

Priprava i karakterizacija makrozoonskog 4'' derivata azitromicina izvedenog iz 4-aminobenzojeve kiseline i salicilaldehida te njegova kompleksa s niklom(II) i bakrom(II)

Galić, Monika

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:195567>

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
Kemijski odsjek

Monika Galić

**PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA
MAKROZONSKOG 4'' DERIVATA
AZITROMICINA IZVEDENOG IZ
4-AMINOBENZOJEVE KISELINE I
SALICILALDEHIDA TE NJEGOVA
KOMPLEKSA S NIKLOM(II) I BAKROM(II)**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2023.

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

Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Predragu Novaku na prenesenom znanju, svim pruženim prilikama za napredak i pomoći tijekom rada na projektu i izradi ovog rada.

*Zahvaljujem komentorici dr. sc. Kristini Smokrović na uloženom trudu, znanju i pomoći.
Hvala kolegici Ledi za uljepšavanje vremena provedenog u laboratoriju.*

Hvala prijateljima na podršci i strpljenju a posebno Ani i Katarini. Najveće hvala mami, tati i bratu na požrtvornosti i vjeri u mene. Bez vas ne bi bila ovdje gdje sam danas i zato hvala.

Sadržaj

SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Makrolidi.....	2
2.2. Mehanizam djelovanja antibiotika	8
2.3. Mehanizam rezistencije	10
2.4. Tiosemikarbazoni.....	11
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. Instrumenti i kemikalije	14
3.2. Priprava etil 4-[(aminokarbamotiol)amino]benzoata, S1.....	15
3.3. Priprava etil 4-({(E)-(2-hidroksifenil)metiliden]amino]karbamotioil}amino)benzoata, S2	15
3.4. Priprava 4-({(E)-(2-hidroksifenil)metiliden]amino]karbamotioil}amino)benzojeve kiseline, S3	16
3.5. Priprava azitromicin - 4''- propil salicilaldehid tiosemikarbazon-4-karboksilamid, S4	16
3.6. Priprava kompleksa makrozona S4 s niklom(II) i bakrom(II).....	16
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. Priprava etil 4-[(aminokarbamotiol)amino]benzoata, S1.....	17
4.2. Priprava etil 4-({(E)-(2-hidroksifenil)metiliden]amino]karbamotioil}amino)benzoat, S2	19
4.3. Priprava 4-({(E)-(2-hidroksifenil)metiliden]amino]karbamotioil}amino)benzojeve kiseline, S3	24
4.4. Priprava azitromicin - 4''- propil salicilaldehid tiosemikarbazon-4-karboksilamid, S4	28
4.5. Karakterizacija kompleksa bakra(II) i nikla(II) s makrozonom S4 (S4-Cu i S4-Ni)	41
§ 5. ZAKLJUČAK	44
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	45
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	46
§ 8. ŽIVOTOPIS	LI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA MAKROZONSKOG 4" DERIVATA
AZITROMICINA IZVEDENOG IZ 4-AMINOBENZOJEVE KISELINE I
SALICILALDEHIDA TE NJEGOVA KOMPLEKSA S NIKLOM(II) I BAKROM(II)

Monika Galić

Porast rezistencije bakterija na antibiotike koji su trenutno na tržištu potaknuo je potrebu za otkrivanjem novih. Makrolidni antibiotik azitromicin koristi se za liječenje bolesti uzrokovanih Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama. Makrozoni su konjugati azitromicina i tiosemikarbazona pripremljeni za liječenje infekcija uzrokovanih rezistentnim bakterijama, s potencijalom zaobilaznja razvijenih mehanizama rezistencije. Kako bi se dodatno povećala biološka aktivnost i farmakološka svojstva, napravljeni su kompleksi tiosemikarbazona s metalnim ionima. U ovom radu prvo je pripremljen tiosemikarbazon izveden iz 4-aminobenzojeve kiseline i salicilaldehida. Nakon toga, dobiveni tiosemikarbazon je vezan na 4"-aminopropilni derivat azitromicina dajući pripadajući makrozon. Istražena je mogućnost kompleksiranja s ionima bakra(II) i nikla(II). Sintetizirani spojevi karakterizirani su spektroskopijom NMR.

(51 stranica, 34 slika, 5 tablica, 93 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, makrozon, spektroskopija NMR, tiosemikarbazon

Mentor: prof. dr. sc. Predrag Novak

Komentor: dr. sc. Kristina Smokrović

Ocjenitelji:

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

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

Datum diplomskog ispita: 3. srpnja 2023.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF A MACROZONE 4" DERIVATIVE OF AZITHROMYCIN DERIVED FROM 4-AMINOBENZOIC ACID AND SALICYLALDEHYDE AND ITS COMPLEX WITH NICKEL(II) AND COPPER(II)

Monika Galić

The increase in bacterial resistance to currently marketed antibiotics has prompted the need to discover new ones. The macrolide antibiotic azithromycin is used to treat diseases caused by Gram-positive and Gram-negative bacteria. Macrozones are conjugates of azithromycin and thiosemicarbazones prepared to treat infections caused by resistant bacteria, with potential of bypassing the developed resistance mechanisms. In order to further increase biological activity and pharmacological properties thiosemicarbazone complexes with metal ions have been made. In this work, a thiosemicarbazone derived from 4-aminobenzoic acid and salicylaldehyde was prepared first. Subsequently, the resulting thiosemicarbazone was bound to the 4"-aminopropyl derivative of azithromycin. The possibility of complexation with copper (II) and nickel (II) ions was explored. The synthesized compounds were characterized by NMR spectroscopy.

(51 pages, 34 figures, 5 tables, 93 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, macrozone, NMR spectroscopy, thiosemicarbazone

Mentor: Dr. Predrag Novak, Full Professor with tenure

Comentor: Dr. Kristina Smokrović, dr. sc.

Reviewers:

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

Substitute: Dr. Tomislav Jednačak, Associate Profesor

Date of exam: July 3rd 2023.

§ 1. UVOD

Trenutno dostupni antibiotici imaju široku primjenu liječenja. Zbog lake dostupnosti i čestog neispravnog korištenja dolazi do porasta rezistencije bakterija na njihovo djelovanje. Zato se razvila potreba za otkrivanjem novih.

Jedna od skupina najčešće korištenih antibiotika su makrolidi, odnosno, makrolaktonski glikozidi. Sastoje se od makrolaktonskog prstena, koji najčešće ima 14, 15 ili 16 članova i ugljikohidrata vezanih na prsten. Predstavnik prve generacije je eritromicin A koji posjeduje isti antimikrobni spektar kao i penicilin. Sljedeću generaciju predstavlja azitromicin. On sadrži petnaesteročlani makrolaktonski prsten, a pokazao se kao bolji antibiotik od eritromicina A zbog bolje gastrointestinalne podnošljivosti. Primjenjuje se kod liječenja infekcija uzrokovanih gram-pozitivnim, kao i gram-negativnim bakterijama. Predstavnik treće generacije je telitromicin, prvi sintetizirani ketolidni antibiotik. Mehanizmi obrane bakterija su transportiranje makrolida izvan stanice te metilacija ili mutacija aminokiselina koji se nalaze u veznom mjestu na bakterijskom ribosomu.⁸

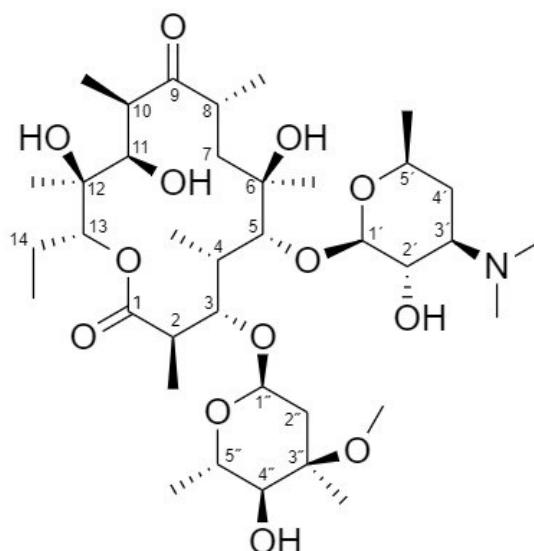
Makrozoni su spojevi nastali reakcijom azitromicina i tiosemikarbazona. Oni zaobilaze mehanizme rezistencije jer posjeduju više veznih mjesta na bakterijskom ribosomu. Tiosemikarbazoni su Schiffove baze nastale reakcijom tiosemikarbazida i aldehida ili ketona, uz oslobađanje vode. Oni samostalno sadrže biološku aktivnost koja se, povezivanjem s metalnim ionima, može povećati. Ovaj rad fokusiran je na sintezi makrozona iz 4''-aminopropilnog derivata azitromicina (4''-O-(3-aminopropil)azitromicin) i tiosemikarbazona sintetiziranog iz 4-aminobenzojeve kiseline i salicilaldehida. Na njega će se tridentantno vezati nikal(II) i bakar(II) u stehiometrijskom omjeru 1:1, kako bi se pozitivno utjecalo na farmakološka i fizičko-kemijska svojstva makrozona. Produktima iz svakog koraka biti će provjerena struktura uz primjenu jednodimenzijske ili dvodimenzijske spektroskopije NMR, a kompleksi nikla i bakra, u zadnjem koraku, karakterizirat će se spektroskopijom EPR (elektronska paramagnetska rezonancija).

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Makrolidi

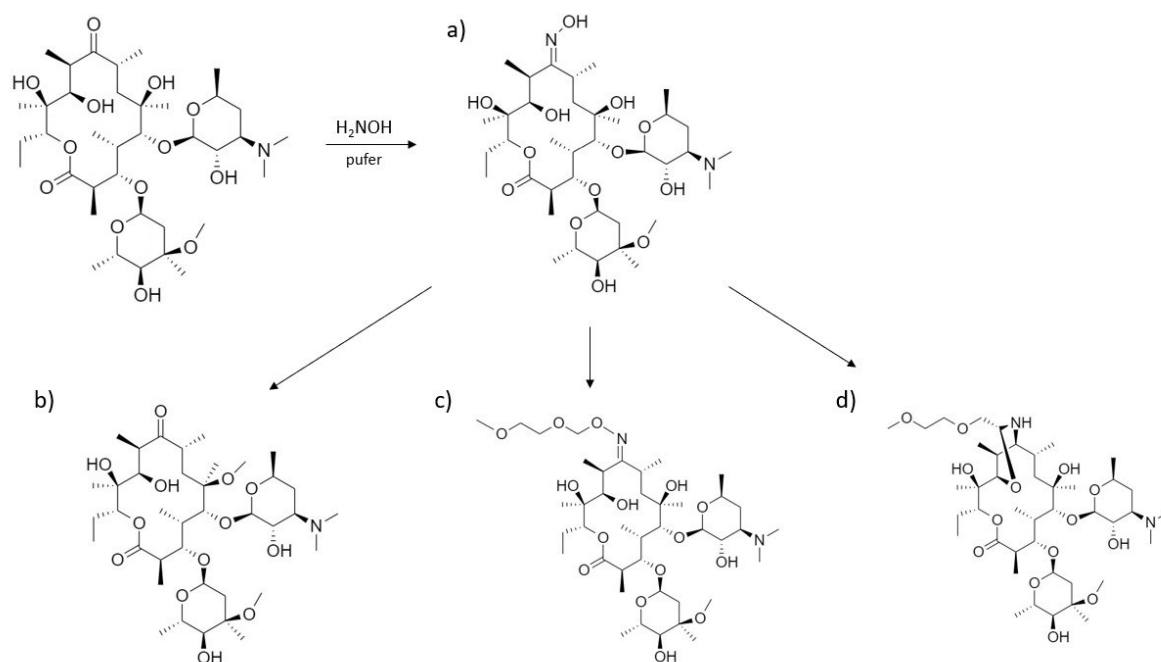
Antibiotici su kemijski spojevi koji se koriste za liječenje bakterijskih infekcija. Za njihovo otkrivanje zaslužan je Alexander Fleming koji je 1928. godine iz plijesni *Penicillium chrysogenum* izolirao penicilin. Svrstava se u grupu β -laktama zajedno sa cefalosporinom koji je izoliran iz *Cephalosporium acremonium*. Preko 70% infektivnih bakterija razvilo je rezistenciju na barem jedan od antibiotika.¹ Posljedica je to široke primjene liječenja raznih bolesti antibioticima i nepropisnog uzimanja lijekova. Zbog toga je potreba za otkrivanjem novih antibiotika i za sintetiziranje već poznatih derivata postala nužna.

Makrolidi su vrsta antibiotika koji imaju široku kliničku primjenu. Osim djelovanja protiv infekcija bakterijama, oni imaju antigljivične, antiparazitne i antivirusne primjene, koriste se u liječenju tumora, autoimunih bolesti i upala.²⁻⁶ Makrolid je skraćeni naziv za spojeve koji sadrže makrolaktonski prsten (aglikon) na koji je glikozidnom vezom povezan monosaharidni supstituent, najčešće dosozamin i kladinoza.⁷ Prsten se obično sastoji od 14 do 16 atoma. U današnje vrijeme oni sa 14 i 15 atoma koriste se za liječenje infekcija kod ljudi, a sa 16 u veterini.^{8,9} U skupinu aglikona s 14 atoma spadaju eritromicin, klaritromicin, roksitromicin, telitromicin i solitromicin. Prsten sa 15 atoma ima azitromicin, a sa 16 atoma josamicin i tilozin. Prvi otkriveni makrolid bio je eritromicin A (slika 11), izoliran iz *Saccharopolyspora erythraea*.^{8,10} On se koristio kao zamjena za penicilin kod osoba koje su na njega alergični, zbog istog antimikrobnog djelovanja.^{11,12}



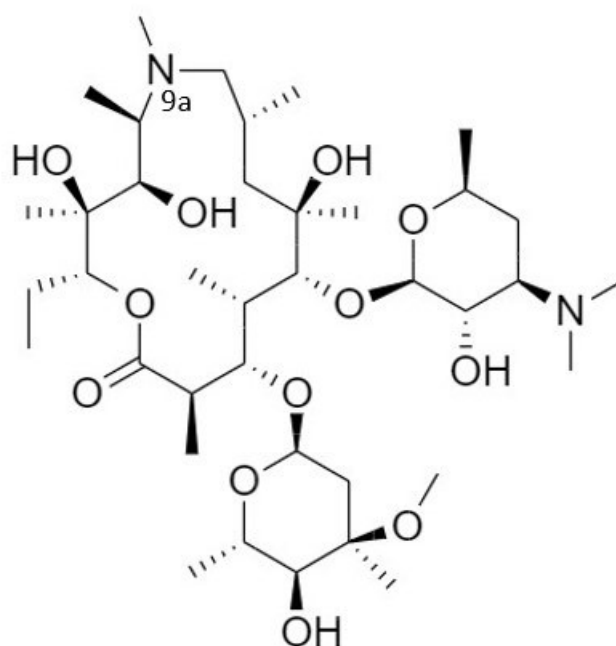
Slika 1. Strukturna formula eritromicina A sa označenim ugljikovim atomima.

Eritromicin djeluje protiv Gram pozitivnih i samo nekoliko Gram negativnih bakterija, te se zbog toga primjenjuje za liječenje spolnih infekcija, infekcija kože i mekog tkiva.^{2,13} Nakon nekog vremena uporabe u liječenju, otkriveno je postojanje nekoliko nedostataka ovog antibiotika. Osim što ima gorak okus ako se konzumira oralnom primjenom, injektiranjem izaziva bol, mučninu i ima lošu bioraspodjivost, što znači da se mala koncentracija apsorbira u stanice.¹⁴ Veliki nedostatak eritromicina je taj što ne podnosi kiseli medij želuca. Kao posljedica nepotpune apsorpcije ne može se predvidjeti njegova koncentracija u krvi i serumu. Naime, dolazi do njegovog metaboliziranja u inaktivni 8,9-anhidroeritromicin-6,9-hemiketal i anhidroeritromicin-6,9:9,12-spiroketal koji ne posjeduju antibiotska svojstva^{11,12}. Kako bi se izbjeglo nastajanje ketal, potrebno je modificirati keto-skupinu ili reaktivnu hidroksilnu skupinu.^{2,15,16} Prvi sintetizirani derivat bio je eritromicin oksim iz kojeg su dalje sintetizirani roksitromicin, diritromicin, klaritromicin i azitromicin (slika 2).^{2,17,18,19}



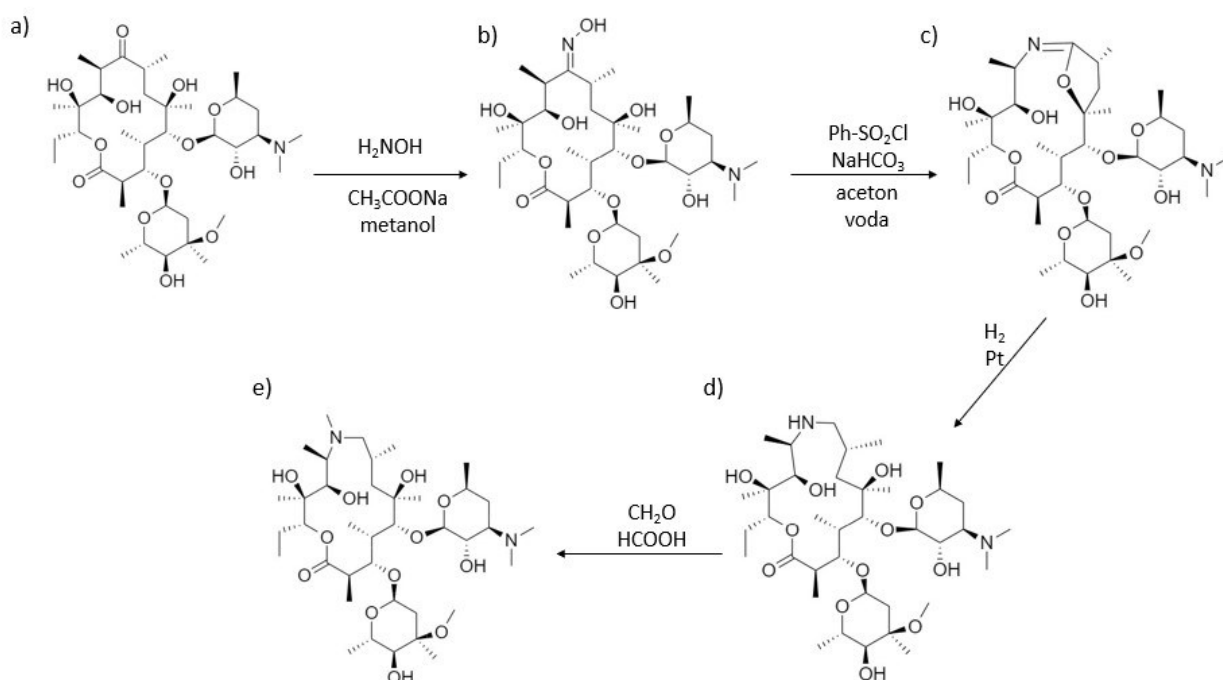
Slika 2. Strukturne formule eritromicin oksima (a), klaritromicina (b), roksitromicina (c), diritromicina (d) iz eritromicina A.

Klaritromicin je derivat eritromicina koji umjesto hidroksilne skupine na šestom ugljikovom atomu u aglikonu ima metoksi skupinu.^{11,12} Azitromicin je predstavnik druge generacije antibiotika, te spada u skupinu azalida (slika 3). Unutar četrnaesteročlanog prstena smjestio se dušikov atom sa supstituiranim metilom umjesto karbonilne skupine na položaju 9a. Dodatna skupina u prstenu čini ga strukturno drugačijim od eritromicina, te je bakterijama bio potreban drugačiji mehanizam rezistencije kako bi se zaštitile od njega.¹¹



Slika 3. Strukturna formula azitromicina.

Puni kemijski naziv azitromicina je 9a-metil-9-deokso-9-dihidro-9a-aza-9a-homoeritromicin, pri čemu oznaka 9a označuje poziciju dušikovog atoma u makrolaktonskom prstenu. Prvi je puta sintetiziran 1980. u Hrvatskoj tvrtki PLIVA.² Stabilan je u kiselom mediju^{2,21}, a testovima *in vivo* dokazano je da ima upola manje nuspojave od eritromicina^{2,22}. Azitromicin ima dvije bazične tercijarne amino skupine od kojih je jedna direktno vezana u laktonskom prstenu na položaju 9a.¹⁵ Sintetiziran je zahvaljujući Beckmannovoj pregradnji (9*E*)-eritromicin A oksima u amid^{2,20,22,23} (slika 4). U otopinu acetona, vode i sode bikarbone dodani su eritromicin A oksim i benzensulfonil klorid te je sintetiziran eritromicin-6,9-imino-eter. Hidratacijom dobivenog produkta otvoren je četrnaesteročlani prsten, te se unutar njega smjestila amino skupina. Redukcijskom metilacijom 9-dihidro-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A sa formaldehidom i mravljom kiselinom dobiven je azitromicin.^{2,20}

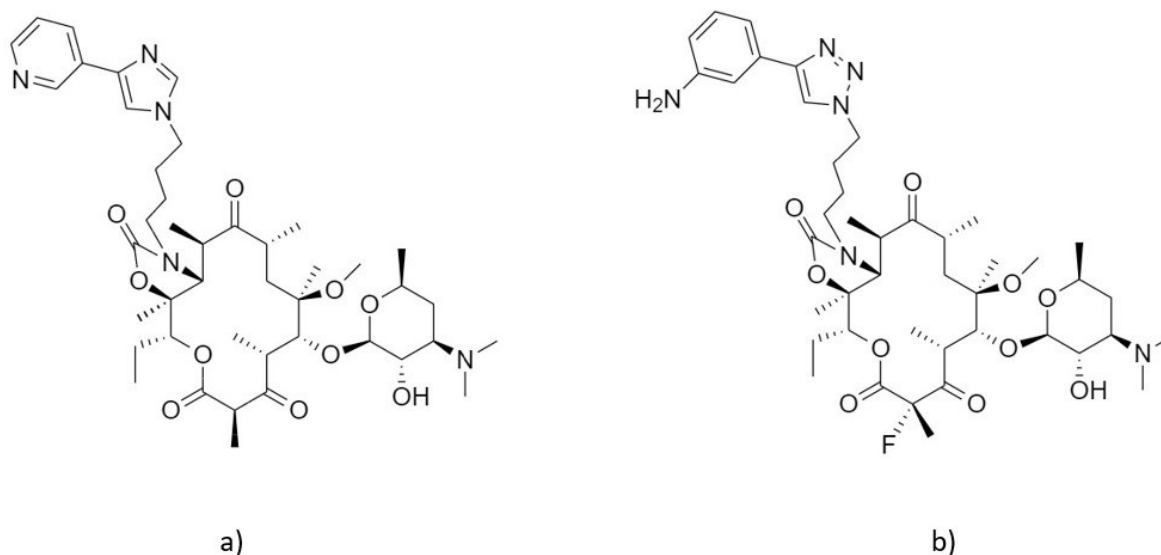


Slika 4. Sinteza azitromicina. a) eritromicin A, b) eritromicin-9(E)-oksim, c) 6,9-iminoeter, d) 9-deokso-9-dihidro-9a-aza-9a-homoeritromicin A, e) azitromicin.

Farmakokinetika makrolida koji podnose niske vrijednosti pH je povoljna. Njihova koncentracija u tkivu je 50 puta veća nego u plazmi.^{11,24} Pronađeno je da se nakuplja unutar lizosoma koji, zbog svojeg kiselog karaktera, predstavlja povoljan medij azitromicinu bazičnih svojstava. Također se zadržava unutar stanice što omogućuje dužik u laktonskom prstenu. Apsorpcija aktivne tvari nakon konzumacije je brza, no nije potpuna. Apsolutna bioraspoloživost je između 35% i 52% zbog nepotpune apsorpcije iz gastrointestinalnog sustava. Nakon jednog sata od uzimanja azitromicina, unutarstanična koncentracija mu je 30 puta veća od vanstanične, a zahvaljujući „ion trapping fenomenu”¹, nakon 24 sata ona je 200 puta veća.²⁵ Farmakodinamika prati mehanizam kojim lijek djeluje protiv mikroorganizama. Učinkovitost djelovanja kontrolira se različitim vremenskim intervalima unutar kojih se antibiotik konzumira te se koristi koncentracija veća od minimalne inhibitorke koncentracije. Tako se osigurava zaštita od razvijanja rezistencije bakterija.^{11,26} Nakon azitromicina otkriven

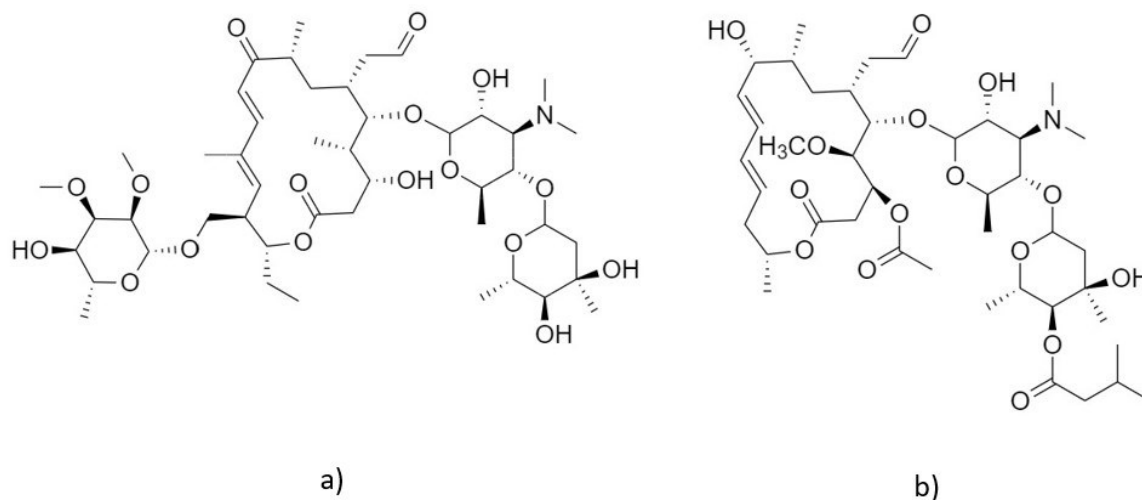
¹ Ion trapping fenomenom je mehanizam kojim se u stanicu unose molekule bez upotrebe enzima i energije. Temelji se na razlici pH vrijednosti stanične membrane te povoljnoj vrijednosti pKa vrijednosti molekula lijeka.⁹⁰

je telitromicin. On je prvi ketolidni antibiotik na tržištu. Ketolidi su 14-eročlani makrolidi koji imaju karbonilnu skupinu na trećem ugljikovom atomu u prstenu umjesto α -L-kladinoze (slika 5).^{27,28} Ova promjena omogućuje stabilnost u kiselom mediju. Također imaju metoksilnu skupinu umjesto hidroksilne na položaju C6 u prstenu. Na položajima C11 i C12 nalazi se karbamat na koji je vezan piridin i imidazol koji su zaslužni za vezanje na ribosomski zid.¹⁴ Najčešća mu je primjena u liječenju respiratornih infekcija.²⁹ Njegovi su nedostaci mnogobrojne nuspojave zbog dodatne pirimidinske skupine od kojih su neke poremećaji u vidu, kardiovaskularni problemi te destabilizirane razine jetrenih enzima.^{8,30} Solitromicin je drugi član ketolidne skupine (slika 5). Umjesto imidazola i piridina ima 1,2,3-triazol i anilin a na samom prstenu ima vezan fluor. No, zbog sumnje na hepatotoksičnost nije odobren od strane Američke Agencije za hranu i lijekove (FDA).^{8,31}



Slika 5. Strukturne formule predstavnika ketolida; a)telitromicin, b)solitromicin.

U skupinu šesnaesteročlanih makrolida uvrštavaju se tilosin A i josamicin (slika 6). Tilosin A se koristi u veterini kao antibiotik i promotor rasta. Otkriveno je i da ima antimalarična svojstva. Većinski djeluje protiv Gram pozitivnih bakterija, a u manjoj mjeri protiv Gram negativnih. Prednost nasuprot eritromicinu mu je ta što ima bolju gastrointestinalnu toleranciju i ne ometa djelovanje drugih lijekova.³²



Slika 6. Strukturne formule makrolida s šesnaesteročlanim laktonskim prstenom; a) tilosin A, b) josamicin.

Klaritromicin se metabolizira u jetri uz pomoć enzima citokrom P-450 3A4 (CYP3A4 podjedinica) i to u aktivni oblik i šest dodatnih produkata.^{27,33} Azitromicin nema interakcije sa CYP3A4 prilikom metaboliziranja,^{27,34} a telitromicin se razgrađuje uz pomoć CYP3A4 i 1A izoenzima.^{27,35} Kod nekih antibiotika dolazi do pojave ometanja djelovanja i apsorpcije drugih lijekova koji se istovremeno konzumiraju. Klaritromicin i eritromicin u jetri oksidira enzim citokrom P-450, točnije podjedinice CYP3A4. Metabolički produkt klaritromicina veže se za željezo koje se nalazi na enzimu, te nastaje neaktivni kompleks. Zbog toga dolazi do inhibicije aktivnosti enzima te je onemogućeno metaboliziranje drugih lijekova.^{27,36} Azitromicin ne posjeduje mehanizam za interakciju s CYP3A4, SLCO1B1 i SLCO1B3 što se pokazalo kao njegova prednost, jer samim time ne ometa djelovanje drugih lijekova i produžuje se vrijeme zadržavanja u stanicama.¹¹

2.2. Mehanizam djelovanja antibiotika

Bakterijski ribosom 70S meta je djelovanja antibiotika, pri čemu S predstavlja sedimentacijski koeficijent. Svi bakterijski ribosomi sastoje se od 50S i 30S podjedinica te kataliziraju polimerizaciju aminokiselina u proteine prema slijedu nukleotida zapisanog u mRNA.³⁸ Manja podjedinica 30S ima ulogu translacije slijeda nukleotida u aminokiselinski slijed, dok 50S

podjedinica ima ulogu povezivanje aminokiselina peptidnom vezom.^{8,39,40} Na 30S podjedinicu veže se mRNA, a na 50S podjedinicu veže se tRNA.⁴¹ Uz pomoć kristalografije i kriogene elektronske mikroskopije dobivene su informacije o izgledu kompleksa makrolida vezanog na ribosom, a time se dobio i uvid u mehanizam vezanja antibiotika na vezno mjesto. Ova spoznaja je vrlo važna kako bi se mogli osmisliti novi makrolidni derivati.^{8,42-47} Utvrđena su četiri načina na koja antibiotici djeluju na bakterije. Oni mogu inhibirati stvaranja peptidnog lanca na samom početku sinteze^{10,49}, disocirati peptidil tRNA sa ribosoma^{10,50}, inhibirati sintezu peptidne veze nakon određenog broja aminokiselina^{10,49} ili ometati njezin rad vezanjem na 50S podjedinicu. Mehanizam rada makrolidnih antibiotika inhibicija je sinteze proteina blokiranjem tunela za izlazak peptidnog lanca zbog vezanja antibiotika na 23S rRNA u području centra za peptidil-transferazu.⁸ Tunel iz kojeg izlazi peptidni lanac širok je otprilike 15 Å. Do većeg sužavanja tunela dolazi na području proteina L4 i L22 te je na tom području širina tunela 10 Å. Njihova pozicija nalazi se nedaleko centra za peptidil-transferazu. Kad se makrolid veže na ovom području, nakon sinteze određenog broja aminokiselina, zbog nedostatka prostora dolazi do disocijacije peptidil tRNA.^{10,51-53} Šećer vezan na makrolidu predstavlja najvažniju komponentu molekule koja ostvaruje kontakt sa zidom tunela. Male molekule makrolida dopuštaju sintezu 6 do 8 aminokiselina, a velike samo 2 aminokiseline.^{54,55} Osim izgleda makrolida, na utjecaj antibiotika na bakteriju ovisi i slijed aminokiselina koji ciljani ribosom sintetizira.^{24,56,57} Utvrđeno je da azitromicin ima dva koraka vezanja za ribosom bakterije *Escherichia coli*. Prvo se smjesti na mjesto malog afiniteta u gornjem dijelu tunela za izlaz proteina, što za posljedicu ima transformaciju ribosomskog tunela i stvaranje stabilnijeg i jačeg kompleksa koji onemogućuje sintezu peptida.^{2,58}

Princip rada makrolida i ketolida je jednak. Vežu se na domenu V 23S rRNA.^{27,59} Ketolidi imaju prednost u borbi protiv rezistentnih sojeva jer se vežu i za domenu II 23S rRNA što im omogućuje dva vezna mjesta na ribosomu bakterija.^{27,60} Zahvaljujući svojoj lipofilnoj strukturi, makrolidi i ketolidi brzo i lako putuju organizmom. Mehanizam inhibicije može biti različit, no važno je znati izgled veznog mjesta i rezistentnih mutacija. Makrolidi svoju aktivnost temelje na inhibiranju translukacije, a ketolidi ometaju stvaranje peptidne veze blokiranjem puta kojim peptid prolazi.⁶¹ Način na koji makrolidi djeluju nije direktno inhibiranje sinteze peptidne veze, već se vezanjem na ribosom ometa daljnja elongacija peptida te se otpuštanju nedovršeni lanci.^{38,62} Eritromicina A veže se vodikovim vezama između adenzina 2058 u 23S podjedinici i hidroksilne skupine desozamidnog šećera makrolidnog

prstena . Dodatna stabilizacija postiže se van der Waalsovima interakcijama sa susjednim nukleinskim kiselinama ribosoma i hidrofobnim dijelom makrolaktonskog prstena. Važnost veznog mjesta A2058 očituje se kod čovjeka čiji ribosomi na toj poziciji imaju gvanozin zahvaljujući kojem se smanjuje afinitet vezanja antibiotika.³⁸ Jačina interakcije makrolida i ribosoma ovise o C5 atomu na monosaharidnom ili disaharidnom supstituentu makrolida i rRNA. Na primjer, kod eritromicina se stvara vodikova veza između šećera desozamina i dušika iz nukleotida A2058 i A2059 (promatano u *E.coli*). Desozamin može stvarati i interakcije sa kisikom iz fosfatnih skupina G2505. Kod 16-eročlanih prstena makrolida se pojavljuje sličan slučaj. Kod njih O2 iz disaharida mikaminoza-mikaroza stvara vodikovu vezu sa A2058. Zbog toga se ovo područje u ribosomima smatra najvažnije vezno mjesto za sve makrolide i njegovom mutacijom dolazi do stvaranja rezistencije. Isti disaharid u tilozinu, karbomicinu A i spiramicinu stvara dodatne hidrofobne interakcije s C5 atomom prstena.^{48,51,52} Karbamati kod ketolida stvaraju interakcije s O4 iz U2609.^{48,63} Osim toga kod eukariota je drugačiji izgled izlaznog tunela na pozicijama proteina L4, L22 i L23 zbog kojeg ne dolazi do ometanja puta peptida.³⁸ Telitromicin ima sličan sistem rada kao i klaritromicin. Oni djeluju kao inhibitori CYP3A4 enzimskog sustava (citokrom P450 3A4 enzim) koji se nalazi u jetri i crijevima, a ima ulogu oksidiranja i inaktivacije malih organskih molekula kao što su antibiotici. Zaustavljanjem njegovog rada omogućuje se veća akumulacija antibiotika u plazmi stanice.⁶⁴ Telitromicin također djeluje mehanizmom zaustavljanja sinteze proteina zbog njihovog pozicioniranja u domenu II i V u 50S rRNA podjedinici,⁶⁵ a solitromicin djeluje na 23S rRNA.⁶⁶

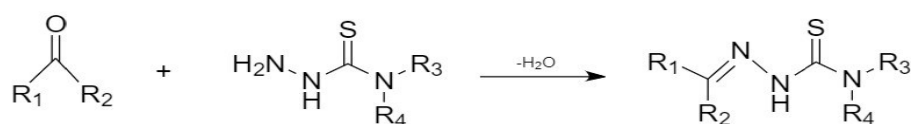
2.3. Mehanizam rezistencije

Bakterijske stanice svoju rezistenciju na antibiotike ostvaruju kemijskom modifikacijom veznog mjesta za makrolid, pri čemu se zbog drugačijeg strukturnog razmještaja ligand ne može vezati.^{2,42} Dolazi do mutacije ili metilacije 23S rRNA koji je dio veznog mjesta ili se mutiraju ribosomski proteini L4 i L22 u 50S podjedinici.^{2,67} Zbog dva načina rezistencije, novosintetizirani makrolidi su najčešće dvostruko inhibitorni. Ako je jedno područje ribosoma razvilo obrambeni mehanizam, antibiotik se i dalje može vezati na drugi način.^{2,68} Rezistencija se razvila zbog mutacije na proteinu L4 koja alosterički ometa vezanje makrolida. Mutacije na L22 proteina ne utječu na vezanje, ali mijenjaju strukturu izlaznog tunela zbog kojeg peptidni lanac može neometano prolaziti.^{48,49} Drugi je način rezistencije dimetilacija 23S rRNA

nukleotida A 2058 uz Erm metiltransferazu. Njegovom metilacijom mijenja se vezno mjesto makrolida te se zbog steričke promjene ne može vezati.^{48,51} Promjena u izgledu veznog mjesta u ribosomu uzrokuje rezistenciju na MLS_B antibiotike (makrolide, linkozamide i streptogramin B)⁶⁹. Enzim koji je odgovoran za metiliranje kodiran je erm genom (eritromicin-rezistentna metilaza). Faktor koji najčešće inducira ekspresiju gena je veličina makrolida, pa tako prsteni makrolida sa 14 i 15 članova induciraju rezistenciju a sa 16 članova puno slabije.⁶⁹ Drugi način na koji se bakterije brane od antibiotika je efluks pumpom. Ovaj protein kodiran je mefA genom (makrolid efluks), a temelji se na smanjivanju koncentracije antibiotika u stanici. Kod Gram negativnih bakterija utvrđeno je da se ovaj mehanizam sastoji od tri dijela : pumpe na unutarnjoj strani membrane, proteina u obliku pore s hidrofilnim lumenom na vanjskom dijelu zida i proteina koji povezuje unutarnju i vanjsku membranu.⁷⁰ Za rad pumpe potrebna je energija zbog kretanja uz koncentracijski gradijent. Za to služi proton-pumpa ili ATP/ADP sustav.⁷⁰ Klaritromicin i azitromicin mogu potaknuti rad metilaze kojom se onemogućuje vezanje ovih substrata u domenu V. Telitromicin, zbog svoje tri keto skupine ne inducira metilaciju.²⁷ Ako se A2058 zamijeni sa gvanozinom, afinitet vezanja antibiotika pada 10⁴ puta za reitromicin.²⁷ Mutacije na L22 stvaraju rezistenciju, ali ne utječu na afinitet vezanja već dolazi do porasta promjera tunela, zbog čega se ne ometa prolaz peptida.^{71,72} Rezistencija razvijena metilacijom zastupljeniji je mehanizam obrane nego mutacije. Na A2058 dolazi do metilacije N6 pozicije.^{71,73}

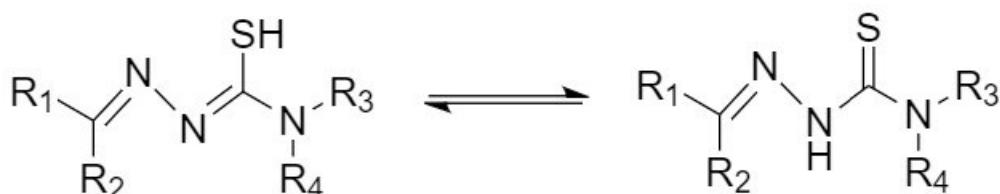
2.4. Tiosemikarbazoni

Tiosemikarbazoni (TSC) su spojevi koji spadaju u Schiffove baze, a dobivaju se reakcijom kondenzacije u kojoj sudjeluju tiosemikarbazid i aldehid ili keton (slika 7). Produkt reakcije spada u skupinu derivata tiouree.^{74,75}



Slika 7. Sinteza tiosemikarbazona iz aldehida/ketona i tiosemikarbazida uz oslobađanje vode, pri čemu su R₁, R₂, R₃, R₄ vodik, alkilna, arilna ili heterociklička skupina.

Tiosemikarbazoni se svrstavaju u dvije skupine: monotiosemikarbazoni i bistiosemikarbazoni, pri čemu bistiosemikarbazoni imaju dva tiosemikarbazona lanca koji mogu biti povezani jednostrukom C-C vezom ili prstenom.⁷⁴ Tiosemikarbazoni mogu postojati u dva tautomerne oblika; tiol i tion (slika 8).⁷⁴ Tion oblik najčešće je zastupljen u čvrstom stanju, a tiol u otopini i to u bazičnom mediju.⁷⁶⁻⁷⁸



Slika 8. Tautomerne strukturne formule tiosemikarbazona u tiolnom i tionskom obliku.

Tiosemikarbazoni pokazuju i antitumorsku aktivnost. Inhibiraju sintezu DNA djelujući na redukciju ribonukleotida u deoksiribonukleotid.^{79,80} Kompleksiranje tiosemikarbazona sa prijelaznim metalima pokazuju još bolju biološku aktivnost.^{79,81} Utvrđeno je da neki 1,4-disubstituirani tiosemikarbazoni mogu postići bolju antimikrobalnu aktivnost od penicilina i ampicilina.⁸² TSC lanac nalazi se u E konformaciji odnosno ima trans-položaj ako se promatra atom sumpora u odnosu na azometinski atom dušika. Ova je konfiguracija je najpovoljnija za stvaranje vodikovih veza.⁸³ Tiosemikarbazoni moraju proći kroz membranu stanice kako bi se mogli vezati na vezno mjesto. Membrana je lipidna, te tiosemikarbazoni mogu proći kroz nju jer većina ima polarnu glavu (tiosemikarbazonid) i aromatski dio koji je hidrofoban. Koordiniranjem metala dolazi do maskiranja hidrofobnog dijela te spoj može bez problema proći granicu. Nakon uspješnog ulaska u stanicu, substrat mora interagirati s enzimom ribonukleotid reduktazom. Ovaj enzim ovisi o ionu željeza i sudjeluje u redukciji riboze do deoksiriboze zbog čega ne dolazi do sinteze te uzrokuje apoptozu.⁸⁴ Zbog inhibicije proliferacije stanice koristi se kod kemoterapije.⁶¹ Zbog toga neki ligandi koji nemaju koordinirani ion metala ne pokazuju bioaktivnost, a s metalom su aktivni, rezultirajući smanjenjem nuspojava prilikom liječenja. Za metal se mogu vezati kao neutralne molekule preko atoma sumpora ili kao anioni nakon gubitka deprotonacije tiosemikarbazonске skupine. Istraživanjem je dokazano da najbolje komplekse tvore s ionima rubidija(II), kobalta(II), nikla(II), paladija(II), platine(II), bakra(II), cinka(II) kadmija(II), žive(II) i kositra(II). Nikal

tvori mnoge dvovalentne spojeve. Najčešće su to monomeri, dimeri i trimeri. Premošćuje se preko O i S donora neutralnog liganda. Bakar također može stvarati monomere, dimere, trimere i polimere. Kompleksiraju se preko neutralnih ili anionskih tiosemikarbazona. Oni sami po sebi imaju ljekovita svojstva. Pokazali su se kao dobri antifugiciti protiv fitopatogenih gljiva *A.alternata*, *F.phaseoline*, *F.equisetti*. Također im je ustanovljeno antitumorsko svojstvo jer induciraju apoptozu u stanicama raka. Prvi lijek koji se bazirao na kompleksu tiosemikarbazona je 2-formilpiridin tiosemikarbazon, a koristi se u borbi protiv raka.⁷⁶ Također su pokazali antimalarična i antivirusna svojstva.^{85,86} Osim u medicinske svrhe ovi ligandi se koriste i u analitičke svrhe. Uz njih se mogu odrediti određeni metali zastupljeni u biološkim ili farmaceutskim uzorcima, te se novonastali kompleksi odvajaju od ostatka otapanjem u određenom otapalu.¹⁶

Nikal je važan kofaktor u enzimima kao na primjer ureaza. Ovaj enzim pronađen je u biljkama, arhebakterijama, eubakterijama, gljivicama a funkcija mu je katalizirat hidrolizu uree do amonijaka i karbamata.⁸⁷ Osim u ureazi, važnu ulogu obavlja i u NiFe hidrogenazi, CO dehidrogenazi, acetyl-CoA sintazi. Bez obzira na to, njegova koncentracija u tkivima je vrlo niska (1 µg/l), dok cinka(II), željeza(II) i bakra(II) ima puno više (100 µg/l)⁸⁵ Tiosemikarbazoni moraju proći kroz polarnu membranu stanice kako bi se mogli vezati na vezno mjesto. To im omogućuje polarna glavu koju čini tiosemikarbazid i aromatski dio koji je hidrofoban. Koordiniranje sa metalom dolazi do maskiranja hidrofobnog dijela te spoj može proći granicu. Nakon ulaska substrat mora interagirati s enzimom ribonukleotid reduktazom. Ovaj enzim ovisi o željezovom ionu a sudjeluje u redukciji riboze do deoksiriboze zbog čaga ne dolazi do sinteze te uzrokuje apoptozu.⁸⁹ Zbog inhibicije proliferacije stanice koristi se kod kemoterapije.⁸⁸

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Instrumenti i kemikalije

Instrumenti korišteni u pripravi uzoraka i provedbi sinteze navedeni su u tablici 1. Uređaji korišteni za karakterizaciju svih dobivenih spojeva također su navedeni u tablici 1.

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

<i>Instrument</i>	<i>Metoda</i>
Mettler AT261 DeltaRange	Vaganje
Roravapor Buchi R-100	Uparivanje
Bruker Avance III HD 400 MHz/54 mm Ascend	Spektroskopija NMR
Bruker Magnetech ESR5000	Spektroskopija EPR

U tablici 2 ispisane su sve kemikalije potrebne za izvedbu pokusa, njihove molarne mase, postotak čistoće i naziv proizvođača.

Tablica 2. Kemikalije, molarne mase, čistoća i naziv proizvođača, korištenih za eksperimentalni dio ovog rada.

<i>Kemikalije</i>	<i>M/g mol⁻¹</i>	<i>Čistoća</i>	<i>Proizvođač</i>
4-(etoksikarbonil)fenil izotiocijanat	207,25	97 %	Alfa Aesar
Hidrazin monohidrat	50,06	98 %	Sigma-Aldrich
Diklormetan	84,93	99,9 %	Carlo Erba Reagents
Salicilaldehid	122,12	98 %	Sigma-Aldrich
Metanol	32,04	99,9 %	Merck Chemical
DMSO-d ₆	84,17	99,9 %	Eurisotop
CD ₃ OD	36,06		

Litijev karbonat	73,89	99,5 %	Sigma-Aldrich
Tetrahidrofuran (THF)	72,11	99,8 %	Merck Chemical
Niklov(II) acetat tetrahidrat	248,86	98 %	Alfa Aesar
Bakrov(II) klorid dihidrat	170,48	98 %	Sigma Aldrich
Etil acetat	88,11	p.a.	Gram Mol
Kalijev karbonat	138,21	99,5 %	Fisher Chemical
1- [bis(dimetilamino)metilen]- 1H-1,2,3-triazolo[4,5- b]piridinijev-3-oksidi heksafluorofosfat (HATU)	380,23	97 %	Acros Organic
N,N-dimetilformamid- dimetilacetal (DIPEA)	129,24	97 %	Acros Organic

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

U 40 mL diklormetana otopljen je 1,00 g etil 4-izotiocijanatobenzoata te je dodan jedan ekvivalent hidrazin monohidrata (0,25 mL, $\rho=1,032$ g/mL). Smjesa je bila miješana magnetskom miješalicom jedan sat. Nakon toga, smjesa je pri sniženom tlaku uparena pomoću Roravapor Buchi R-100. Mala količina produkta **S1** otopljena je u 500 μ L DMSO- d_6 i snimljen je ^1H NMR spektar.

3.3. Priprava etil 4-({[(E)-(2-hidroksifenil)metiliden]amino]karbamotioil}amino)benzoata, S2

Produktu **S1** dobivenom nakon uparivanja dodano je 50 mL metanola i jedan ekvivalent salicilaldehida ($\rho=1,17$ g/mL). Reakcijska smjesa miješala se 3 sata te se otapalo uparilo na rotavaporu. Nekoliko miligrama produkta **S2** otopljeno je u 500 μ l MeOD te su snimljeni ^1H NMR spektar i COSY spektar.

3.4. Priprava 4-((*E*)-(2-hidroksifenil)metiliden)amino]karbamotioil)amino)benzojeve kiseline, S3

U istu tikvicu gdje se nalazi spoj S2 dodano je deset ekvivalenata litijevog karbonata (2,00 g), 21 mL tetrahidrofurana i 1 mL destilirane vode. Nakon 24 sata miješanja, smjesa je filtrirana vakuumskom filtracijom preko Büchnerova lijevka. Filtratu je dodano 2 kapi ledene octene kiseline nakon čega je otapalo upareno. Produkt S3 otopljenom u 500 μ L DMSO- d_6 snimljen je ^1H NMR spektar i COSY spektar.

3.5. Priprava azitromicin - 4''- propil salicilaldehid tiosemikarbazon-4-karboksilamid, S4

U okrugloj tikivici pomiješano je 18,58 mg dobivenog produkta (1 ekvivalent) s 20 mL diklormetana, 1,2 ekvivalenta 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinijev-3-oksidi heksafluorofosfat (HATU, $m=28,3$ mg) i 1,2 ekvivalenta N,N-dimetilformamid-dimetilacetal (DIPEA, $V=30$ μ L). Nakon otapanja svih reaktanata dodan je 1 ekvivalent ($m=50,0$ mg) 4''-aminopropilnog derivata azitromicina (M4'', $n=0,062$ mmol). Reakcijska smjesa miješana je 24 sata, nakon čega je otapalo upareno. Dodano je 10 mL vodene otopine natrijevog hidroksida (pH 8) te je otopina ekstrahirana s tri obroka od 10 mL etil acetata. Sakupljeni organski sloj nakon ekstrakcije osušen je kalijevim karbonatom te je dodano 3 mL diklormetana. Smjesa je filtrirana uz lijevak i vatu, filtrat je uparen na rotavaporu. 10,00 mg produkta S4 otopljeno je u DMSO- d_6 te su snimljeni ^1H NMR, COSY, HSQC i HMBC spektri. Također su snimljeni ^1H NMR i COSY spektri 4''-aminopropilnog derivata azitromicina.

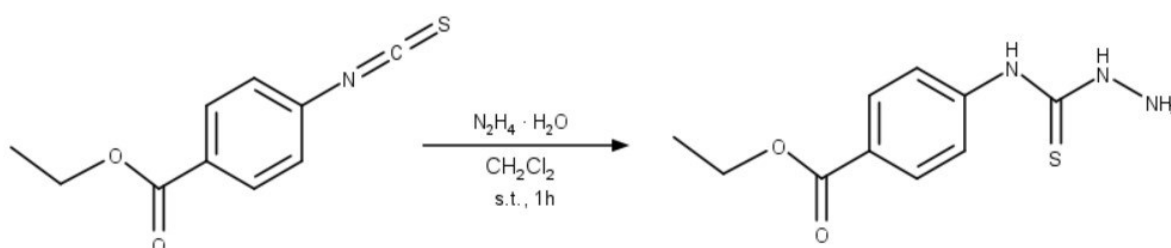
3.6. Priprava kompleksa makrozona S4 s niklom(II) i bakrom(II)

U 4 mL metanola otopljeno je 5,00 mg makrozona S4 i 1,00 mg niklova(II) acetata tetrahidrata (1:1). U reakcijsku smjesu je dodano i 2 kapi amonijaka. Otopina je ostavljena da se upari na zraku pri sobnoj temperaturi. Isti postupak ponovljen je s bakrovim(II) kloridom dihidratom koji je pomiješan s makrozonom S4 u omjeru 1:1 u metanolu uz dodatak amonijaka. Nakon uparavanja kompleksima snimljen je EPR spektar.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

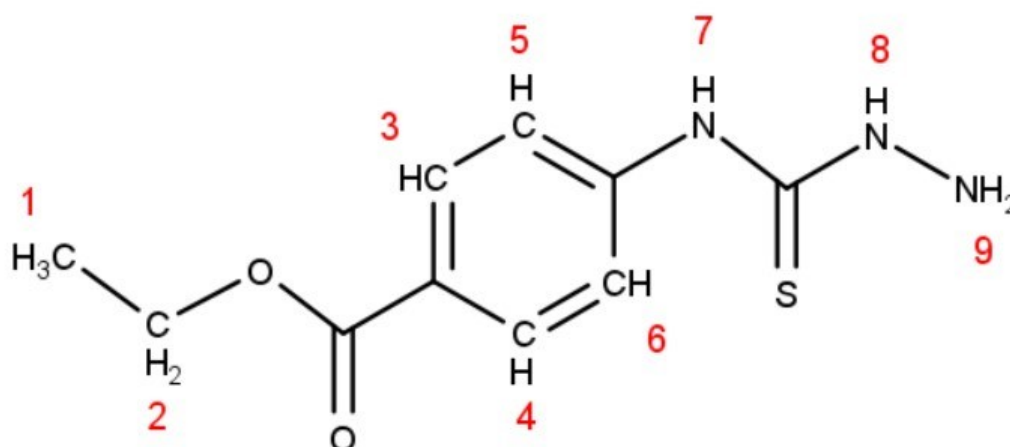
4.1. Priprava etil 4-[(aminokarbamotiol)amino]benzoata, S1

Tiosemikarbazid etil 4-[(aminokarbamotiol)amino]benzoat nastaje nukleofilnom adicijom hidrazin monohidrata na 4-(etoksikarbonil)fenil izotiocijanat (shema 1).

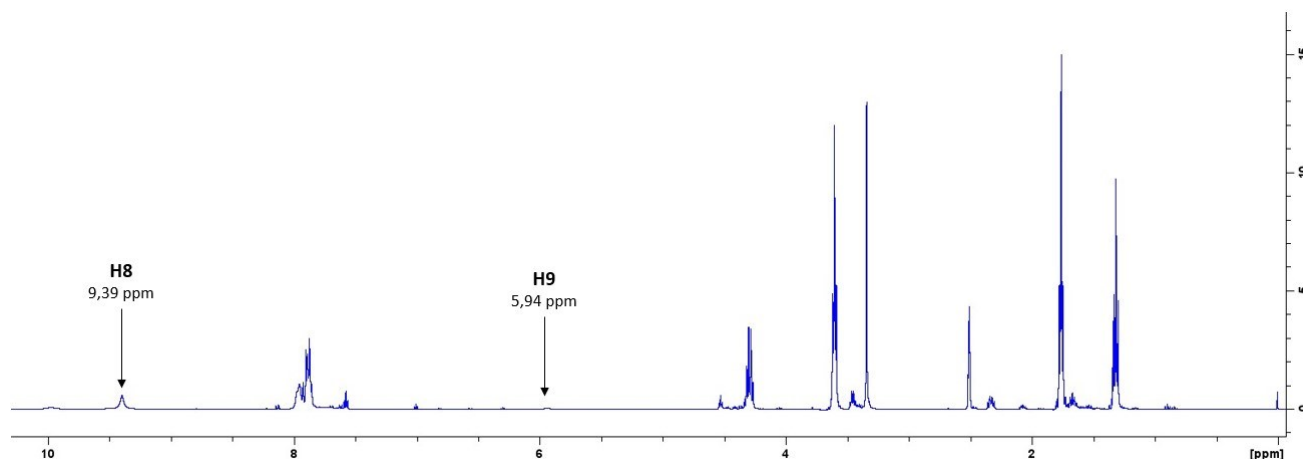


Shema 1. Kemijska priprava spoja S1 iz 4-(etoksikarbonil)fenil izotiocijanat i hidrazina monohidrata u diklormetanu pri 298K.

Dobiveni tiosemikarbazid S1 (slika 1) karakteriziran je spektroskopijom ¹H NMR. Njegov spektar prikazan je na slici 2, a kemijski pomaci protona ispisani su u tablici 1.



Slika 1. Struktura spoja S1 s označenim protonima. Protoni H3, H4 i H5, H6 su ekvivalentni.



Slika 2. Spektar ^1H NMR spoja **S1** snimljen u DMSO-d_6 pri 298K uz označene signale protona H8 i H9.

Nastanak tiosemikarbazida prepoznaje se iz kemijskih pomaka protona H8 i H9. Oba potječu od hidrazina, ali njihove vrijednosti se uvelike razlikuju. Kemijski pomak protona H8 je 9,39 ppm, a protona H9 je 5,94 ppm. Uzrok ove razlike je upravo novostvorena veza između ugljika tiosemikarbazidne skupine i dušika s vezanim protonom H8.

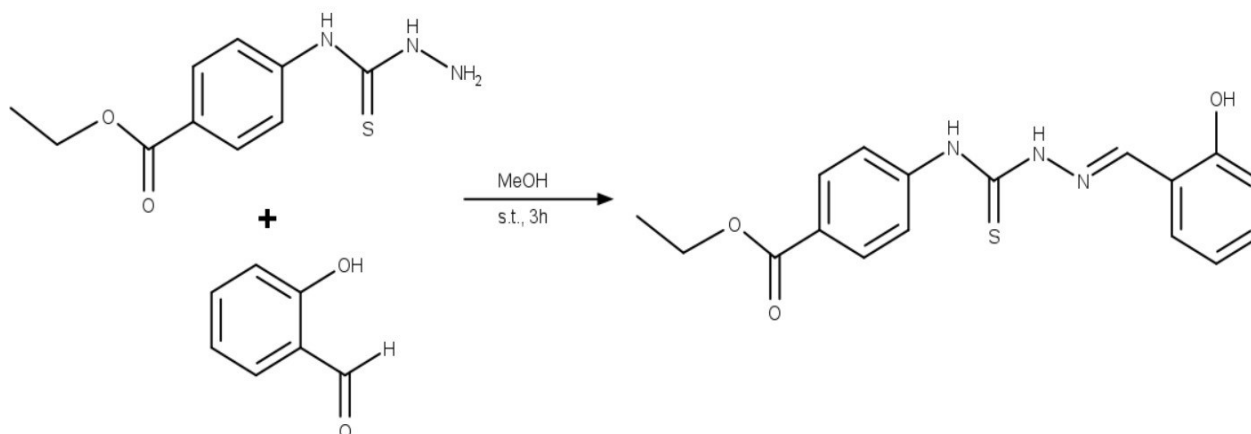
Tablica 1. Asignacija kemijskih pomaka ^1H NMR spoja **S1**.

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

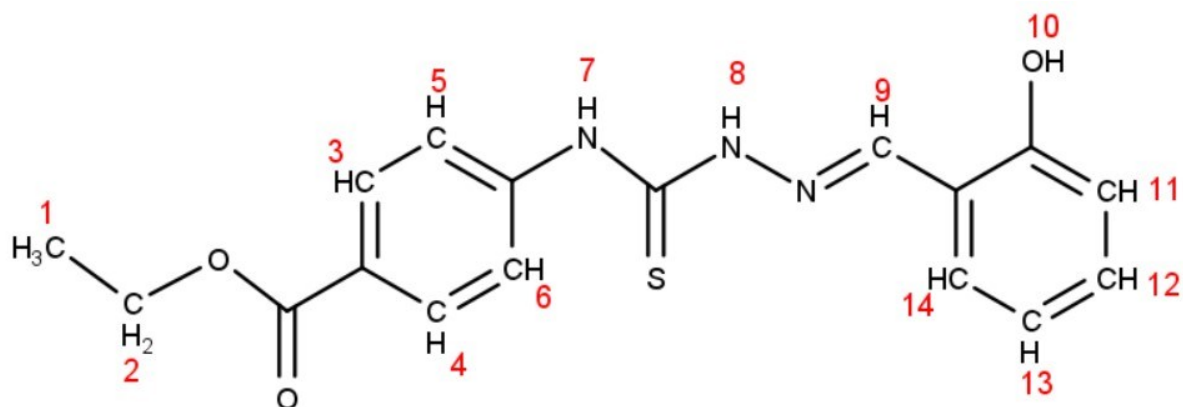
U spektru na slici 2. uočavaju se signali otapala i reaktanata. Pri 5,58 ppm nalazi se singlet koji pripada protonima iz diklormetana. Pri 2,50 ppm nalazi se karakteristični signal za DMSO koji je korišten u deuteriranom obliku kao otapalo za snimanje NMR-a, no zbog higroskopsnosti dolazi do lakog vezanja vode iz zraka. Zbog toga je vidljiv singlet vode pri 3,33 ppm.

4.2. Priprava etil 4-({[(*E*)-[(2-hidroksifenil)metiliden]amino]karbamotioil}amino)benzoat, S2

Tiosemikarbazon ester S2 nastaje reakcijom kondenzacije između amino skupine tiosemikarbazida S1 i karbonilne skupine salicilaldehida (shema 2). Struktura nastale Schiffove baze i imino veza potvrđene su analizom spektra ^1H NMR (slika 4) i spektra COSY (slika 5).



Shema 2. Kemijska priprava spoja S2 iz S1 i salicilaldehida u metanolu pri 298K.

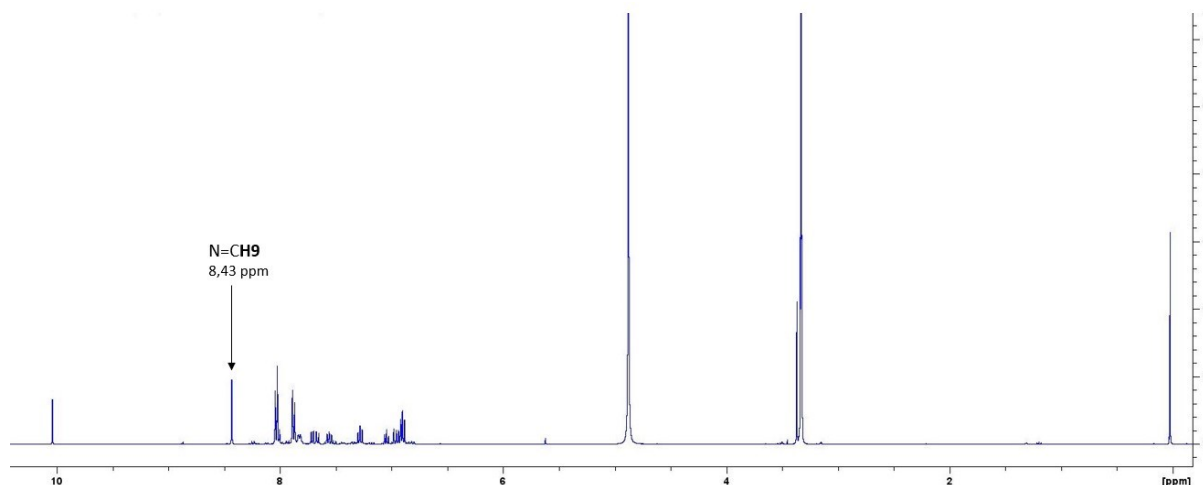


Slika 3. Strukturna spoja S2 s označenim protonima. Protoni H3, H4 i H5, H6 su kemijski ekvivalentni

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

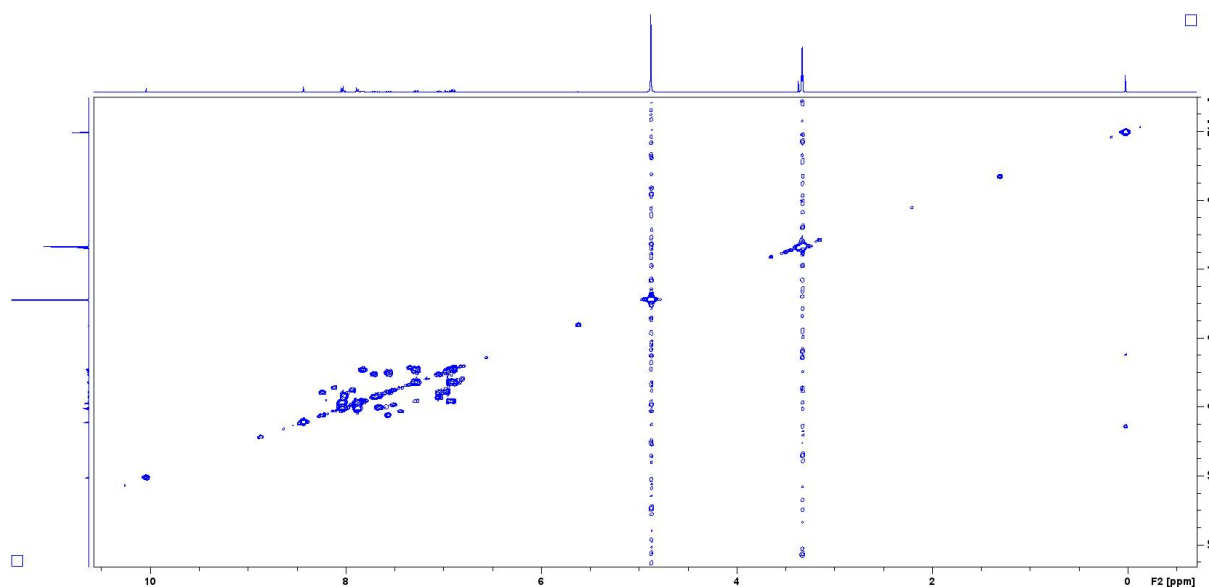
H-atom	δ / ppm
1	1,19
2	3,45
3,4	8,03
5,6	7,87
7	-
8	-
9	8,43
10	-
11	8,24
12	7,57
13	7,02
14	6,97

U spektru (slika 4) nema signala amino skupine koji je u tiosemikarbazidu **S1** bio označen s H9 (slika 1), što ukazuje na promjenu u strukturi. Navedeni dušik tvori imino vezu s karbonilnim ugljikom. Na njega je vezan proton H9 (slika 3) koji ima singlet pri 8,43 ppm. Zbog snimanja u deuteriranom metanolu, ne uočavaju se protoni H7 i H8 vezani na dušik zbog brze izmjene protona u MeOD. Singlet pri 4,87 ppm je signal vode. Veliki signal kvinteta pri 3,33 ppm dolazi od deuteriranog metanola korištenog za mjerenje.



Slika 4. Spektar ^1H NMR spoja **S2** snimljen u MeOD pri 298K s označenim signalom protona H9.

Dobiveni spoj sadrži dva spinska sustava odvojena tioureom (slika 5). Jaki signali u spektru ^1H i šum vidljiv u spektru COSY pripadaju otapalima korištenim u reakcijskoj smjesi. Signal salicilaldehida koji nije reagirao vidljiv je na 10,03 ppm. U spektru COSY označeni su aromatski protoni koji čine jedan spinski sustav (slika 6).

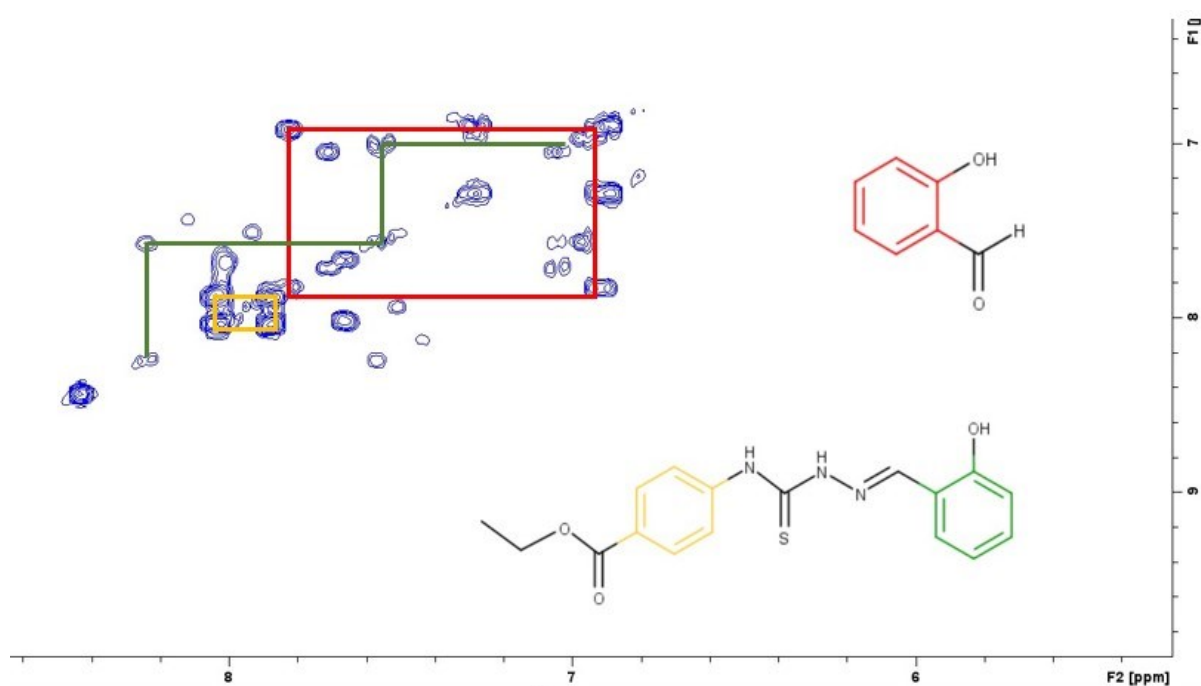


Slika 5. Spektar COSY spoja **S2** snimljen u MeOD pri 298K.

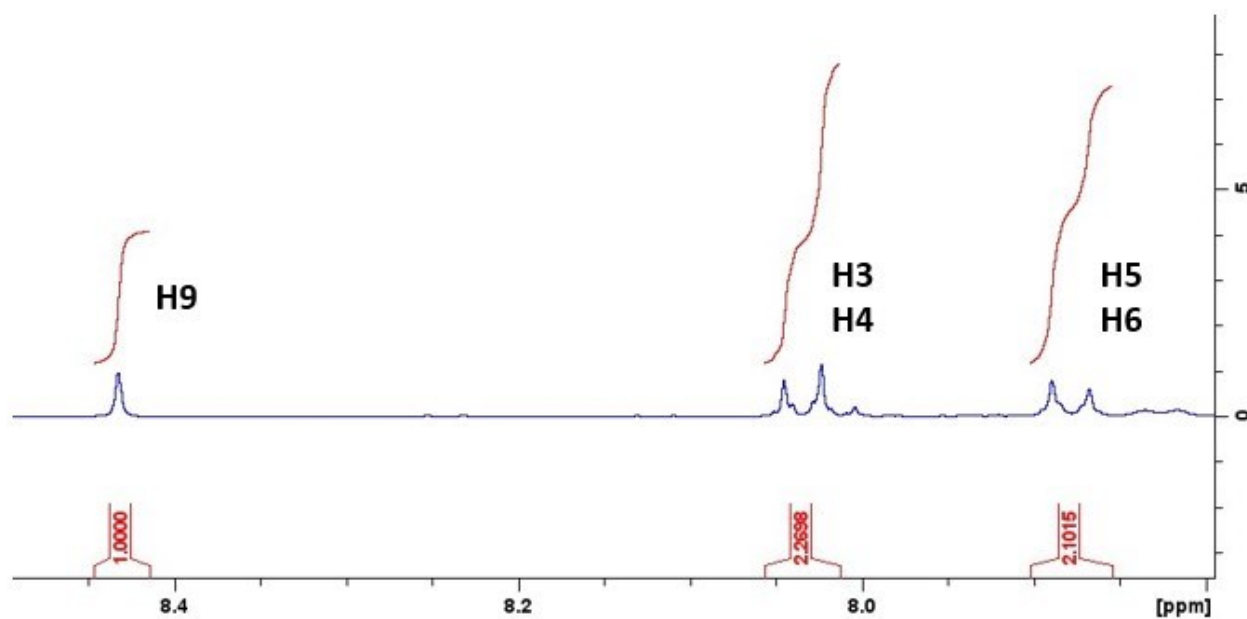
Na uvećanom spektru COSY (slika 6) vidljiva je povezanost protona u skalarnoj sprezi za oba spinska sustava u molekuli produkta. Protoni H3 i H4 (slika 3) su kemijski ekvivalentni te posjeduju jednak kemijski pomak (žuto).. Integriranjem njihovih kemijskih pomaka pri 8,03

ppm i 7,87 ppm dobivene su vrijednosti 2,2698 i 2,1015 što potvrđuje postojanje dva para kemijski ekvivalentna protona (slika 7).

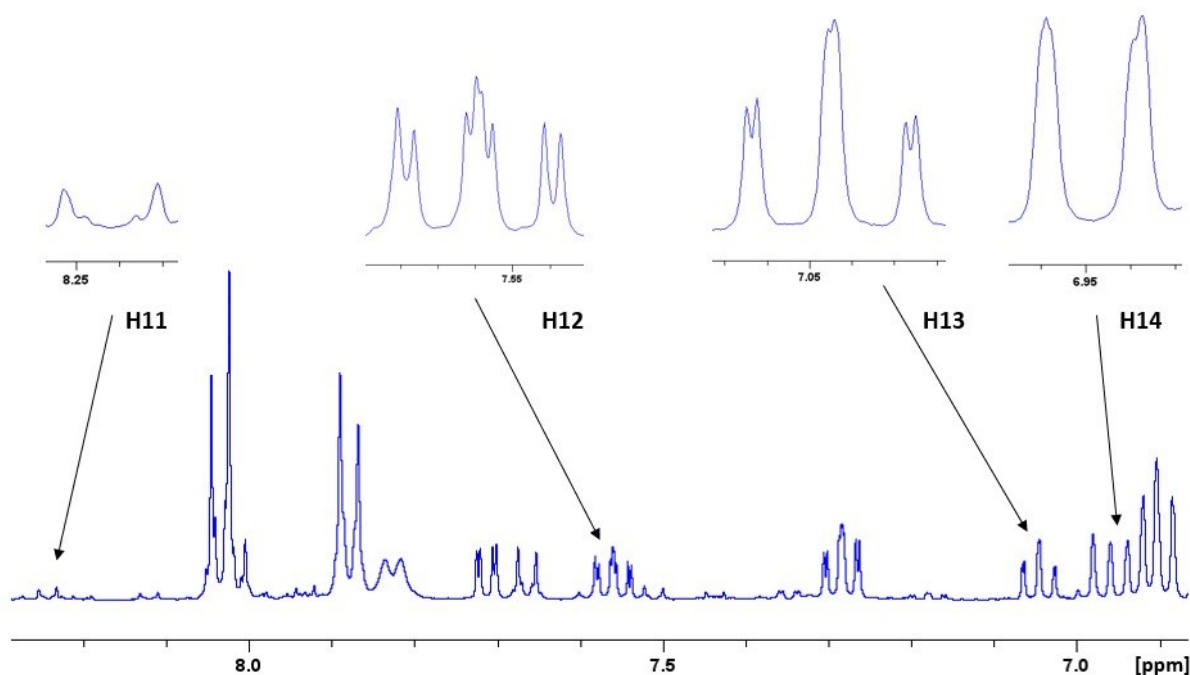
Drugi spinski sustav odnosi se na drugi benzenski prsten (zeleno). Protoni H11, H12, H13 i H14 međusobno su skalarno spregnuti. Proton H9 nema spregu s njima što se zaključuje iz singletnog signala u spektru ^1H . U aromatskom području spektra u rasponu od 6,86 ppm do 8,30 ppm pojavljuju se dubleti pri 8,24 ppm i 6,97 ppm i tripleti pri 7,57 ppm i 7,02 ppm (slika 8). Na temelju cijepanja multipliteta potvrđen je disupstituirani benzenski prsten u orto-položaju.



Slika 6. Uvećani prikaz spektra COSY spoja **S2** uz označene spinske sustave (žuto i zeleno) i spinski sustav salicilaldehida (crveno).



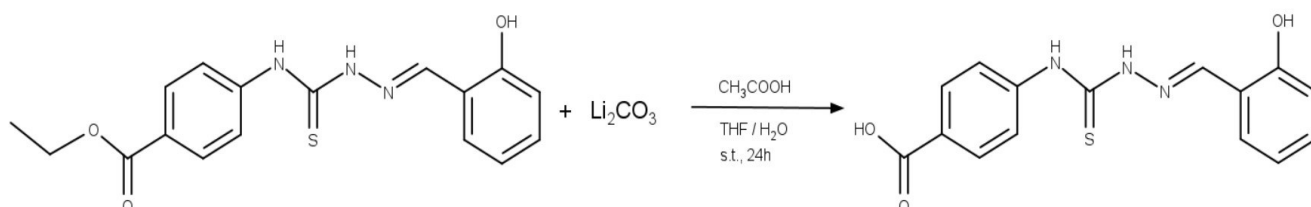
Slika 7. Uvećani prikaz dijela spektra ^1H NMR koji odgovara području signala protona H9,H3,H4,H5,H6 spoja **S2** snimljenog u MeOD. Ispod signala nalaze se vrijednosti integrala.



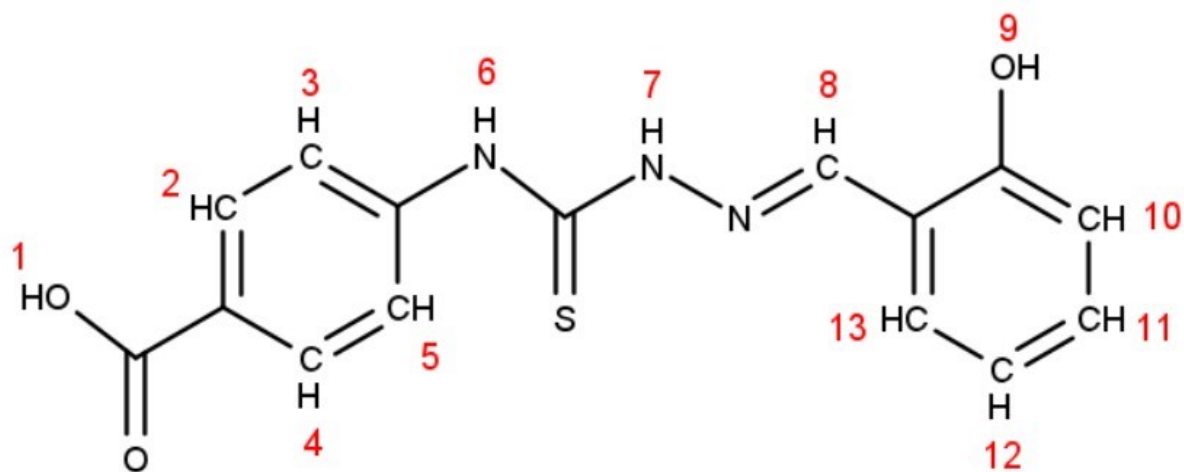
Slika 8. Spektar ^1H NMR spoja **S2** u području 6,86-8,30 ppm uz uvećani prikaz područja koja odgovaraju pojedinim signalima.

4.3. Priprava 4-({[(*E*)-[(2-hidroksifenil)metiliden]amino]karbamotioil}amino)benzojeve kiseline, S3

Reakcija tiosemikarbazona i derivata makrolida može se odvijati samo ako tiosemikarbazon ima karboksilnu kiselinu u svojoj strukturi. Zbog toga je potrebno produkt **S2** hidrolizirati kako bi se esterska skupina prevela u karboksilnu (shema 3). U tu svrhu upotrijebljen je litijev karbonat u otopini tetrahidrofurana i vode (21:1). Li_2CO_3 dodan je u velikom suvišku kao heterogeni katalizator, a mala količina vode također pomaže u ubrzavanju reakcije.⁹¹ Kao međuprodukt dobivena je litijeva sol spoja **S2** te je smjesa prvo uparena na rotavaporu, kako bi se uklonio THF a zatim se smjesa filtrirala uz sniženi tlak. Karbonat je ostao u talogu, a litijev karboksilat je zadržan u filtratu. Sljedeći korak bio je zakiseljavanje otopine ledenom octenom kiselinom. Da bi došlo do hidrolize međuprodukta, potreban je pH manji od 7, te se tada odvija protonacija karboksilne skupine čime se dobije 4-({[(*E*)-[(2-hidroksifenil)metiliden]amino]karbamotioil}amino)benzojeva kiselina.

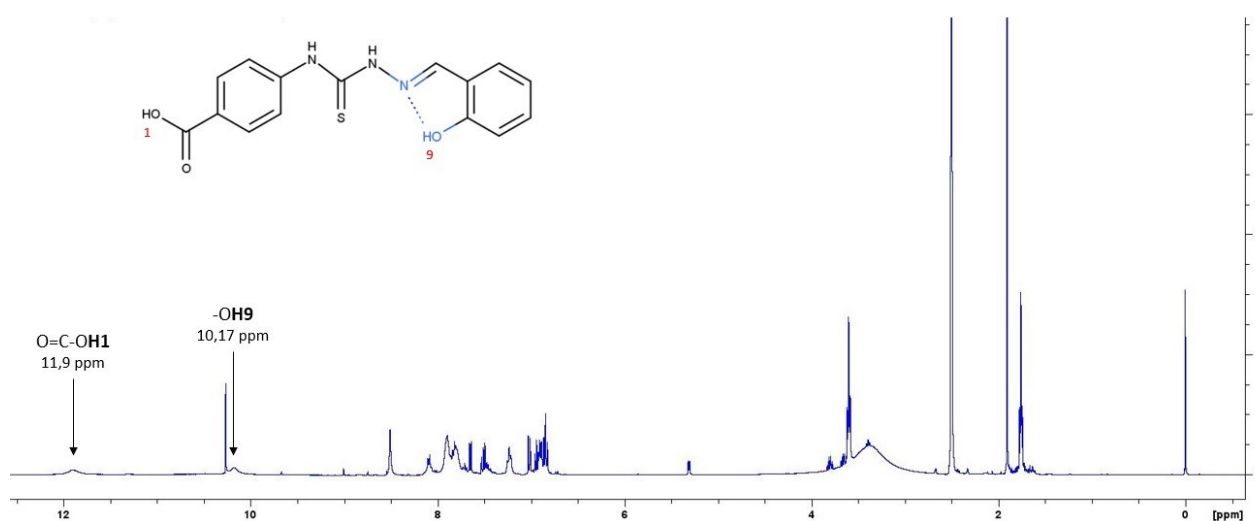


Shema 3. Kemijska priprava tiosemikarbazona **S3** uz spoj **S2**, litijev karbonat i ledene octene kiseline u tetrahidrfuranu i vodi pri sobnoj temperaturi.

Slika 9. Strukturna spoja **S3** s označenim protonima.Tablica 3. Asignacija kemijskih pomaka ^1H NMR spoja **S3**.

H-atom	δ / ppm
1	11,9
2	7,71
3	6,73
4	7,65
5	6,95
6	8,75
7	9,01
8	8,51
9	10,17
10	8,1
11	7,51
12	7,0
13	5,3

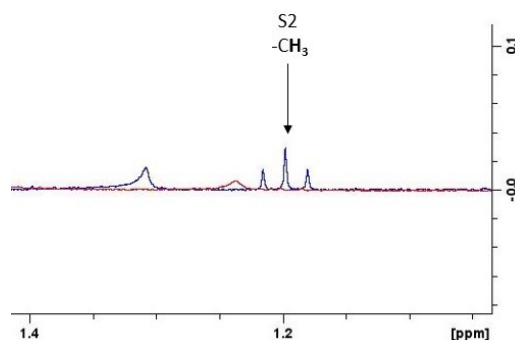
U spektru ^1H NMR (slika 10) uočena su tri široka signala pri 11,9 ppm, 10,17 ppm i 3,38 ppm. Pripadaju protonima H1 koji je dio karboksilne skupine, H9 dio hidroksilne skupine vezane na aromat i protonu vode iz otapala (slika 9). Širina ovih signala je posljedica brze izmjene protona spoja s protonima iz otapala. Iako i protoni H6 i H7 spadaju u izmjenjive protone jer su vezani za dušik, nemaju široki signal već naprotiv jedva primjetni. Signal za proton H9 hidroksilne skupine pomaknut je prema nižem magnetnom polju odnosno ima veći kemijski pomak što ukazuje na postojanje intramolekulske vodikove veze. Veza $\text{O}-\text{H}\cdots\text{N}$ nastaje između hidroksilne skupine i iminskog dušika. Za njezin nastanak je važno da su proton-donor i proton-akceptor u povoljnoj prostornoj orijentaciji. Zbog toga je konformacija tiosemikarbazona drugačija od dosad prikazanog. Hidroksilna i imino skupina moraju biti u sin-položaju s obzirom na kemijsku vezu između imino i benzenskog ugljika (slika 10). U spoju **S2** također postoji intramolekulska vodikova veza između istih atoma, no ona nije vidljiva u ^1H spektru, jer je korišten deuterirani metanol u kojem dolazi do brže izmjene protona vezanih na kisiku i dušiku.



Slika 10. Spektar ^1H tiosemikarbazona **S3** u DMSO- d_6 uz označene izmjenjive protone H1 i H9 te prikazom intermolekulske vodikove veze (plavo).

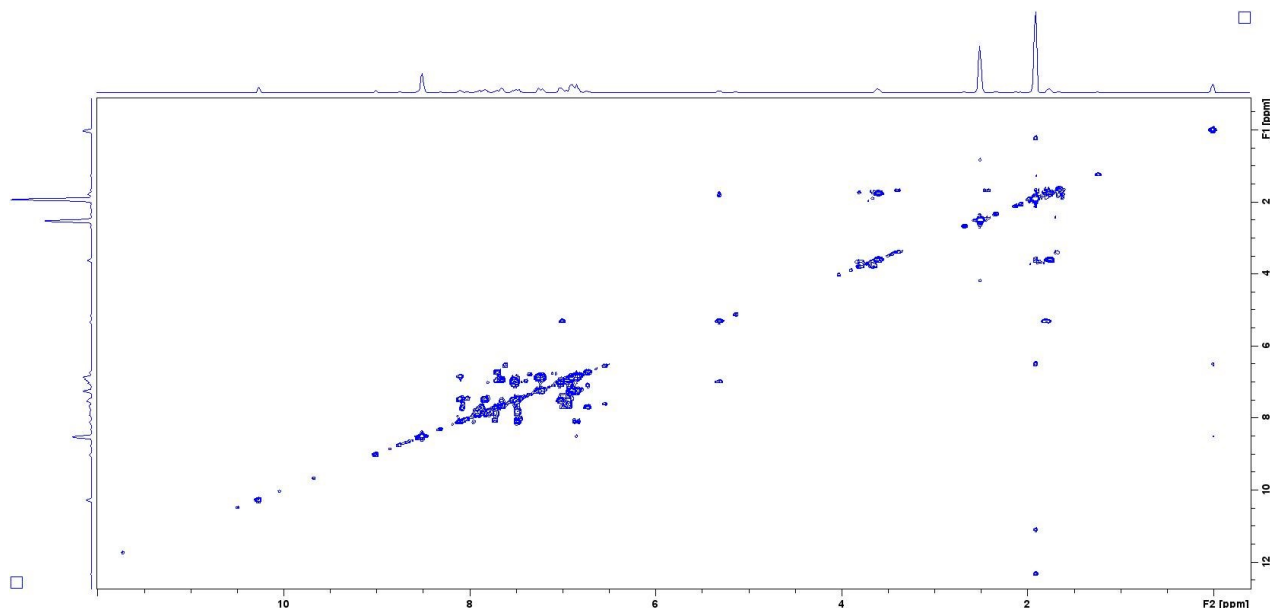
Dodatni dokaz da je došlo do hidrolitze estera u karboksilnu kiselinu vidljiv je u spektru ^1H NMR u području između 1,4 ppm i 1,1 ppm (slika 11). Usporedbom spektra tiosemikarbazona estera **S2** i tiosemikarbazona karboksilne kiseline **S3** vidljivo je da u spektru drugoga (crvenom)

ne postoji signal metilne skupine $-\text{CH}_3$ pri 1,19 ppm koja je vidljiva u spektru prvoga (plavo) u obliku tripleta.

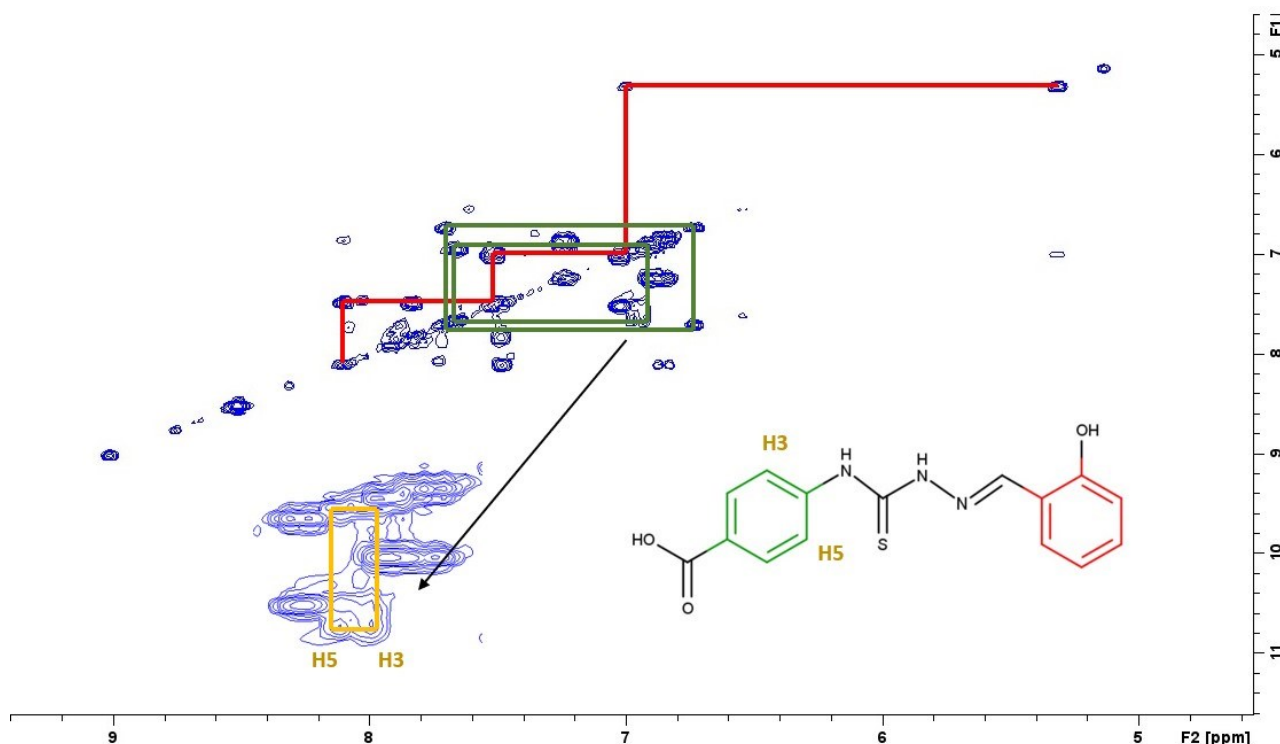


Slika 11. Preklopljeni spektri ^1H NMR spojeva **S2** (plavo) i **S3** (crveno) u rasponu 1,1-14 ppm te označenim protonima metilne skupine spoja **S2**. Spektar spoja **S2** je snimljen u MeOD a **S3** u DMSO- d_6 .

Analizom spektra COSY (slika 12) utvrđeni su korelacijski signali protona pojedinog benzenskog prstena tiosemikarbazona **S3**. Korelacija protona aromata porijeklom iz salicilne kiseline označena je crvenom bojom. Ne postoji sprezanje protona H8 jer je od najbližeg protona udaljen sa četiri kemijske veze, a u COSY spektru je moguće sprezanje protona udaljenih najviše s tri veze. Protoni drugog aromatskog prstena pokazuju spregu između atoma H2 i H3 pri 7,71 i 6,73 ppm, te između H4 i H5 pri 7,65 i 6,95 ppm. Uočeno je slabo sprezanje između protona H5 i H3, što potvrđuje da se radi o istom benzenskom prstenu u para-orijentaciji (slika 13).



Slika 12. Spektar COSY spoja **S3** snimljen u DMSO- d_6 pri 298K.

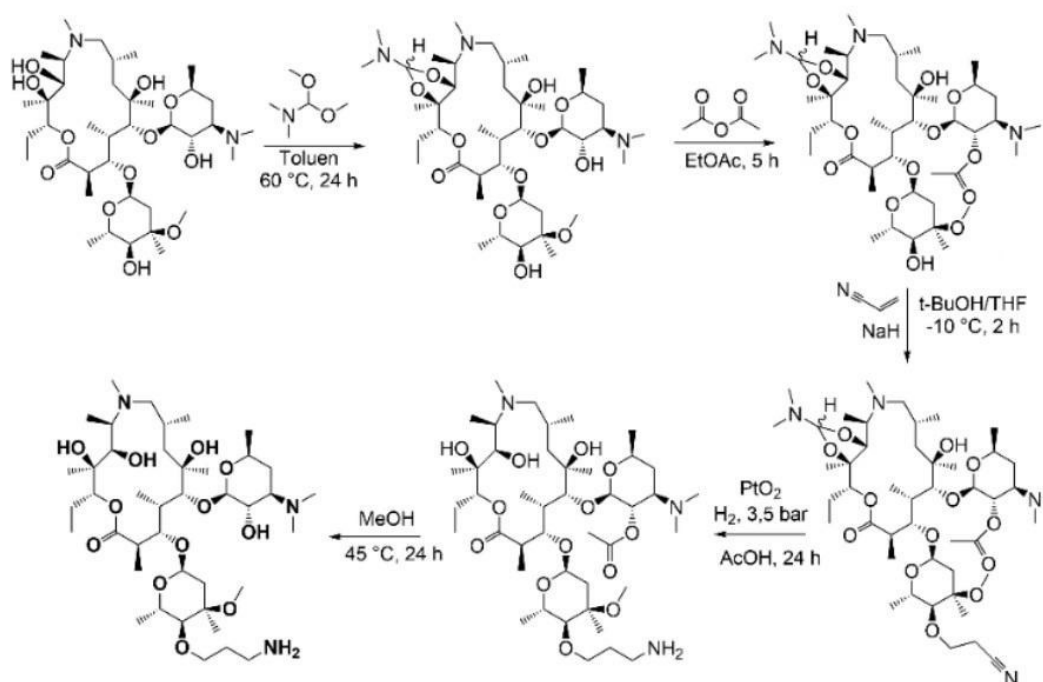


Slika 13. Uvećani prikaz spektra COSY spoja **S3** snimljen u DMSO- d_6 pri 298K u rasponu od 9,2-4,6 ppm s označenim spinskim sustavima aromatskih prstena (zeleno i crveno) i uvećanim područjem korelacijskog signala između protona H3 i H5.

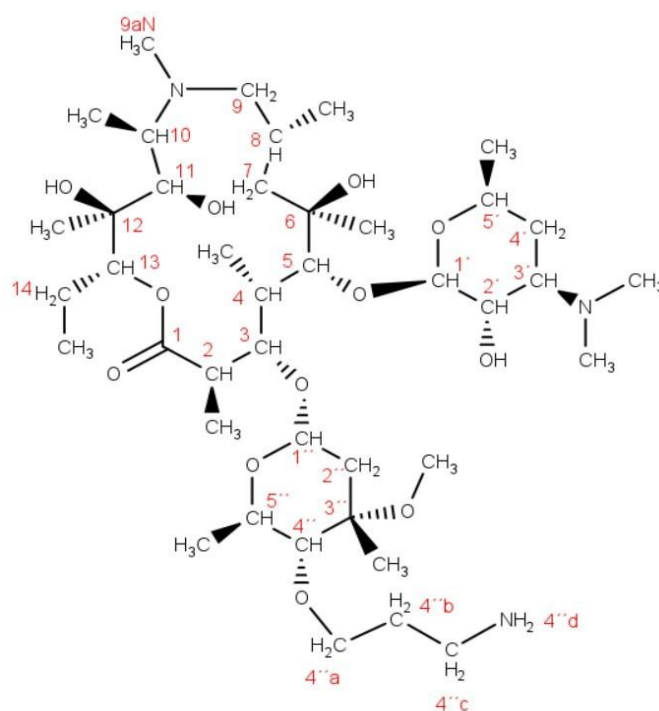
4.4. Priprava azitromicin - 4''- propil salicilaldehid tiosemikarbazon-4-karboksilamid, **S4**

4.4.1. Karakterizacija 4''-O-(3-aminopropil)azitromicina (**M4''**)

U sklopu ovog diplomskog rada nije pripremljen 4''-aminopropilni derivat azitromicina, već je korišten prethodno sintetiziran produkt.⁹² Analizirani su njegovi spektri ^1H NMR (slika 15) i COSY (slika 16) kako bi se lakše i uspješnije karakterizirao sintetizirani makrozon **S4**. Na slici 14 prikazana je struktura spoja **M4''** koji se sastoji od azitromicina i aminopropila vezanog na kisik atoma 4''C. Sinteza navedenog derivata azitromicina prikazana je na preuzetoj shemi 4.



Shema 4. Priprava 4-O-(3-aminopropil)azitromicina **M4''**.⁹³

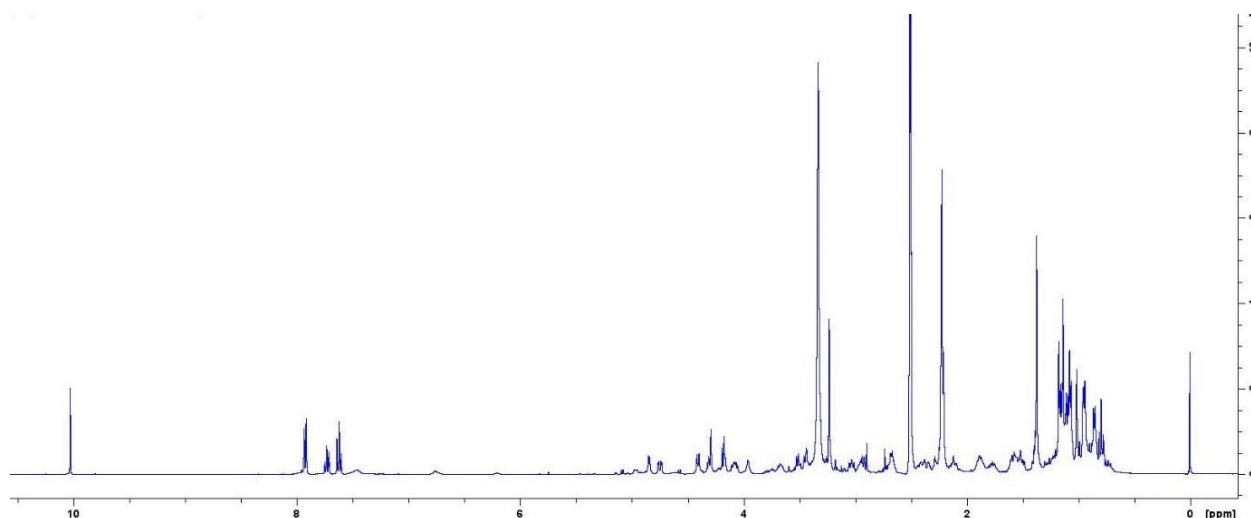


Slika 14. Struktura spoja **M4''** s označenim protonima.

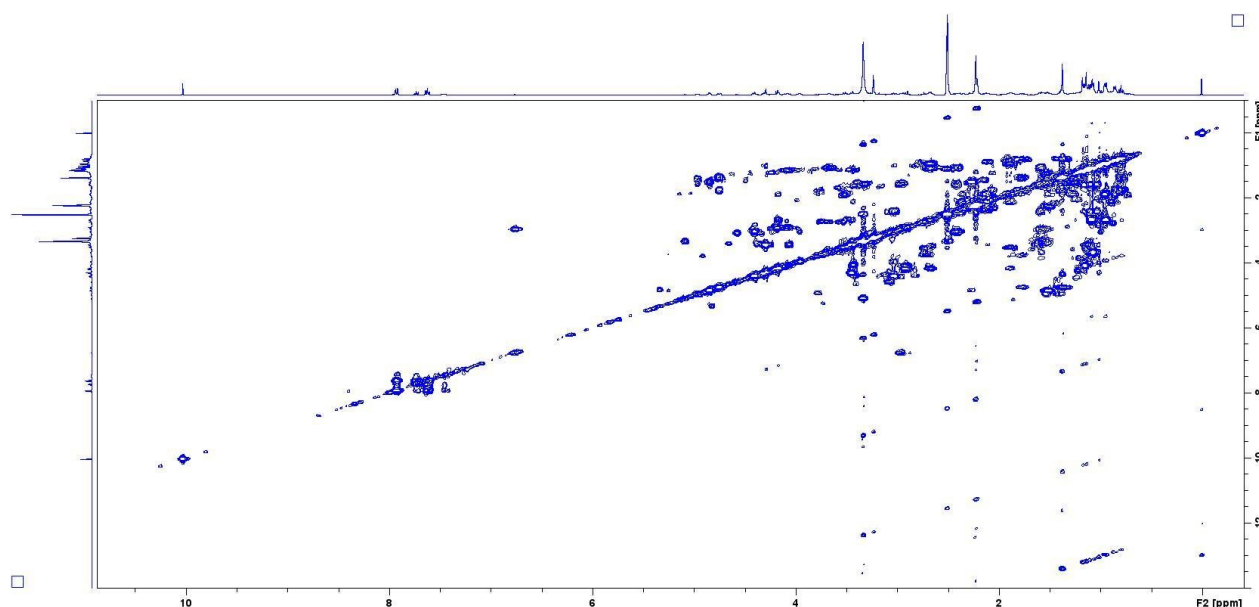
Tablica 4. Asignacija kemijskih pomaka ^1H NMR 4''-aminopropilnog derivata azitromicina.

H-atom	δ / ppm	H-atom	δ / ppm
2	2,95	14CH ₃	1,25
2CH ₃	0,95	1'	4,58
3	4,29	2'	3,08
4	1,37	2'OH	- ^a
4CH ₃	1,01	3'	2,40
5	4,75	3'CH ₃	2,89
6OH	- ^a	4'	1,88-2,12
6CH ₃	1,17	5'	3,52
7	2,91	5'CH ₃	1,10
8	1,74	1''	4,75
8CH ₃	0,85	2''	1,40-1,77
9	2,95	3''CH ₃	1,37
9aCH ₃	2,22	3''OCH ₃	3,12
10	3,43	4''	3,43
10CH ₃	1,15	5''	4,08
11	4,07	5''CH ₃	1,14
11OH	- ^a	4''a	3,67
12OH	- ^a	4''b	1,08-1,57
12CH ₃	0,99	4''c	2,50-2,67
13	4,84	4''d	2,21
14	1,51-2,26		

^a -signal nije pronađen

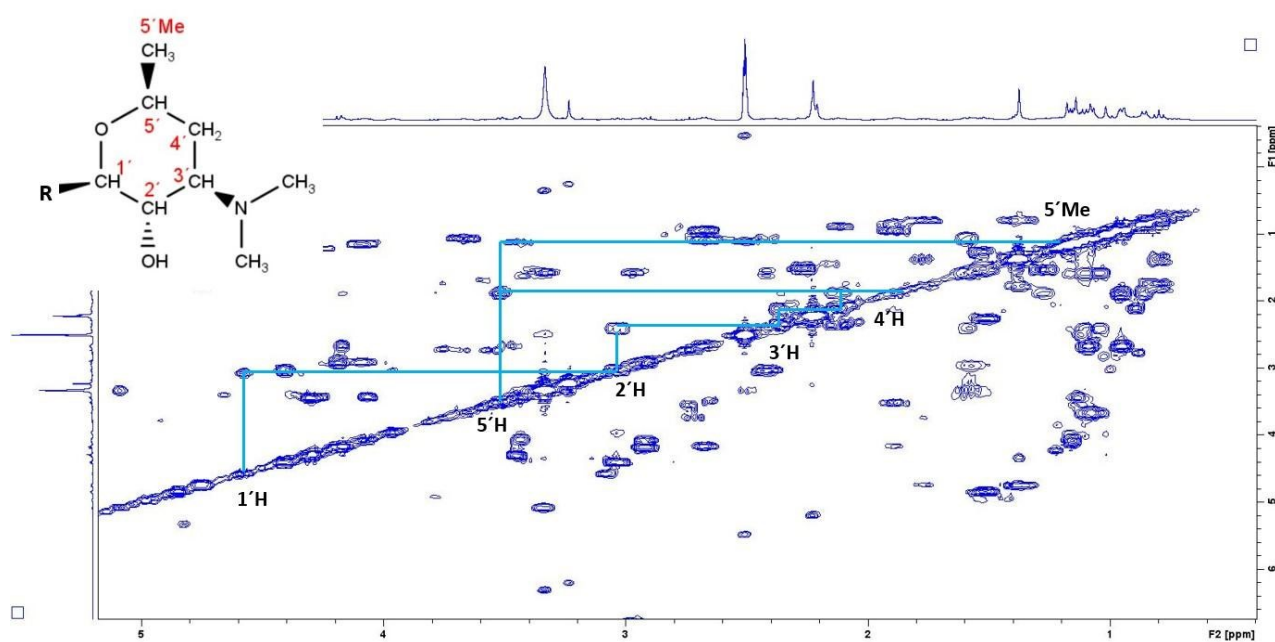


Slika 15. Spektar ^1H NMR spoja M4'' snimljen u DMSO-d_6 pri 298K.



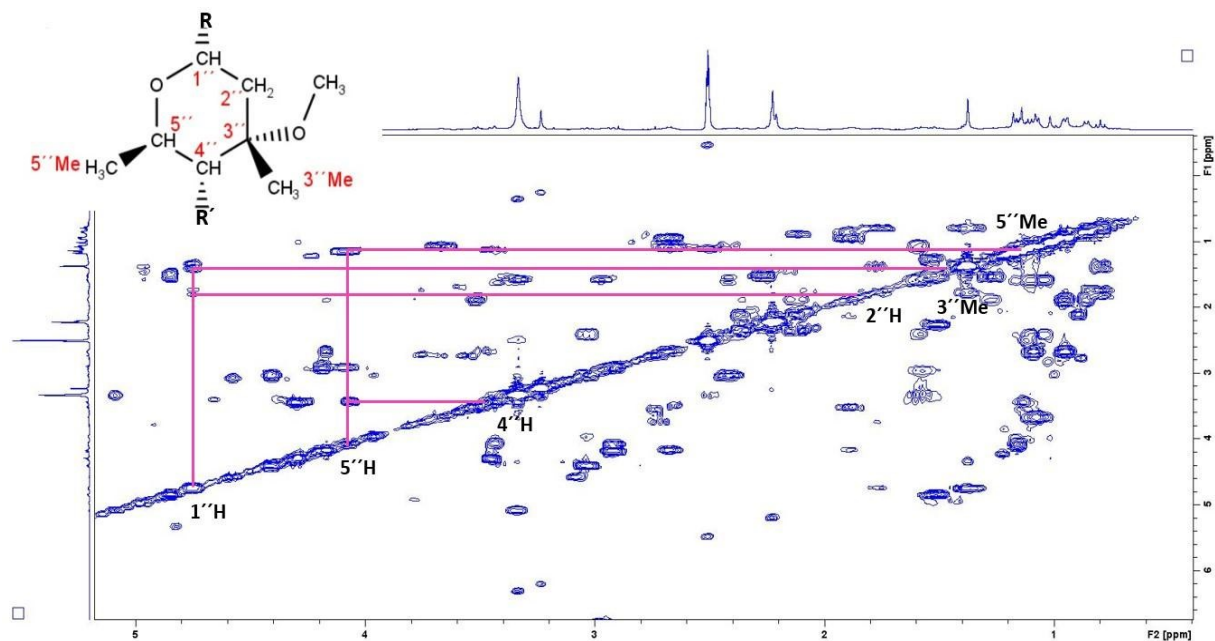
Slika 16. Spektar COSY spoja M4'' snimljen u DMSO-d_6 pri 298K.

Analizom korelacijskih signala u spektru COSY utvrđeno je koji protoni pripadaju pojedinom šećeru vezanom na petnaesteročlani prsten azitromicina (slika 17). Prvo je obrađen šesteročlani prsten vezan preko kisika na peti ugljikov atom makrolida. Sastoji se od jednog spinskog sustava svih protona osim dvije metilne skupine vezane na 3' amin. Signal hidroksilne skupine vezane na 2'C atom nije pronađen u spektru ^1H NMR (slika 15) jer se radi o izmjenjivom protonu.



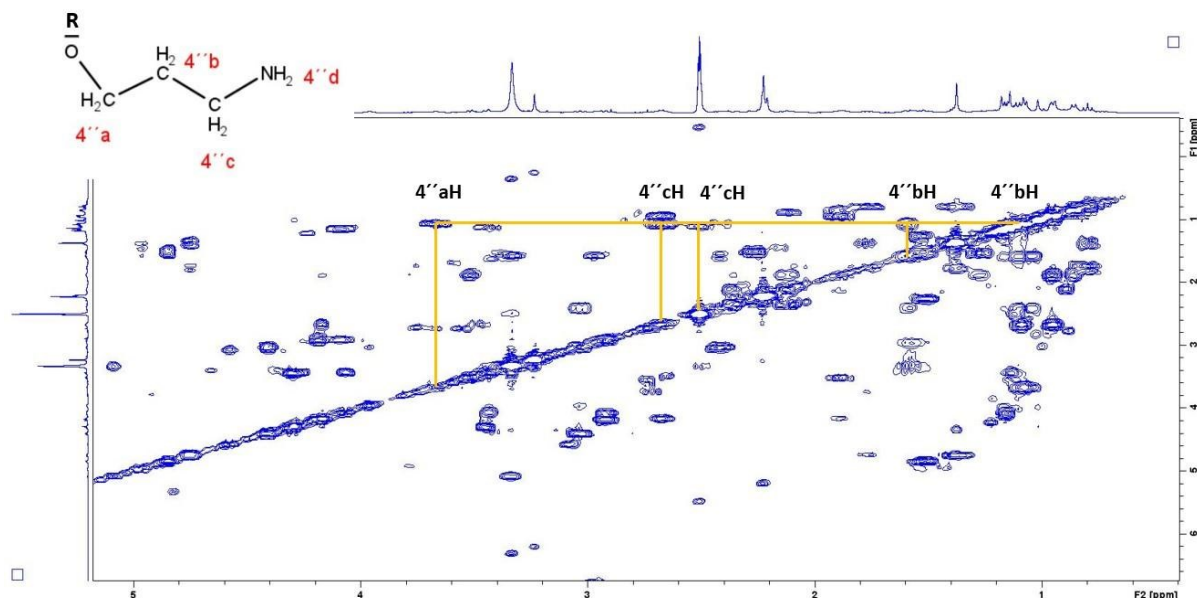
Slika 17. Uvećani prikaz spektra COSY spoja **M4''** u DMSO- d_6 pri 298K u rasponu od 0,60 - 5,2 ppm. Plavom bojom označen je spinski sustav u desozaminu vezanom na atom 5C spoja **M4''** prikazanog na vrhu slike.

Korelacije drugog spinskog sustava kladinoze vezane na atom 3C makrolida prikazane su na slici 18. Ovdje se međusobno skalarno sprežu svi protoni osim protona metilne skupine vezane za kisik na atomu 3''C.



Slika 18. Uvećani prikaz spektra COSY spoja **M4''** u DMSO- d_6 pri 298K u rasponu od 0,60 - 5,2 ppm. Rozom bojom označen je spinski sustav u kladinozi vezanoj na atom 3C spoja **M4''** prikazanog na vrhu slike.

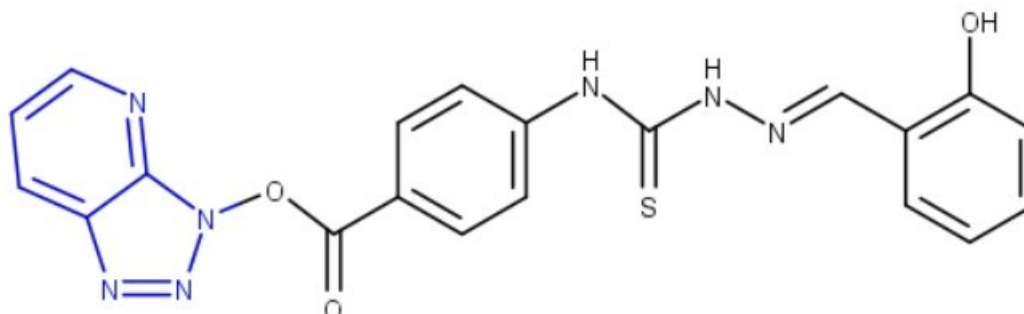
Na temelju međusobnog sprezanja protona koji čine aminopropilni supstituent, asignirani su i njihovi kemijski pomaci (slika 19). Na amino skupinu će se, u sljedećem koraku, vezati pripremljeni tiosemikarbazon.



Slika 19. Uvećani prikaz spektra COSY spoja **M4''** u DMSO- d_6 pri 298K u rasponu od 0,60 - 5,2 ppm. Žutom bojom označen je spinski sustav aminopropilne skupine vezane na atom $4''C$ spoja **M4''** prikazanog na vrhu slike.

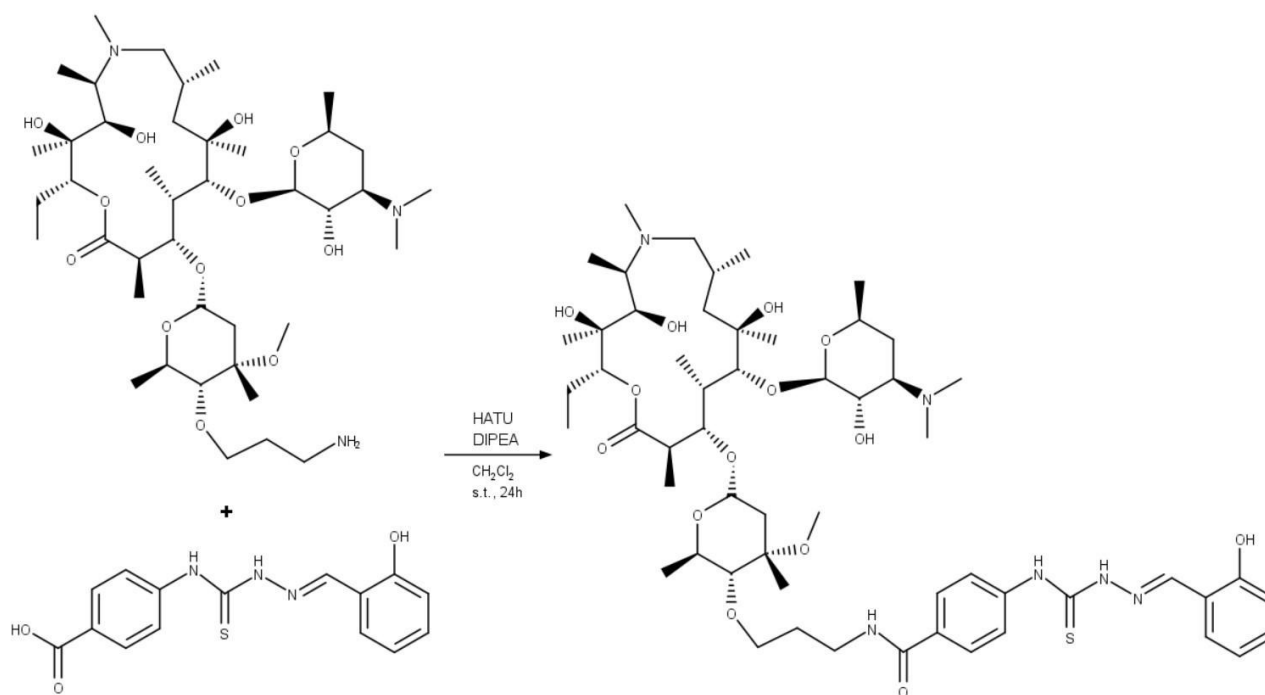
4.4.2. Priprava i asignacija makrozona **S4**

Prije reakcije esterifikacije makrolida **M''4** i tiosemikarbazona **S3**, potrebno je aktivirati estersku skupinu tiosemikarbazona. Koristi se reagens DIPEA koji služi za deprotonaciju karboksilne skupine spoja **S3**. Produkt reakcije su karboksilatni anion i diizopropiletilamonijeva sol. U sljedećem koraku dolazi do elektrofilnog napada HATU-a na karboksilatni anion te se oslobađa voda. Ovom reakcijom dobivena je aktivirana esterska skupina (slika 20), a 1-hidroksi-7-azabenzotriazol služi kao dobra izlazna skupina.

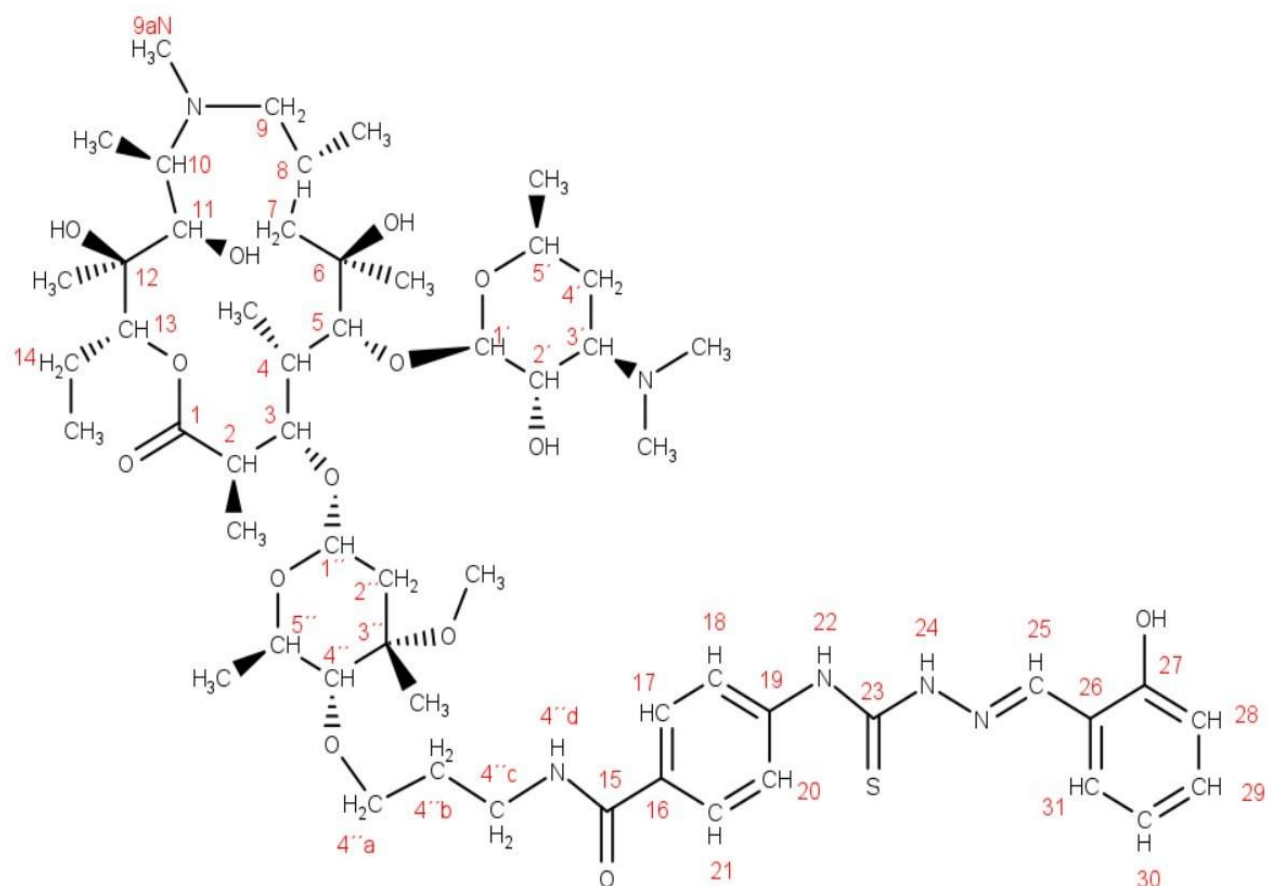


Slika 20. Strukturni prikaz aktivirane esterske skupine tiosemikarbazona **S3** uz HATU.

Nakon 30 minuta, dodan je 4''-O-(3-aminopropil)azitromicin, čija se amino skupina nukleofilnim napadom veže za karboksilnu skupinu tiosemikarbazona **S3** (shema 5). Dobiveni makrozon **S4** karakteriziran je jednodimenzijskom (slika 22) i dvodimenzijskom (slika 23) spektroskopijom NMR. Puni naziv makrozona je N-(3-{{(2*R*,3*R*,4*S*)-6-{{(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,8*R*,10*R*,11*R*,12*S*,13*S*,14*R*)-11-{{(2*R*,3*S*,4*R*,6*S*)-4-(dimetilamino)-3-hidroksi-6-metiloksan-2-il]oksi}-2-etil-3,4,10-trihidroksi-3,5,6,8,10,12,14-heptametil-15-okso-1-oksa-6-azaciklopentadekan-13-il]oksi}-4-metoksi-2,4-dimetiloksan-3-il]oksi}propil)-4-({(E)-[(2-hidroksifenil)metiliden]amino]karbamotioil}amino)benzamide. Povezanost protona i ugljikovih atoma kroz jednu ili više veza dobiveni su analizom HSQC (slika 24) i HMBC (slika 25) spektara.



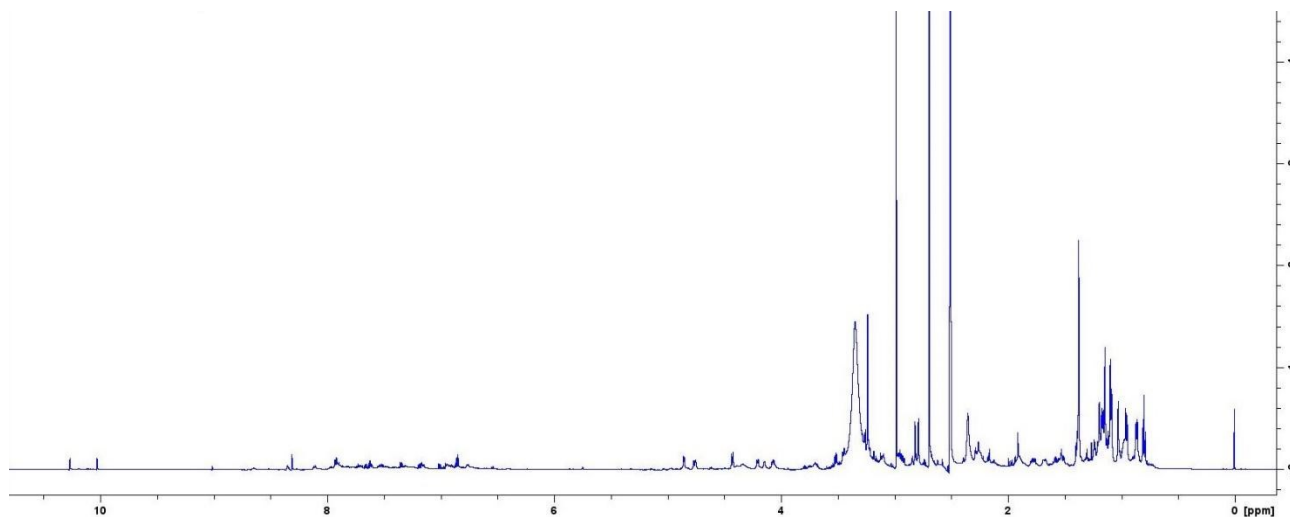
Shema 5. Kemijska priprava spoja **S4** iz 4''-aminopropilnog derivata azitromicina i **S3** uz HATU, DIPEA u diklormetanu pri 298 K.

Slika 21. Strukturna spoja **S4** s označenim protonima.Tablica 5. Asignacija kemijskih pomaka ^1H NMR spoja **S4**.

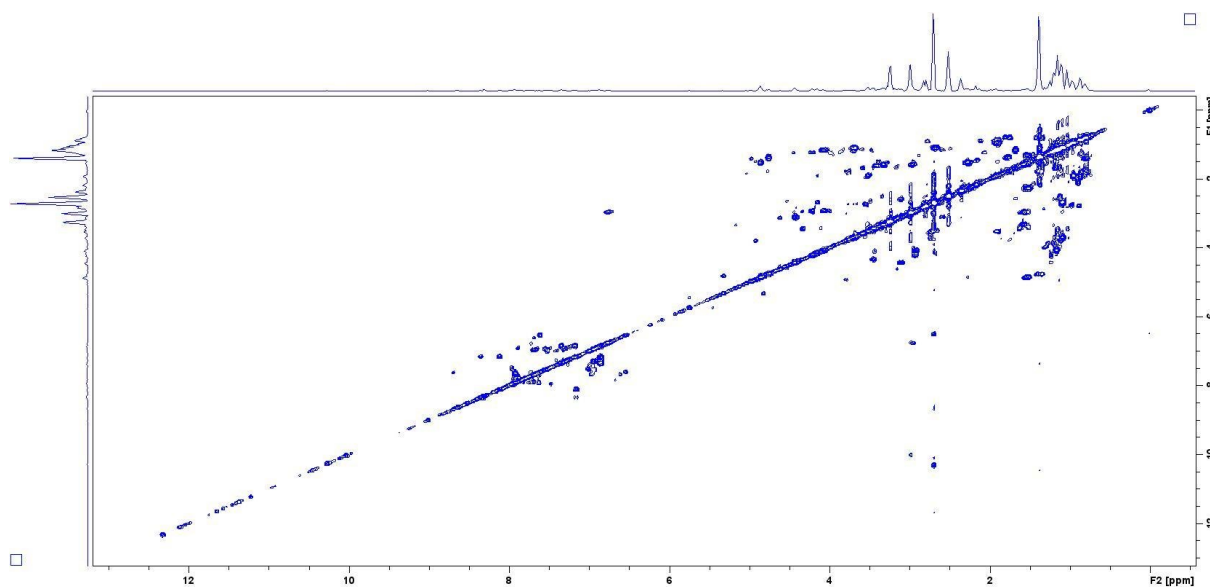
Atom	$\delta(^1\text{H}) /$ ppm	$\delta(^{13}\text{C}) /$ ppm	Atom	$\delta(^1\text{H}) /$ ppm	$\delta(^{13}\text{C}) /$ ppm
1	-	178,1	5'CH3	1,10	21,9
2	2,98	43,21	1''	4,74	76,7
2CH₃	0,95	9,34	2''	1,77-1,40	21,4
3	4,55	71,7	3''	-	74,7
4	1,37	30,8	3''CH3	1,36	30,8
4CH₃	1,02	18,0	3''OCH3	3,12	49,6
5	4,75	76,8	4''	3,43	76,7
6	-	73,3	5''	4,07	65,4
6OH	- ^a	-	5''CH3	1,14	21,5

6CH₃	1,19	27,6	4''a	3,69	67,2
7	2,98	37,7	4''b	1,57	30,2
8	1,90	26,3	4''c	2,98	37,4
8CH₃	0,87	22,6	4''d	6,75	-
9	2,95	77,3	15	-	168,9
9a NCH₃	2,35	40,4	16	-	136,8
10	3,46	68,6	17	7,89	130,4
10CH₃	1,14	21,5	18	7,69	131,3
11	4,07	77,8	19	-	161,7
11OH	- ^a	-	20	7,63	129,2
12	-	73,3	21	7,92	130,0
12CH₃	0,99	18,11	22	10,82	-
12OH	-	-	23	-	-
13	4,85	95,1	24	10,26	-
14	1,51-2,27	33,1	25	-	-
14CH₃	1,26	15,24	26	8,3	150,85
1'	4,62	102,7	27	-	146,3
2'	3,09	70,3	28	-	139,5
2'OH	- ^a	-	28OH	- ^a	-
3'	2,35	40,8	29	8,10	127,3
3'N (CH₃)₂	2,84	40,5	30	7,35	130,3
4'	2,12	34,7	31	7,15	119,0
5'	3,51	83,4	32	6,85	119,3

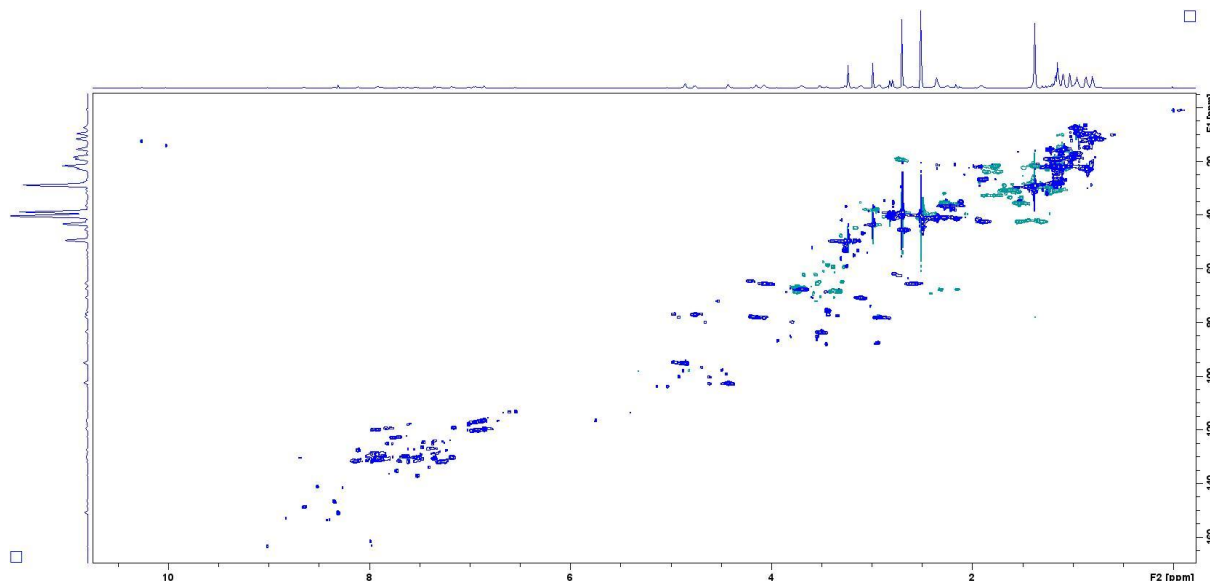
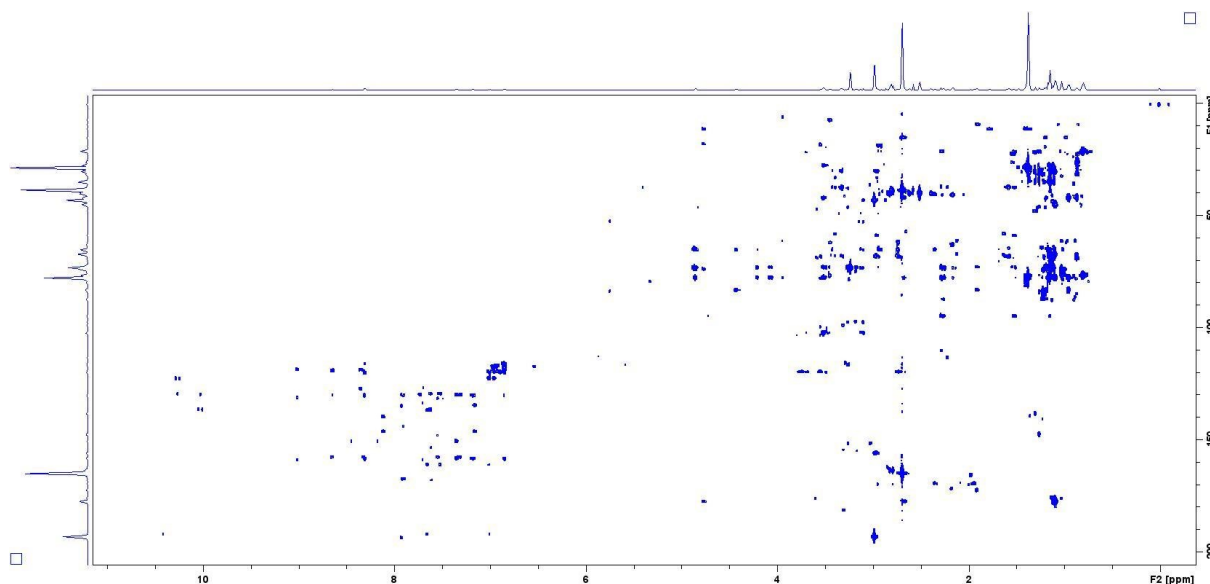
^a -signal nije pronađen



Slika 22. Spektar ^1H NMR spoja S4 snimljen u DMSO- d_6 pri 298 K.

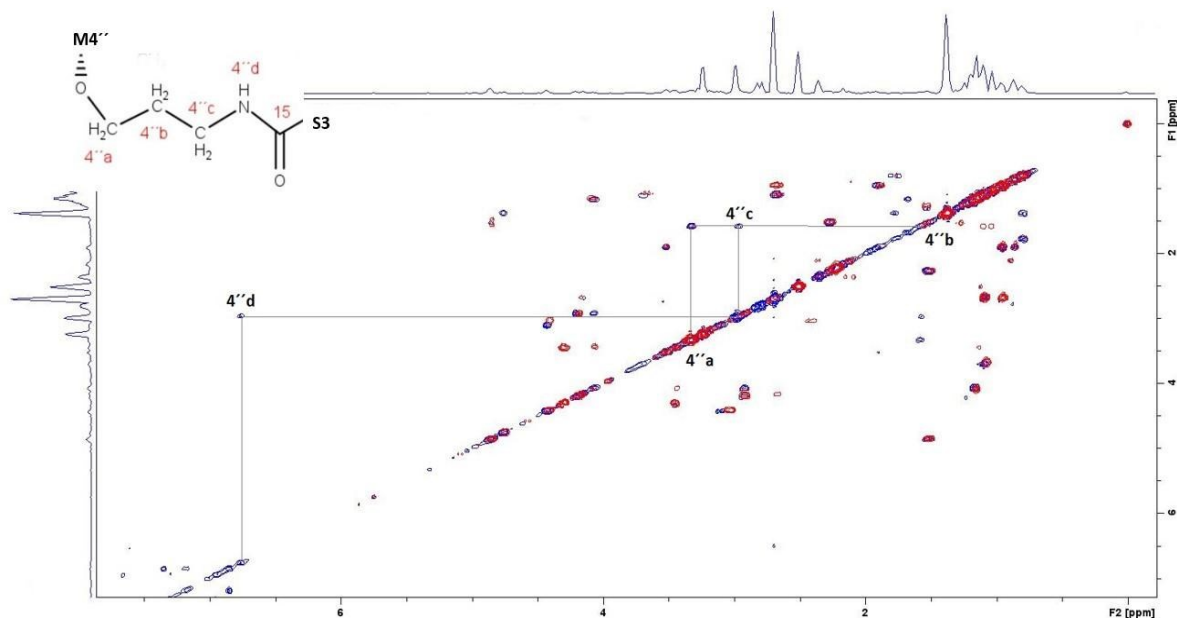


Slika 23. Spektar COSY spoja S4 snimljen u DMSO- d_6 pri 298 K.

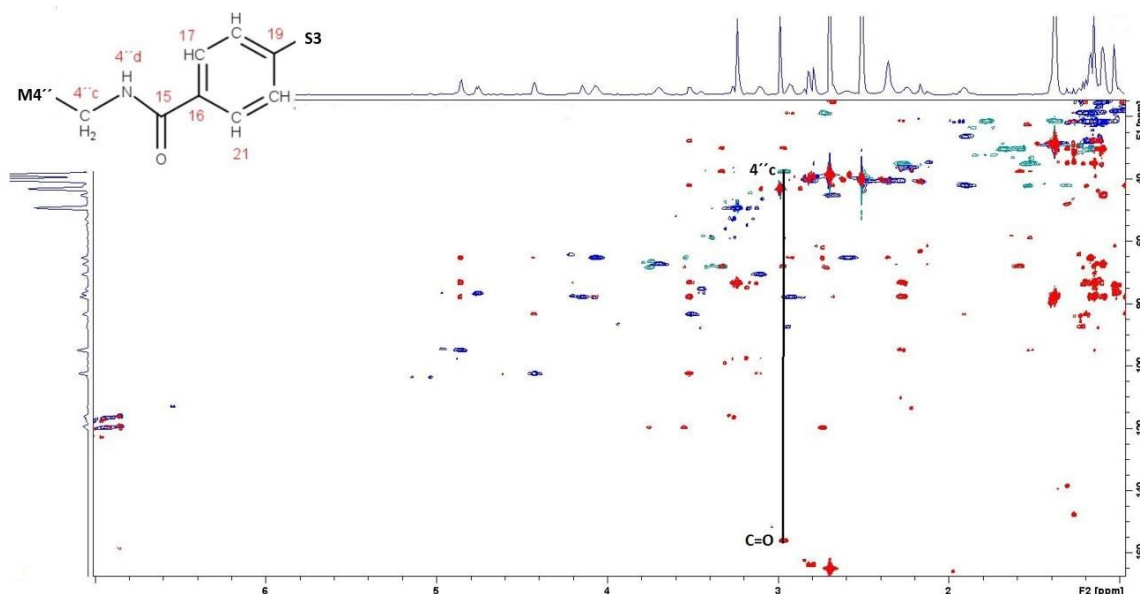
Slika 24. Spektar HSQC spoja **S4** snimljen u DMSO- d_6 pri 298 K.Slika 25. Spektar HMBC spoja **S4** snimljen u DMSO- d_6 pri 298 K.

Prvi pokazatelj koji govori da je došlo do vezanja makrolida **M4''** i tiosemikarbazona **S3** je izostajanje signala u spektru ^1H NMR makrozona za karboksilnu kiselinu. Ne postoji signal pri 11,9 ppm, što upućuje na prisutnost protona iz karboksilne skupine, kao što je pronađeno u spektru ^1H tiosemikarbazona **S3**. Sljedeća promjena koja se dogodila u spektru vidljiva je u preklopljenom spektru COSY spojeva **S4** i **M4''** (slika 26). U njemu je prikazano spinsko sprezanje protona koji čini skupina 4''-O-(3-aminopropil) vezana na azitromicin te je uočen odsjenjujući učinak protona H4''d u spoju **S4**. Njegov kemijski pomak iznosi 6,97 ppm, a kemijski pomak istog protona u **M4''** iznosi 2,21 ppm. Također, pojavljuje se razlika između

kemijskog pomaka protona H4''c makrolida (2,67/2,51 ppm) i makrozona (2,98 ppm). To znači da je došlo do pomaka prema nižim magnetnim poljima zbog stvaranja nove esterske veze. Potvrda novonastale esterske veze prikazana je u preklopljenim spektrima HSQC i HMBC, gdje je pronađen korelacijski signal između protona H4''c i karbonilnog ugljikovog atoma (slika 27).



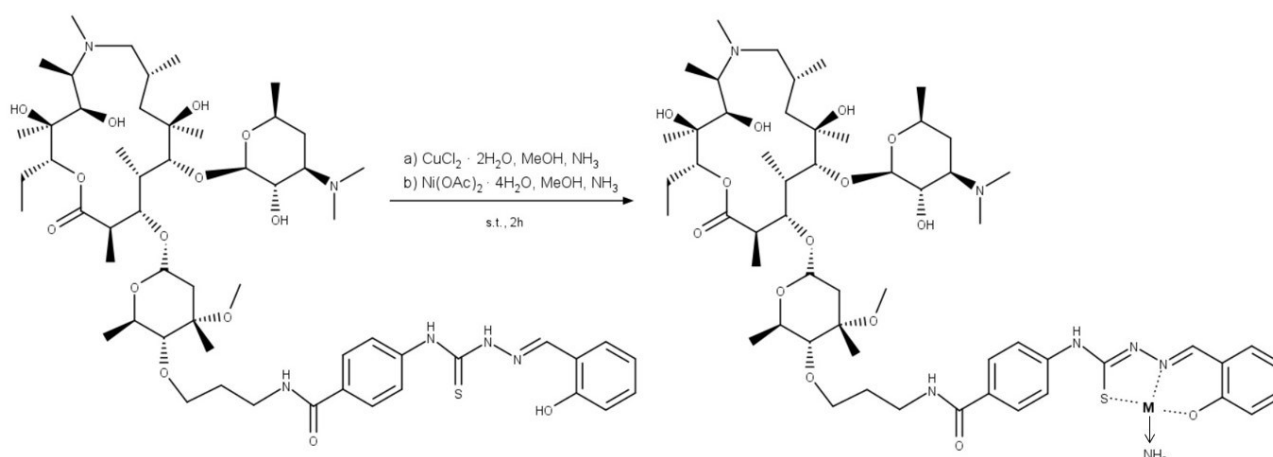
Slika 26. Uvećani dio preklopljenog spektra COSY spoja **S4** (plavo) s **M4''** (crveno) u rasponu od 0-8 ppm snimljen u DMSO-d₆ pri 298 K s označenim korelacijskim signalima između protona H4''c i protona H4''a, H4''b i H4''d.



Slika 27. Uvećani dio preklapljenih spektara HSQC (plavo i zeleno) HMBC (crveno) spoja **S4** i u rasponu od 0-8 ppm snimljen u DMSO- d_6 pri 298K s označenim korelacijskim signalima između protona H4''c i karbnilne skupine (C=O).

4.5. Karakterizacija kompleksa bakra(II) i nikla(II) s makrozonom **S4** (**S4-Cu** i **S4-Ni**)

U zadnjem koraku pripremljeni su kompleksi makrozona **S4** s bakrom(II) i niklom(II) (shema 6). Za navedene reakcije korišteni su bakrov(II) klorid monohidrat i niklov(II) acetat tetrahidrat.



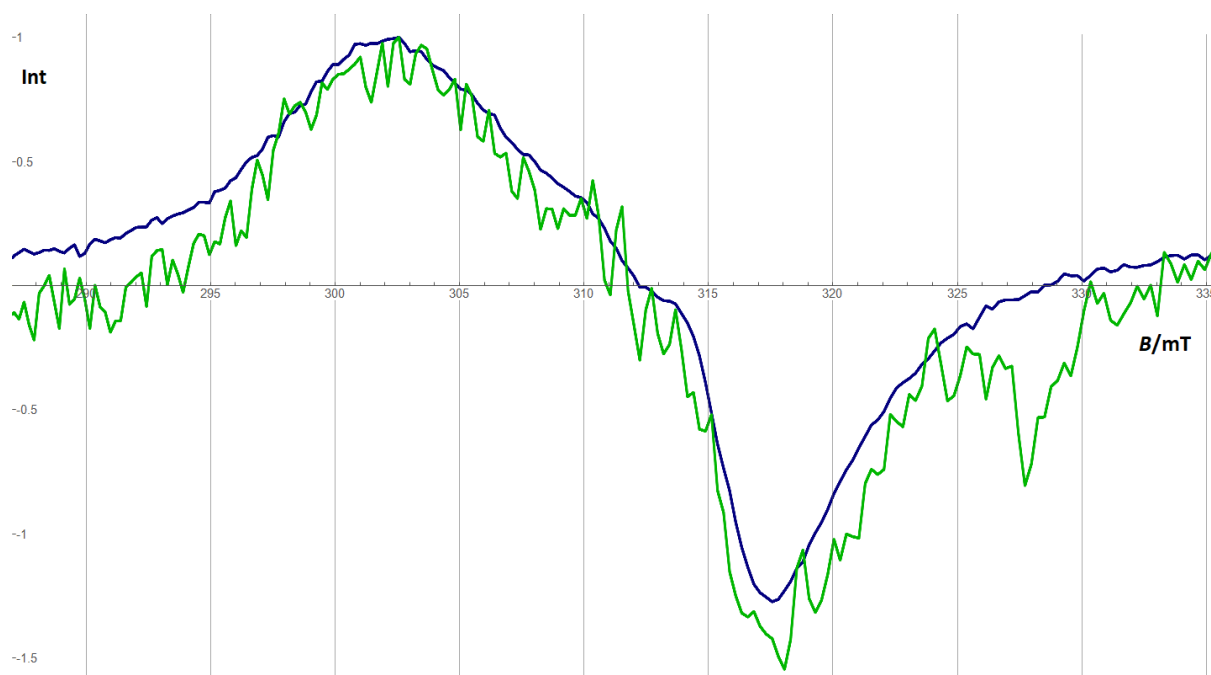
Shema 6. Kemijska priprava kompleksa makrozona **S4** s bakrom(II) i niklom(II). M je oznaka za dvovalentni metal nikla i bakra.

Tiosemikarbazonski dio makrozona S4 tridentantno koordinira metalne ione. Za to su odgovorni atomi dušika, sumpora i kisika koji predstavljaju izvrsne donorske atome za stvaranje koordinacijske veze. Nakon kompleksiranja dolazi do promjene funkcijskih skupina tautomernim procesom. Jednostruka veza između ugljika i dušika prelazi u dvostruku, a dvostruka veza između ugljika i sumpora prelazi u jednostruku te dolazi do prijelaza iz tionskog u tiolni oblik.

Kompleks nikla(II) nije bilo moguće karakterizirati spektroskopijom NMR zbog njegove slabe topljivosti. Zbog izražene promijene boje prilikom pripreve kompleksa, iz plavo zelene u žuto-narandastu, zaključeno je da je ipak došlo do nastajanja kompleksa **S4-Ni**.

Etanolna otopina kompleksa **S4-Cu** analizirana je spektroskopijom EPR zbog njene veće osjetljivosti. Spektroskopijom EPR dobivamo informaciju o promijeni okoline paramagnetskog centra, u ovom slučaju koordinacijske sfere iona bakra(II). EPR spektri prikazani na slici 28 potvrđuju da je došlo do promijene u koordinacijskoj sferi bakra(II). Nastanak kompleksa uzrokovao je i promjenu boje iz plavo-zelene u maslinasto-zelenu.

Oba kompleksa su se pokazala slabo topljivima u polarnim i nepolarnim otapalima (DMSO, diklormetan, etanol). Zbog toga bi se moglo poraditi na modificiranju okosnice liganda uz pomoć različitih funkcijskih skupina kako bi se poboljšala topljivost kompleksa, ponajviše u fiziološkom mediju.



Slika 28. Usporedba spektara etanolne otopine bakrova(II) klorida dihidrata (plavo) i etanolne otopine spoja **S4-Cu** (zeleno). Spektri su normalizirani prema najvećoj vrijednosti i bazna linija je korigirana. Prikazana je prva derivacija ovisnosti absorpcije mikrovalnog zračenja o snazi magnetskog polja B_i .

§ 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu uspješno je provedena sinteza makrozonskog 4'' derivata azitromicina izvedenog iz 4-aminobenzojeve kiseline i salicilaldehida te njegovih kompleksa s niklom(II) i bakrom(II). U prvom koraku je iz etil 4-izotiocijanatobenzoata i hidrazin monohidrata sintetiziran 4-[(aminokarbamotiol)amino]benzoat. Njegovom reakcijom sa salicilaldehydom dobiven je etil 4-({[(E)-(2-hidroksifenil)metiliden]amino]karbamotioil}amino)benzoat. Hidroliza je uspješno provedena uz litijev karbonat i octenu kiselinu, a produkt reakcije je etil 4-({[(E)-(2-hidroksifenil)metiliden]amino]karbamotioil}amino)benzojeva kiselina. Dobiveni tiosemikarbazon vezan je na 4''-aminopropilni derivat azitromicina uz dodatka HATU i DIPEA što je potvrđeno spektroskopijom NMR. Na tako dobiveni makrozon vezani su nikel(II) i bakar(II) te su snimljeni njihovi spektri EPR. Sljedeći korak bio bi provođenje bioloških testova kako bi se utvrdila aktivnost sintetiziranog makrozona i njegovih metalnih kompleksa na susceptibilne i rezistentne sojeve bakterija. Pripravljene makrozon i njegovi kompleksi su dobri polazni spojevi u dizajnu derivata koji bi potencijalno imali bolja biološka i fizikalno-kemijska svojstva.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ADP – adenzindifosfat

ATP – adenzin trifosfat

COSY – korelacijska spektroskopija

DIPEA – N,N-diizopropiletilamin

DMSO-d₆ – deuterirani dimetil sulfoksid

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

EPR – elektronska paramagnetska rezonancija

FDA – Američka Agencija za hranu i lijekove

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

HMBC – engl. heteronuclear multiple bond correlation

HSQC – engl. heteronuclear single quantum coherence

MeOH – metanol

MLS – makrolidi, linkozamidi, streptogramin

mRNA – engl. messenger ribonukleinska kiselina

NMR – nuklearna magnetna rezonancija

rRNA – ribosomska ribonukleinska kiselina

THF – tetrahidrofuran

tRNA – engl. transfer ribonukleinska kiselina

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. F. Franceschi, E. M. Duffy, *Biochem. Pharmacol.* **71** (2006) 1016–1025.
2. D. Jelić, R. Antolović, *Antibiotics* (2016) 1-13.
3. M. T. Labro, *J Antimicrob Chemother.* **41** (1998) 37–46
4. M. T. Labro, *Expert Opin. Pharmacother.* **5** (2004) 541–550
5. K. Sassa, Y. Mizushima, T. Fujishita, R. Oosaki, M. Kobayashi, *J. Antimicrob. Chemother.* **43** (1999) 67–72
6. M. Bukvić Krajačić, M. Perić, K.S. Smith, Z. Ivezić Schönfeld, D. Žiher, A. Fajdetić, N. Kujundžić, W. Schönfeld, G. Landek, J. Padovan, *J. Med. Chem.* **54** (2011) 3595–3605
7. J. Retsema, F. Wenchi, *Int. J. Antimicrob. Agents* **18** (2001) 3-10
8. T. Jednačak, I. Mikulandra, P. Novak, *Int. J. Mol. Sci.* **21** (2020) 77–99
9. B. Arsic, J. Barber, A. Cikoš, M. Mladenovic, N. Stankovic, P. Novak, *Int. J. Antimicrob. Agents* **51** (2018) 283–298
10. D. Jelić, R. Antolović, *Antibiotics* **5** (2016) 29
11. A. E. Fohnera, A. Sparreboom, R. B. Altman, T. E. Klein, *Pharmacogenet. Genomics* **27** (2017) 164–167
12. J. M. Zuckerman, *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **18** (2004) 621–649
13. S. Omura, *Macrolide Antibiotics. Chemistry, Biology and Practice*, Academic Press Inc., San Diego, 2002. str. 8-22
14. P. Fernandes, D. Pereira, P. B. Watkins, D. Bertrand, *J. Med. Chem.* (2019)
15. G. P. Dinos, *British Journal of Pharmacology* **174** (2017) 2967–2983
16. M. T. Labro, H. Abdelghaffar, C. Babin-Chevaye, *J. Antimicrob. Chemother.* **48** (2004) 1906-1104
17. B. V. Yang, M. Goldsmith, A. Rizzi, *Tetrahedron Lett.* **55** (1994) 3025–3028
18. R. Fattori, F. Pelacini, S. Romagnano, G. Fronza, R. Rallo, *J. Antibiot.* **49** (1996) 938–940
19. S. Romagnano, G. Fronza, R. Fattori, F. Pelacini, R. Rallo, *J. Antibiot.* **49** (1996) 938–940.
20. S. Djokić, G. Kobrehel, G. Lazarevski, N. Lopotar, Z. Tamburašev, B. Kamenar, A. Nagl, I. Vicković, *J. Chem. Soc.* **40** (1986) 603-613

21. E. F. Fiese, S. H. Steffen, *J. Antimicrob. Chemother.* **25** (1990) 39–47
22. S. Đokić, *PLIVA Saopć.* **31** (1988), 1–2
23. S. Mutak, *J. Antibiot.* **60** (2007) 85–122
24. J. M. Zuckerman, F. Qamar, B. R. Bono, *Med Clin North Am.* **95** (2011) 761–791
25. I. Francetić, *Medicus*, **17** (2008) 9-14
26. L. Baietto, S. Corcione, G. Pacini, G. D. Perri, A. D’Avolio, F. G. De Rosa, *Curr. Drug. Metab.* **15** (2014) 581–598
27. J. M. Zuckerman, *Infect Dis Clin N Am* **18** (2004) 621–649
28. C. S. Shain, G. W. Amsden, *Ann Pharmacother* **36** (2002) 64-452
29. D. Turner, *Ann Intern Med.* **144** (2006) 447-448
30. M. Turner, G. R. Corey, E. Abrutyn, *Ann. Intern. Med.* **144** (2006) 447–448
31. B. Owens, *Nat. Biotechnol.* **35** (2017) 187–188
32. B. Arsic, J. Barber, A. Čikoš, M. Mladenovic, N. Stankovic, P. Novak, *International Journal of Antimicrobial Agents* (2017) 1-42
33. D. J. Hardy, D. R. Guay, R. N. Jones, *Diagn Microbiol Infect Dis* **15** (1992) 39–53
34. T. Mazzei, C. Surrenti, A. Novelli, *J Antimicrob Chemother* **31** (1993) 57–63
35. G. G. Zhanel, M. Dueck, D. J. Hoban, *Drugs* **61** (2001) 98-443
36. J. F. Westphal, *Br J Clin Pharmacol* **50** (2000) 95-285
37. H. C. Neu, *J Antimicrob Chemother* **27** (1991) 1–9
38. V. Godinić Mikulčić, *Studia lexicographica* **12** (2018) 33–52
39. D. Sohmen, S. Chiba, N. Shimokawa-Chiba, C. A. Innis, O. Berninghausen, R. Beckmann, K. Ito, D. N. Wilson, *Nat. Commun.* **6** (2015) 6941
40. K. Opron, Z. F. Burton, *Int. J. Mol. Sci.* **20** (2019) 40
41. J. Retsema, W. Fu, *International Journal of Antimicrobial Agents* **18** (2001) 3–10
42. F. Schlünzen, J. M. Harms, F. Franceschi, H. A. Hansen, H. Bartels, R. Zarivach, A. Yonath, *Structure* **11** (2003) 329–338
43. D. Tu, G. Blaha, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Cell* **121** (2005) 257–270
44. J. A. Dunkle, L. Xiong, A. S. Mankin, J.H.D. Cate, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107** (2010) 17152–17157
45. M. S. Svetlov, E. Plessa, C. Chen, A. Bougas, M. G. Krokidis, G. P. Dinos, Y. S. Polikanov, *RNA* **25** (2019) 600–606

46. E. B. Pichkur, A. Paleskava, A. G. Tereshchenkov, P. Kasatsky, E. S. Komarova, D. I. Shiriaev, A. A. Bogdanov, O. A. Dontsova, I. A. Osterman, P. V. Sergiev, *RNA* **26** (2020) 715–723
47. Y. Halfon, D. Matzov, Z. Eyal, A. Bashan, E. Zimmerman, J. Kjeldgaard, H. Ingmer, A. Yonath, *Sci. Rep.* **9** (2019) 11460
48. M. Gaynor, A. S. Mankin, *Curr. Top. Med. Chem.* **3** (2003) 949–960
49. J. C. Mao, E. E. Robishaw, *Biochem.* **11** (1972) 4864–4872
50. J. R. Menninger, D. P. Otto, *Antimicrob. Agents Chemother.* **21** (1982) 810–818
51. F. Schlunzen, R. Zarivach, J. Harms, A. Bashan, A. Tocilj, R. Albrecht, A. Yonath, F. Franceschi, *Nature* **413** (2001) 814–821
52. J. Hansen, J. A. Ippolito, N. Ban, P. Nissen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Mol. Cell* **10** (2002) 117–128.
53. I. S. Gabashvili, S. T. Gregory, M. Valle, R. Grassucci, M. Worbs, M. C. Wahl, A. E. Dahlberg, J. Frank, *EMBO J.* **8** (2001) 181–188
54. J. Poehlsgaard, S. Douthwaite, *Nature reviews. Microbiology.* **3** (2005) 870–881
55. T. Tenson, M. Lovmar, M. Ehrenberg, *J. Mol. Biol.* **330** (2003) 1005–1014
56. B. Weisblum, *Antimicrob. Agents Chemother.* **39** (1995) 797–805
57. T. Tenson, A. S. Mankin, *Peptides* **22** (2001) 1661–1668
58. A. D. Petropoulos, E. C. Kouvela, A. L. Starosta, D. N. Wilson, G. P. Dinos, *J. Mol. Biol.* **385** (2009) 1179–1192
59. L. H. Hansen, P. Mauvais, S. Douthwaite. *Mol Microbiol* **31** (1999) 31–623
60. S. Douthwaite, L. H. Hansen, P. Mauvais, *Mol Microbiol* **36** (2000) 93–183
61. F. Franceschi, E. M. Duffy, *Biochem. Pharmacol.* **71** (2006) 1016–1025
62. J. C. H. Mao, E. E. Robishaw, *Biochemistry* **10** (1971) 2054–2061
63. G. Garza-Ramos, L. Xiong, P. Zhong, A. Mankin, *J. Bacteriol.* **183** (2002) 6898–6907
64. E. R. Samuels, I. Sevrioukova, *Mol. Pharmac.* **15** (2018) 279–288
65. M. Turner, G. R. Corey, E. Abrutyn, *Ann Intern Med.* **144** (2006) 447–448
66. B. Owens, *Nature Biotechnology* **35** (2017) 187–188
67. M. O’Connor, S. T. Gregory, A. E. Dahlberg, *Nucleic Acids Res.* **32** (2004) 5750–5756
68. A. D. Petropoulos, E. C. Kouvela, A. L. Starosta, D. N. Wilson, G. P. Dinos, *J. Mol. Biol.* **385** (2009) 1179–1192
69. J.-C. Pechere, *International Journal of Antimicrobial Agents* **18** (2001) 25–28

70. T. Nakae, *Crit Rev Microbiol* **13** (1986) 1–62
71. J. Poehlsgaard, S. Douthwaite, *Nature reviews. Microbiology*. **3** (2005) 870–881.
72. D. Pardo, R. Rosset, *Mol. Gen. Genet.* **156** (1977) 267–27
73. R. Skinner, E. Cundliffe, F. J. Schmidt, *J. Biol. Chem.* **258** (1983) 12702–12706
74. T. S. Lobana, R. Sharma, G. Bawa, S. Khanna, *Coord. Chem. Rev.* **253** (2009) 977–1055
75. B. A. Gingras, R. W. Hornal, C. H. Bayley, *Can. J. Chem.* **38** (1960) 712
76. 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)
77. B. A. Gingras, R. L. Somorjai, C. H. Bayley, *Can. J. Chem.* **39** (1961) 973–985
78. S. N. Poddar, N. Saha, *J. Indian Chem. Soc.* **52** (1975) 57
79. Z. Afrasiabi, E. Sinn, W. Lin, Y. Ma, C. Campana, *J. Inorg. Chem.* **99** (2009) 1526–1531
80. H. Beraldo, D. Gambino, *Mini-Rev. Med. Chem.* **4** (2004) 31
81. S. N. Pandeya, J. R. Dimmock, *Pharmazie* **48** (1993) 659
82. T. Plech, *J. Med. Chem.* **46** (2011) 241–248
83. D. Chattopadhyay, S. K. Mazumdar, T. Banerjee, W. S. Sheldrick, *Acta Crystallogr. Sect. C* **45** (1989) 314–317
84. G. Pelosi, *The Open Crystallography Journal* **3** (2010) 16-28
85. H. B. Shawish, 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)
86. I. Đilović, M. Rubčić, V. Vrdoljak, S. K. Pavelić, M. Kralj, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **16** (2008) 5189–5198
87. B. Soltani, M. Ghorbanpour, C. J. Ziegler, M. Ebadi-Nahari, R. Mohammad-Rezaei, *Polyhedron* **180** (2020) 114423
88. 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
89. G. Pelosi, *The Open Crystallography Journal* **3** (2010) 16-28
90. https://www.bionity.com/en/encyclopedia/Ion_trapping.html (9.6.2023.)
91. S. Mattsson, M. Dahlstrom, S. Karlsson, *Tetrahedron Letters* **48** (2007) 2497-2499
92. E. Hošnjak, *Priprava i karakterizacija kompleksa nikla(II) s makrozenskim 4'' derivatom azitromicina izvedenim iz 4-formilbenzojeve kiseline*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2022, str. 20-22

93. I. Mikulandra, *Priprava, karakterizacija i biološka aktivnost makrozona, novih derivata azitromicina*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2022, str. 116

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Monika Galić

Datum rođenja: 30. siječnja 1999.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2005–2013	Osnovna škola Vugrovec - Kašina, Zagreb
2013–2017	XV. Gimnazija, Zagreb
2017–2021	Preddiplomski studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2021	Diplomski studij kemije, smjer: istraživački; Analitička kemija i biokemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2018, 2023	Otvoreni dan Kemijskog odsjeka PMF-a (Dan i noć na PMF-u)
2022	Volonterski rad, MMCE Conference, Primošten, Hrvatska
2023	Volonterski rad, Adriatic NMR Conference, Mali Ston, Hrvatska

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

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