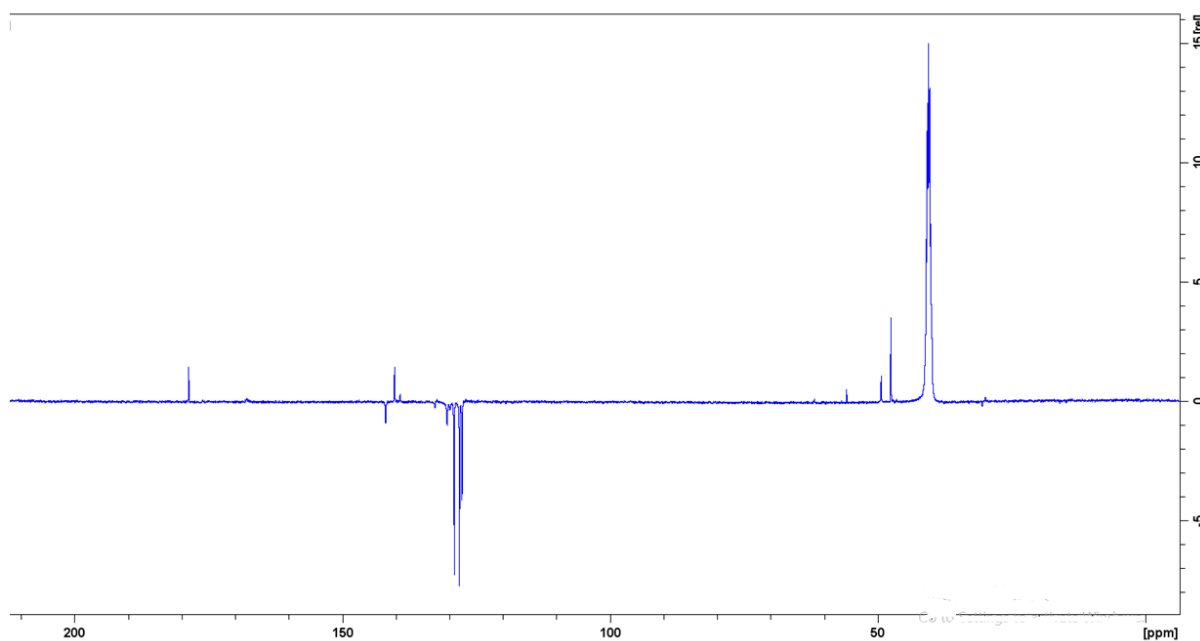
Struktura dobivenog tiosemikarbazona **P6** (Shema 6.). potvrđena je infracrvenom spektroskopijom uz prigušenu totalnu refleksiju (ATR), Slika 13., te spektroskopijom NMR. U spektru ATR uočena je karakteristična vrpca istezanja  $[v(C=N)]$  pri  $1526\text{ cm}^{-1}$ , koja potvrđuje da je aldehid reagirao. U spektru COSY (Slika 11.) vidljive su korelacije protona u aromatskim dijelovima molekule koji čine dva spinska sustava. Jedan spinski sustav čiji protoni pripadaju aromatskom prstenu iz 4-formil benzojeve kiseline te drugi iz aromatskog prstena tiosemikarbazona **T6**. Također iz spektra COSY uočava se korelacija između protona H8 i H8a, te slaba korelacija protona H8 (8,14 ppm) s protonima iz aromatskog prstena. U istom spektru vidljiva je i korelacija visokog intenziteta između protona H9a i H10. Asignirani su spektri  $^1\text{H}$  (Slika 9.) i DEPT-Q (Slika 10.) spoja **P6** te je na temelju dvodimenzijskog spektra HSQC (Slika 12.) potvrđena korelacija između pojedinih ugljika i vodika kroz jednu kemijsku vezu (Tablica 5.).



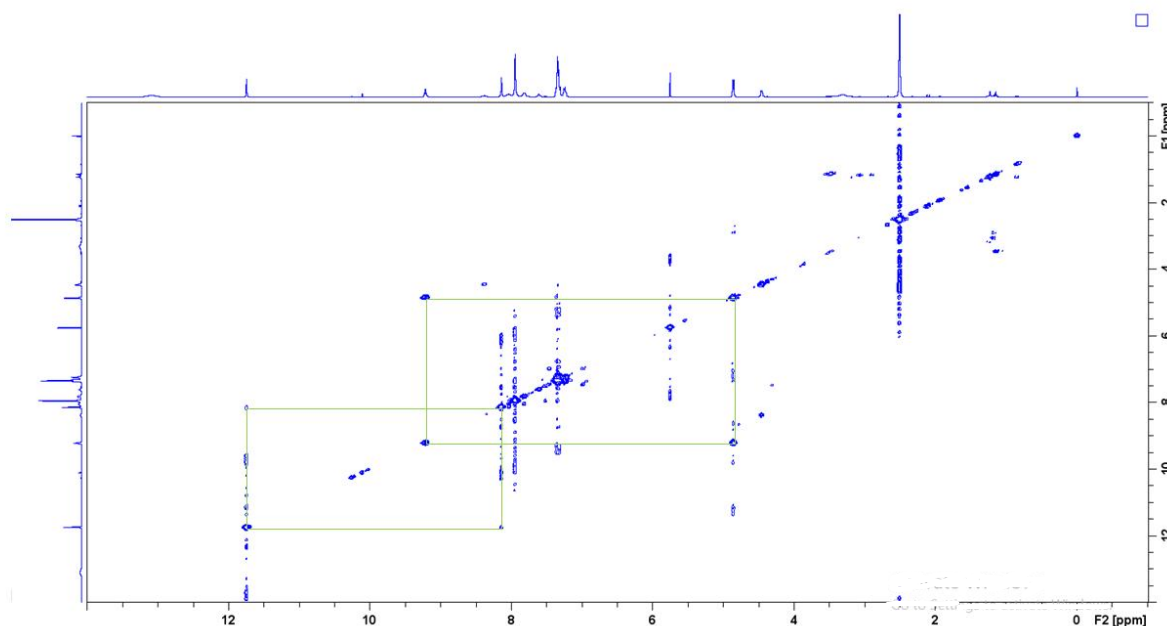
Slika 8. Struktura tiosemikarbazona P6 s označenim lokantima.



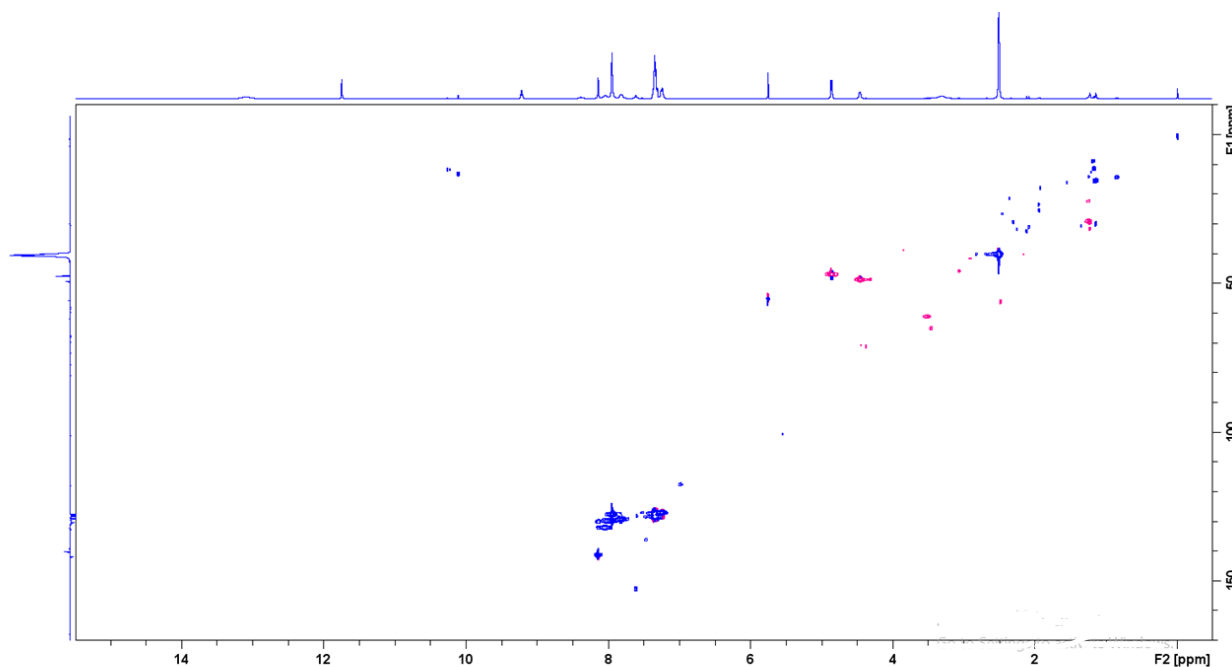
Slika 9. Spektar  $^1\text{H}$  NMR tiosemikarbazona P6 snimljen u DMSO- $d_6$  pri 298K.



Slika 10. Spektar DEPT-Q NMR tiosemikarbazona P6 snimljen u DMSO- $d_6$  pri 298K.



Slika 11. Spektar COSY tiosemikarbazona P6 snimljen u DMSO- $d_6$  pri 298K s označenim korelacijama protona H8a (11,74 ppm) i H8 (8,14 ppm) i protona H10 (4,86 ppm) s H9a (9,22 ppm).

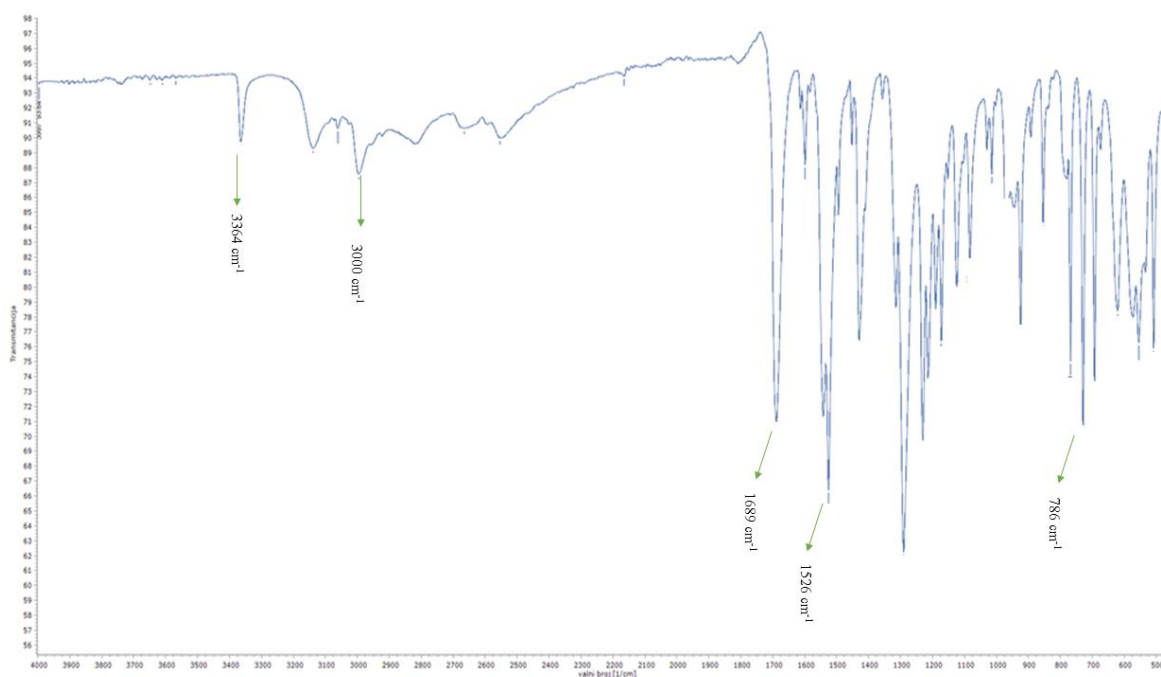


Slika 12. Spektar HSQC NMR tiosemikarbazona P6 snimljen u DMSO- $d_6$  pri 298K.



Tablica 5. Asignacija kemijskih pomaka  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR tiosemikarbazona P6.

Spoj	P6	
Atom	$\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C})/\text{ppm}$
1	-	167,89
1a	13,096	-
2	-	131,60
3, 7	7,95	129,97
4, 6	7,82	129,43
5	-	140,15
8	8,14	141,9
9	-	178,66
9a	9,22	-
10	4,86	47,53
11	-	139,18
12, 16	7,35	128,2
13, 15	7,24	127,21
14	7,25	128,62

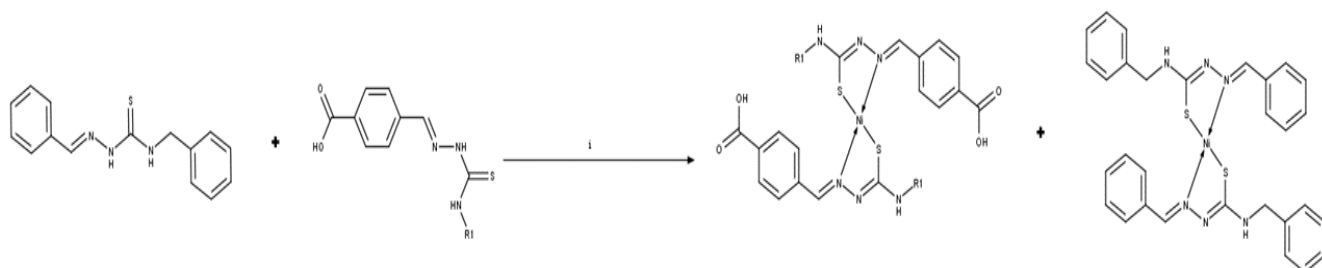


Slika 13. Snimljeni spektar IR tiosemikarbazona **P6**. Vrpce istezanja pri  $3364\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu(\text{N-H})$ ],  $3000\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu(\text{C-H, aromatski})$ ],  $1689\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu(\text{C=O})$ ],  $1526\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu(\text{C=N})$ ],  $786\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu(\text{C=S})$ ] potvrđuju da je sinteza uspješno provedena.

Preostali tiosemikarbazoni korišteni prilikom izrade diplomskog rada pripremljeni su na Zavodu za analitičku kemiju te je njihova struktura potvrđena spektroskopijom IR uz prigušenu totalnu refleksiju (Dodatak D1-D14).

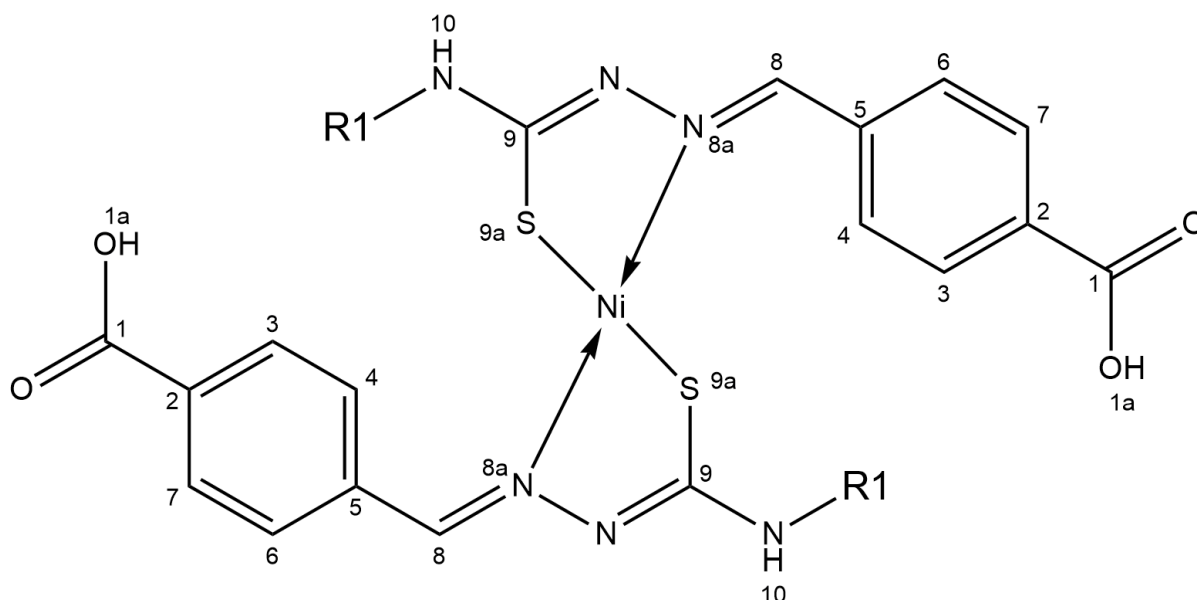
## 4.1.3. Priprava kompleksa tiosemikarbazona s niklom(II), (Ni(II)-PX)

Reakcijom tiosemikarbazona i **B6** s niklom(II) nastaju kelatni kompleksi nikla(II) s tiosemikarbazonomima i kelatni kompleksi nikla(II) s **B6** (Shema 7.)



Shema 7. Shema nastajanja kompleksa Ni(II)-PX i Ni(II)-B6. (i) Ni(OAc)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O/ NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, ACN, TEA, s.t., 24 h.

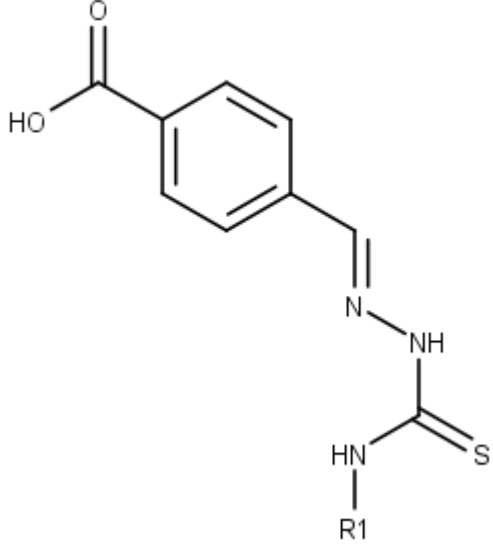
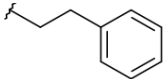
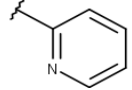
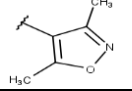
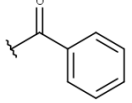
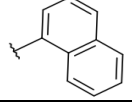
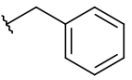
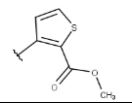
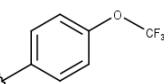
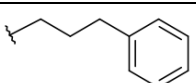
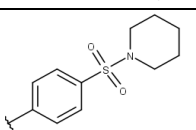
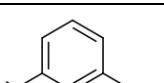
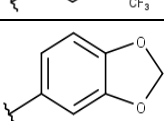
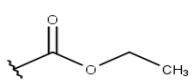
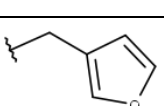
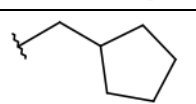
Tiosemikarbazoni se na metalni ion nikla(II) vežu bidentatno preko dušika (N<sup>8a</sup>) i sumpora (S<sup>9a</sup>) (Slika 14.).



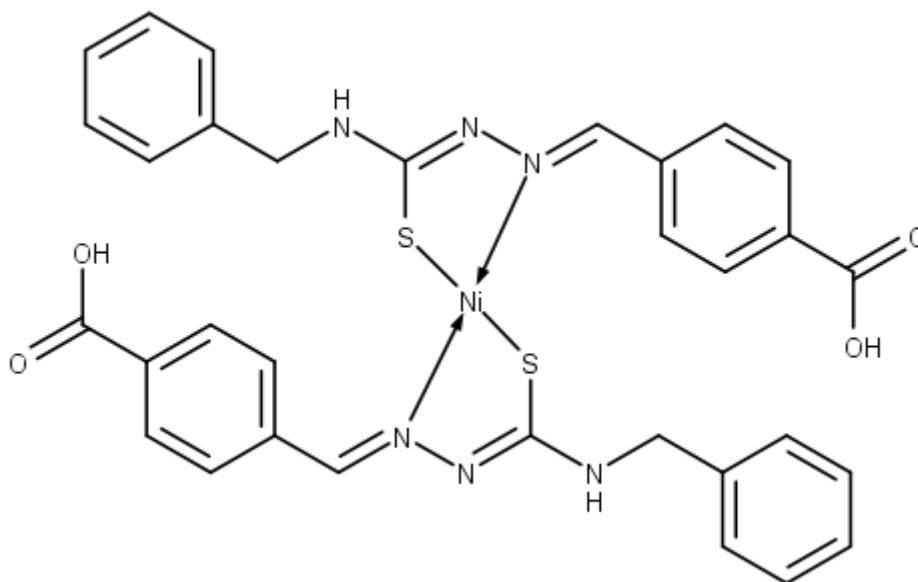
Slika 14. Označeni kompleks Ni(II)-PX.

Strukture svih tiosemikarbazona i njihovih supstituenata navedeni su u Tablici 6.

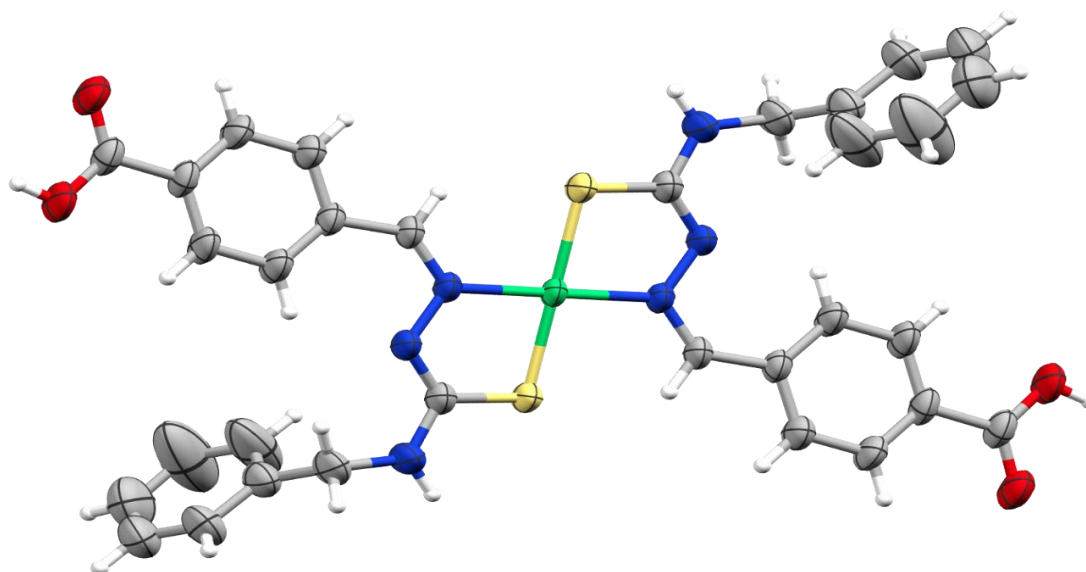
Tablica 6. Strukture tiosemikarbazona

Tiosemikarbazon	Struktura tiosemikarbazona	Substituent (R1)
P1		
P2		
P3		
P4		
P5		
P6		
P7		
P8		
P9		
P10		
P11		
P12		
P13		
P14		
P16		

Budući da je jedino za kompleks Ni(II)-P6 (Slika 15.) potvrđena kristalna struktura pomoću difrakcije rentgenskog zračenja na jediničnom kristalu (Slika 16.), daljnja priprava makrozona nastavljena je s navedenim kompleksom.



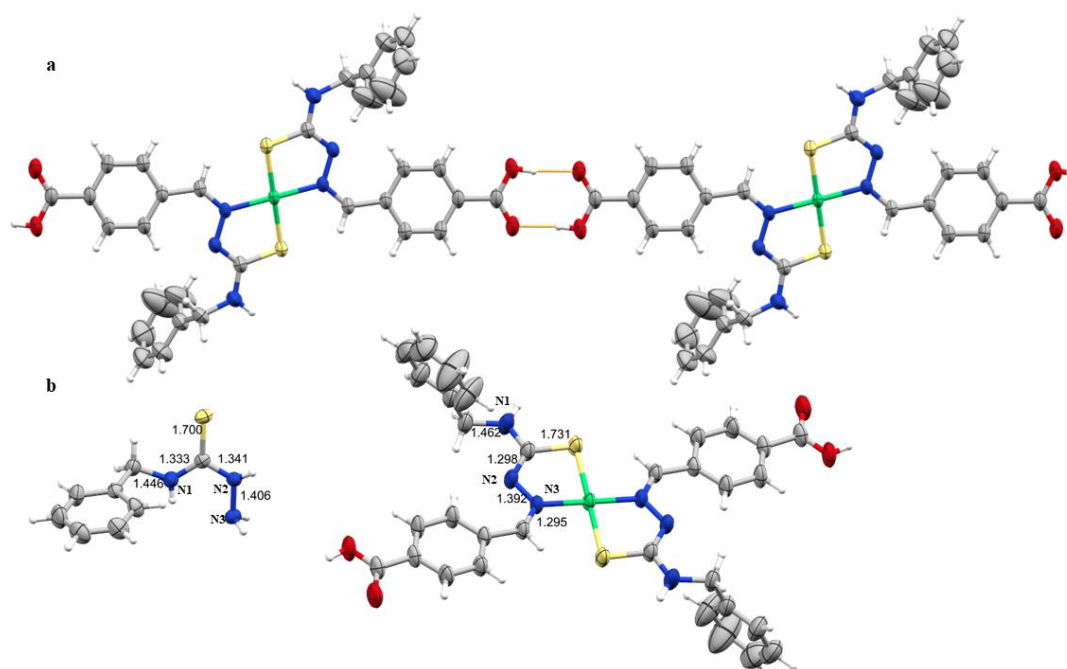
Slika 15. Struktura kompleksa Ni(II)-P6.



Slika 16. Molekulska struktura kompleksa Ni(II)-P6. Atomi ugljika prikazani su sivom, vodika bijelom, kisika crvenom, dušika plavom, sumpora žutom, a nikla zelenom bojom.

Dobiveni kompleks Ni(II)-P6 je mononuklearni kompleks u kojemu je omjer liganada i metala 2:1 a poprima kvadratno-planarnu geometriju. Atom nikla povezan je koordinacijsko-kovalentnom vezom s četiri donorska atoma, odnosno s azometinskim dušikom i tionskim sumporom iz svakog liganda. Takvo nam vezivanje potvrđuje i usporedba duljina veza u tiosemikarbazidu (T6) i kompleksu Ni(II)-P6 (Slika 17b.). Usljed koordinacije sumporovog atoma s niklovim atomom dolazi do delokalizacije elektrona pri čemu veza između ugljika i sumpora postaje jednostruka (produljuje se,  $d = 1,731 \text{ \AA}$ ), a veza između ugljika i N2 postaje dvostruka (skraćuje se,  $d = 1,298 \text{ \AA}$ ). Također, budući da je duljina veze između dušika N3 i ugljika u kompleksu ( $d = 1,295 \text{ \AA}$ ) vrlo slična duljini veze između dušika N2 i ugljika u kompleksu ( $d = 1,298 \text{ \AA}$ ), te da dolazi do deprotonacije dušika N3, zaključujemo kako je došlo do formiranja dvostruke veze između N3 i ugljika.

Kompleksi Ni(II)-P6 međusobno se povezuju u lance dvjema vodikovim vezama preko karboksilne skupine, pri čemu karbonilni kisik djeluje kao akceptor vodikove veze a hidroksilna skupina kao donor vodikove veze (Slika 17a.).



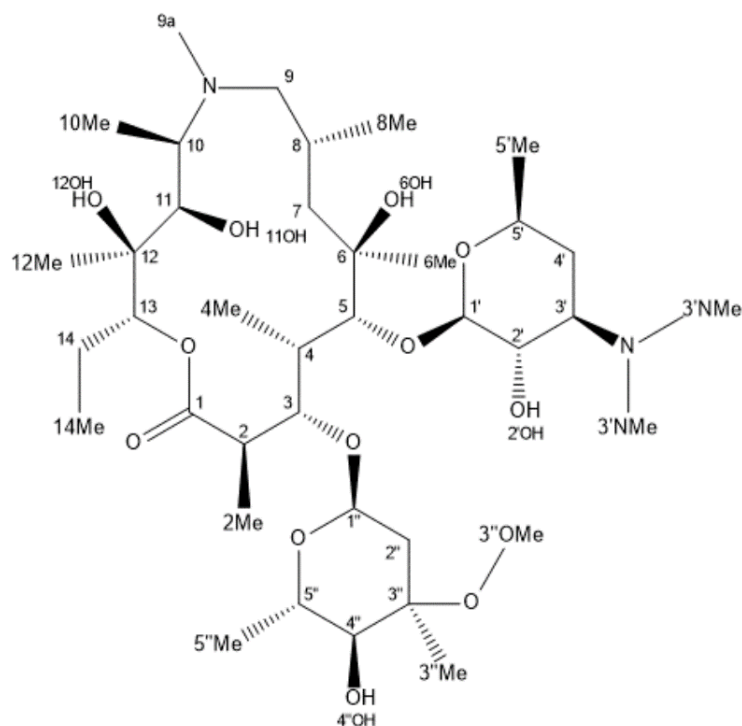
Slika 17. Međumolekulske interakcije kompleksa **Ni(II)-P6** (a). Usporedba duljina veza između pojedinih atoma u **T6** i kompleksu **Ni(II)-P6** (b).

## 4.2. Priprava i karakterizacija 4''-aminopropil derivata azitromicina (**M4''**)

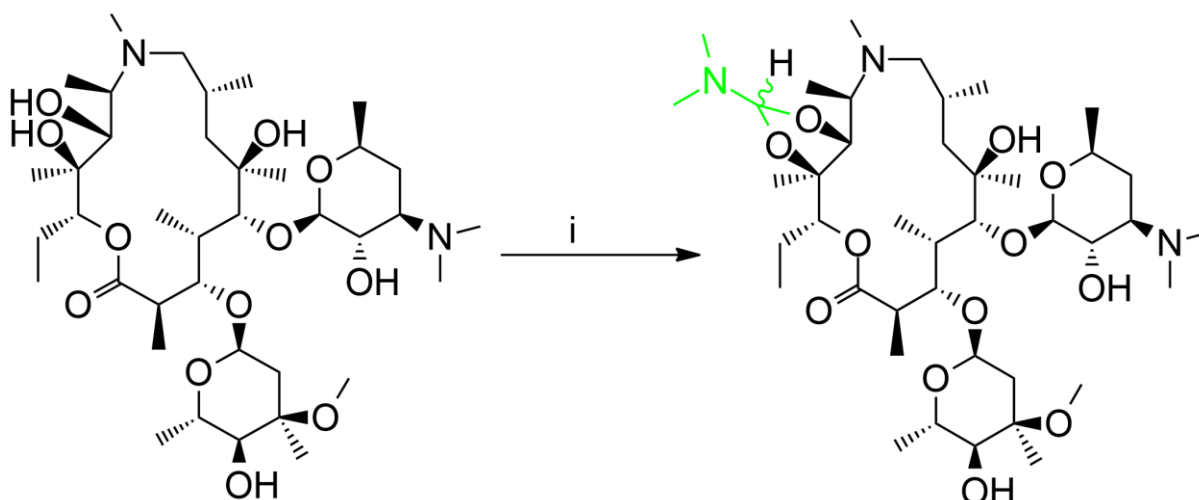
U sklopu ovog diplomskog rada uspješno je pripremljen 4''-aminopropil derivat azitromicina. Sinteza se sastojala od pet koraka, a detaljan postupak sintetskog puta opisan je u eksperimentalnom dijelu ovog rada.

### 4.2.1. Priprava **S1**

Prvi korak sinteze uključuje zaštitu diola reakcijom azitromicina (Slika 18.) sa zaštitnom skupinom DMF-DMA kako bi spriječili Michaelovu adiciju akrilonitrila na ta dva položaja. (Shema 8.).

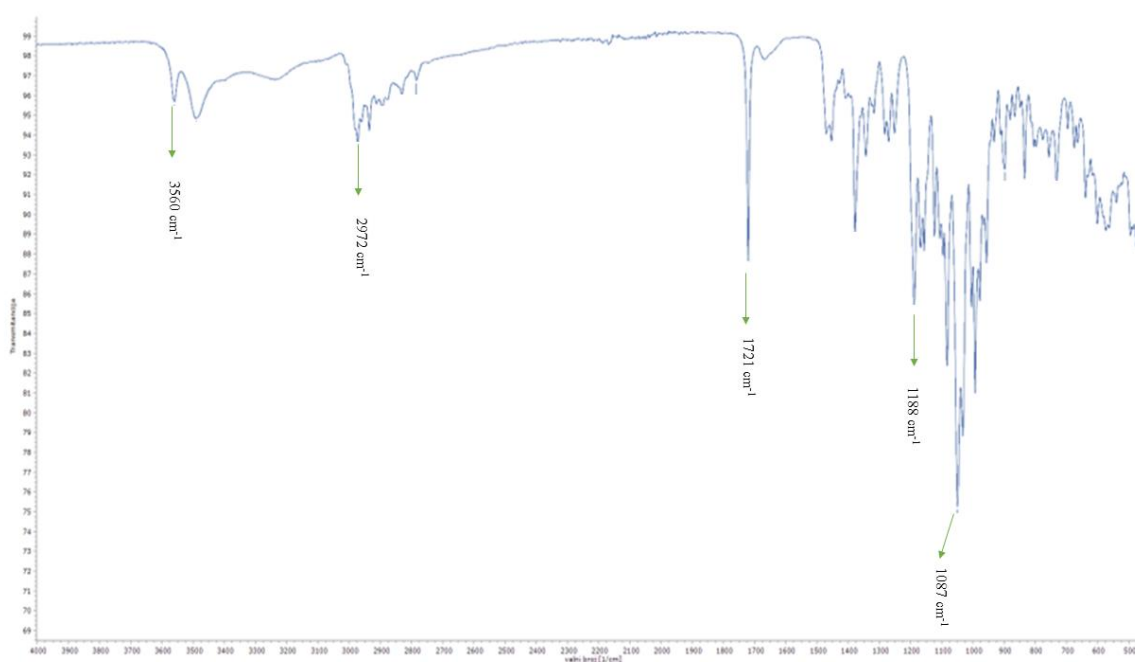


Slika 18. Struktura azitromicina s navedenim oznakama korištenim prilikom asignacije spektara NMR.

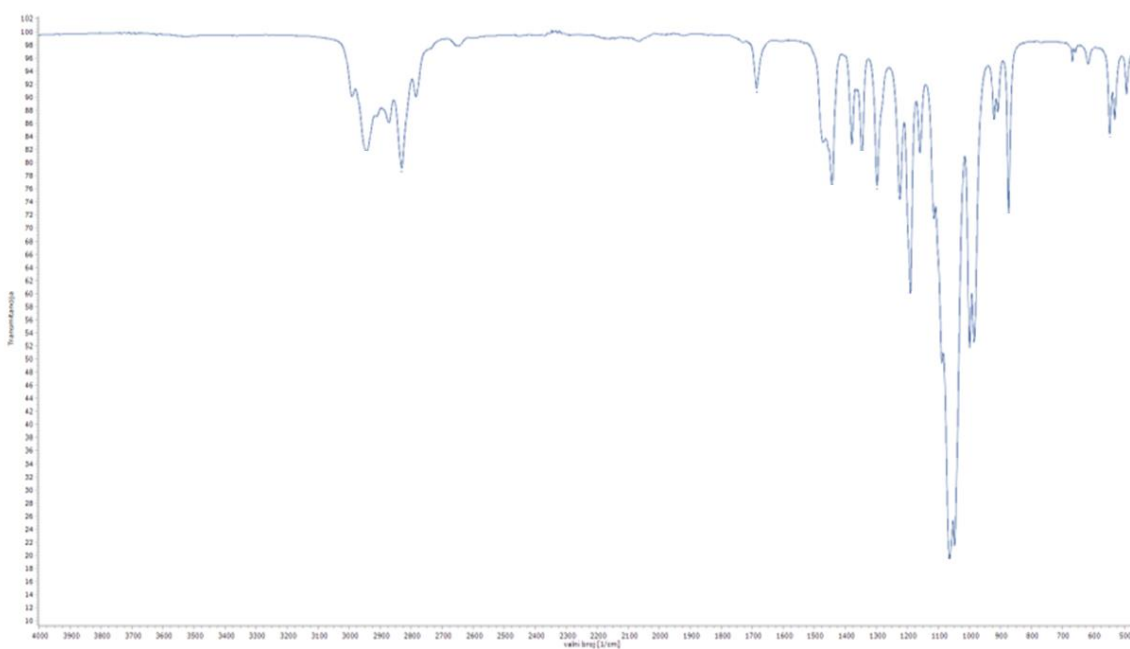


Shema 8. (i) *N,N*-Dimetilformamid-dimetilacetal (DMF-DMA), toluen, 60 °C, 24 h.

Zaštita diolne funkcijske skupine potvrđena je spektroskopijom IR – ATR (Slika 19., Slika 20.). U spektru IR spoja **S1** izostaje karakteristična vrpca istezanja O-H skupine pri ~ 3500  $\text{cm}^{-1}$  što potvrđuje ispravno vezanje zaštitne skupine. Također, prisutnost zaštitne skupine potvrđena je spektroskopijom NMR. U spektru DEPT-Q (Slika 22.) vidljiv je slabi signal CH skupine pri 111 ppm. U spektru  $^1\text{H}$  NMR (Slika 21.) pri 2,27 ppm prisutan je signal integrala 6 koji ukazuje na protone iz dvije  $\text{CH}_3$  skupine zaštitne skupine amid acetala.

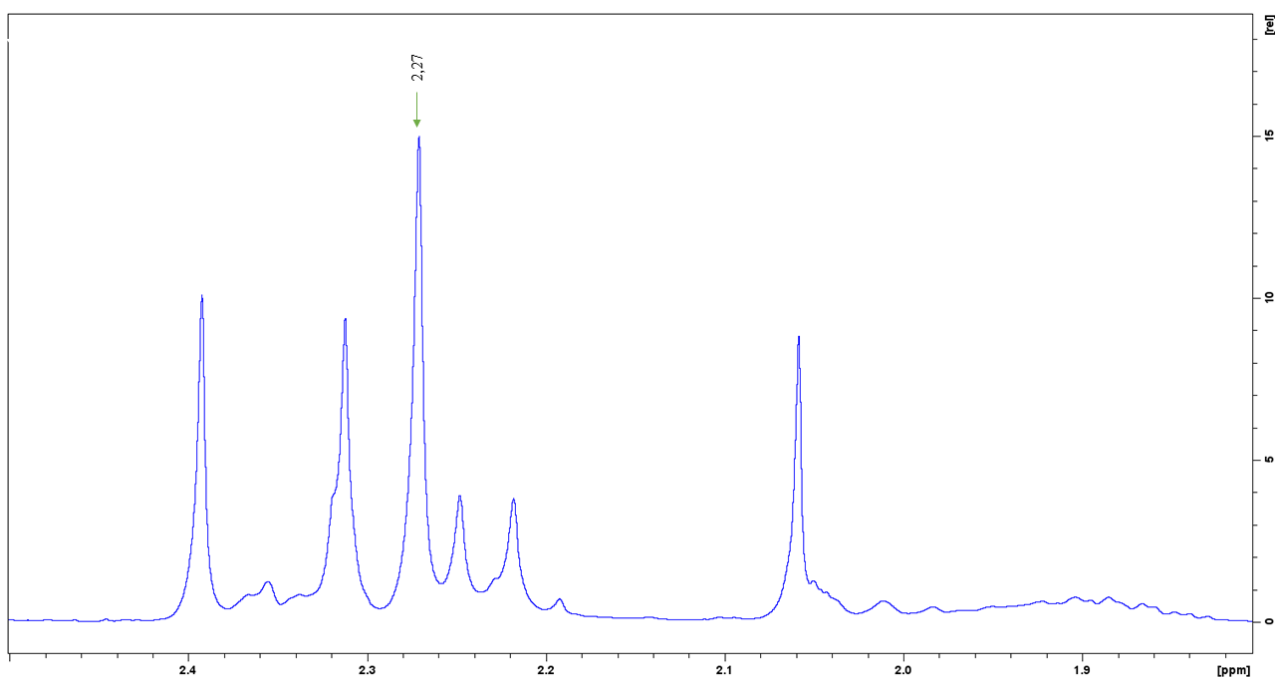


Slika 19. Snimljeni spektar IR azitromicina. Vrpce istežanja pri 3560 cm<sup>-1</sup> [ν(O-H)], 2972 cm<sup>-1</sup> [ν(CH<sub>2</sub>)], 1721 cm<sup>-1</sup> [ν(C=O)], 1188 cm<sup>-1</sup> [ν(R-O-R)], 1087 cm<sup>-1</sup> [ν(C-N)] potvrđuju strukturu azitromicina.

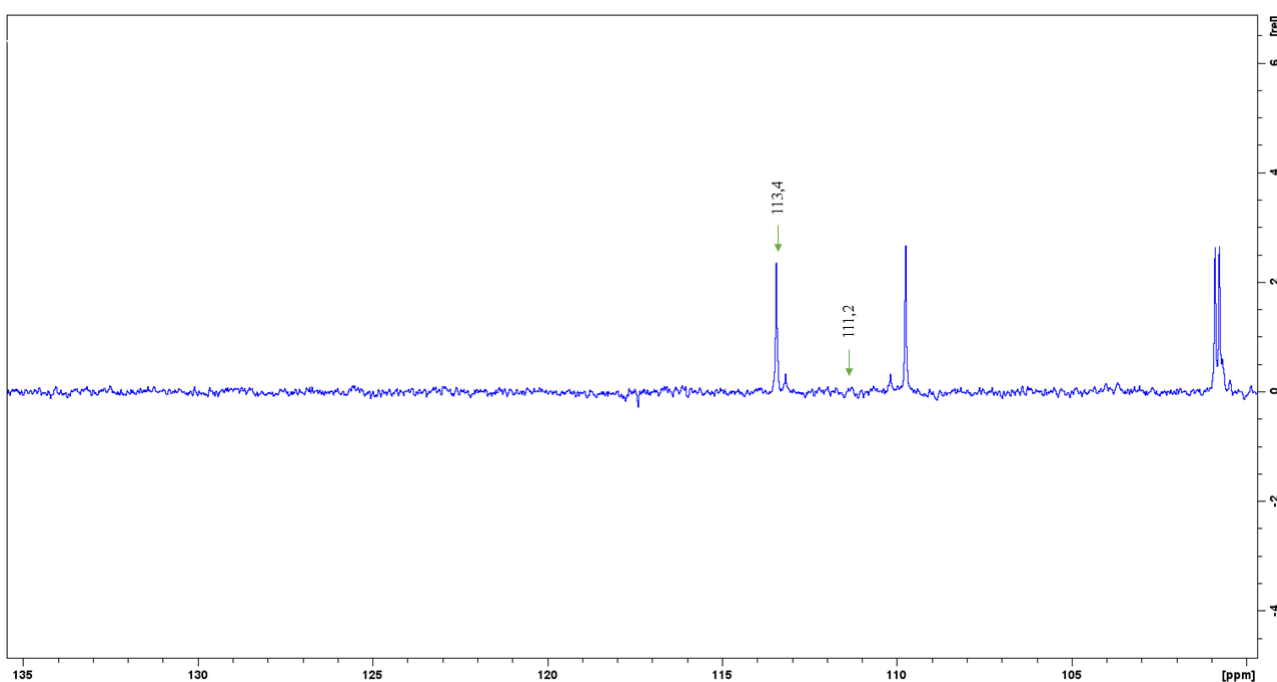


Slika 20. Snimljeni spektar IR S1.





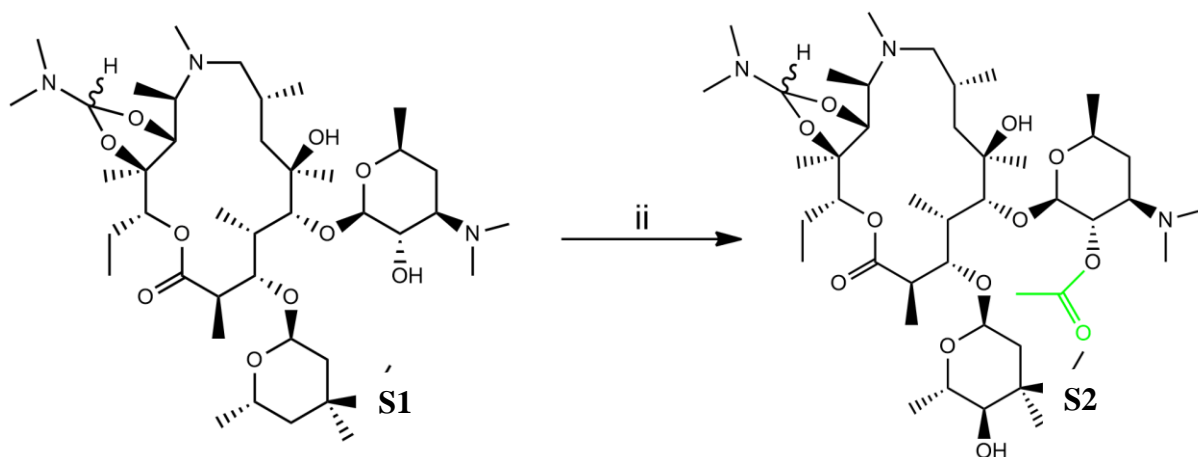
Slika 21. Uvećani dio spektra  $^1\text{H}$  NMR spoja **S1** snimljen u kloroformu-d pri 298K.



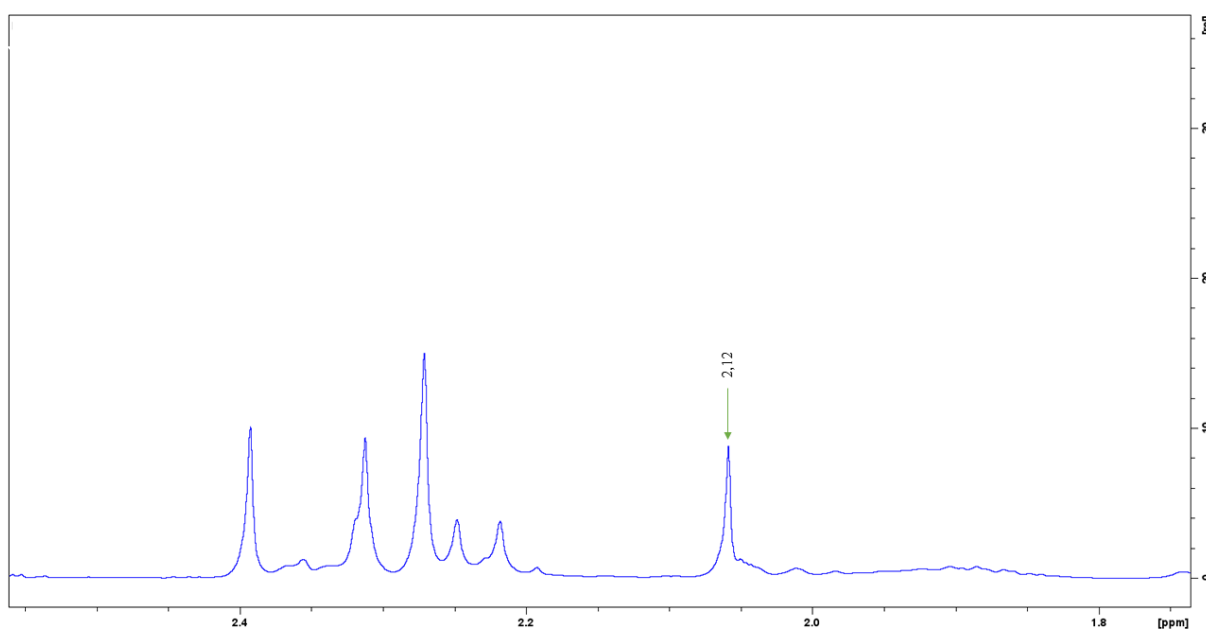
Slika 22. Uvećani dio spektra DEPT-Q NMR spoja **S1** snimljen u kloroformu-d pri 298K.

#### 4.2.2. Priprava **S2**

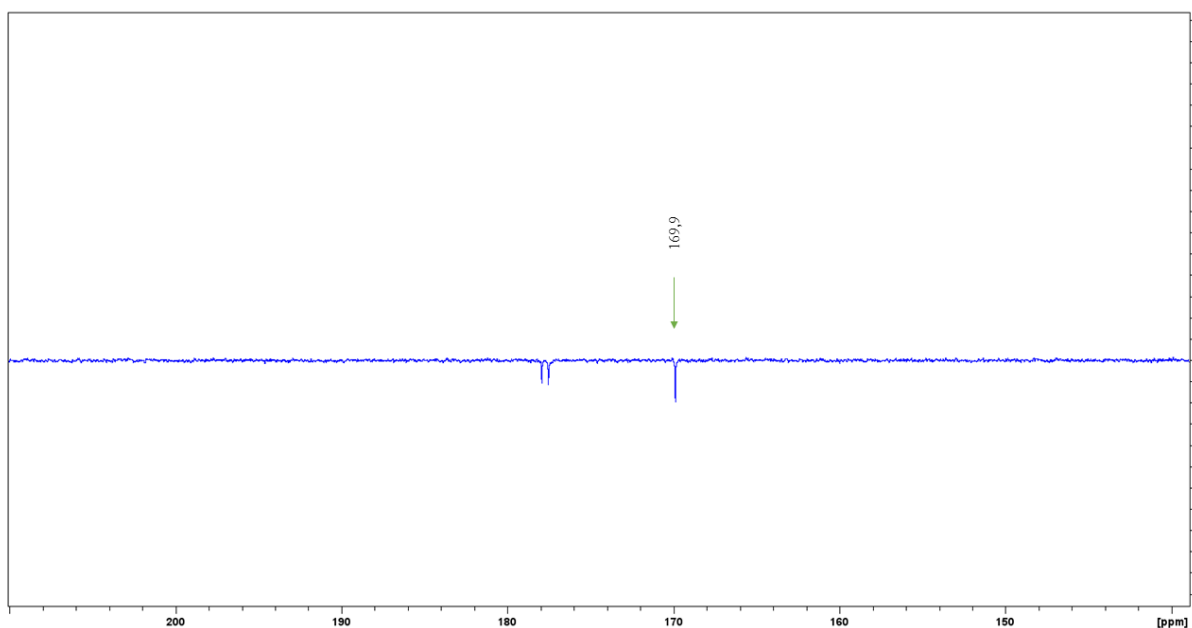
Drugi korak sinteze obuhvaća zaštitu skupine OH na položaju 2' acetatnim esterom (Shema 9.).



Prisutnost zaštitne skupine potvrđena je spektrima <sup>1</sup>H i DEPT-Q. U spektru <sup>1</sup>H NMR (Slika 23.) opažen je signal pri **2,12** ppm (3H) koji odgovara protonima skupine CH<sub>3</sub> iz acetalne zaštite. U spektru DEPT-Q (Slika 24.) pri **169,87** ppm vidljiv je signal karbonskog atoma C acetalne zaštite.



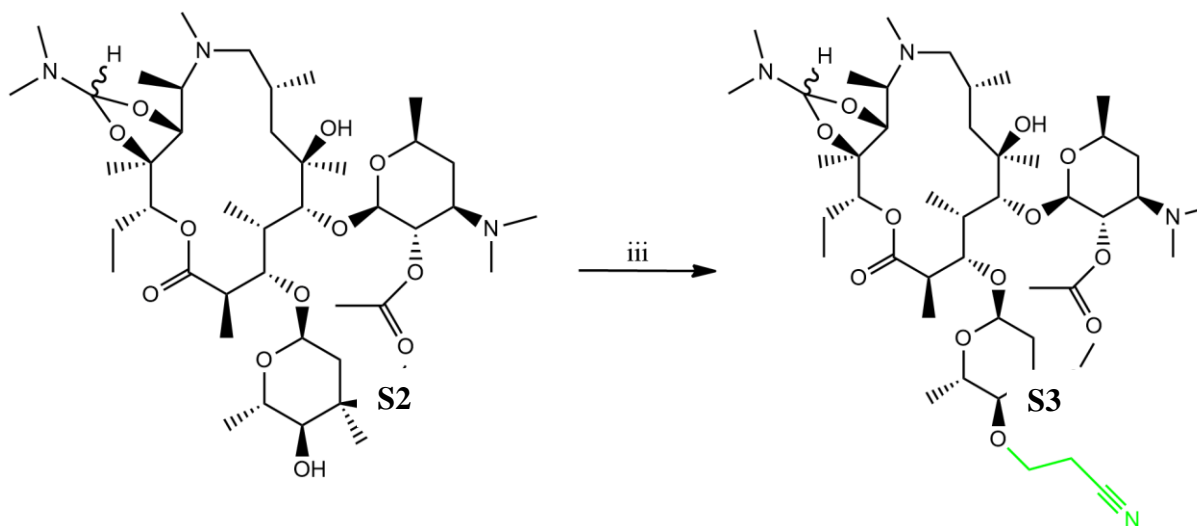
Slika 23. Uvećani dio spektra <sup>1</sup>H NMR spoja **S2** snimljen u kloroformu-d pri 298K.



Slika 24. Uvećani dio spektra DEPT-Q spoja **S2** snimljen u kloroformu-d pri 298K.

#### 4.2.3. Priprava **S3**

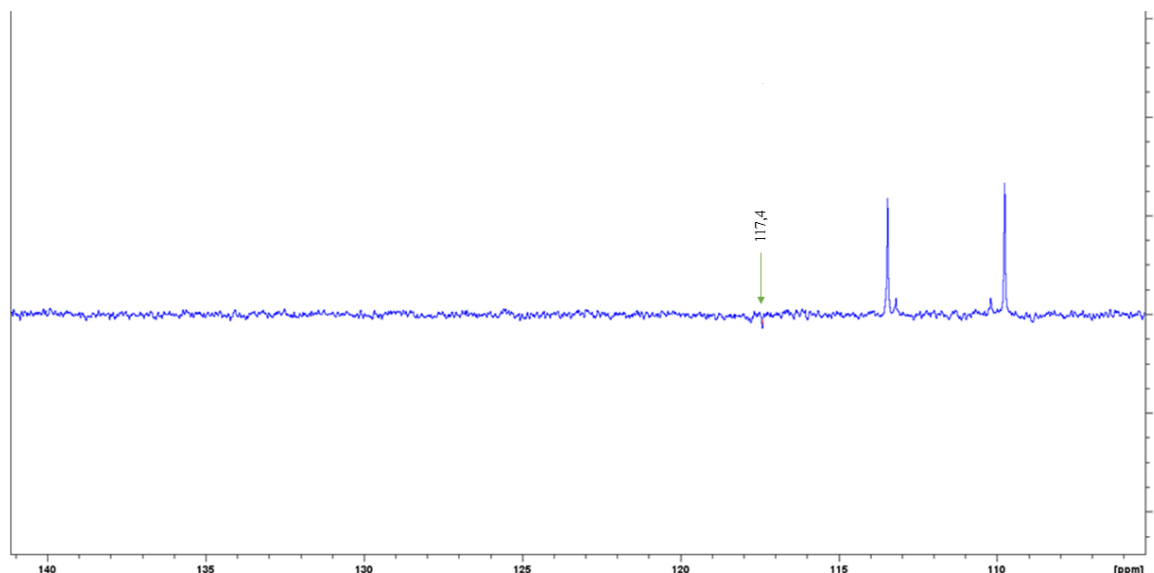
Treći korak sinteze obuhvaća Michaelovu adiciju akrilonitrila na skupinu 4''-OH u kladinozi u prisutnosti cezijeva karbonata u *t*-butanolu.



Shema 10. Michaelova adicija akrilonitrila. (iii) *t*-BuOH, akrilonitril, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 27 °C, 48 h.

Uspješno vezanje akrilonitrila na skupinu 4''-OH potvrđeno je spektroskopijom NMR. U spektru DEPT-Q opažen je signal kvaternog atoma C pri **117,40** ppm koji odgovara nitrilnom atomu C. Cezijev karbonat djeluje kao baza i omogućuje nastajanje adukta Michaelove reakcije. Pretpostavka je da prvi korak polimerizacije obuhvaća adiciju slobodne hidroksilne

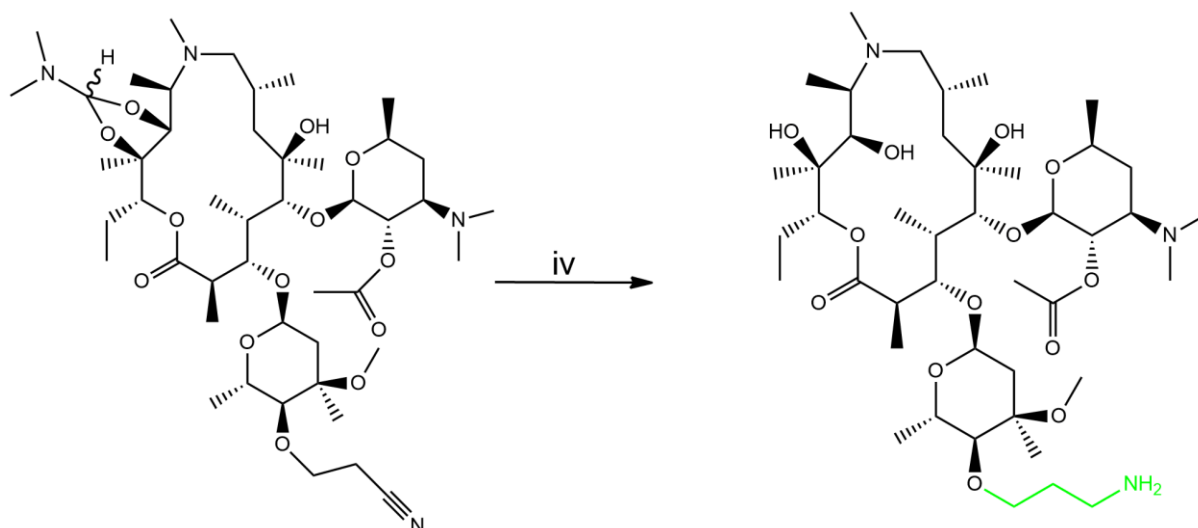
skupine na akrilonitril, koji daje karbanion na atomu  $\alpha$ -C pored cijano skupine. Kako bi se izbjegla nepoželjna polimerizacija i kako bi se karbanion protonirao, kao izvor protona uveden je *t*-butanol.



Slika 25. Uvećani dio spektra DEPT-Q NMR **S3** snimljen u kloroformu-d pri 298K.

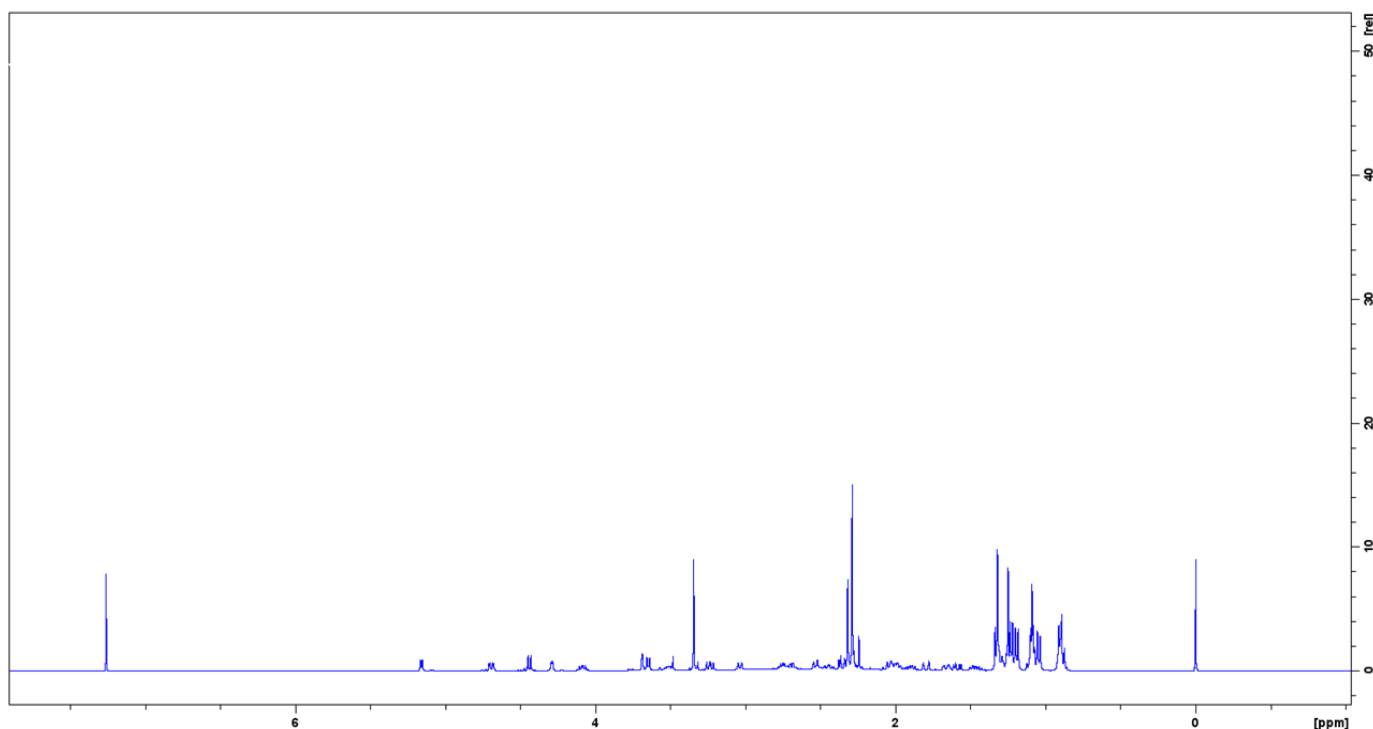
#### 4.2.4. Priprava **S4**

U četvrtom koraku sinteze redukcijom cijanoetilnog adukta (**S3**) nastaje primarni amin (Shema 11.). U ovom koraku hidrogeniranja dolazi do protonacije, odnosno octena kiselina protonira primarne amine i na taj način sprječava nastanak sekundarnih amina kao nusprodukta. PtO<sub>2</sub>, poznatiji kao Adamsov katalizator adsorbira atome vodika na svoju površinu te preko njega ide izmjena atoma vodika. Prema tome, hidrogeniranje se ne događa u homogenoj otopini, već se umjesto toga odvija na površini čvrstih čestica katalizatora. Ovaj način hidrogeniranja omogućuje selektivnu hidrogenaciju alifatskih nitrila u primarne amine.



Shema 11. Redukcija cijanoetilnog adukta (**S3**). (iv) PtO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, 5 bar, AcOH, s.t., 24 h.

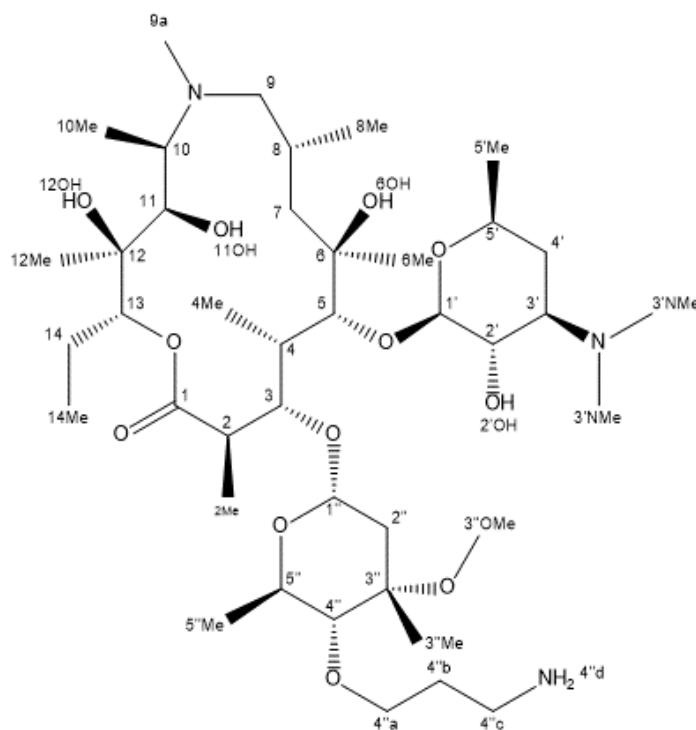
Snimljen je spektar <sup>1</sup>H NMR u kojem su vidljivi signali pri **3,69; 3,83** ppm (2H, H-4''a), **1,68; 1,21** ppm (2H, H-4''b) i **1,82; 1,32** ppm (2H, H-4''c) čime je potvrđena uspješna redukcija **S3** (Slika 26.).



Slika 26. Spektar <sup>1</sup>H NMR spoja **S4** snimljen u kloroformu-d pri 298K.

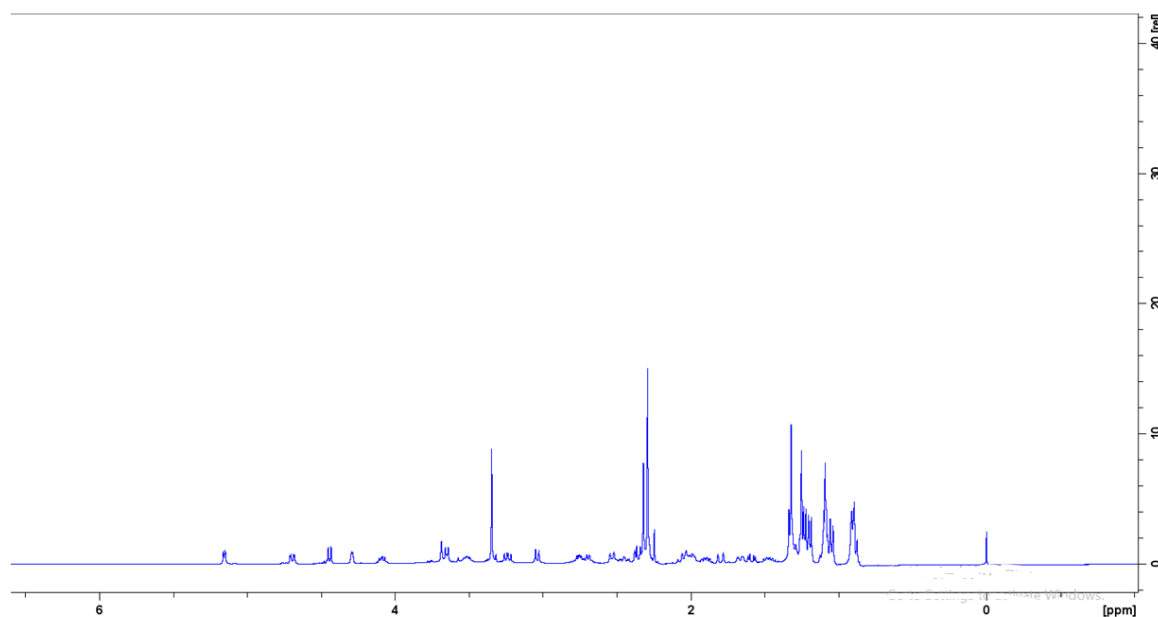
#### 4.2.5. Priprava **M4''**

Peti, ujedno i posljednji korak sinteze, obuhvaća uklanjanje 2'-O-acetilne zaštitne skupine i formiranje 4''-aminopropilnog derivata azitromicina (Slika 27.).

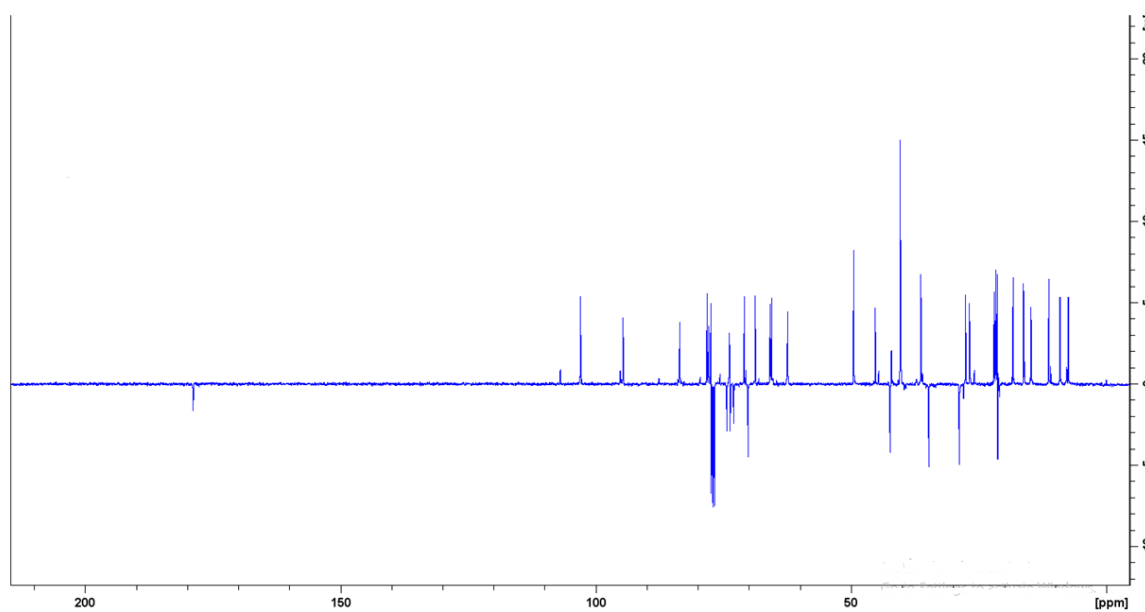


Slika 27. Struktura 4''-aminopropil derivata azitromicina (**M4''**).

Na temelju snimljenih jedno- i dvodimenzijских spektara NMR te kombinacijom dobivenih podataka potvrđena je struktura spoja **M4''** prikazana na Slici 27.. U spektru HSQC uočavamo signale dijastereoizomernih protona vezanih na ugljike C4''b i C4''c, dok je za proton H4''a vidljiv samo jedan signal (Slika 30.). Usporedbom spektra HSQC i HMBC vidljivi su korelacijski signali ugljika C4''b s protonima H4''a (3,68 ppm) i H4''c (1,30;1,83 ppm) (Slika 31.), te ugljika C4''c s protonima H4''b (1,25;1,67) (Slika 32.). Nadalje, unatoč lošoj rezoluciji spektra HMBC, njegovim se uvećanjem i usporedbom sa spektrom HSQC pojavljuje signal slabijeg intenziteta iz kojeg je vidljiva korelacija između ugljika C4'' (87,6 ppm) i protona H4''a (3,68 ppm), što potvrđuje da se supstitucija aminopropilnog ogranka dogodila upravo na položaju 4'' (Slika 33.). Asignirani su spektri <sup>1</sup>H (Slika 28.) i DEPT-Q (Slika 29.) spoja **M4''** te je na temelju dvodimenzijского spektra HSQC (Slika 30.) potvrđena korelacija između pojedinih ugljika i vodika kroz jednu kemijsku vezu (Tablica 7.).



Slika 28. Spektar <sup>1</sup>H NMR spoja **M4''** snimljen u kloroformu-d pri 298K.



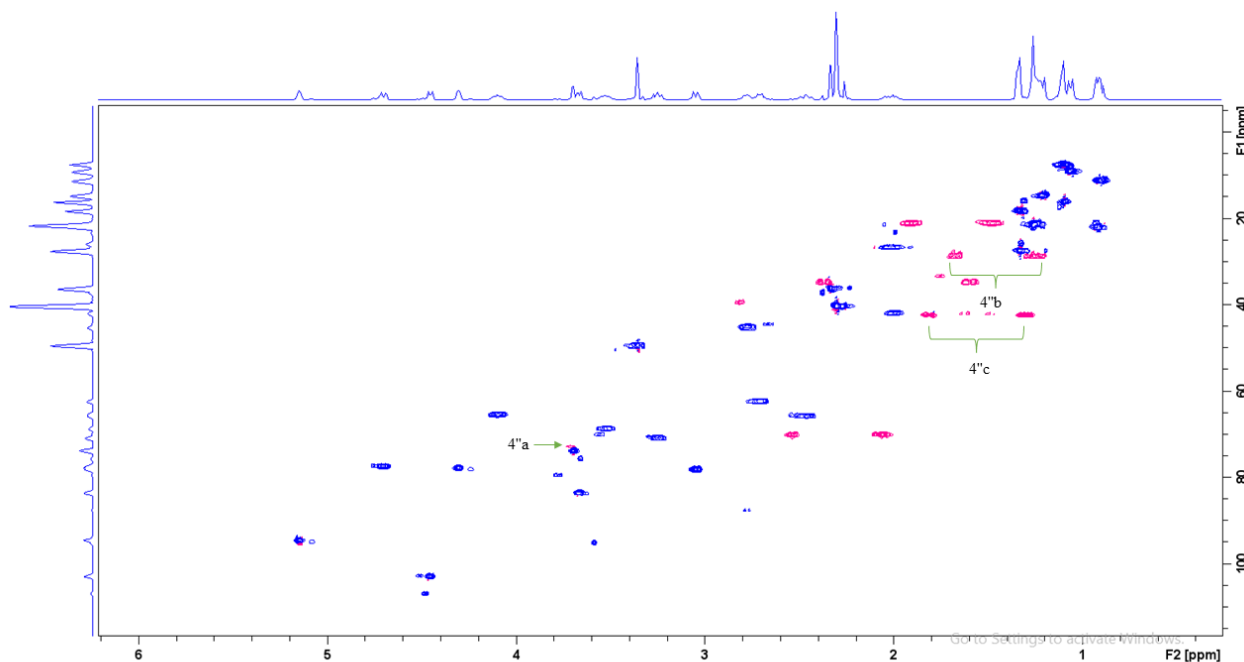
Slika 29. Spektar DEPT-Q NMR spoja **M4''** snimljen u kloroformu-d pri 298K.

Tablica 6. Asignacija kemijskih pomaka  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  spoja M4".

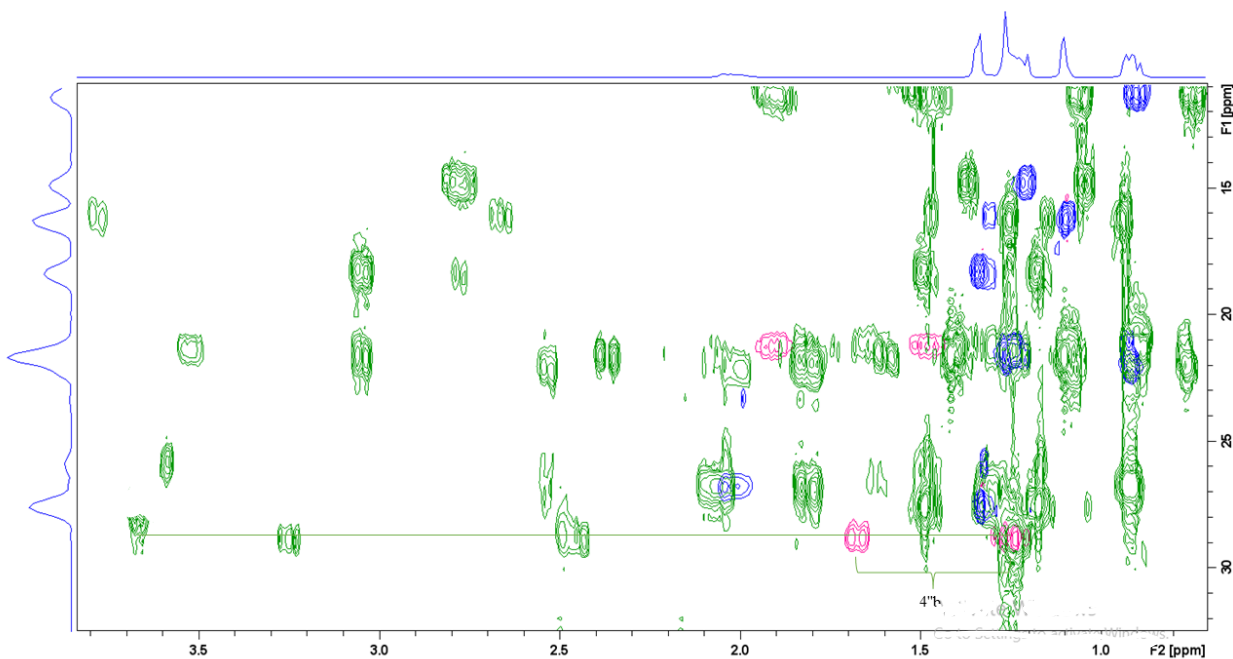
Spoj		M4"			
Atom	$\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C})/\text{ppm}$	Atom	$\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C})/\text{ppm}$
<b>1</b>	-	178,80	<b>14</b>	1,91; 1,47	21,26
<b>2</b>	2,77	45,25	<b>14Me</b>	0,90	11,27
<b>2Me</b>	1,20	14,74	<b>1'</b>	4,44	102,97
<b>3</b>	4,29	77,85	<b>2'</b>	3,24	70,89
<b>4</b>	1,99	42,07	<b>2'OH</b>	- <sup>a</sup>	-
<b>4Me</b>	1,06	9,06	<b>3'</b>	2,48	65,84
<b>5</b>	3,67	83,52	<b>3'NMe<sub>2</sub></b>	2,29	40,36
<b>6</b>	-	74,28	<b>4'</b>	2,10; 1,33	26,72
<b>6Me</b>	1,33	27,56	<b>5'</b>	3,52	68,74
<b>7</b>	2,81; 2,29	39,36	<b>5'Me</b>	0,92	21,99
<b>8</b>	1,89	26,78	<b>1''</b>	5,15	94,8
<b>8Me</b>	0,92	21,98	<b>2''</b>	2,39; 1,59	34,76
<b>9</b>	2,54; 2,06	70,12	<b>3''</b>	-	72,81
<b>9aN</b>	2,32	36,31	<b>3''Me</b>	1,26	21,62
<b>10</b>	2,73	62,39	<b>3''OMe</b>	3,35	49,46
<b>10Me</b>	1,10	7,43	<b>4''</b>	2,77	87,6
<b>11</b>	3,65	75,53	<b>4''a</b>	3,68	73,65
<b>11OH</b>	- <sup>a</sup>	-	<b>4''b</b>	1,67; 1,25	28,81
<b>12</b>	-	76,72	<b>4''c</b>	1,83; 1,30	42,36
<b>12Me</b>	1,09	16,22	<b>4''d</b>	- <sup>a</sup>	-
<b>12OH</b>	3,03	-	<b>5''</b>	4,09	65,53
<b>13</b>	4,69	77,4	<b>5''Me</b>	1,34	18,27

<sup>a</sup> nije opažen signal

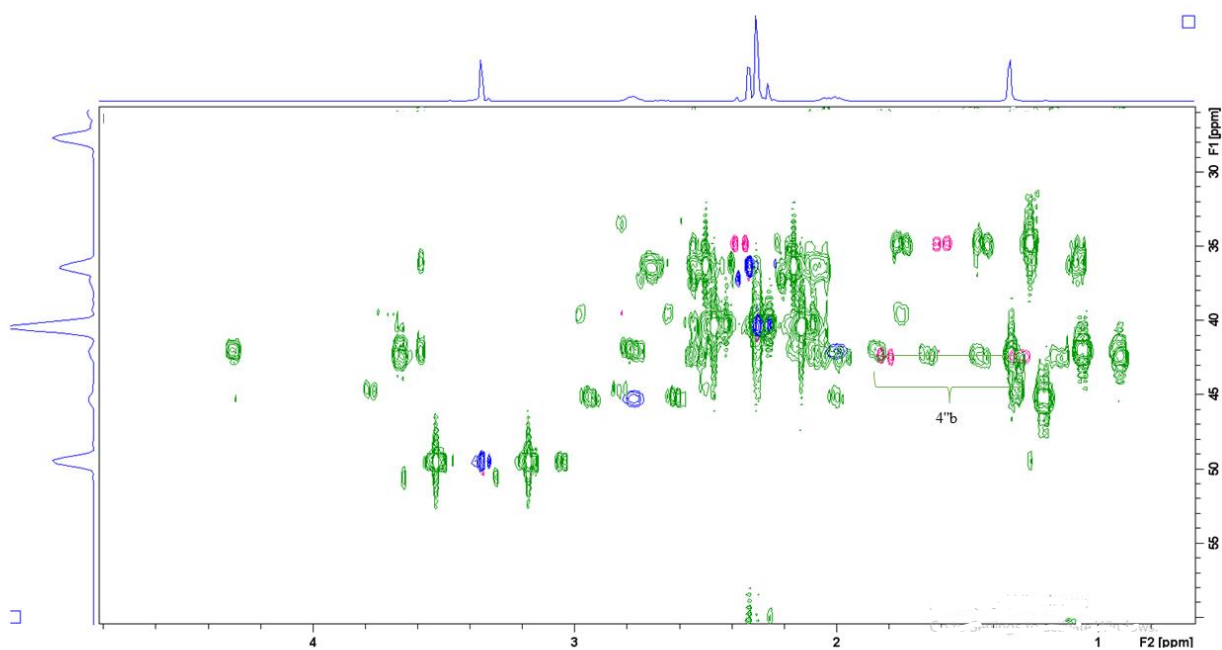




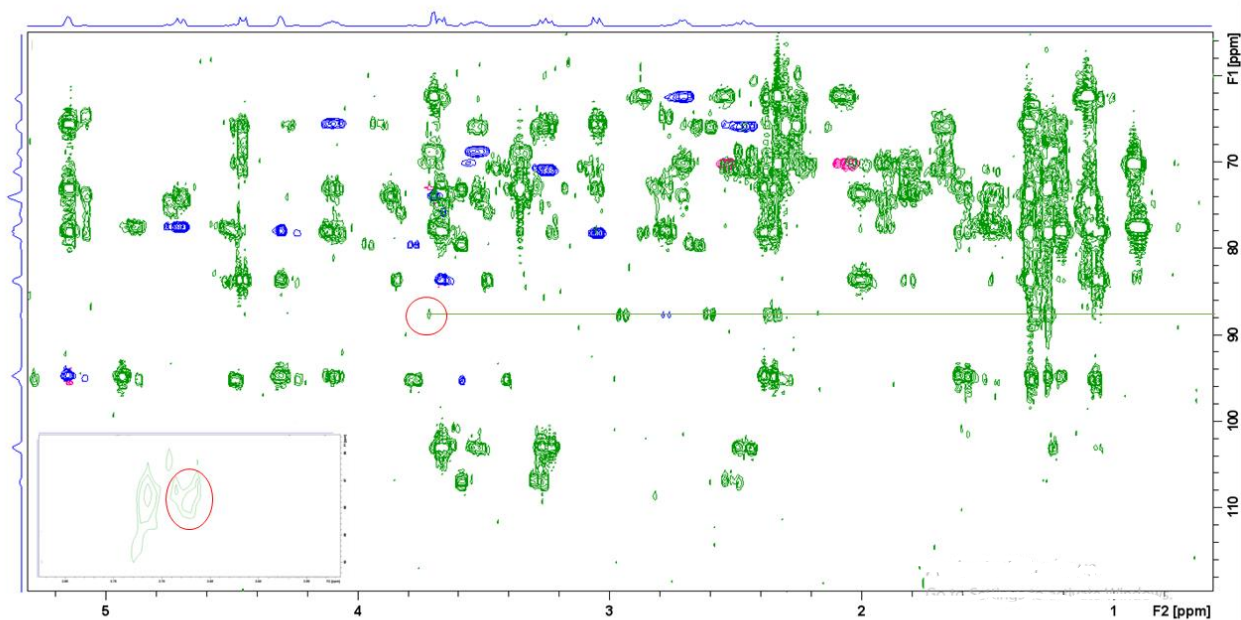
Slika 30. Spektar HSQC NMR spoja  $M4''$  snimljen u kloroformu-d pri 298K s označenim korelacijskim signalima ogranka  $C4''a-C4''c$ .



Slika 31. Uvećani dio preklopljenog spektra HMBC (zeleni signali) spoja  $M4''$  i spektra HSQC (plavi i rozi signali) spoja  $M4''$  snimljen u kloroformu-d pri 298K s označenim korelacijskim signalima ugljika  $C4''b$  s protonima  $H4''a$  i  $H4''b$ .



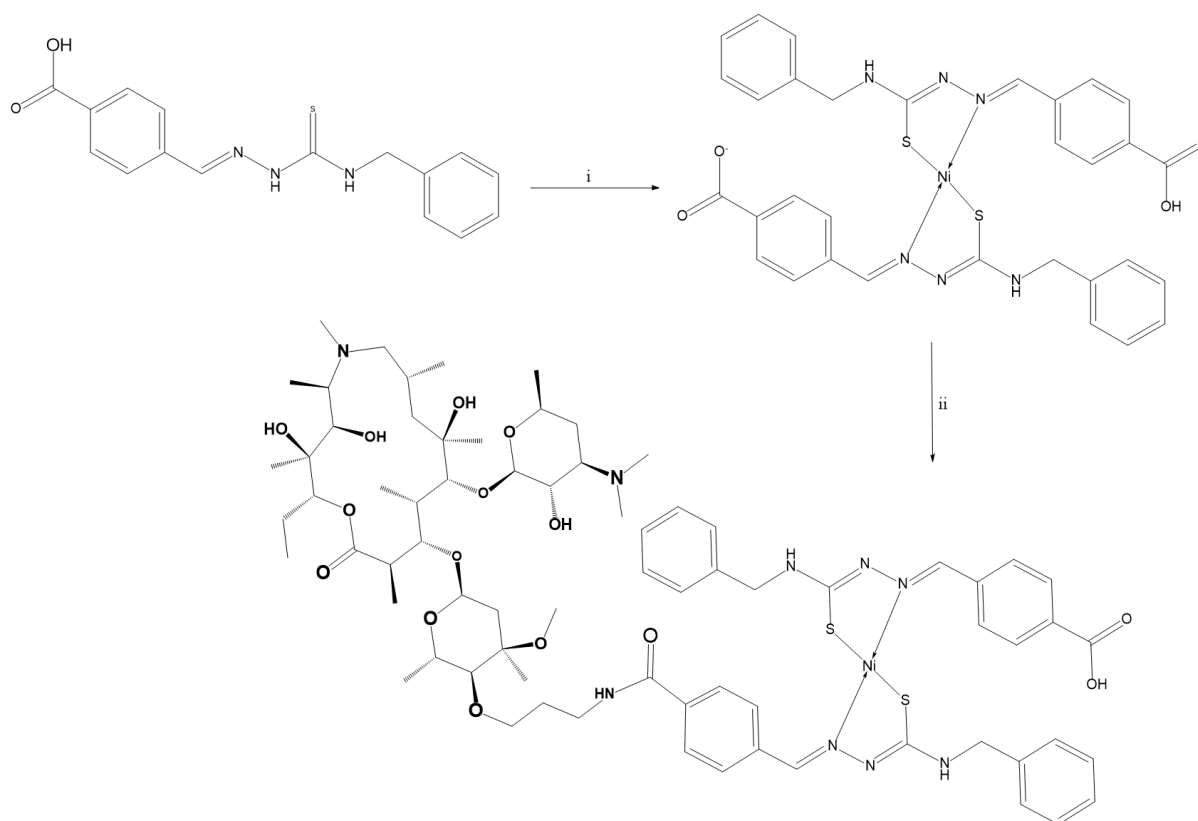
Slika 32. Uvećani dio preklopljenog spektra HMBC (zeleni signali) spoja M4'' i spektra HSQC (plavi i rozi signali) spoja M4'' snimljen u kloroformu-d pri 298K s označenim korelacijskim signalima ugljika C4''c s protonima H4''b.



Slika 33. Uvećani dio preklopljenog spektra HMBC (zeleni signali) spoja M4'' i spektra HSQC (plavi i rozi signali) spoja M4'' snimljen u kloroformu-d pri 298K s označenim korelacijskim signalima ugljika C4'' s protonom H4''a.

### 4.3. Priprava i karakterizacija kompleksa makrozona $M4''$ -Ni(II)-P6

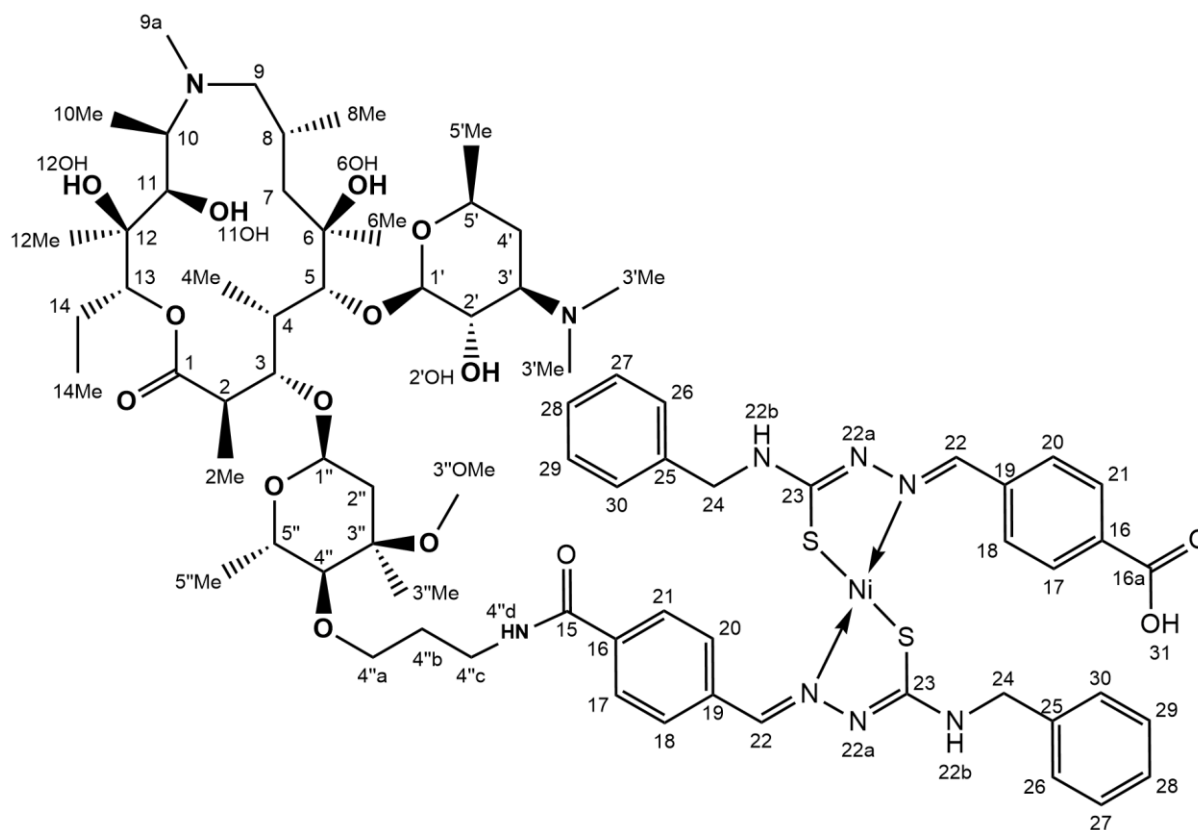
Konačan produkt, niklov kompleks makrozona, pripremljen je reakcijom prethodno pripremljenog tiosemikarbazona **P6**, aminopropilnog derivata azitromicina –  $M4''$  i  $Ni(OAc)_2 \times 4H_2O$  uz dodatak TEA-a i HATU. U prvom koraku, prilikom formiranja kompleksa Ni(II)-P6, dodatkom TEA-a dolazi do deprotonacije karboksilne skupine pri čemu nastaje karboksilatni anion i trietilamonijeva sol. U drugom je koraku dodan HATU koji se u ovoj reakciji ponaša kao dehidratacijsko sredstvo i reagira s karboksilatnim anionom (nukleofil), pri čemu HATU postaje dobra izlazna skupina. Makrozon je formiran nukleofilnim napadom amino skupine  $M4''$  na ugljikov atom karboksilne skupine aktiviranog estera (Shema 12.).



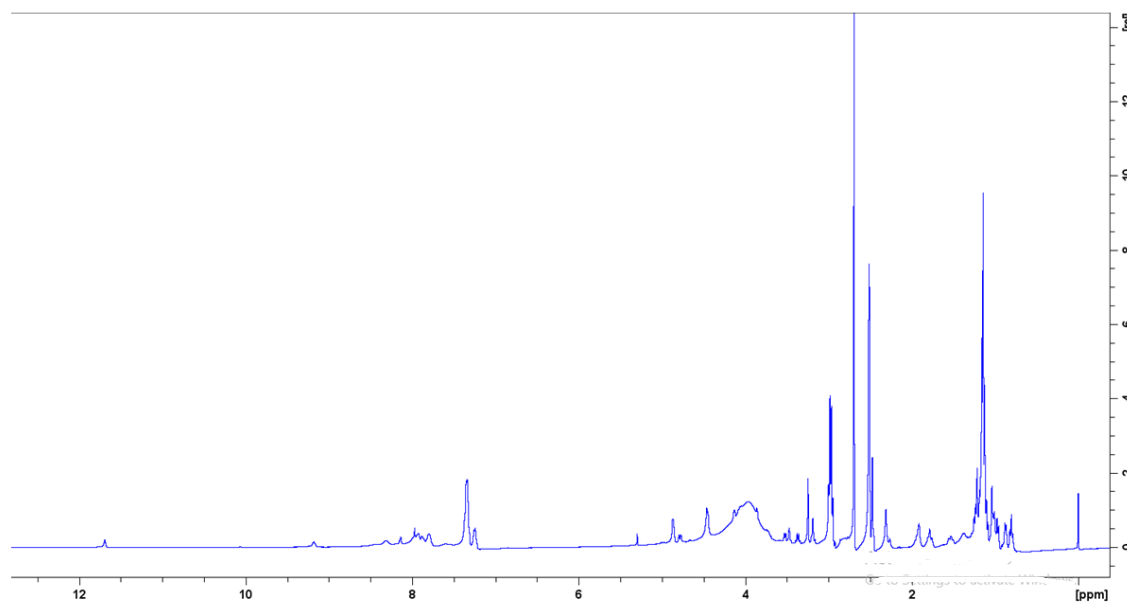
Shema 12. Priprava makrozona  $M4''$ -Ni(II)-P6. (i)  $Ni(OAc)_2 \times 4H_2O$ , TEA, DCM, s.t., 30 min; (ii) HATU,  $M4''$ , s.t., 24 h.

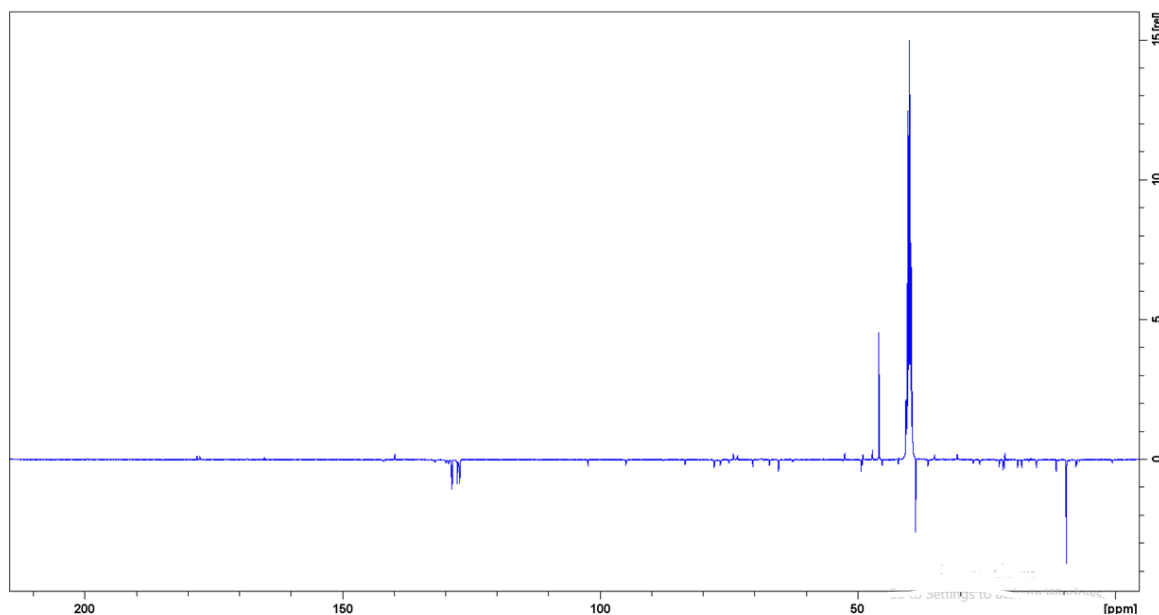
Karakterizacija kompleksa nikla(II) s makrozonским 4'' derivatom azitromicina provedena je pomoću spektroskopije NMR. Kombinacijom podataka dobivenih iz snimljenih jedno- i dvodimenzijskih spektara NMR predložena je struktura makrozona  $M4''$ -Ni(II)-P6 (Slika 34.).

Zbog veličine i kompleksnosti spoja **M4''-Ni(II)-P6** dolazi do preklapanja pojedinih signala te oni u daljnjim spektrima NMR nisu vidljivi. U Tablici 8. nalaze se kemijski pomaci asigniranih atoma u spektrima  $^1\text{H}$  (Slika 35.) i DEPT-Q (Slika 36.), koji su potvrđeni na temelju korelacije protona i ugljika kroz jednu kemijsku vezu analizom spektra HMQC (Slika 38.). Nadalje, u spektru  $^1\text{H}$  NMR vidljivi su signali pri 2,31 ppm i 2,47 ppm koji ukazuju na to da je dio kompleksa deprotonirana karboksilna skupina a dio trietil amonijeva sol. U usporedbi s kemijskim pomacima protona u spektru  $^1\text{H}$  NMR spoja M4'', prilikom povezivanja kompleksa Ni(II)-P6 s M4'' dolazi do odsjenjenja protona H4''c i H4''d zbog anizotropnog utjecaja elektrona karbonilnog kisika na atomu C15. Također, zbog utjecaja atoma dušika na položaju 4''d, ugljikov atom C16 odsjenjeniji je u spektru DEPT-Q makrozona nego u onom tiosemikarbazona. U spektru COSY (Slika 37.) vide se dva spinska sustava od kojih jedan pripada kompleksu Ni(II)-P6 (iznad 6 ppm-a) a drugi makrolidu M4'' (ispod 6 ppm-a). Najodsjenjeniji signal pri 11,69 ppm koji ne korelira niti s jednim drugim protonom odgovara protonu H31, odnosno karboksilatnoj skupini nevezanog liganda. Da je došlo do povezivanja kompleksa Ni(II)-P6 s M4'' na željenom mjestu potvrđuje nam spektar HMBC (Slika 39.). U spektru HMBC vidi se korelacija atoma C15 (165,09 ppm) s protonima H4''d (7,97 ppm) i H4''c (3,87 ppm) te korelacija atoma C25 (128,5 ppm) s H24 (4,88 ppm) i H26,30 (7,25 ppm). Uvećanjem spektra HMBC potvrđena je korelacija atoma C16a (178,17 ppm) s H31 (11,69 ppm).



Slika 34. Struktura makrozona M4''-Ni(II)-P6 uz označene lokante.

Slika 35. Spektar  $^1\text{H}$  makrozonskog kompleksa Ni(II)-P6-M4'' snimljen u DMSO- $d_6$  pri 298K.



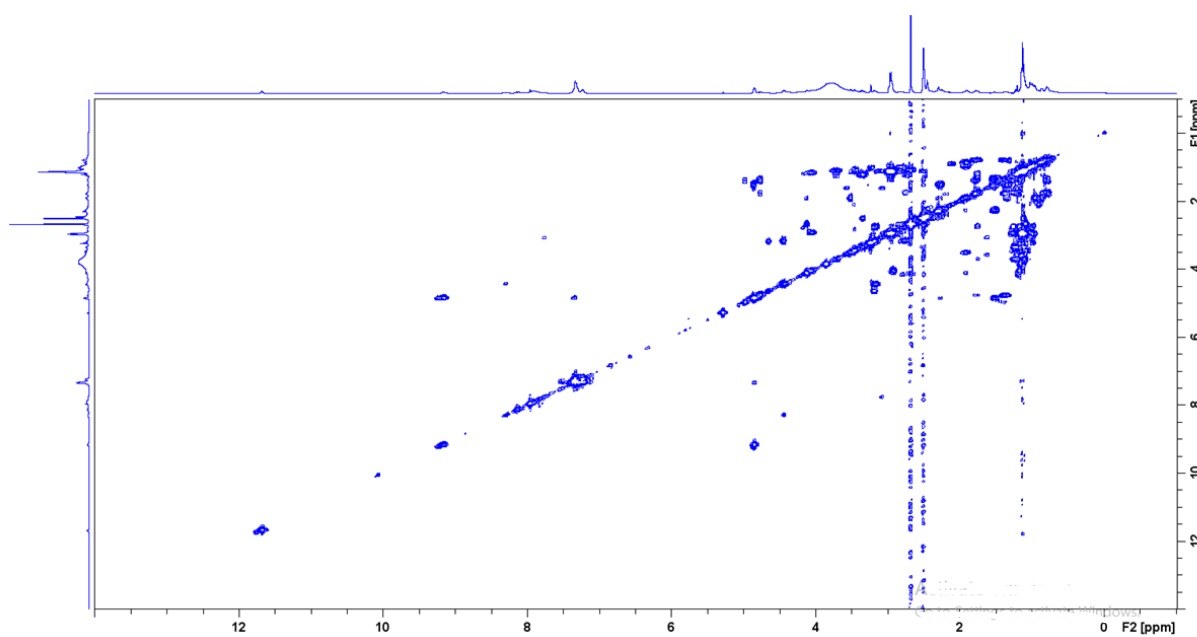
Slika 36. Spektar DEPT-Q makroznskog kompleksa Ni(II)-P6-M4'' snimljen u DMSO-d<sub>6</sub> pri 298K.

Tablica 7. Asignacija kemijskih pomaka <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C makroznskog kompleksa Ni(II)-P6-M4''.

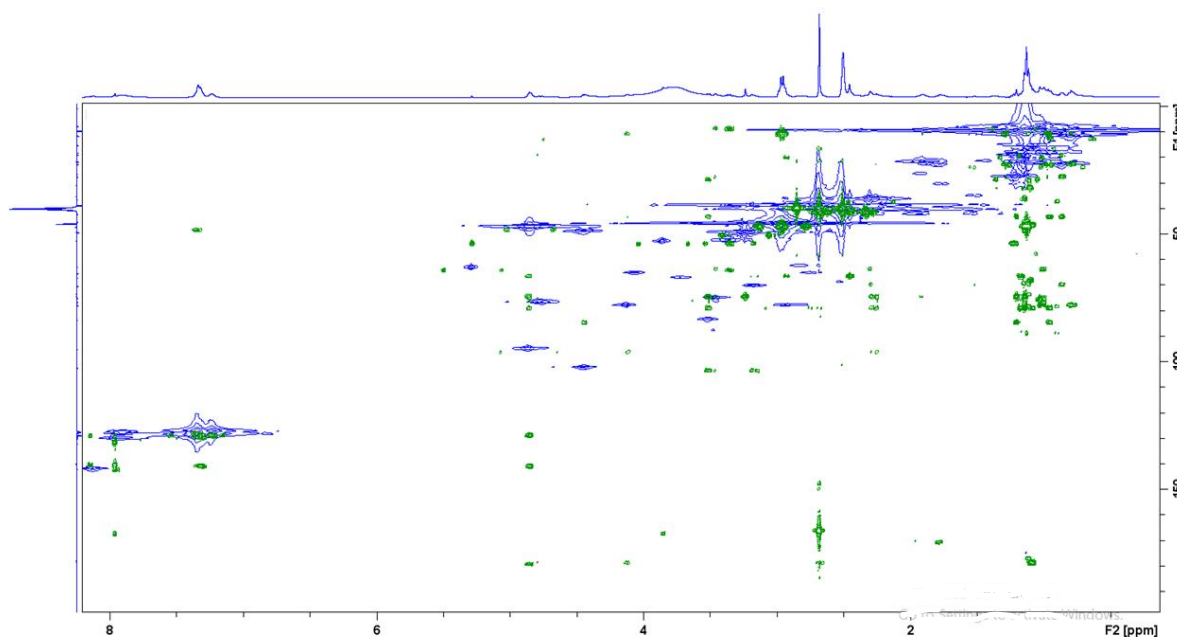
Spoj	M4''				
Atom	$\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C})/\text{ppm}$	Atom	$\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C})/\text{ppm}$
<b>1</b>	-	177,62	<b>14</b>	- <sup>a</sup>	21,38
<b>2</b>	2,97	45,20	<b>14Me</b>	- <sup>a</sup>	11,432
<b>2Me</b>	- <sup>a</sup>	15,28	<b>1'</b>	4,45	102,27
<b>3</b>	4,13	77,81	<b>2'</b>	3,17	70,30
<b>4</b>	3,50	42,09	<b>2'OH</b>	- <sup>a</sup>	-
<b>4Me</b>	1,06	9,46	<b>3'</b>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>
<b>5</b>	3,53	83,45	<b>3'NMe<sub>2</sub></b>	2,69	40,36
<b>6</b>	- <sup>a</sup>	73,10	<b>4'</b>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>
<b>6Me</b>	- <sup>a</sup>	27,49	<b>5'</b>	3,52	68,15
<b>7</b>	- <sup>a</sup>	45,83	<b>5'Me</b>	- <sup>a</sup>	21,48
<b>8</b>	- <sup>a</sup>	26,29	<b>1''</b>	4,78	94,96
<b>8Me</b>	- <sup>a</sup>	21,76	<b>2''</b>	- <sup>a</sup>	35,06
<b>9</b>	- <sup>a</sup>	68,58	<b>3''</b>	-	70,30
<b>9aN</b>	2,25	36,33	<b>3''Me</b>	1,19	18,90
<b>10</b>	- <sup>a</sup>	65,31	<b>3''OMe</b>	3,24	49,24
<b>10Me</b>	1,01	- <sup>a</sup>	<b>4''</b>	3,48	87,67
<b>11</b>	3,47	74,90	<b>4''a</b>	3,72	73,29
<b>11OH</b>	- <sup>a</sup>	-	<b>4''b</b>	- <sup>a</sup>	30,63
<b>12</b>	-	- <sup>a</sup>	<b>4''c</b>	3,87	39,97
<b>12Me</b>	1,04	16,79	<b>4''d</b>	7,97	-
<b>12OH</b>	- <sup>a</sup>	-	<b>5''</b>	4,77	67,09

<b>13</b>	4,99	76,65	<b>5''Me</b>	1,13	18,13
<b>15</b>	-	165,09	<b>24</b>	4,86	47,09
<b>16</b>	-	139,78	<b>25</b>	-	128,50
<b>17, 21</b>	7,23; 8,132	127,19	<b>26, 30</b>	7,25	128,63
<b>18, 20</b>	7,89	127,67	<b>27, 29</b>	7,34	128,75
<b>19</b>	-	137,47	<b>28</b>	-	129,85
<b>22</b>	8,31	141,94	<b>16a</b>	-	178,17
<b>22b</b>	9,17	-	<b>31</b>	11,69	-
<b>23</b>	-	139,84			

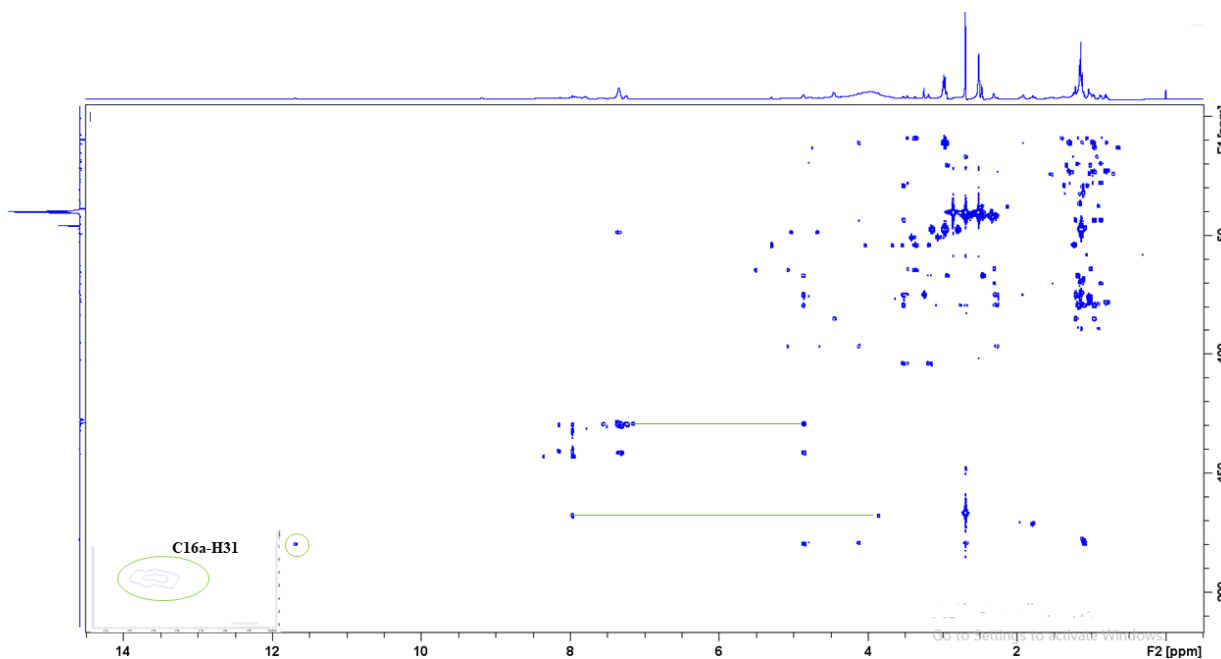
<sup>a</sup> nije opažen signal



Slika 37. Spektar COSY makrozonskog kompleksa Ni(II)-P6-M4'' snimljen u DMSO-d<sub>6</sub> pri 298K.



Slika 38. Preklopljeni spektar HMQC (plavi signali) i HMBC (zeleni signali) makroznskog kompleksa Ni(II)-P6-M4'' snimljen u DMSO-d<sub>6</sub> pri 298K.



Slika 39. Spektar HMBC makroznskog kompleksa Ni(II)-P6-M4'' s označenim korelacijskim signalima C15 s H4''c i H4''d, C25 s H24 i H26,30, te uvećani dio korelacijskog signala atoma C16a i H31 snimljen u DMSO-d<sub>6</sub> pri 298K.



#### 4.4. Biološka aktivnost

Određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), prema standardnim protokolima (CLSI, engl. *Clinical Laboratory Standards Institute*) dobivena je antibakterijska aktivnost *in vitro* za novo pripravljeni makrozon M4''-Ni(II)-P6.

Biološka aktivnost makrozona napravljena je na nekoliko rezistentnih i susceptibilnih sojeva bakterija koje uzrokuju različite infekcije u organizmu. Poput azitromicina, makrozon **M4''-Ni(II)-P6** nije pokazao aktivnost na sojeve *S. pneumoniae* B0633, *S. pyogenes* B0544, *S. aureus* B0331, *S. aureus* B0330 i *S. cerevisiae* ATCC 7752. Nadalje, vrlo dobra biološka aktivnost (1-16 µg/mL) dobivena je za sojeve *S. pneumoniae* B0326, *S. pyogenes* B0545, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC, *E. coli* ATCC 25922. Makrozon je pokazao izvrsnu aktivnost na gram negativne bakterije *E. coli* ATCC 25922 (MIK = 8 µg/mL), koja je čak osam puta veća nego za antibiotik azitromicin. Dobiveni je rezultat od velike važnosti iz razloga što je zbog posebne strukture vanjske membrane gram-negativnih bakterija jako teško razviti antibiotik na koji one neće biti rezistentne. Najbolja antibakterijska aktivnost (MIK ≤0.125 µg/mL) opažena je za sojeve *S. pneumoniae* B0652, *S. pyogenes* B0542 i *M. catarrhalis* ATCC 23246.

U Tablici 9. prikazane su minimalne inhibitorne koncentracije pripravljenog makrozona kao i azitromicina. 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).

Tablica 8. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) sintetiziranog makrozona i antibiotika azitromicina na različite Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije.

		<b>M4''-Ni(II)-P6</b>	<b>Azitromicin</b>
		<b>MIK (µg/mL)</b>	
<b>G+</b>	<i>S. pneumoniae</i> B0652 (M)	≤0.125	≤0.125
<b>G+</b>	<i>S. pneumoniae</i> B0326 (cMLS)	16	16
<b>G+</b>	<i>S. pneumoniae</i> B0633	>64	>64
<b>G+</b>	<i>S. pyogenes</i> B0542 (M)	≤0.125	≤0.125
<b>G+</b>	<i>S. pyogenes</i> B0545 (cMLS)	16	16
<b>G+</b>	<i>S. pyogenes</i> B0544	>64	>64
<b>G+</b>	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 (M)	2	1
<b>G+</b>	<i>S. aureus</i> B0331 (cMLS)	>64	>64
<b>G+</b>	<i>S. aureus</i> B0330	>64	>64
<b>G+</b>	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	8	8
<b>G-</b>	<i>M.catarrhalis</i> ATCC 23246	≤0.125	≤0.125
<b>G-</b>	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<b>8</b>	>64
	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 7752	>64	>64

## § 5. ZAKLJUČAK

U sklopu ovog diplomskog rada uspješno je pripremljen i okarakteriziran makrozonski kompleks nikla(II) s 4'' derivatom azitromicina. S obzirom na vrlo dobru biološku aktivnost kompleksa tiosemikarbazon-metalni ion i izvrsna farmakokinetička svojstva azitromicina, pripremom kompleksa makrozona proširen je spektar antiinfektivnih spojeva s posebnim naglaskom na rezistentne sojeve.

Struktura dobivenog konačnog spoja, **M4''-Ni(II)-P6**, potvrđena je pomoću jednodimenzijskih i dodimenzijskih tehnika NMR, a međuprodukti su okarakterizirani i infracrvenom spektroskopijom te difrakcijom rentgenskog zračenja na monokristalu.

Najznačajniji doprinos ovog istraživanja je u postizanju vrlo dobre biološke aktivnosti makrozonskog kompleksa M4''-Ni(II)-P6 na različite sojeve gram pozitivnih i gram negativnih bakterijskih sojeva. Posebno se ističe aktivnost kompleksa na gram negativnu bakteriju *E. coli* ATCC 25922, koji je pokazao čak osam puta veću aktivnost u usporedbi s antibiotikom azitromicinom. Izuzev izvrsne biološke aktivnosti na gram negativne bakterije, dobiveni spoj pokazao je odličnu aktivnost za sojeve *S. pneumoniae* B0652, *S. pyogenes* B0542 i *M. catarrhalis* ATCC 23246. sliču azitromicinu.

Rezultati dobiveni u ovom diplomskom radu mogu poslužiti kao dobar temelj za daljnja istraživanja i razvoj derivata makrolida sa svrhom suzbijanja rezistencije bakterija na već postojeće antibiotike s posebnim naglaskom na gram negativne sojeve.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ATR – attenuated total reflection

COSY – correlation spectroscopy

DCM – diklormetan

DEPT – distortionless enhancement by polarisation transfer

DIPEA – *N,N*-diizopropiletilamin

DMSO-*d*<sub>6</sub> – deuterirani dimetil sulfoksid

FDA – Food and Drug Administration

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

heksafluorofosfat

HMBC – heteronuclear multiple bond correlation

HMQC – heteronuclear multiple quantum coherence

HSQC – heteronuclear single quantum coherence

MeOH – metanol

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

NMR – nuklearna magnetna rezonancija (engl. *nuclear magnetic resonance*)

RNA – ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

rRNA – ribosomska ribonukleinska kiselina

THF – tetrahidrofur

TLC – tankoslojna kromatografija

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. I. Arslan, *Encyclopedia of Infection and Immunity* **2022**, 652–661.
2. R. B. Woodward, *Angew. Chem.* **69** (1957) 50–58.
3. M. Bukvić Krajačić, M. Dumić, P. Novak, M. Cindrić, S. Koštrun, A. Fajdetić, S. Alihodžić, K. Brajša and N. Kujundžić, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21** (2011) 853–856
4. B. Arsić, P. Novak, M. G. Rimoli, J. Barber, G. Kragol, F. Sodano, *Macrolides: Properties, Synthesis and applications*, De Gruyter, Berlin, 2019, str. 1–73.
5. M. Gopalakrishnan et al, *Chem. J.* **42** (2008) 271–276.
6. N. Siddiqui, O. Singh, *Indian J. Pharm. Sci.* **65** (2003) 423–425.
7. T. Plech et al, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 241–248.
8. P. Umadevi et al, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **4** (2012) 379–383.
9. D. L. Klayman, J. P. Scovill, J. F. Bratosevich, J. Bruce, *J. Med. Chem.* **26** (1983) 35–39.
10. H. J. Zhang et al, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 4702–4708.
11. B. Soltani, M. Ghorbanpour, C.J. Ziegler, M. Ebadi-Nahari, R. Mohammad-Rezaei, *Polyhedron* **180** (2020) 114423.
12. Z. Afrasiabi, E. Sinn, W. Lin, Y. Ma, C. Campana, *J. Inorg. Chem.* **99** (2009) 1526–1531.
13. P. H. Patel, M. F. Hashimi, *Macrolides, StatPearls*, Treasure Island, 2022.
14. T. Jednačak, I. Mikulandra, P. Novak, *Int. J. Mol. Sci.* **21** (2020) 77–99.
15. Moselio Schaechter, *Encyclopedia of Microbiology*, Academic Press, Cambridge, 2009, str. 529–558.
16. T. Sugimoto, T. Tanikawa, K. Suzuki, Y. Yamasaki, *Bioorg. Med. Chem.* **20** (2012) 5787–5801.
17. P. Fernandes, D. Pereira, P. B. Watkins, D. Bertrand, *J. Med. Chem.* (2019) <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01159>
18. A. E. Fohnera, A. Sparreboom, R. B. Altman, T. E. Klein, *Pharmacogenet. Genomics* **27** (2017) 164–167.
19. M. Gaynor, A. S. Mankin, *Curr. Top. Med. Chem.* **3** (2003) 949–960.

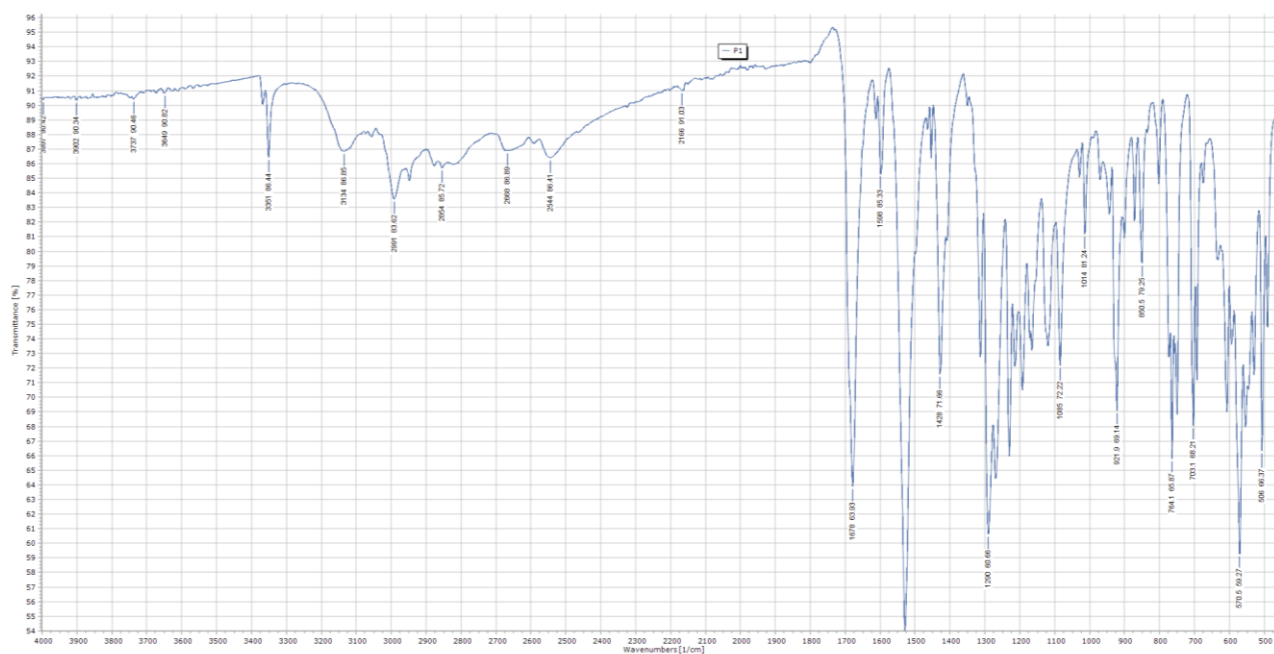
20. F. Marinelli, O. Genilloud, *Antimicrobials*, Springer–Verlag Berlin Heidelberg, 2014, str. 211–230.
21. S. Alihodžić, M. Bukvić, I. J. Elenkov, A. Hutinec, S. Koštrun, D. Pešić, G. Saxty, L. Tomašković, D. Žiher, *Progress in Medicinal Chemistry*, Elsevier, 2018, str. 113-131
22. A. Janas, P. Przybylski, *Eur. J. Med. Chem.* **182** (2019) 111662.
23. N. Vázquez-Laslop, A. S. Mankin, *Trends Biochem. Sci.*, **43** (2018) 668-684.
24. F. Franceschi, E. M. Duffy, *Biochem. Pharmacol.* **71** (2006) 1016–1025.
25. J. Poehlsgaard, S. Douthwaite, *Nature reviews. Microbiology.* **3** (2005) 870–881.
26. P. Novak, J. Barber, A. Čikoš, B. Arsić, J. Plavec, G. Lazarevski, P. Tepeš, N. KošutićHulita, *Bioorg. Med. Chem.* **17** (2009) 5857–5867.
27. D. Tu, G. Blaha, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Cell* **121** (2005) 257–270.
28. P. Novak, T. Jednačak, Z. Mandić (ur.), *Physico-chemical methods in drug discovery*, IACP, Zagreb, 2011, str. 189–231.
29. M. Sheikhy, A. R. Jalilian, A. Novinrooz, F. Motamedi-Sedeh, *J. Biomed. Sci. Eng.* **5** (2012) 39–42.
30. R. H. Drews, H. A. Gallis, *The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* **13** (2012) 634–639
31. L. Verdier, G. Bertho, J. Gharbi-Benarous, J. P. Girault, *Bioorg. Med. Chem.* **8** (2000) 1225–1243
32. I. Grgičević, I. Mikulandra, M. Bukvić, M. Banjanac, V. Radovanović, I. Habinovec, B. Bertoša, P. Novak, *Int. J. Antimicrob. Agents* **56** (2020) 106147
33. S. Kosol, E. Schrank, M. Bukvić, G. E. Wagner, N. H. Meyer, C. Göbl, K. Zangger, P. Novak, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 5632–5636.
34. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (datum pristupa 3. lipnja 2022)
35. L. Katz, A.S. Mankin T. Schmidt (ur.), *Encyclopedia of Microbiology*, Academic Press, Massachusetts, 2009 str. 529–558.
36. J. C. Pechere, *Int. J. Antimicrob. Agents.* **18** (2001) 25–28.
37. B. Weisblum, *Antimicrob. Agents Chemother.* **39** (1995) 577–585.
38. N. Davydova, V. Streltsov, M. Wilce, A. Liljas, M. Garber, *J. Mol. Biol.* **322** (2002) 635– 644.

39. C. Fyfe, T. H. Grossman, K. Kerstein, J. Sutcliffe, *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* **10** (2016).
40. C.H. Ballow, G. W. Amsden, *Annals of Pharmacotherapy*, 26 (1992) 1253-1261
41. I. B. Seiple, Z. Zhang, P. Jakubec, A. Langlois-Mercier, P. M. Wright, D. T. Hoh, K. Yabu, S. Rao Allu, T. Fukuzaki, P. N. Carlsen, Y. Kitamura, X. Zhou, M. L. condakes, F. T. Szczypinski, W. D. Green, A. G. Myers, *Nature* **533** (2016) 338.
42. P. Fernandes, D. Pereira, P. B. Watkins, D. Bertrand, *J. Med. Chem.* **63** (2019) 6462–6473.
43. V. Godinić Mikulčić, *Studia lexicographica* **12** (2018) 33–52.
44. T. S. Lobana, R. Sharma, G. Bawa, S. Khanna, *Coord. Chem. Rev.* **253** (2009) 977–1055.
45. A. Gaber, M. S. Refat, A. A. M. Belal, I. M. El-Deen, N. Hassan, R. Zakaria, M. Alhomrani, A. S. Alamri, W. F. Alsanie, E. M. Saied, *Molecules* **26** (2021) <https://doi.org/10.3390/molecules26082288>
46. Z. Afrasiabi, E. Sinn, W. Lin, Y. Ma, C. Campana, S. Padhye, *J. Inorg. Chem.* **99** (2005) 1526-1531.
47. K. Pičuljan, *Struktura i vodikove veze derivata tiosemikarbazona u otopini*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2014, str. 5–10.
48. Z. Afrasiabi, E. Sinn, W. Lin, Y. Ma, C. Campana, *J. Inorg. Chem.* **99** (2009) 1526–1531.
49. B. Soltani, M. Ghorbanpour, C.J. Ziegler, M. Ebadi-Nahari, R. Mohammad-Rezaei, *Polyhedron* **180** (2020) 114423
50. H. B. Shawish, W. Y. Wong, Y. W. Wong, S. W. Loh, C. Y. Looi, P. Hassandarvish, A. Y. L. Phan, W. F. Wong, H. Wang, I. C. Paterson, C. K. Ea, M. R. Mustafa, M. J. Maah, *PLOS ONE* **9** (2014)
51. J. S. Casas, M. S. García-Tasende, J. Sordo, *Coord. Chem. Rev.*, **209** (2000), 197–261.
52. R. W. Brockman, R. W. Sidwell, G. Arnett, S. Shaddix, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **133** (1970) 609–614.
53. Giorgio Pelosi, *The Open Crystallography Journal* **3** (2010) 16-28.
54. J. Shao, B. Zhou, A. J. Di Bilio, L. Zhu, T. Wang, C. Qi, J. Shih, Y. Yen, *Mol. Cancer Ther.* **5** (2006) 586–592.

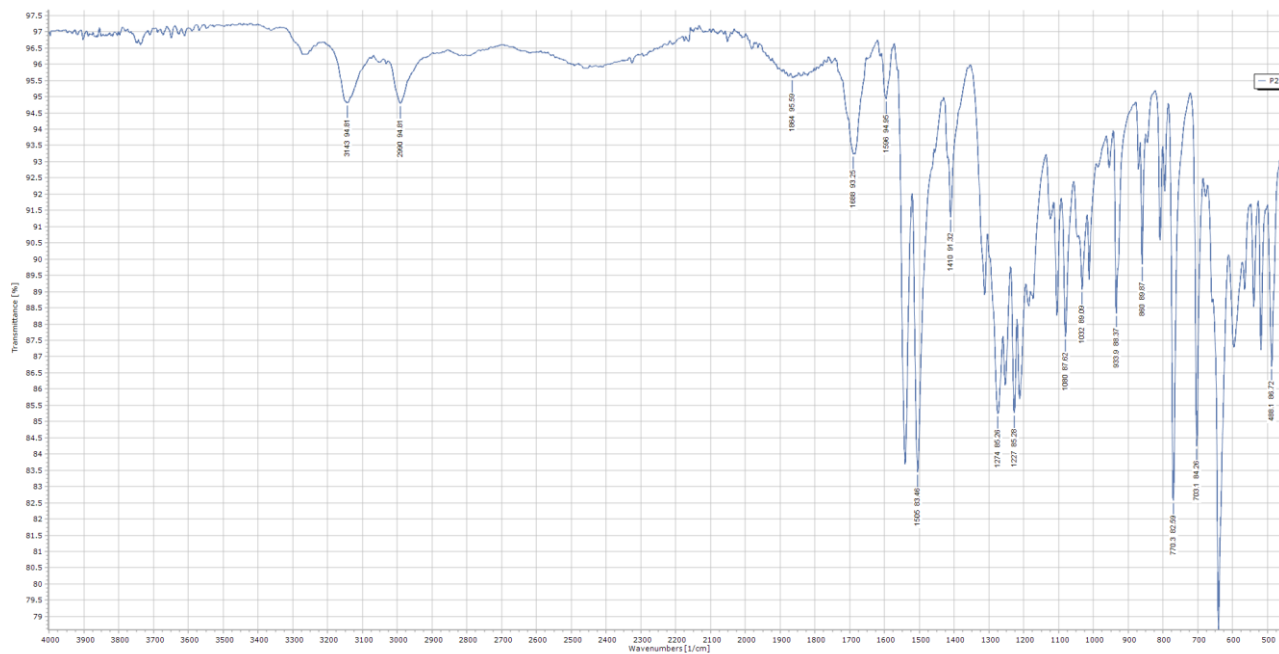
- 
55. J. A. Ludwig, G. Szakács, S. E. Martin, B. F. Chu, C. Cardarelli, Z. E. Sauna, N. J. Caplen, H. M. Fales, S. V. Ambudkar, J. N. Weinstein, M. M. Gottesman, *Cancer Res.* **66** (2006) 4808–4815.
56. C. Wu, S. Shukla, A. M. Calcagno, M. D. Hall, M. M. Gottesman, S. V. Ambudkar, *Mol. Cancer Ther.* **6** (2007) 3287–3296.



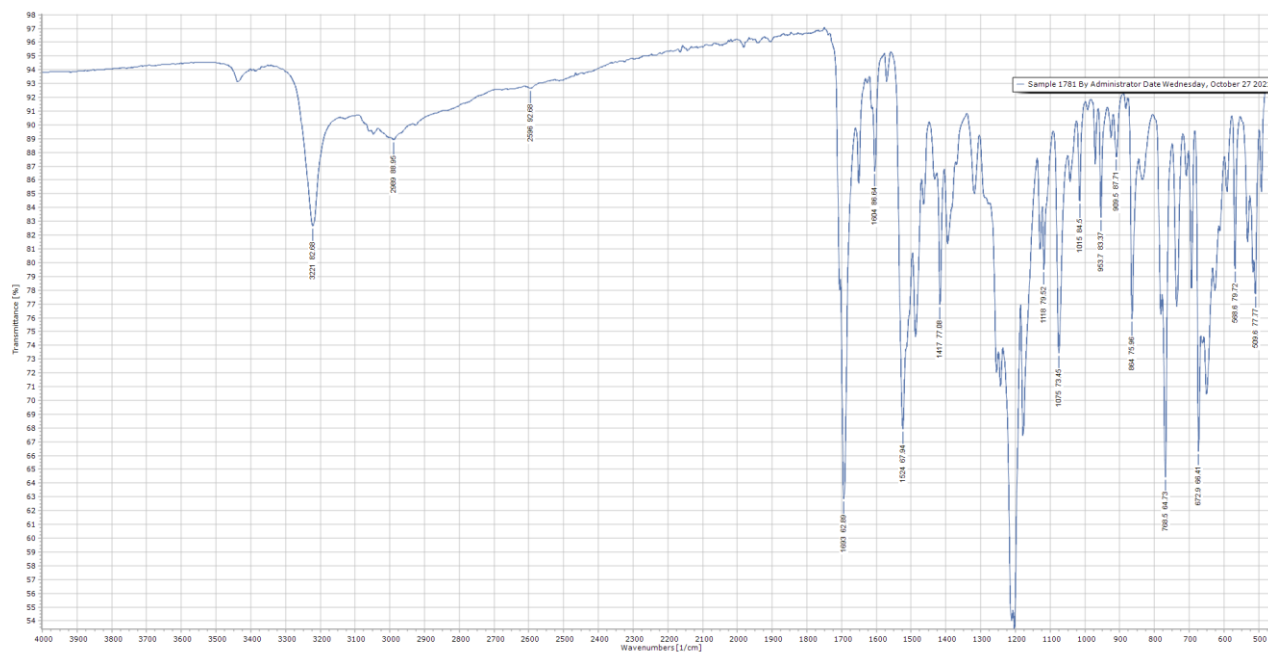
## § 8. DODATAK



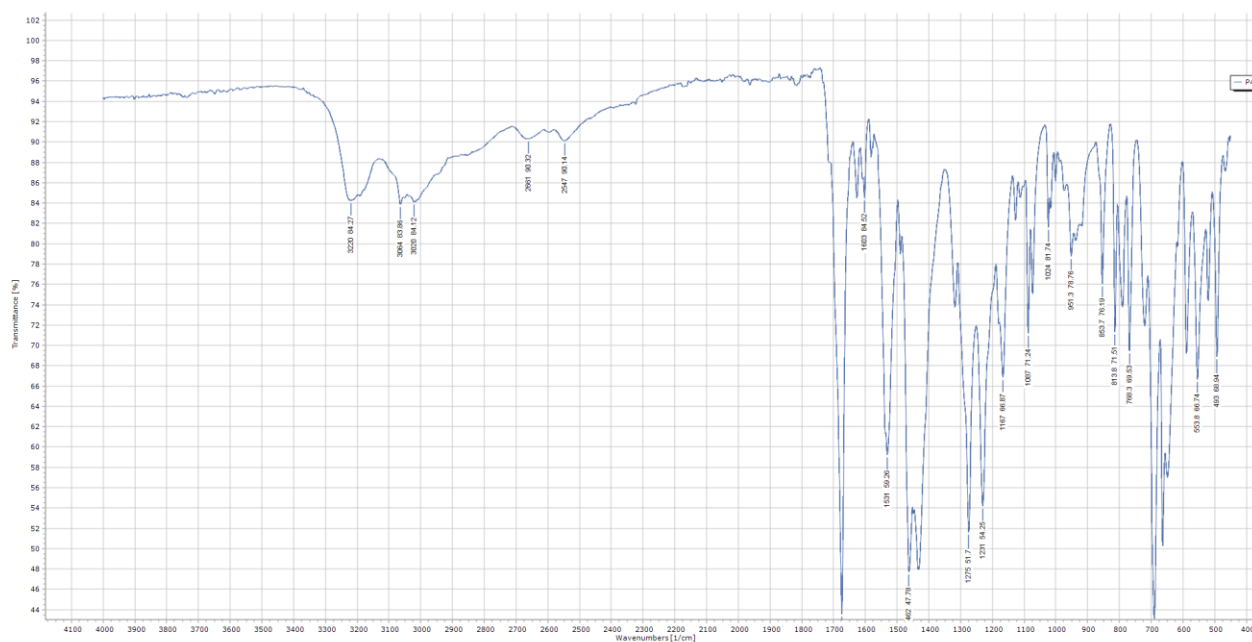
Slika D1. Snimljeni IR spektar tiosemikarbazona P1.



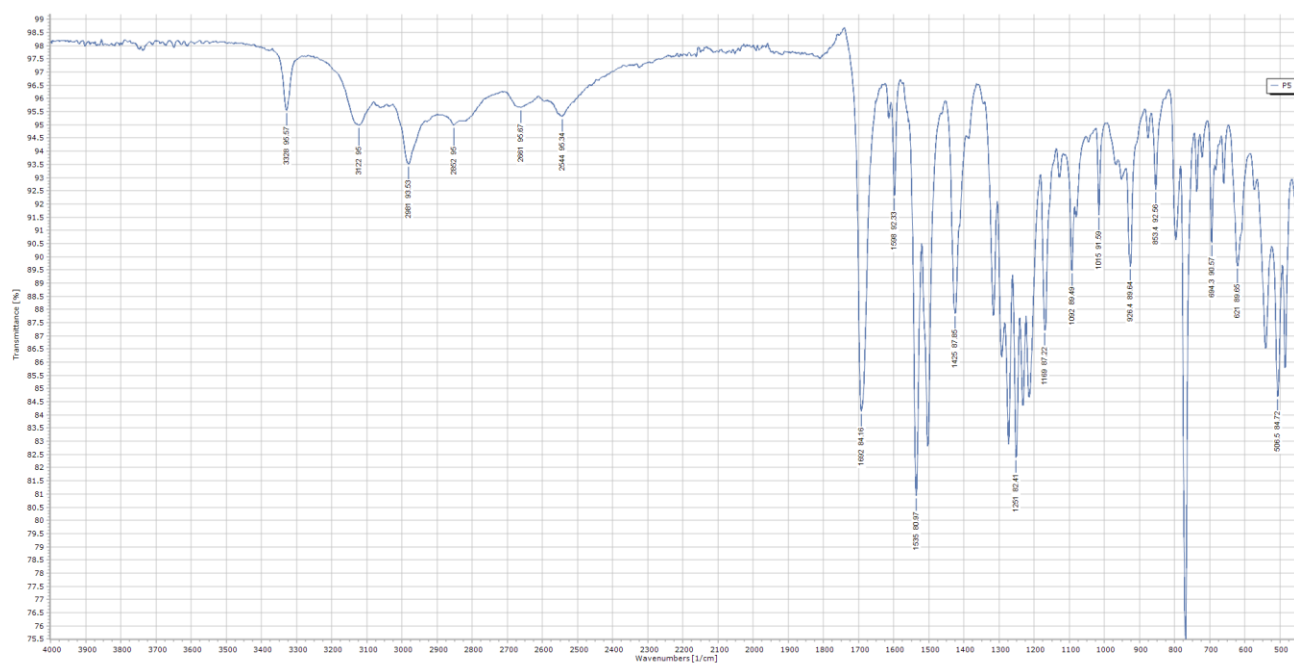
Slika D2. Snimljeni IR spektar tiosemikarbazona P2.



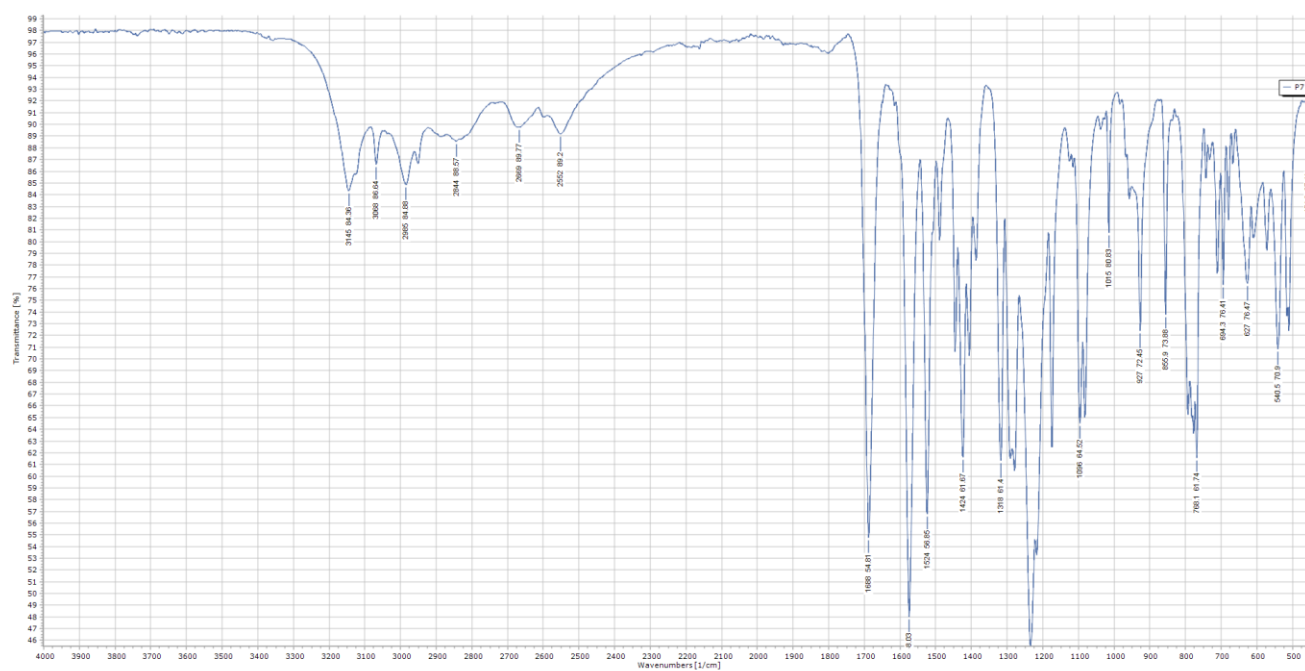
Slika D3. Snimljeni IR spektar tiosemikarbazona P3.



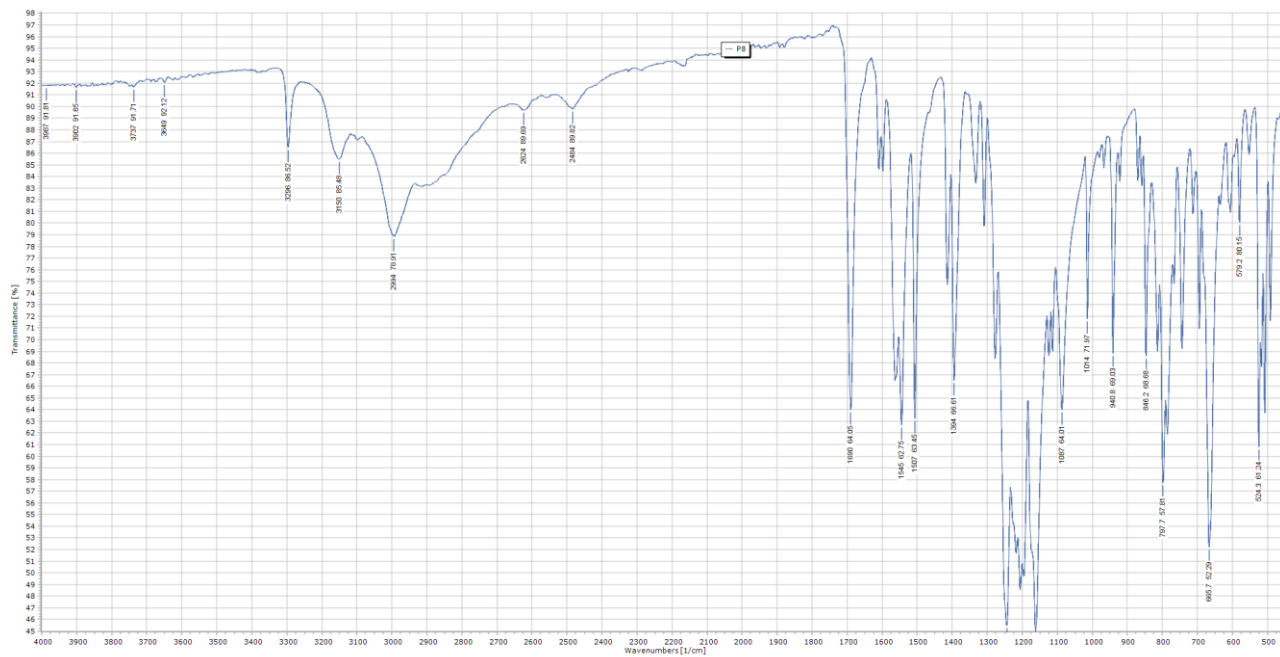
Slika D4. Snimljeni IR spektar tiosemikarbazona P4.



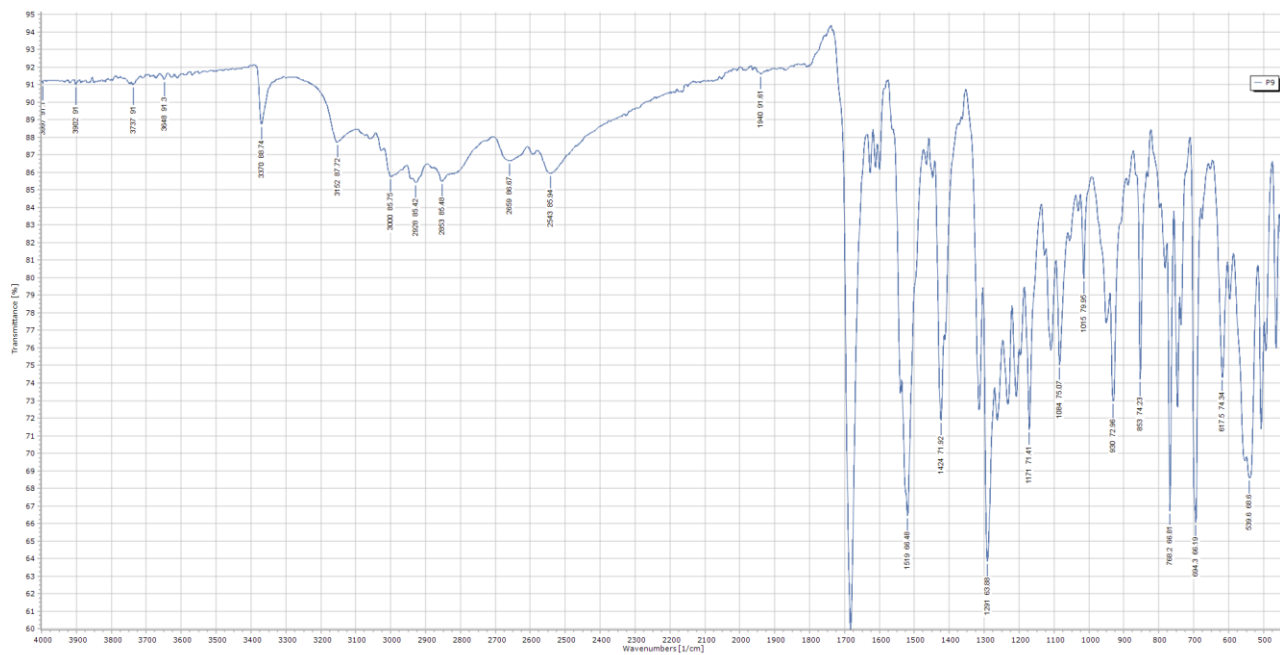
Slika D5. Snimljeni IR spektar tiosemikarbazona P5.



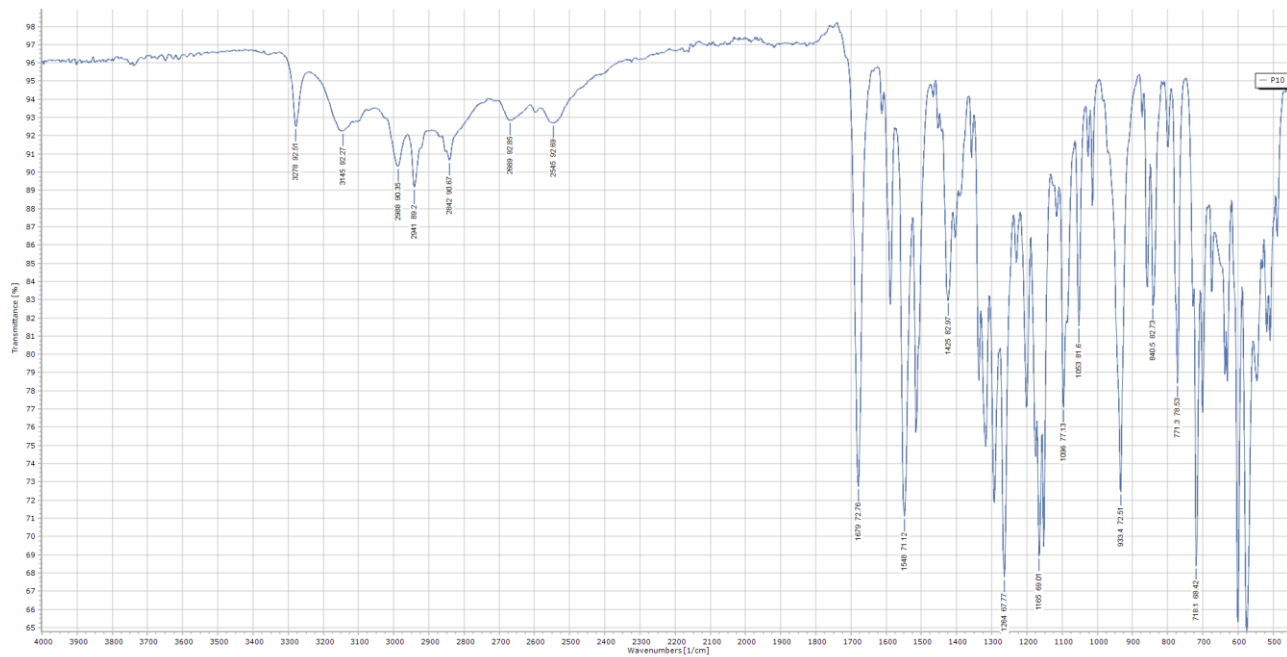
Slika D6. Snimljeni IR spektar tiosemikarbazona P7.



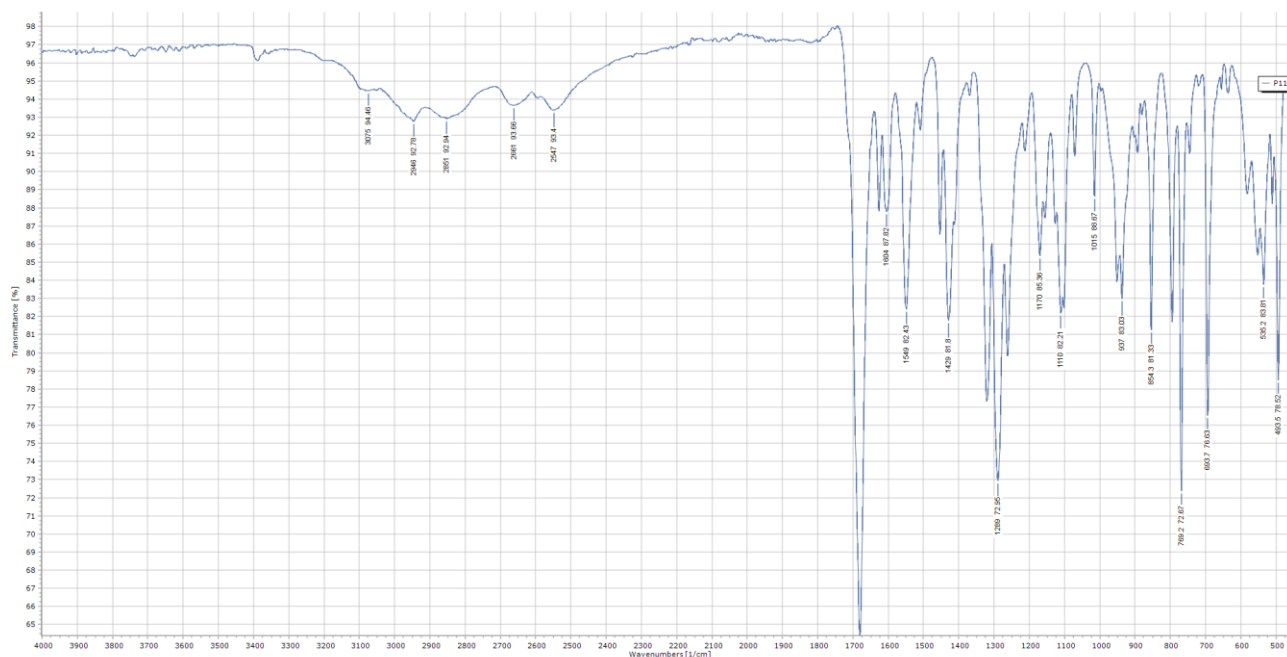
Slika D7. Snimljeni IR spektar tiosemikarbazona P8.



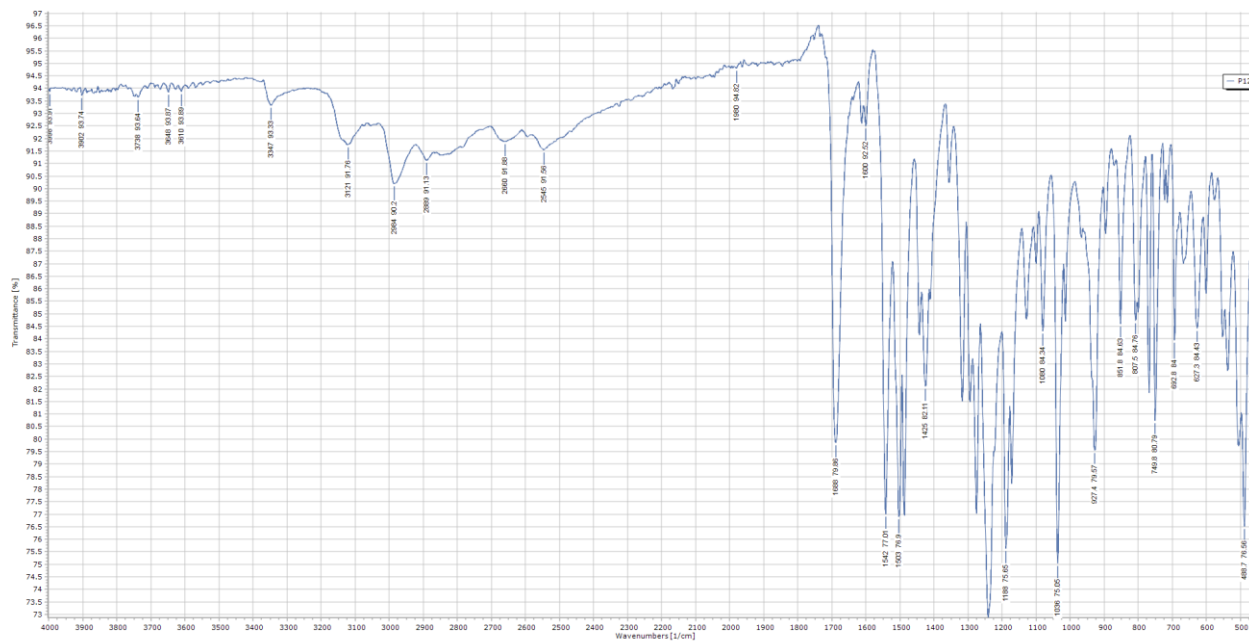
Slika D8. Snimljeni IR spektar tiosemikarbazona P9.



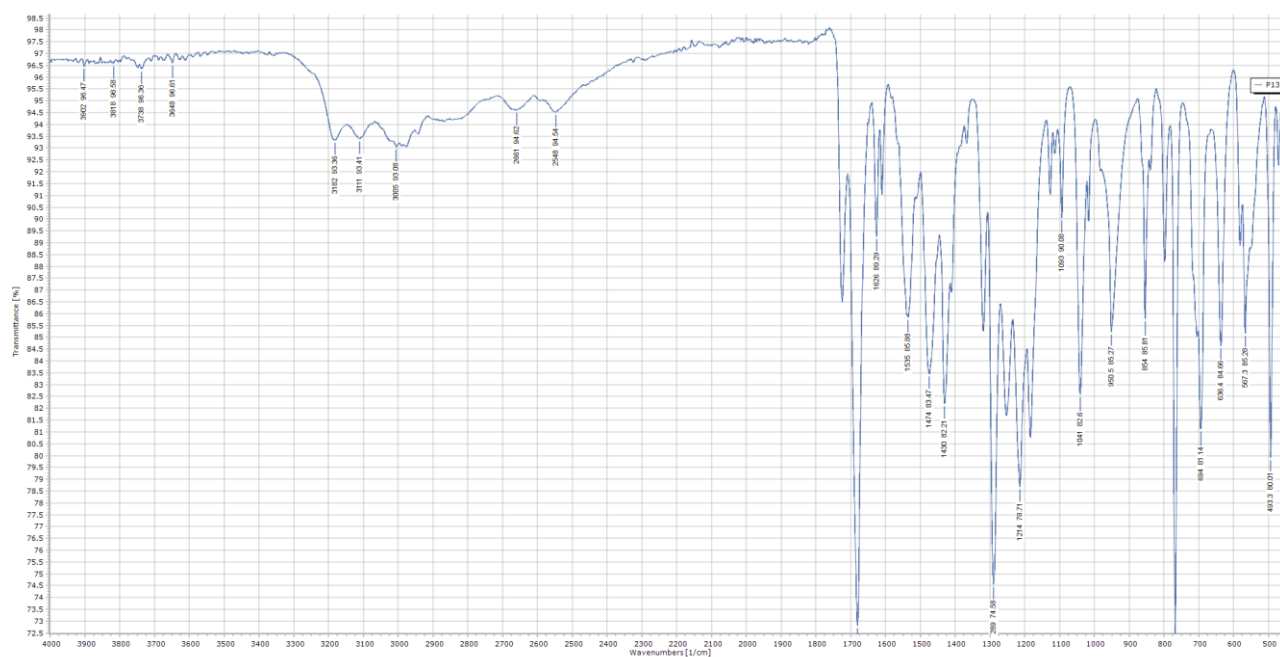
Slika D9. Snimljeni IR spektar tiosemikarbazona P10.



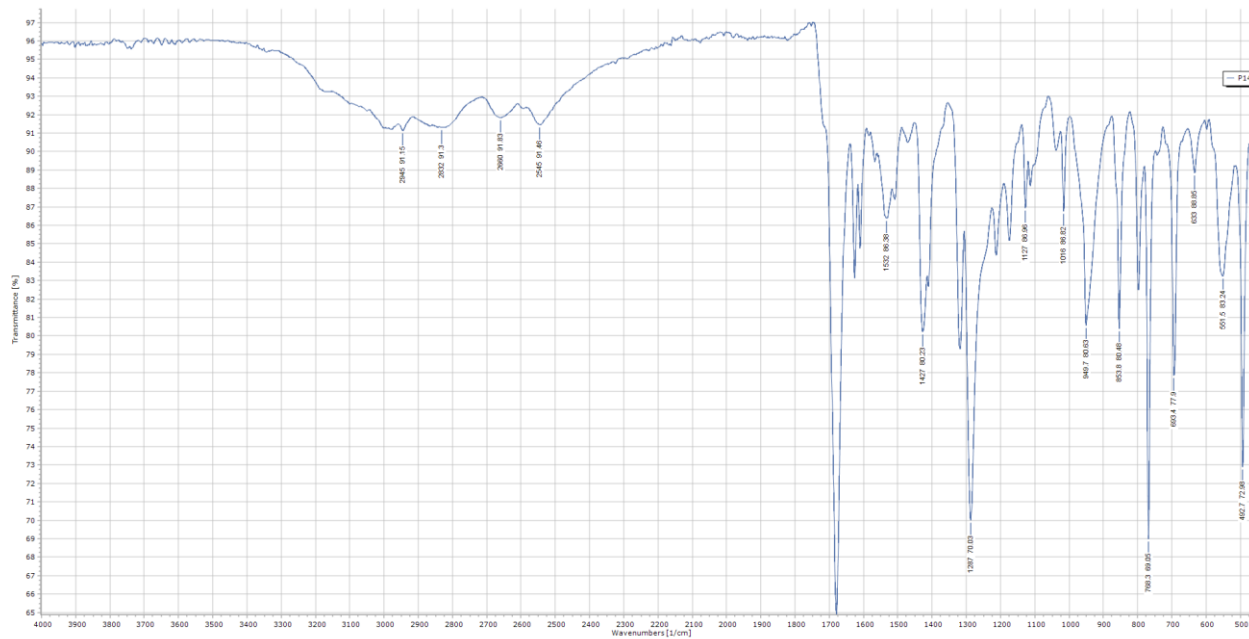
Slika D10. Snimljeni IR spektar tiosemikarbazona P11.



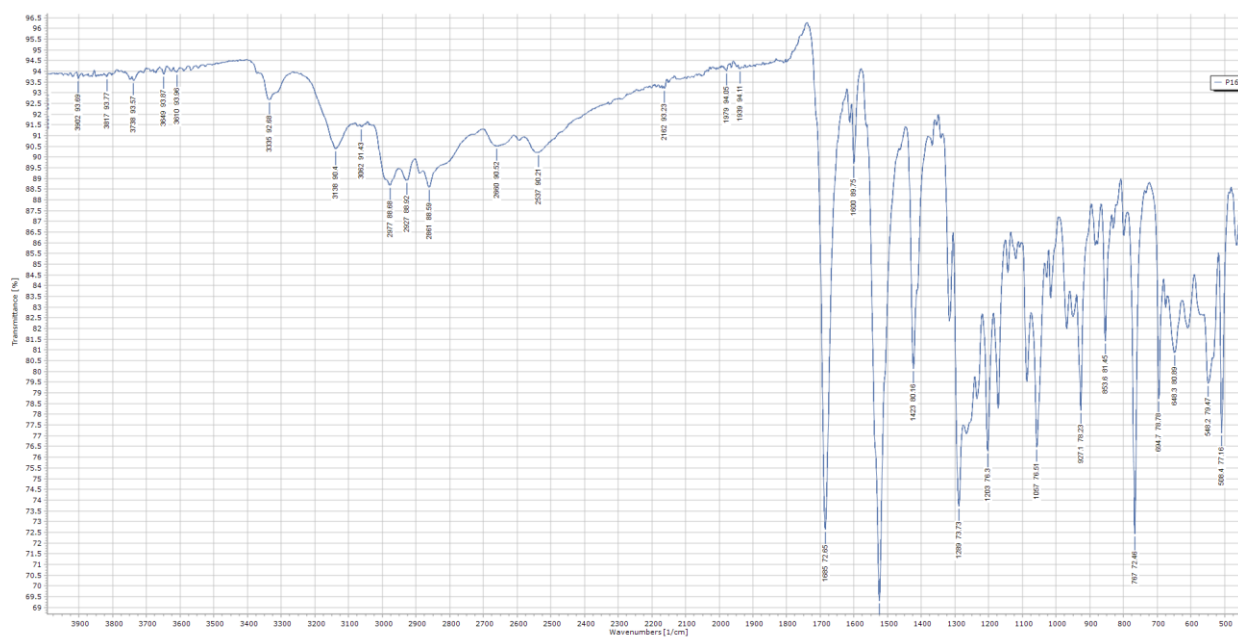
Slika D11. Snimljeni IR spektar tiosemikarbazona P12.



Slika D12. Snimljeni IR spektar tiosemikarbazona P13.



Slika D13. Snimljeni IR spektar tiosemikarbazona P14.



Slika D14. Snimljeni IR spektar tiosemikarbazona P16.

## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Ema Hošnjak

Datum rođenja: 26. ožujka 1997.

Mjesto rođenja: Pula

### Obrazovanje

2003. - 2011. Osnovna škola Vidikovac, Pula

2011. - 2015. Gimnazija Pula, Pula

2016. - 2020. Preddiplomski studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2020. - Diplomski studij kemije, smjer: istraživački; Analitička kemija i biokemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

### Nagrade i priznanja

2021. Rektorova nagrada

Kategorija: Nagrada za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici-Prirodne znanosti

Rad: Online Znanstvene čarolije

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2020. - 2022. Voditeljica volonterskog projekta *Znanstvene čarolije*

2017. – 2022. Članica volonterskog projekta *Znanstvene čarolije*

2017. – 2022. Otvoreni dan kemije (Dan i noć na PMF-u)

2018. – 2021. Znanstveni piknik

2020. Supervizorica volonterskog projekta *BASF Kids' Lab – Malci genijalci*



## Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. Tomislav Jednačak, Ivana Mikulandra, Monika Kapustić, Iva Kušec, Kristina Smokrović, Ema Hošnjak, Ivo Piantanida, Marta Koščak, Klaus Zangger, Predrag Novak, *Interactions of Macrozones With Their Biological Receptors*, Magnetic moments in central Europe 2022., Primošten, 2022. Knjiga sažetaka; str. 89
2. Kristina Smokrović, Ema Hošnjak, Saranyarat Sanemit, Hana Čipčić-Paljetak, Saša Kazazić, Ivana Mikulandra, Predrag Novak, *Synthesis and characterisation of nickel(II) macrozone complexes derived from 4-formylbenzoic acid and 3-formylsalicylic acid*, Magnetic moments in central Europe 2022., Primošten, 2022. Knjiga sažetaka; str. 106
3. Paula Pranjić, Iva Habinovec, Ivana Mikulandra, Ema Hošnjak, Predrag Novak, *Isolation and Structural Characterization of Novel 3-trifluoromethoxyphenyl- and 3-(3-phenylpropyl)-macrozones and Their Diastereoisomers Using LC-SPE/cryo NMR*, Adriatic NMR 2021., 2021, Primošten; Knjiga sažetaka str. 66