Priprava i karakterizacija kompleksa nikla(II) s makrozonskim 4’’-derivatom azitromicina izvedenih iz 3-formil-2-hidroksibenzojeve kiseline

Sanemit, Saranyarat

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:943301

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Saranyarat Sanemit

Priprava i karakterizacija kompleksa nikla(II) s makrozonskim 4''-derivatom azitromicina izvedenim iz 3-formil-2-hidroksibenzojeve kiseline

Diplomski rad

predložen Kemijskom 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 neposrednim voditeljstvom 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 što mi je pružio priliku da sudjelujem u projektima i podijelili ste sa mnom dio svojih znanja. Zahvaljujem asistenticu dr. sc. Kristini Smokrović na strpljenju, susretljivosti i prenesenom znanju tijekom izrade diplomskog rada.

Veliko hvala ekipi "kućica" na druženju i podršci tijekom studiranja. Bilo mi je zabavno i nezaboravno družiti s vama, bez vas moje studiranje bi bilo dosadno.

Ines, hvala ti puno na druženju tijekom ovih pet godina studiranja. Jako mi je drago da smo se upoznali, iako je to bilo samo pet godina, ali osjećam se kao da smo odavno upoznali. Hvala ti što si me znala saslušati, raspoložiti i na svakim utješnim riječima. Puno toga smo skupa prošli, i dobrih i loših iskustva, mnogo puta smo se posvađali, ali si i uvijek tu sa mnom.

Toni, hvala ti puno na trudu i strpljenju oko ispravljanja mojih gramatičkih grešaka. Znam da ti nije lako ispraviti, ali i dalje trudiš se za mene. Tako mi je drago da te imam uz sebe. Hvala ti puno na podršci i na svemu.

Od srca hvala mojoj profesorici Ljiljani, koja me naučila hrvatski jezik. Bez Vas moje cjelokupno školovanja i studiranje ne bi bilo uspješno. Nikad neću zaboraviti koliko truda i strpljenja ste uložili oko mene dok smo učili hrvatski. Uvijek ste me podržavali, uvijek ste bili uz mene kadgod trebam pomoć, uvijek ste me slušali na moje probleme i dali savjete. Hvala Vam puno na svemu.

Na kraju, veliko hvala mami, Ivanu, baki, djedu, Annabell i svima u obitelji, bez vas ovo ne bi bilo moguće. Hvala vam na neizmjernoj podršci i vjeri u mene. Bilo je puno teških vremena, ali sam uspjela proći tih teških vremena zahvaljujući vama koji ste uvijek bili uz mene, uvijek ste me podržavali i me pogurali unaprijed. Uvijek ste mi rekli da ne odustajem od svojih ciljeva iako je nekad taj cilj bilo jako teško postići i uvijek ste vjerovali da ja to mogu. Dokazali ste da je to sve mogu postići i da nije sve tako crno. Drago mi je što sam vas poslušala i nisam odustala, inače ne bih bila ovdje. Nema riječi kojim bih opisivala koliko sam zahvalna na svemu što ste napravili za mene. Hvala na svoj podršci i bezuvjetnoj ljubavi koji ste me pružili.

Sadržaj

SAŽETAK VIII
ABSTRACT X
§ 1. UVOD 1
§ 2. LITERATURNI PREGLED 2
2.1. Makrolidni antibiotici 2
2.2. Sinteza i biološka aktivnost tiosemikarbazonskih derivata 10
2.3. Metode za proučavanja strukture i interakcije makrolidnih antibiotika 16
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO 22
3.1. Kemikalije i instrumenti 22
3.2. Priprava tiosemikarbazona 24
3.3. Priprava 4''-aminopropil derivata azitromicina 25
3.4. Priprava makrozona i niklova(II) kompleksa makrozona 28
3.5. Metode karakterizacije 29
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA 30
4.1. Sinteza i karakterizacija tiosemikarbazona 30
4.2. Priprava i karakterizacija 4''-aminopropil derivata azitromicina 34
4.3. Priprava i karakterizacija makrozona i niklova(II) kompleksa makrozona 49
§ 5. ZAKLJUČAK 57
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI) 58
§ 7. LITERATURNI IZVORI 59
§ 8. DODATAK XV
§ 9. ŽIVOTOPIS XXII

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA KOMPLEKSA NIKLA(II) S MAKROZONSKIM 4"- DERIVATOM AZITROMICINA IZVEDENIH IZ 3-FORMIL-2-HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE

Saranyarat Sanemit

Makrolidni antibiotici poput azitromicina imaju antikancerogeno i protuupalno djelovanje te se široko primjenjuju u liječenju infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama. S vremenom bakterije postaju otpornije na makrolidne antibiotike pa je potrebno istražiti nove spojeve koji će pokazati veću biološku aktivnost. Makrozoni predstavljaju nove konjugate derivata azitromicina i tiosemikarbazona. Potencijalna su nova klasa makrolidnih antibiotika koji pokazuju biološku aktivnost usporedivu s azitromicinom. Sami tiosemikarbazoni pokazuju dobru antibakterijsku aktivnost, a njihovi kompleksi s prijelaznim metalima pokazuju bolje antibakterijsko djelovanje te njihovim vezanjem očekujemo dodatno poboljšanje biološke aktivnosti. U ovom radu pripravljen je kompleks nikla(II) s makrozonskim 4"-derivatom azitromicina izvedenim iz 3-formilsalicilne kiseline i benzil-tiosemikarbazida. Svi pripravljeni spojevi okarakterizirani su spektroskopijom NMR i infracrvenom spektroskopijom. Idući korak istraživanja uključit će testove biološke aktivnosti *in vitro* pripravljenih makrozona na susceptibilne i rezistentne sojeve bakterija.

(61 stranica, 52 slika, 9 tablica, 52 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, makrolidni antibiotici, makrozoni, tiosemikarbazon, 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. prof. dr. sc. Mirta Rubčić
Zamjena: doc. Dr. sc. Tomislav Jednačak
Datum diplomskog ispita: 29. rujan 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

SYNTHESIS AND CHARACTERISATION OF NICKEL(II) COORDINATION COMPOUNDS MACROZONE 4"- DERIVATIVE OF AZITHROMYCIN DERIVED FROM 3-FORMYL-2-HYDROXYBENZOIC ACID

Saranyarat Sanemit

Macrolide antibiotics such as azythromycin possess anticancer and antiinflammatory effects and are widely used in the treatment of infections caused by Gram-pozitive and Gram-negative bacteria. Over time, bacteria have developed resistance to macrolide antibiotics, so it is necessary to discover new compounds with better biological activity. Macrozones represent new conjugates of azithromycin and thiosemicarbazone derivatives. They are potentially a new class of macrolide antibiotics that show biological activity comparable to azithromycin. Thiosemicarbazones themselves show good antibacterial effect, but their complexes with transition metals show even better activity. Hence, we expect an additional improvement of their activity by their coupling to azithromycin. Here we report the synthesis of nickel(II) coordination compound of macrozone 4"- azythromycin conjugate derived from 3-formylsalicylic acid and benzyl thiosemicarbazide. The prepared compounds have been characterized by NMR and infrared spectroscopies. The next step will include *in vitro* biological evaluation against a panel of susceptible and resistant bacteria strains.

(61 pages, 52 figures, 9 tables, 52 references, original in croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb
Keywords: azithromycin, macrolide antibiotic, macrozone, thiosemicarbazone, NMR spectroscopy

Mentor: Dr. Predrag Novak, Profesor
Commenter: Dr. sc. Kristina Smokrović
Reviewers:
1. Dr. Predrag Novak, Profesor
2. Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor
3. Dr. Mirta Rubčić, Professor

Substitute: Dr. Tomislav Jednačak, Assistant Professor
Date of exam: September 29th 2022.

§ 1. UVOD

Makrolidi pripadaju skupini spojeva koji se sastoje od makrocikličkog laktonskog prstena (aglikona) koji na sebe ima vezana dva ili više šećera. Važne predstavnike makrolidnog antibiotika čine 14-, 15- i 16-eročlani aglikonski prstenovi jer oni posjeduju antibakterijsko djelovanje te protuupalno, antikancerogeno i antimalarično djelovanje. Koriste se za liječenje infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama.[1-5]

Eritromicin, prvi makrolidni antibiotik i predstavnik prve generacije, izoliran je iz soja *Saccharopolyspora erythraea*. Zbog njegove nestabilnosti u kiseloj sredini želuca i raznih nuspojava, potaknuto je razvijanje nove generacije makrolida. Azitromicin, predstavnik druge generacije 15-eročlanih semisintetskih derivata eritromicina, primjenjuje se za liječenje respiratornih infekcija i nekih spolno prenosivih bolesti. Uvođenjem atoma dušika u aglikonski prsten dodatno se poboljšava stabilnost makrolida u kiselim uvjetima i znatno poboljšava farmakokinetika.[6-13]

Zbog sve većeg razvoja bakterijske rezistencije na postojeće antibiotike, potrebno je osmisliti i pripraviti nove spojeve s većom biološkom aktivnosti. Osim makrolida, dobru antibakterijsku aktivnost pokazali su i tiosemikarbazoni, a njihovom koordinacijom s metalima znatno se povećava antibakterijska aktivnost.[21]

Cilj ovog rada je pripraviti i okarakterizirati kompleks nikla(II) s makrozonskim 4''-derivatom azitromicina. Struktura pripravljenog spoja odredit će se analizom jedno- i dvodimenzijskih spektara NMR te infracrvenom spektroskopijom.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Makrolidni antibiotici

Termin "antibiotik" prvi put je upotrijebio Jean Paul Vuillemin 1889. godine za označavanje aktivne komponente uključene u proces antibioze.[1] Antibiotici se koriste za liječenje infekcija uzrokovanih bakterijama i mikroskopskim organizmima. Oni se mogu klasificirati na temelju njihove kemijske strukture kao makrolidi, fluorokinoloni, β-laktami, tetraciklini, amino glikozidi, nitrofurani i itd.[1]

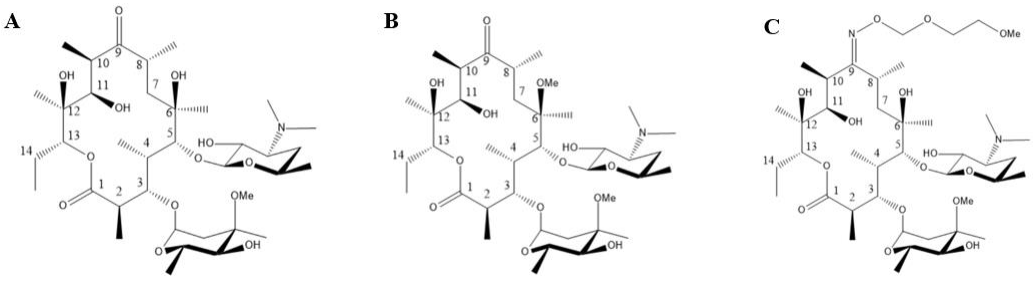
Makrolidi su jedna od najčešće primijenjenih klasa antibiotika koji se dobivaju iz soja bakterija *Streptomyces* i pripadaju klasi poliketida prirodnog porijekla.[2] Srž makrolidne strukture je makrolaktonski prsten čija veličina može varirati ovisno o broju ugljikovih atoma (8 do 64). Općenito, makrolidi se sastoje od 12-eročlanog do 16-eročlanog makrolaktonskog prstena (aglikoni) koji na sebe imaju vezane različite funkcijske skupine koje definiraju njihova biološka svojstva. Funkcijske skupine su najčešće saharidne i aminosaharidne komponente.[3] Među laktonskim makrolidima, oni koji posjeduju 14-, 15- i 16-eročlane aglikonske prstenove čine važne predstavnike makrolidnih antibiotika prirodnog porijekla. Karakteriziraju ih šećerne podjedinice (kladinoza i desozamin) koje su glikozidnim vezama vezane na aglikonski prsten. Oni pokazuju širok raspon biološke aktivnosti i posjeduju antibakterijsko djelovanje, osobito protiv Gram-pozitivnih bakterija. Također, djeluju protiv nekih Gram-negativnih organizama kao što su *Bordetella pertussis* i *Legionella pneumophila*. Osim toga, posjeduju i protuupalno, antimalarično i antikancerogeno djelovanje. Makrolidni antibiotici prvenstveno se koriste za liječenje akutnih i kroničnih infekcija, a djeluju tako da se vežu za bakterijsku 50S ribosomsku podjedinicu i ometaju sintezu proteina. Međutim, mogu izazvati neželjene nuspojave kao što su hepatotoksičnost, alergijske reakcije ili gastrointestinalni poremećaji.[3-5]

[1] Antibiotik se definira kao kemijski spoj proizveden ili dobiven od živog organizma koji je u malim koncentracijama sposoban inhibirati životne procese mikroorganizma.

2.1.1. Podjela makrolida

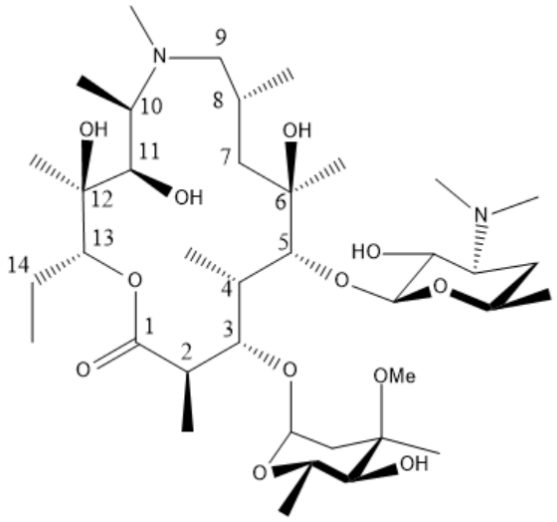
Prema broju atoma u laktonskom prstenu, klinička primjena makrolidnih antibiotika se dijeli u tri skupine: 14-eročlani, 15-eročlani i 16-eročlani antibiotici, a prema načinu dobivanja mogu se podijeliti u tri generacije. Prvu generaciju čine prirodni spojevi koje sintetiziraju poliketidne sintaze prisutne u bakterijama iz roda *Streptomyces*. Iako makrolidi pokazuju izvrsna antibakterijska svojstva, imaju velike nedostatke zbog svoje slabe bioraspoloživosti, nepredvidive farmakokinetike i nestabilnosti u kiselom želučanom mediju. Zbog toga, potaknuta je potraga za novim derivatima sa poboljšanim svojstvima i to je rezultiralo drugom generacijom makrolida. Drugu generaciju makrolida čine polusintetski derivati prirodnog porijekla iz prve generacije. Ketolidi predstavljaju treću generaciju makrolida. Njihova aktivnost izrazito djeluje protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih aerobnih patogena.[5-7]

Predstavnici 14-eročlanih makrolidnih antibiotika su: eritromicin, klaritromicin i roksitromicin. Eritromicin je prvi predstavnik makrolidnih antibiotika te ujedno i predstavnik prve generacije (Slika 1A.). Izoliran je 1949. godine iz soja *Saccharopolyspora erythraea* iz uzorka tla. Eritromicin ima antimikrobni spektar sličan spektru penicilina te se koristio za liječenje pacijenata koji su bili alergični na penicilin. Najveći nedostatak eritromicina je njegova slaba stabilnost u kiselim uvjetima, pri čemu se pretvara u neaktivni anhidroeritromicin. Osim toga, karakterističan je po gorkom okusu, slaboj oralnoj bioraspoloživosti, boli pri ubrizgavanju i izaziva brojne gastrointestinalne nuspojava.[8,9] Za razliku od eritromicina, klaritromicin i roksitromicin pripadaju makrolidnim antibioticima druge generacije. Klaritromicin je polusintetski derivat eritromicina. Stabilniji je od eritromicina u kiselim uvjetima zbog metilacije C6 hidroksilne skupine koja sprečava stvaranje anhidroeritromicina. Polusistenski makrolidni antibiotik roksitromicin dobiva se iz eritromicina s bočnim lancem N-oksima vezanim za laktonski prsten.[8-10]



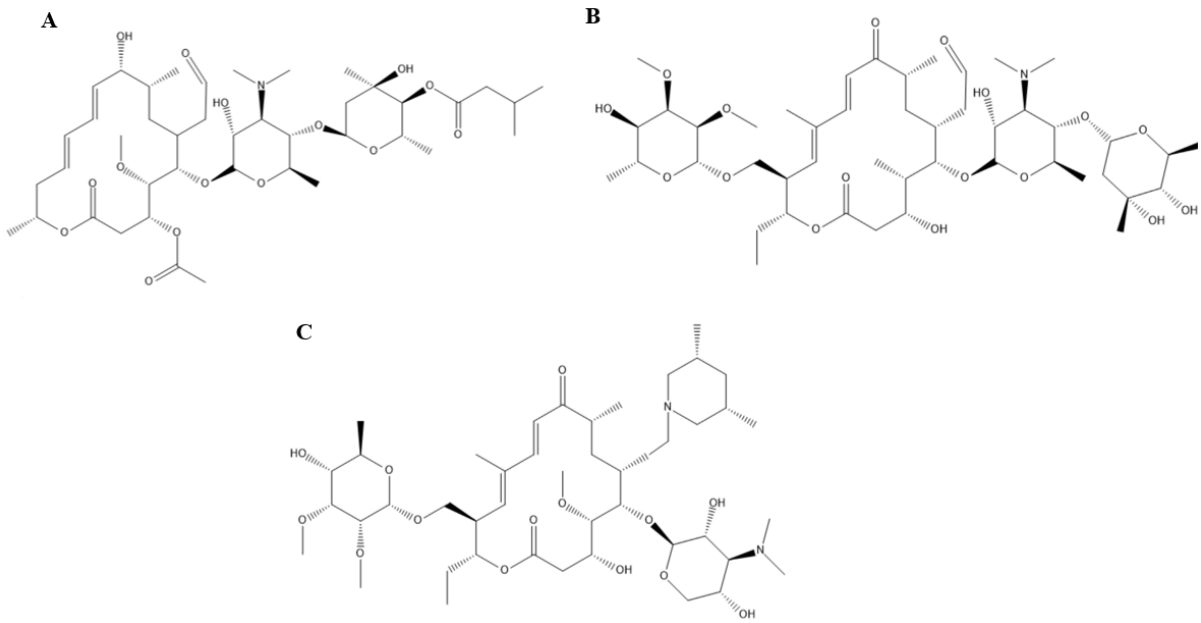
Slika 1. Struktura makrolida prve generacije (**A**) eritromicina, (**B**) klaritromicina i (**C**) roksitromicina.[1]

Uvođenjem atoma dušika u makrociklički laktonski prsten dobivena je nova potklasa makrolidnih antibiotika nazvana azalidima. Glavni predstavnik azalida te ujedno i predstavnik druge generacije 15-eročlanih makrolida je azitromicin. Primjenjuje se u liječenju respiratornih i crijevnih infekcija te spolno prenosivih bolesti, kao što je klamidija. Azitromicin je 1980. godine otkrila hrvatska farmaceutska tvrtka PLIVA, a 1988. godine odobrila ga je za medicinsku upotrebu pod imenom *Sumamed*®. Prednost azitromicina pred drugim makrolidnim antibioticima je njegova iznimna farmakokinetika i metabolička stabilnost. Dodatak atoma dušika u makrolaktonski prsten poboljšava stabilnost makrolida u kiselim uvjetima. Ima poboljšanu oralnu bioraspoloživost i produljeno vrijeme poluživota u plazmi što omogućuje smanjenje oralne doze na jednu ili dvije dnevno, a ujedno i povećava prodiranje antibiotika u tkiva.[7, 11]



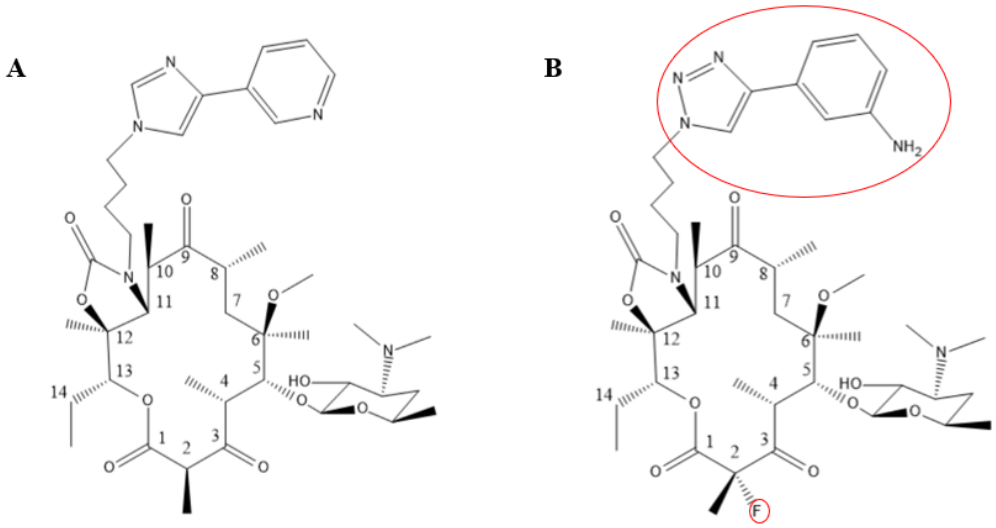
Slika 2. Struktura makrolida druge generacije, azitromicin.[1]

Josamicin i tilozin su predstavnici 16-eročlanih makrolidnih antibiotika i pripadaju prvoj generaciji makrolida. Josamicin je sintetiziran iz sojeva *Streptomyces narbonensis var. josamyceticus.* Za razliku od 14- i 15-eročlanih makrolidnih antibiotika, josamicin nije uobičajeno koristiti u kliničkoj primjeni. Tilozin se nalazi u prirodi kao produkt fermentacije *Streptomyce fradiae.* Polusintetski derivat tilozina je tilmikozin koji se koristi u veterinarskoj medicini za liječenje bakterijskih infekcija.



Slika 3. Struktura (**A**) josamicina (**B**) tilozina i (**C**) tilmikozina.[1]

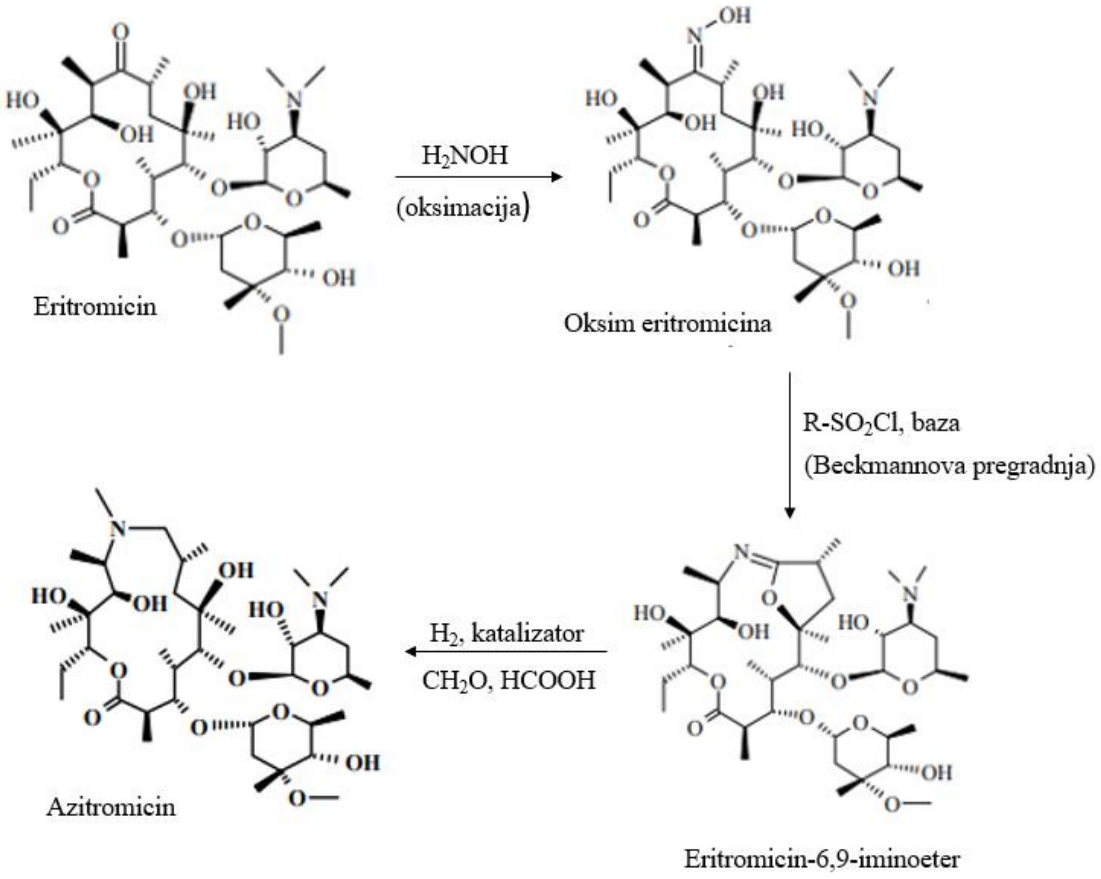
Druga generacija makrolida (azitromicin) pokazuje poboljšana farmakokinetička svojstva i bolju metaboličku stabilnost u kiselim uvjetima. Unatoč tome, azitromicin nema dovoljno širok spektar antibakterijskog djelovanja zbog porasta broja rezistentnih bakterijskih sojeva što je potaknulo na razvijanje treće generacije makrolida, nazvanih ketolidi. Ketolide karakterizira prisutnost keto skupine na položaju C3 laktonskog prstena umjesto šećera kladinoze i alkil-heteroaril bočni lanac. Predstavnik makrolida treće generacije je telitromicin, 14-eročlani ketolid koji je izveden iz klaritromicina. Koristi se u liječenju bakterijskih infekcija dišnog sustava, uključujući i infekcije uzrokovane bakterijama koje su stekle otpornost na makrolide prvih dviju generacija. Telitromicin je povučen sa tržišta zbog izazivanja niza nuspojava kao što su poremećaji vida, sinkopa, oštećenje jetre (hepatotoksičnost), a u najgorem slučaju može dovesti i do zatajenja jetre. Zbog toga se razvila sljedeća generacija ketolida, nazvanih fluoroketolidi. Predstavnik fluoroketolida je solitromicin. Strukturno je sličan telitromicinu, sadrži 1,2,3-triazol-aminofenil kao bočni lanac i atom fluora na C2 položaju (Slika 4B.). Atom fluora sudjeluje u interakciji solitromicina s bakterijskim ribosomom. Učinkovit je u liječenju bakterijske upale pluća, ali ga nije odobrila Američka Uprava za hranu i lijekove (eng. U.S. Food and Drug Administration, FDA) zbog sličnosti njegove strukture s telitromicinom.[7,8]



Slika 4. Strukture (**A**) telitromicina, (**B**) solitromicina.[8]

2.1.2. Dobivanja azitromicina

Prva generacija makrolida eritromicin, imala je nisku toksičnost i dobru podnošljivost, ali je bila nestabilna u kiselom mediju. U kiseloj sredini želuca, eritromicin se metabolizira u neaktivni 8,9-anhidroeritromicin-6,9-hemiketal i anhidroeritromicin-6,9:9,12-spiroketal. Kako bi se poboljšala kiselinska stabilnost i oralna bioraspoloživost eritromicina, prva generacija polusintetskih makrolida uvedena je u medicinsku praksu. Cilj je bio izbjeći stvaranje ketala što je rezultiralo raznim novim derivatima. Najvažniji derivat eritromicina je bio oksim eritromicina, dobiven reakcijom eritromicina s hidroksilamin-hidrokloridom uz prisutnost slabe baze i pufera. Provođenjem Beckmannove pregradnje oksim 9(*E*)-eritromicina u amid. Reakcijom oksima eritromicina s benzensulfonil-kloridom u smjesi acetona i vode s natrijevim bikarbonatom nastaje eritromicin-6,9-iminoeter. Daljnjom reduktivnom metilacijom 9-dihidro-9-deokso-9*a*-aza-9*a*-homoeritromicina s formaldehidom i mravljom kiselinom nastaje azitromicin.[7,12,13] Shematski prikaz sinteze azitromicina prikazan je na slici 5.



Slika 5. Shematski prikaz sinteze azitromicina.[7]

Uvođenjem dušika u makrolaktonski prsten azitromicina potiče se stabilizacija prstena i sprečava stvaranje anhidroeritromicina te se pojačava njegova aktivnost protiv Gram-negativnih bakterija. Azitromicin se koristi za liječenje širokog spektra bakterijskih infekcija, uključujući i infekcije dišnog sustava uzrokovane bakterijama poput *Haemophilus influenzae* i *Neisseria gonorrhoeae*. Manje je toksičan od eritromicina te je negativan na mutagenost, karcinogenost i teratogenost. Omogućena je primjena kod trudnica i djece i jedan je od najprodavanijih lijekova. No, kao i svi lijekovi, azitromicin može uzrokovati nuspojave. Česte nuspojave su glavobolja, proljev, bolovi u trbuhu i kožni osip.[7-10]

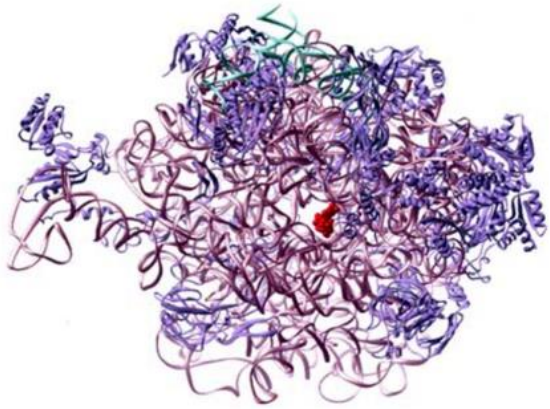
2.1.3. Mehanizam djelovanja makrolidnih antibiotika i interakcija s ribosomom

Makrolidni antibiotici naširoko se primjenjuju u kliničkoj upotrebi za liječenje infekcija gornjih i donjih dišnih puteva. Oni ciljano djeluju na bakterijski ribosom (70S) koji se sastoji od dvije podjedinice, male (30S) i velike (50S). Mala podjedinica je odgovorna za dekodiranje genetskih

informacija kodiranih u mRNA, dok je velika podjedinica zadužena za polimerizaciju aminokiselina u proteine. Makrolidi se vežu za 23S rRNA u 50S podjedinici, na ili u blizini centra peptidil tranferaze (PTC) što blokira izlazni tunel za novosintetizirane peptide i na taj način se inhibira sinteza bakterijskih proteina.[11,14]

Mehanizam inhibicije sinteze proteina makrolida ovisi o specifičnoj kemijskoj strukturi molekula lijeka. To utječe na njegovu interakciju s ribosomom kao i način inhibitornog djelovanja. Postoje četiri mehanizma inhibicije sinteze proteina makrolida i svi ti mehanizmi u određenoj su korelaciji s mjestom vezanja makrolida na ribosomu. Makrolidni antibiotici inhibiraju sintezu proteina na sljedeća četiri načina: 1) inhibicija elongacije peptidnog lanca tijekom rane faze translacije, 2) poticanje disocijacije peptidil tRNA s ribosoma, 3) inhibicija stvaranja peptidne veze i 4) interferencija s 50S podjedinicom.[15,16]

Dokazano je da interakcije između ribosoma i novosintetiziranog peptida koje se odvijaju unutar izlaznog tunela utječu na napredovanje biosinteze proteina. Tunel je primarno izgrađen od 23S rRNA, relativno je širok (15 Å), ali sadrži suženje (oko 10 Å) koje tvore ribosomski proteini L4 i L22. Suženje se nalazi u blizini centra peptidil transferaze, a makrolidi se vežu blizu ovog suženja i inhibiraju elongaciju peptidnog lanca. U prisutnosti vezanih 14- i 15-eročlanih makrolida, inhibicija se događa kad novosintetizirani peptid postane dovoljno velik da dosegne vezani makrolid u blizini suženja tunela. Kao posljedica inhibicije elongacije peptidnog lanca dolazi do disocijacije peptidil tRNA od ribosoma.[15]



Slika 6. Položaj eritromicina u izlaznom tunelu, 23S rRNA prikazana je svijetloljubičastom bojom, 5S rRNA zelenom bojom, ribosomski proteini tamnoljubičastom bojom, a eritromicin crvenom bojom.[15]

Interakcija makrolida i ribosoma javlja se između C5 mono- ili disaharidnih bočnih lanaca od 14-, 15- i 16-eročlanog prstena makrolida i nukleotidne baze A2058 kod 23S rRNA. Vodikove

veze se formiraju između skupine 2'-OH i atoma dušika u nukleotidnim bazama A2058 i A2059. Vezanje makrolida je stabilizirano pakiranjem hidrofobne strane laktonskog prstena na nukleotide rRNA 2611 i 2057. Šećer desozamin eritromicina i drugi srodni makrolidi s 14-eročlanim prstenom stvaraju interakcije vodikovih veza s nukleotidnim bazama A2058 i A2059. Pravilno vezanje desozamina je važno jer se jedan od mehanizama rezistencije temelji na modifikaciji nukleotida A2058. Gubitak ili modifikacija skupine 2'-OH inaktivira 14-, 15- i 16-člane makrolide.[15]

2.1.4. Mehanizmi rezistencije bakterija

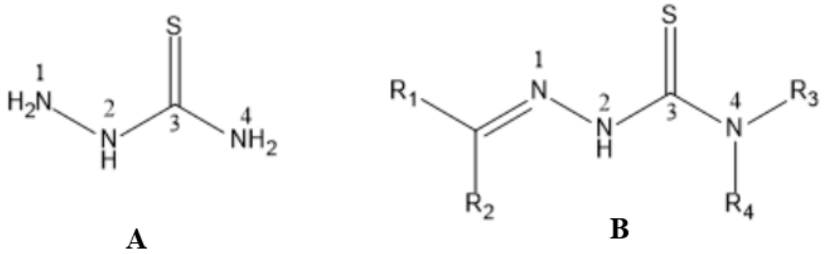
Široka uporaba makrolidnih antibiotika neizbježno je dovela do širenja rezistentnih sojeva. Dva najčešća mehanizma rezistencije su izbacivanje antibiotika iz stanice (efluks) i modifikacija ciljnog mjesta djelovanja antibiotika u ribosomu. Najrjeđi mehanizam rezistencije je inaktivacija makrolidnog antibiotika. Ovaj mehanizam uključuje fosforilaciju 2'-OH skupine šećera pomoću fosfotransferaze i hidrolizu makrocikličkog laktona pomoću esteraze.[5]

Jedan od načina na koji bakterije mogu izbjeći djelovanje makrolida je smanjenje unutrastanične koncentracije korištenjem efluks pumpi. Makrolide se izbacuje iz stanice prije nego što dospiju do ribosoma. Do smanjenja nakupljanja antibiotika u stanici dolazi zbog MefA, skupine transportnih proteina odnosno pumpi. Skupina proteina MefA kodirana je genom *mefA*, a transkripcija gena *mefA* inducirana je 14- i 15-eročlanim makrolidnim antibioticima. Energija za efluks dobiva se iz energije pohranjene u gradijentu protona. Modifikacija ciljnog mjesta u ribosomu se odnosi na metiliranje ili dimetiliranje nukleotida 23S rRNA, A2058. Enzimi odgovorni za takav mehanizam rezistencije su Erm metiltransferaze. Dimetilacija A2058, koja se nalazi unutar mjesta vezanja makrolida, drastično smanjuje afinitet antibiotika zbog steričke smetnje, čime bakterije postaju otporne na visoke koncentracije antibiotika. Osim toga, modifikacija 23S rRNA rezultira visokom razinom otpornosti bakterija na makrolide, linkozamide i streptogramin B (MLS_b). Postoji dva tipa rezistencije na makrolide (M), linkozamide (L) i streptogramin (B): inducibilna i konstitutivna. Konstitutivan tip rezistencije razvije se bez prisutnosti makrolida, dok se inducibilan tip rezistencije aktivira nakon prisutnosti makrolida u stanici.[17,18]

2.2. Sinteza i biološka aktivnost tiosemikarbazonskih derivata

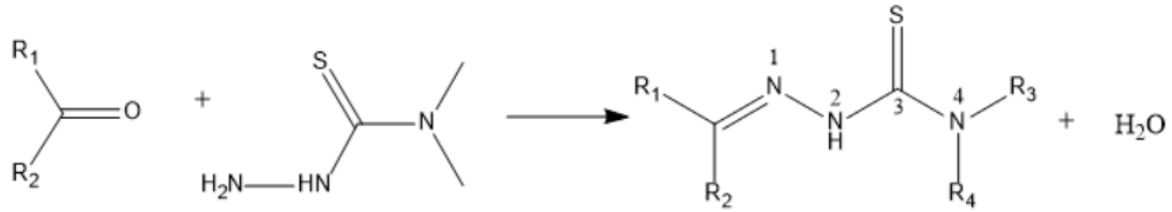
2.2.1. Tiosemikarbazidi i tiosemikarbazoni

Tiosemikarbazidi, $N^1H_2-NH-(C=S)-N^4H_2$, su moćni intermedijeri za sintezu farmaceutskih i bioaktivnih materijala i stoga se intenzivno koriste u području medicinske kemije. Važan je prekursor u sintezi mnogih polidentatnih liganada. Iminska veza (−N=CH−) u ovim spojevima korisna je u organskoj sintezi, posebice za pripravu heterocikla i neprirodnih β-aminokiselina. Reaktivnost njegovih dviju terminalnih amino skupina se međusobno razlikuje. Amino funkcijska skupina (N^1H_2-) je reaktivnija i lako se kondenzira s 2-hidroksi/amino supstituiranim karbonilnim spojevima u obliku Schiffovih baza. Tioamidna skupina (N^4H_2-) slabo reagira s karbonilnim spojevima. Dokazano je da neki derivati tiosemikarbazida ometaju mehanizme efluksne pumpe kod rezistentnih sojeva *Staphylococcus aureus* te se mogu primijeniti kao antimikrobni agensi.[19,20]



Slika 7. Opće strukturne formule tiosemikarbazida (A) i tiosemikarbazona (B).

Tiosemikarbazoni su Schiffove baze koje pripadaju skupini derivata tiouree s općom formulom $R_1R_2C=N-NH-(C=S)-NR_3R_4$, a dijele se u dvije skupine: monotiosemikarbazoni i bistiosemikarbazoni. Obično se dobivaju kondenzacijom tiosemikarbazida s odgovarajućim aldehidom ili ketonom (Slika 8.)[20]



Slika 8. Shematski prikaz reakcije dobivanja tiosemikarbazona, gdje su R_1, R_2, R_3, R_4 = H, alkilna, arilna ili heterociklička skupina.[20]

Tiosemikarbazoni su klasa anorganskih kelatora, stvaraju komplekse s različitim prijelaznim metalima uključujući bakar, paladij i nikal. Biološka aktivnost tiosemikarbazona i njihovih metalnih kompleksa poznata je već dulje vrijeme. Ovi spojevi pokazuju veliki izbor bioloških aktivnosti u rasponu od antivirusnih, antikancerogenih, antitumorskih i protuupalnih. Razni tiosemikarbazonski derivati s metalima su sintetizirani prvenstveno za istraživanje antikancerogenih svojstava. Brojna istraživanja pokazala su da njihova aktivnost ovisi o vrsti metala i funkcijskim skupinama vezanim na tiosemikarbazidnu strukturnu jedinicu. Tiosemikarbazoni utječu na mehanizam inhibicije aktivnosti ribonukleaze reduktaze (RNR) i topoizomeraze II (Top2), enzima neophodnih za razvoj tumorskih stanica. Enzim ribonukleaza reduktaza odgovoran je za sintezu deoksiribonukleotid-difosfata iz ribonukleotid-difosfata u procesu sinteze DNA. Enzim topoizomeraza II odgovaran je za odmotavanje i zamotavanje dvostruke zavojnice DNA tijekom sinteze proteina. Murphy i suradnici su dokazali da je prisutnost metalnog iona Cu(II) neophodna za aktivnost tiosemikarbazona protiv enzima Top2.[21]

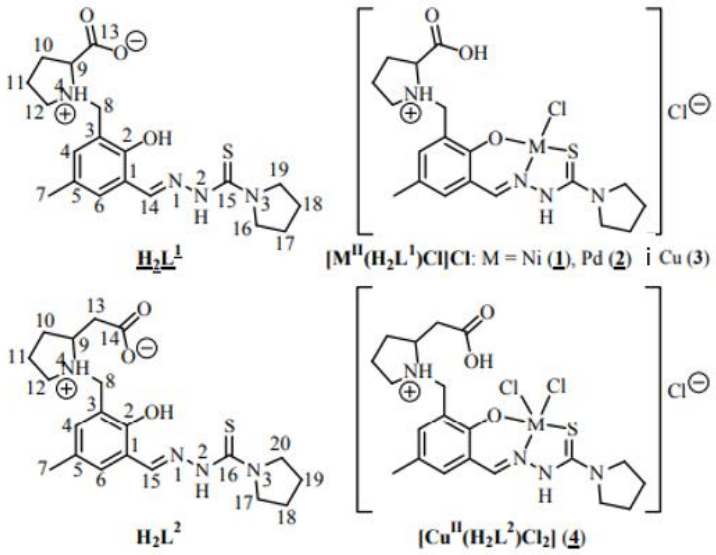
2.2.2. Tiosemikarbazoni s metalima

Mnogi tiosemikarbazoni izvrsni su kelatori za ione prijelaznih metala, kao što su željezo(II), bakar(II) i cink(II). Obično koordiniraju preko X, N, S atoma, gdje je X donorski atom dodatne funkcionalne skupine aldehida ili ketona. Koordinacija tiosemikarbazona s metalom rezultira većom citotoksičnosti od proliganda. Unatoč njihovoj visokoj citotoksičnosti *in vitro*, glavni nedostatci spojeva tiosemikarbazona kao antitumorskih sredstva su niska topljivost u vodi, visoka lipofilnost i visoka toksičnost *in vivo*.[22-25]

Bakrovi(II) kompleksi pokazuju povoljnu antitumorsku aktivnost i često pokazuju vrlo visoku antiproliferativnu aktivnost. Aktivnost na inhibiciju topoizomeraze IIα ispitana je na nizu bakrenih(II) kompleksa s tiosemikarbazonima u usporedbi s odgovarajućim proligandima. Među njima je [CuLCl], gdje je HL = 2-piridinaldehid 4-*N*-etiltiosemikarbazon pokazao izvrsnu aktivnost na inhibiciju enzima topoizomeraze IIα. Pretpostavlja se da kvadratno-planarna koordinacijska geometrija bakra(II) u kompleksu ima utjecaj na svojstva inhibicije topoizomeraze IIα.[26,27]

S ciljem da se poveća lipofilnost spojeva tiosemikarbazona, Dobrova i suradnici su pripravili spoj 2-hidroksibenzaldehid tiosemikarbazon supstituiran na terminalnom dušikovom

atomu i spojen na α- i β-aminokiselinu, prolin i homoprolin. Sintetizirali su dva organska konjugata, 5-metil-2-hidroksibenzaldehid 4-*N*-pirolidin-3-tiosemikarbazon spojen na L-prolin i β^3-homoprolin i četiri nova kompleksa s niklom(II), paladijem(II) i bakrom(II). Kiralni spoj 2-hidroksi-3-metil-(*S*)-pirolidin-2-karboksilat-5-metilbenzaldehid 4-*N*-pirolidin-3-tiosemikarbazon pripremljen je na sljedeći način: 3-klorometil-2-hidroksi-5-metilbenzaldehid reagira s hidrokloridnom soli metilnog estera L-prolina u prisutnosti trietilamina, što dovodi do nastajanja željenog konjuguta. Nakon toga slijedi reakcija kondenzacije s 4-*N*-pirolidin-3-tiosemikarbazidom. Posljednji korak je hidroliza metilne esterske skupine pri čemu nastaje odgovarajući tiosemikarbazon vezan s L-prolinom preko metilenske skupine, proligand H_2L^1. Na sličan način se dobiva proligand H_2L^2, umjesto hidrokloridne soli metilnog estera L-prolina koristi se metilni ester (*R/S*)-β^3-homoprolina. U sintezu ovog proliganda, uključuje se mehanizam Wolffove pregradnje koji je ključni korak za dodavanje CH_2 skupine. Reakcijom proliganda s $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, $PdCl_2$ i $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ u etanolu pri sobnoj temperaturi nastaju odgovarajući metalni kompleksi.[23]



Slika 9. Struktura proliganda L-prolina i β^3-homoprolina tiosemikarbazona H_2L^1 i H_2L^2 te njihovih kompleksa s metalom.[23]

Antiproliferativno djelovanje dva proliganda H_2L^1 i H_2L^2 i četiri metalna kompleksa **1-4** istraženo je u stanicama ljudskog raka A549 (stanični karcinom pluća), CH1 (karcinom jajnika) i SW480 (karcinom debelog crijeva) pomoću kolorimetrijskog testa MTT. Koordinacija H_2L^1 s niklom(II) i paladijem(II) pokazuju značajno slabu antiproliferativnu aktivnost u sve tri skupine raka, dok kompleksi H_2L^1 i H_2L^2 s bakrom(II) povećavaju citotoksičnost. S druge

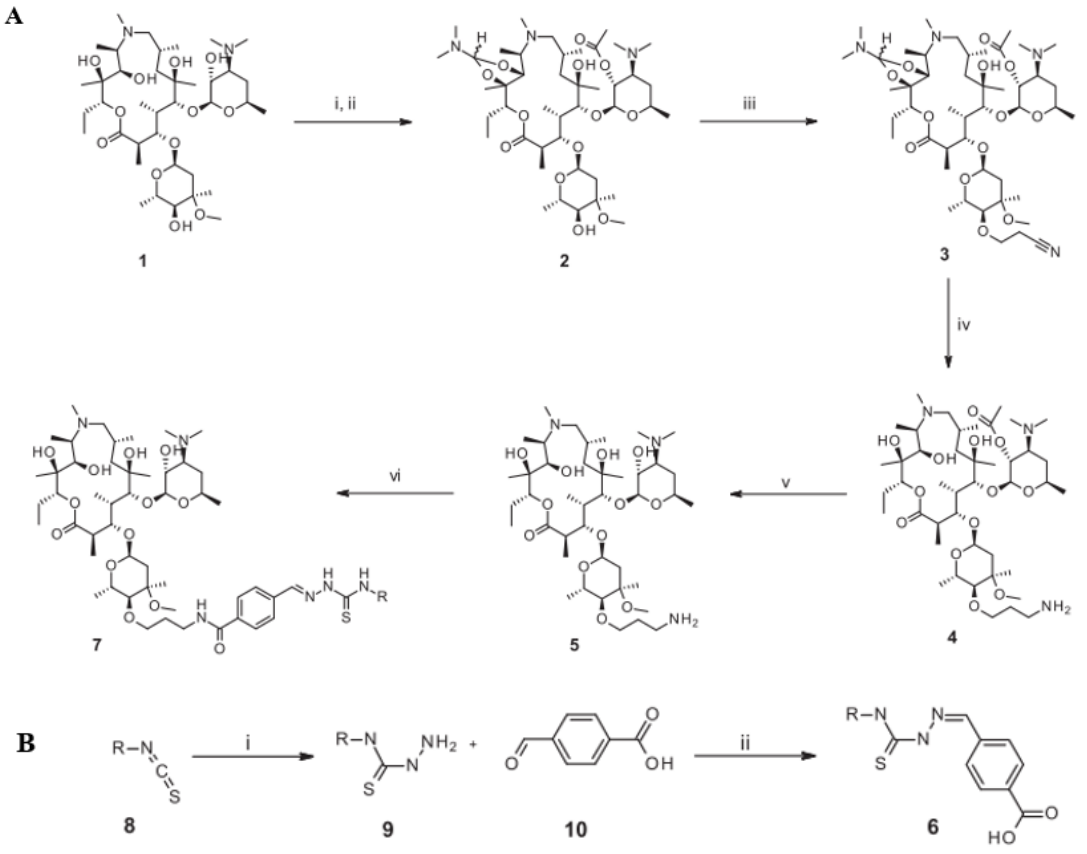
strane, spojevi H_2L^1, H_2L^2, kompleksi **3** i **4** ne pokazuju selektivnost na kancerogene stanice u odnosu na normalne stanice. Na temelju podataka dobivenih rendgenskom strukturnom analizom potvrđeno je da su kompleksi **1-3** kvadratno-planarni što dovodi do zaključka da je uloga koordinacijske geometrije u mehanizmu citotoksičnosti zanemariva. Međutim, supstitucija pirolidina na terminalnom dušikovom atomu tiosemikarbazona ima znatan utjecaj na citotoksičnost. Značajno se povećava citotoksičnost proliganda H_2L^1 i H_2L^2 i njihovog bakrenog(II) kompleksa. Dodavanjem skupine CH_2 između pirolidinskog prstena i karboksilne skupine aminokiselina povećava se strukturna fleksibilnost, ali značajno se smanjuje antiproliferativna aktivnost proliganda i njihovog bakrenog(II) kompleksa.[23]

2.2.3. Novi antimikrobni tiosemikarbazonski derivat azitromicina i njegova biološka aktivnost

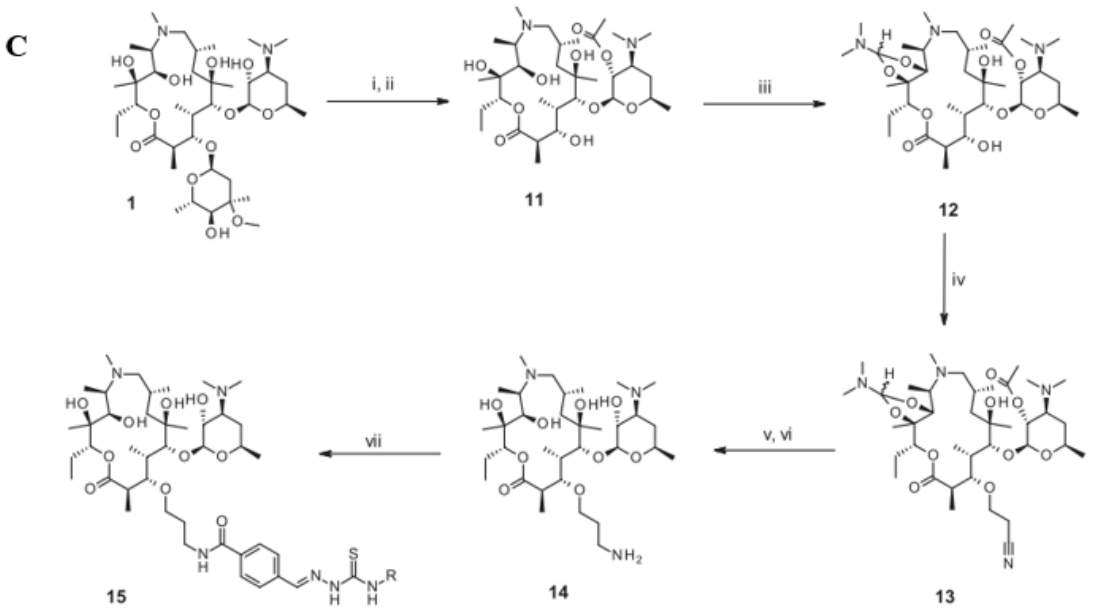
Porast bakterijske rezistencije na postojeće antibiotike predstavlja ozbiljnu prijetnju ljudskom zdravlju te su zbog toga otkriće i razvoj novih antibiotika neophodni. Nažalost, posljednjih godina broj novih antibiotika na tržište drastično se smanjio. Međutim, povlačenjem makrolidnog antibiotika telitromicina s tržišta i nemogućnost dobivanja odobrenja solitromicina od FDA potaknulo je potragu za novim antiinfektivnim makrolidnim spojevima. Kako bi se smanjila učestalost otpornosti bakterija na antibiotike, novi makrolidni spojevi moraju imati sposobnost stvaranja interakcija s ribosomom 23S rRNA na više mjesta. Azitromicin, predstavnik 15-eročlanog makrolida druge generacije, pokazuje široki spektar antibakterijskog djelovanja na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterijske sojeve. Posjeduje povoljnu farmakokinetiku s visokom akumulacijom u stanicama, metaboličku stabilnost i dobru podnošljivost. S druge strane, tiosemikarbazoni imaju sposobnost inhibirati enzime neophodne za razvoj tumorskih stanica, a koordinacijom s metalom pokazuju antiinfektivnu, antiupalnu i antitumorku aktivnost. Stoga se povezivanjem makrolida s tiosemikarbazonima (makrozonima) ostvaruje sinergijski učinak na njihov ukupan biološki profil koji uključuje i aktivnost na rezistentne bakterijske sojeve. Posebno su zanimljivi derivati azitromicina s modificiranim položajima 4", 3 i 9*a*. Konjugacija s različitim molekulama na tim položajima pokazala je povećanu biološku aktivnost na neke susceptibilne i rezistentne sojeve bakterija. Daljnja istraživanja makrozona provode se s ciljem razvoja novih potencijalnih lijekova.[28,29]

Sinteza novih derivata makrolid-tiosemikarbazona, makrozon **7** i **15**, prikazana je na slici 10. Sinteza makrozona odvija se u nekoliko složenih koraka, a obuhvaća: (1) zaštitu hidroksilne skupine, (2) Michaelovu adiciju akrilonitrila, (3) redukciju nitrila do primarne amine (4) uklanjanje zaštitne skupine, (5) pripravu tiosemikarbazona reakcijom 4-formilbenzojeve kiseline s tiosemikarzabidom i (6) reakciju amidacije tiosemikarbazona s prekursorom uz dodatak reagensa HATU i DIPEA u diklormetanu.[29]

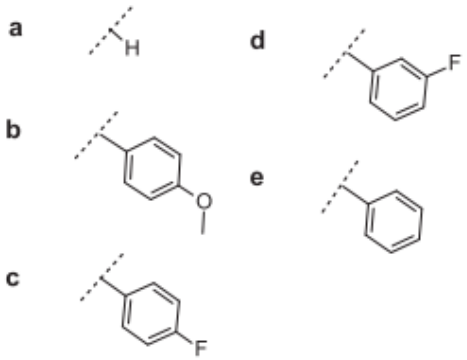
Makrozon **15**, umjesto kladinoznog šećera na položaju C-3, sadrži aminopropilnu poveznicu. Sinteza ovog makrozona postignuta je selektivnom zaštitom hidroksilne skupine na položajima 2', 11 i 12 i cijepanjem kladinoznog šećera hidrolizom glikozidne veze.[29]



Slika 10. Sinteza novih konjugata, (A) (i) *N*,*N*-dimetilformamid dimetil acetal (DMF/DMA) (8 eq), toluen, 60 °C, 17 h; (ii) Ac_2O (1 ekv.), $NaHCO_3$ (3 ekv.), DCM, s.t., 17 h; (iii) *t*-BuOH/THF 1/1, akrilonitril (6 ekv.), NaH (1,1 ekv.), –10 °C do sobne temperature, 1 h; (iv) PtO_2, H_2, 5 bara, AcOH, s.t., 17 h; (v) MeOH, s.t., 17 h; (vi) **6**, HATU, DIPEA, DCM; (B) (i) hidrazin hidrat, *i*PrOH, s.t. 1 h; (ii) *i*PrOH, s.t. 17 h.[29]



Slika 10. Sinteza novih konjugata (**C**) (i) Ac_2O (1 ekv.), $NaHCO_3$ (3 ekv.), DCM, s.t., 17 h; (ii) 6 M HCl, 4 h; (iii) DMF/DMA, toluen, 60 °C, 17 h; (iv) *t*-BuOH/THF 1/1, akrilonitril (6 ekv.), NaH (1,1 ekv.), –10 °C do sobne temperature, 1 h; (v) PtO_2, H_2, 5 bara, AcOH, s.t., 17 h; (vi) MeOH, s.t., 17 h; (vii) **6**, HATU, DIPEA, DCM. s.t., sobna temperatura.[29]



Slika 11. Supstituenti R za sintezu tiosemikarbazona.[29]

Tablica 1. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) sintetiziranih spojeva i standardnog antibiotika azitromicina (AZM) na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije.[29]

Bakterija	MIK (μg/mL)										
	7a	**7b**	**7c**	**7d**	**7e**	**15a**	**15b**	**15c**	**15d**	**15e**	**AZM**
S. pneumoniae ATCC 49619	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	0.25	0.5	0.5	0.5	<0.125
S. pneumoniae B0326 (M)	2	<0.125	0.25	0.25	<0.125	<0.125	1	2	1	2	4
S. pyogenes B0542	0.25	<0.125	0.25	0.5	0.25	0.25	1	1	1	1	<0.125
S. aureus ATCC 29213	8	8	4	4	4	>64	16	32	32	32	1
S. aureus B0331 (M)	64	8	8	4	4	>64	32	64	>64	>64	>64
S. aureus B0330 (cMLS)	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
E. faecalis ATCC 29212	8	1	1	1	1	<0.125	8	8	8	8	4
H. influenzae ATCC 49247	-	16	16	16	8	64	64	64	64	64	2
S. cerevisiae ATCC 7752	>64	>64	>64	>64	>64	2	>64	>64	>64	>64	>64

U tablici 1. prikazani su vrijednosti MIK sintetiziranih spojeva s antibiotikom azitromicinom. Pokazalo se da svi spojevi imaju izvrsnu aktivnost na sojeve *Streptococcus pneumoniae*. Makrozoni **15a** i **7a-7e** pokazuju 32 puta bolju aktivnost od azitromicina na efluks rezistentne sojeve S. *pneumoniae*. Derivati **7a-7e** pokazali su dobru aktivnost na rezistentni soj *S. aureus* na koji azitromicin nije aktivan. Kod svih 4"-derivata uočena je umjerena aktivnost na Gram-negativnu bakteriju *Haemophilus influenzae*. Ovi rezultati mogu poslužiti kao dobra osnova za daljnje napore medicinske kemije usmjerene prema otkrivanju i razvoju antimikrobnih spojeva s poboljšanim djelovanjem na rezistentne patogene.[29]

2.3. Metode za proučavanja strukture i interakcije makrolidnih antibiotika

Struktura i interakcije makrolidnih antibiotika mogu se proučavati različitim eksperimentalnim i teorijskim metodama. Osnovni principi naprednih eksperimentalnih alata za studije makrolida su: rentgenska kristalografija, kriogena elektronska mikroskopija (Cryo-EM) i NMR spektroskopija.[30]

2.3.1. Rendgenska kristalografija

Rendgenska kristalografija se koristi za proučavanje strukturnih i molekularnih interakcija te pruža podatke na atomskoj razini. Primarno se koristi za određivanje 3D strukture kemijskih i biokemijskih spojeva, pružajući konformaciju molekula u kristalu uz njihovu konfiguraciju. U rendgenskoj kristalografiji, dolazi do difrakcije rentgenskog zračenja na atomima u kristalnoj rešetci. Mjerenjem kutova i intenziteta u difraktiranog zračenja može se proizvesti trodimenzionalna mapa gustoće elektrona. Iz ove mape mogu se odrediti položaji pojedinačnih

atoma u molekulama, duljine veza i druge informacije. Zajedno sa spektroskopijom NMR može se koristiti za karakterizaciju interakcije ligand-receptor. Glavni nedostatak ove metoda je potreba za kokristalizicijom makrolidnih antibiotika s ribosomom. Unatoč tome, uspješno je kokristalizirano nekoliko makrolidnih spojeva s bakterijskim ribosomom, među kojima je kompleks makrolida eritromicina i telitromicina s 50S ribosomskom podjedinicom bakterije *D. radiodurans* i kompleks makrolida azitromicina, karbomicina, spiramicina te tilozina s 50S podjedinicom ribosoma arheje *H. marismortui*.[31]

2.3.2. Kriogena elektronska mikrospkopija (Cryo-EM)

Ova metoda omogućuje strukturnu analizu bioloških makromolekula korištenjem koherentne elektronske zrake koja se fokusira na smrznutu otopinu uzorka uklopljenu u tanki sloj leda na temperaturi od -180 °C. Nakon interakcije s uzorkom, emitirane zrake se usmjeravaju na detektoru elektrona i pretvaraju u slike. Ova metoda omogućava strukturno određivanje proteinskih kompleksa, virusa ili ribosoma i daje vizualizaciju za konformacijske promjene nakon vezanja liganda. Cryo-EM metode se mogu podijeliti u dvije skupine: single-particle analysis (SPA) i cryogenic electron tomography (cryo-ET). SPA se temelji na svrstavanju i izračunavanju prosjeka mnoštva slika izoliranih makromolekula i kompleksa *in vitro*, nakon čega slijedi rekonstrukcija 3D mape. Strukturne informacije se prikupljaju iz više kopija iste strukture. Snimanje cryo-ET se provodi na jednom području uzorka, ali iz različitih kutova.[30]

2.3.3. Proučavanje strukture i interakcija makrolida NMR spektroskopijom

Spektroskopija NMR (engl. *nuclear magnetic resonance spectroscopy*) danas je nezamjenjiva metoda za određivanje strukture organskih, anorganskih i bioloških molekula. Temelji se na istraživanju svojstava pojedinih atoma unutar molekule. Primjenjuje se na one jezgre koje imaju magnetski moment, odnosno čiji je magnetski moment različit od nule, primjerice ^{1}H, ^{13}C, ^{31}P, ^{19}F i ^{15}N. Svaka jezgra posjeduje dva kvantna broja: kvantni broj nuklearnog spina I i nuklearni magnetni spinski kvantni broj m_I. Kvantni broj nuklearnog spina I može biti cijeli ili polucijeli broj ovisno o masenom (A) i atomskom broju (Z).[32]

Spektroskopija NMR temelji se na pobuđivanju jezgri fotonom energije koja je jednaka razlici energije dvaju spinskih stanja. Takve energije se postižu pomoću vanjskog magnetnog

polja ili radiofrekvencijskim pulsevima. Postoje jednodimenzijske i dvodimenzijske tehnike NMR. Jednodimenzijski spektri NMR bilježi ovisnost intenziteta signala o kemijskim pomaku koji je proporcionalan Larmorovoj frekvenciji. Nakon pobude, detektirani signal u vremenskoj domeni prevodi se postupkom Fourierove transformacije u frekvencijsku domenu. Spektri se asigniraju na temelju kemijskih pomaka i multipletnosti signala. Ovisno o položaju i intenzitetu signala mogu se otkriti fragmenti i funkcijske skupine u analiziranom spoju. Dvodimenzijske tehnike NMR sastoje se od perioda: pripreme, evolucije, miješanja i detekcije. Ova tehnika pruža više informacija o strukturi spoja.[32] Postoji mnogo jedno- i dvodimenzijskih tehnika NMR, a u nastavku su opisane samo one tehnike korištene za određivanje strukture spojeva u ovom radu.

2.3.3.1. Tehnika ^{1}H NMR

Ovom se tehnikom detektiraju signali kemijski neekvivalentnih protona u spoju, a njihov broj je proporcionalan omjeru površina ispod pojedinih signala. Spektar ^{1}H NMR nam daje prvi uvid u strukturu molekule na temelju opaženih kemijskih pomaka i konstanti sprege spin-spin.

2.3.3.2. Tehnika DEPT-Q

Modifikacija tehnike DEPT (engl. *distortionless enhancement by polarisation transfer*), jednodimenzijska je tehnika koja omogućava editiranje spektara heterojezgri (^{13}C) prema multiplicitetu uz pojačanje intenziteta signala jezgri ^{13}C. Za razliku od DEPT, pomoću tehnike DEPT-Q se može dobiti informacija o kvaternim ugljikovim atomima.

2.3.3.3. Tehnika COSY

COSY (engl. *correlation spectroscopy*) je najviše korištena homonuklearna dvodimenzijska tehnika NMR. Koristi se za dobivanje informacija o povezanosti protona preko skalarne sprege kroz dvije ili tri kemijske veze. Spektar COSY je simetričan, a postoje samo dijagonalni signali ako nema sprezanja među spinovima, odnosno izvandijagonalni ako sprega postoji.

2.3.3.4. Tehnika HSQC

HSQC (engl. *heteronuclear single quantum coherence*) tehnika se koristi za detekciju heteronuklearne sprege kroz jednu vezu između protona i heterojezgri (^{13}C , ^{15}N).

2.3.3.5. Tehnika HMBC

Tehnika HMBC (engl. *heteronuclear multiple bond corelation*) omogućava uvid u korelacije protona s ugljikovim atomima preko dvije, tri ili četiri kemijske veze te povezivanje pojedinih spinskih sustava. Pomoću ove tehnike mogu se opaziti korelacije između protona i kvaternih ugljikovih atoma.

Spektroskopija NMR, osim što se koristi za određivanje strukture molekule, koristi se i za ispitivanje interakcije lijekova s biološkim receptorima. Korištenjem eksperimenta NMR, moguće je objasniti konformacije slobodnog i vezanog liganda, mjesta vezanja liganda i lokalnu pokretljivost kompleksa, liganda i receptora. Prema parametrima koji se koriste za proučavanje interakcije ligand-receptor, tehnike NMR mogu se podijeliti na titraciju, difuziju, relaksaciju i eksperimente temeljene na nuklearnom Overhauserovom efektu (NOE).[33]

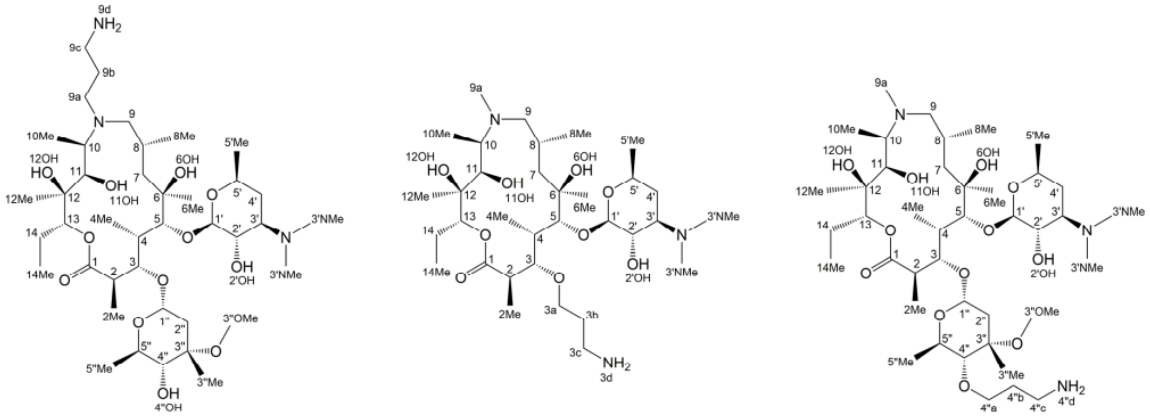
Titracijom NMR se može detektirati vezanje liganda, što se očituje širenjem linija i razlikama u kemijskim pomacima liganda. Na temelju difuzijske translacije, tehnikom NMR se dobivaju informacije o vezanju liganda i procjeni snage vezanja. Ako se kompleks formira, pokretljivost liganda postaje slična makromolekularnom receptoru. Pomoću tehnike DOSY (engl. *diffusion-ordered NMR spectroscopy*) mogu se mjeriti koeficijenti difuzije slobodnih i vezanih liganada. Mjerenje vremena relaksacije koristi se za proučavanje interakcija makrolida. Vezanje liganda može se detektirati promjenama u longitudinalnim (T_1) i transverzalnim (T_2) vremenima relaksacije ili pojačanjem paramagnetske relaksacije (PREs). Eksperiment PRE se izvodi s inertnim paramagnetskim sredstvom topljivim u vodi, koje stvara paramagnetsko otapalo i mijenja magnetska svojstva otopine. Tijekom brze izmjene između slobodnog i vezanog stanja, PRE otapala se mogu detektirati i prenijeti na slobodni ligand.[33]

Najčešće korištene metode NMR koje se temelje na prijenosu polarizacije NOE su razlika prijenosa zasićenja (engl. *saturation transfer difference*, STD) i spektroskopija prijenosa nuklearnog Overhauserovog efekta (engl. *transferred nuclear Overhauser spectroscopy*, trNOESY). Ove dvije metode pružaju obilje informacija o molekulskoj strukturi i interakcijama makrolida s bakterijskim ribosomima. STD se primjenjuje za identifikaciju veznih epitopa liganada, dok trNOESY omogućuje precizno određivanje konformacije slobodnog i vezanog liganda. Praćenjem signala NOE u spektrima trNOESY moguće je procijeniti 3D konformaciju makrolida u vezanom stanju. Za male molekule, NOE signali su pozitivni ili jednaki nuli zbog njihovih kratkih vremena korelacije. Ovisno o viskoznosti otapala, spektri NOESY makrolida

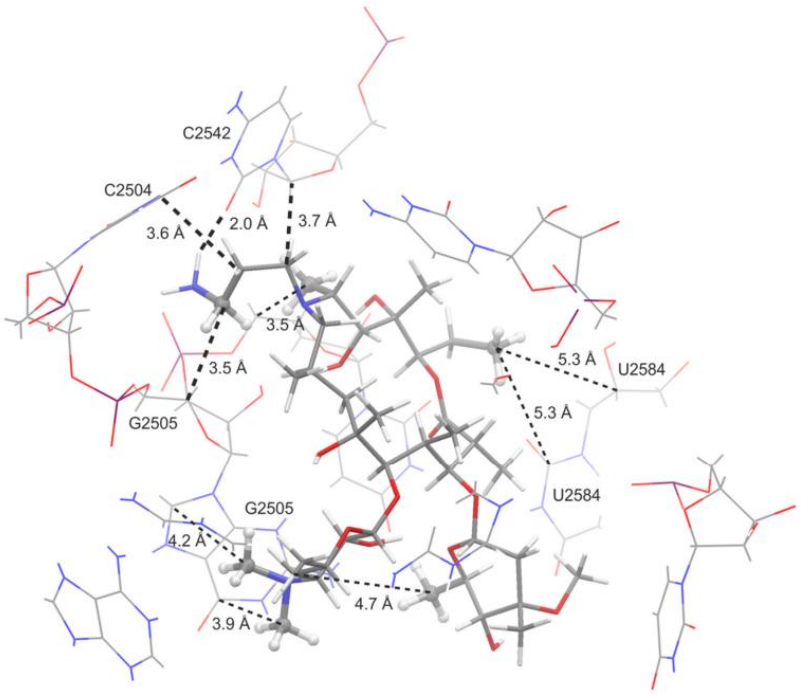
mogu imati pozitivan ili negativan efekt NOE, dok receptori pokazuju jake i negativne efekte NOE. Kada su vezani na ribosom, makrolidi pokazuju dulje vrijeme korelacije nego u slobodnom stanju.[33]

Za potpuno razumijevanje mehanizma djelovanja makrolida važno je utvrditi njihovu konformaciju u otopini i istražiti interakcije s ribosomom. Tijekom posljednjih desetljeća mnoga su istraživanja usmjerena prema analizi ribosomsko-makrolidnih kompleksa. Kombiniraju NMR i metode molekularnog modeliranja za proučavanje konformacijskog ponašanja slobodnih i vezanih 14- i 15-eročlanih makrolidnih antibiotika. Spektroskopijom NMR otkrivena su dva konformacijska stanja eritromicina u otopini: *folded-out* i *folded-in*.[30,33]

Mikulandra i suradnici su pripravili tri aminopropil-azitromicin derivata (**1a-c**) te proučavali njihovu strukturu i interakcije pomoću spektroskopije NMR. Derivati aminopropil-azitromicina (**1a-c**) prekursori su u sintezi makrozona, novih bioaktivnih konjugata azitromicina i tiosemikarbazona. Spojevi **1a-c** pokazali su dobru aktivnost protiv nekih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, uključujući sojeve *S. pneumoniae i S. pyogenes* koji su otporni na rezistenciju efluks i protiv Gram-negativne *E. coli* na koje je azitromicin bio neaktivan.[33]



Slika 12. Struktura derivata aminopropil–azitromicina, prekursora u sintezi makrozona.[33]



Slika 13. Interakcije spoja **1a** i glavni kontakti s nukleotidima ribosoma *E. coli*.[33]

Struktura prekursora karakterizirana je jedno- i dvodimenzijskom spektroskopijom NMR, a za interakciju s ribosomom primjenjuju se eksperimenti STD i trNOESY. Stoga su eksperimenti STD i trNOESY pokazali da se sva tri derivata aminopropil-azitromicina vežu na ribosom te da su vezane konformacije slične slobodnim. Kad se usporedi povećanje STD-a među spojevima **1a-c**, uočavaju se zajedničke regije u neposrednoj blizini površine ribosoma koje nalikuju azitromicinu i nekim drugim 15-eročlanim makrolidima. Dodatni efekti STD primijećeni su za metilenske protone aminopropilnih skupina, što ukazuje na interakciju NH_2 s ribosomom, ali se ne mogu uočiti u spektrima zbog izmjene s deuterijem iz otapala Tris-d_{11} pufera. Interakcije s ribosomom se dodatno istražuju metodom molekulskog umetanja (engl.*molecular docking*). Makrolaktonski prsten bio je u konformaciji *folded-out*, a vezanje je uglavnom postignuto van der Waalsovim interakcijama s nukleotidama.[30,33]

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije i instrumenti

Popis kemikalija korištenih u izradi diplomskog rada, njihovi proizvođači, molarne mase i čistoće navedene su u tablici 1.

Tablica 2. Popis kemikalija korištenih prilikom izrade diplomskog rada.

Kemikalija	Čistoća	M/g mol^{-1}	Proizvođač
Acetonitril (ACN)	99,9%	41,05	Fisher Chemical
Akrilonitril	99%	53,06	TCI America
Amonijak, 25%		17,031	Alkaloid Skopje
Anhidrid octene kiseline	97%	102,09	Carlo Erba Reagents
Azitromicin		749,0	
Bakrov(II) sulfat pentahidrat ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	98%	249,68	Kemika
Benzil izotiocijanat	98%	149,21	Acros Organics
Cezijev karbonat (Cs_2CO_3)	99,5%	325,82	Acros Organics
Cikloheksan		84,16	
Diklormetan (CH_2Cl_2)	99,9%	84,93	Carlo Erba Reagents
DMSO-d_6	99,9%	84,17	Eurisotop
Di-*tert*-butil-dikarbonat (Boc_2O)	98%	218,25	Carbolution Chemcals
Etanol (EtOH)	p.a.	46,07	Gram Mol
Etil acetat (EtOAc)	p.a.	88,11	Gram Mol
n-heptan		100,21	
Hidrazin monohidrat	98%	50,06	Sigma-Aldrich
Kalijev karbonat (K_2CO_3)	99,5%	138,21	Fisher Chemical
Kalijev jodid (KI)	p.a.	166,01	Kemika
Kloroform ($CHCl_3$)	99,2%	119,38	VWR Chemicals
Klorovodična kiselina (HCl)	p.a.	36,46	Kemika
Metanol (MeOH)		32,04	Merck Chemical

Natrijev borohidrid ($NaBH_4$)	98%		Acros Organics
***N*,*N*-dimetilformamid-dimetilacetal (DMF-DMA)**	97%	129,24	Acros Organics
Niklov(II) acetat tetrahidrat ($Ni(OAc)_2 \cdot 4H_2O$)	99,5%	248,86	Acros Organics
Niklov(II) klorid heksahidrat ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	99,5%	237,70	Acros Organics
Octena kiselina (CH_3COOH)	p.a.	60,05	Gram Mol
Salicilna kiselina	p.a.	138,12	Kemika
Sumporna kiselina, 96% (H_2SO_4)	p.a.	98,08	Carlo Erba Reagents
***t*-Butanol (*t*-BuOH)**	99,5%	74,12	Carlo Erba Reagents
Tetrahidrofuran (THF)		72,11	
Trietilamin (Et_3N)		101,19	
Trifluorooctena kiselina (TFA)	99%	114,02	Sigma-Aldrich
Toluen	p.a.	92,14	Gram Mol
1-[bis(dimetilamino)metilen-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinijev-3-oksid heksafluorofosfat (HATU)	97%	380,23	Acros Organics
Heksametilentetramin (HMTA)	99%	140,19	Acros Organics

U tablici 3. navedeni su instrumenti korišteni za strukturnu karakterizaciju i analizu pripravljenih spojeva prilikom izrade diplomskog rada.

Tablica 3. Popis instrumenata korištenih za analizu i karakterizaciju spojeva.

Instrument	Metoda
Rotovapor Buchi R-100	Uparavanje
Mettler AT261 DeltaRange	Vaganje
Bruker Avance III HD 400 MGh/54mm Ascend	Spektroskopija NMR
Perkin-Elmer Spectrum Two	Spektroskopija IR

3.2. Priprava tiosemikarbazona

3.2.1. Sinteza formilsalicilne kiseline

Općenito, zagrijavanjem heksametilentetramina (HMTA) i salicilne kiseline u vodenoj otopini, nastaju dva strukturna izomera formilsalicilne kiseline (**FS**) kao produkt. To su 3- i 5-formilsalicilna kiselina. Miješane forme mogu se odvojiti vrućom filtracijom, pri čemu će nastati 5-fromilsalicilna kiselina, a prekristalizacijom iz vodene otopine će nastati 3-formilsalicilna kiselina.[34] Formilsalicilna kiselina se pripravlja tako da se u okrugloj tikvici pomiješa salicilna kiselina (1 ekvivalent, m = 1,38 g) s trifluorooctenom kiselinom (10 mL), a zatim se doda HMTA (2 ekvivalenta, m = 2,8 g) i bakrov(II) sulfat pentahidrat (1 ekvivalent, m = 1,6 g). Reakcijska smjesa se refluksira uz miješanje i zagrijavanje na 90 °C idućih 5 h, pri čemu dolazi do nastanka zelenog taloga. Talog se profiltira te se otopi u 20 mL toluena. Smjesa se zagrijava i profiltira, pri čemu nastaje zeleni talog koji odgovara formi 5-formilsalicilne kiseline. Matičnica se upari te se nakon uparavanja doda 20 mL vode i klorovodične kiseline (10 mL, c = 6 mol/dm^3). Dolazi do nastanka žutog taloga koji se dalje prekristalizira i nastane 3-formilsalicilna kiselina. U daljnjoj sintezi koristi se samo 3-formilsalicilna kiselina, a u daljnjem tekstu koristit će se oznaka **FS** ili formilsalicilna kiselina. Nakon što se talog **FS** osuši, snimi se spektar ATR na Perkin-Elmer Spectrum Two i NMR spektar na Bruker Avance III HD 400 MGh/54mm Ascend, pri čemu se koristi deuterirano otapalo kloroforma.

3.2.2. Sinteza benzil-tiosemikabazida

Benzil-tiosemikarbazid (**TSH6**) dobiven je reakcijom benzil izotiocijanata (1 ekvivalent, V = 370 μL) s hidrazin monohidratom (1 ekvivalent, V = 85 μL) u diklormetanu (20 mL). Reakcijska smjesa se miješa pri sobnoj temperaturi idućih 2 h pri čemu dolazi do nastajanja tiosemikarbazida. Dobiveni tiosemikarbazid je profiltriran preko Büchnerovog lijevka i potom je posušen. Nakon provedene sinteze snimljen je NMR spektar na Bruker Avance III HD 400 MGh/54mm Ascend, pri čemu je korišteno deuterirano otapalo kloroforma.

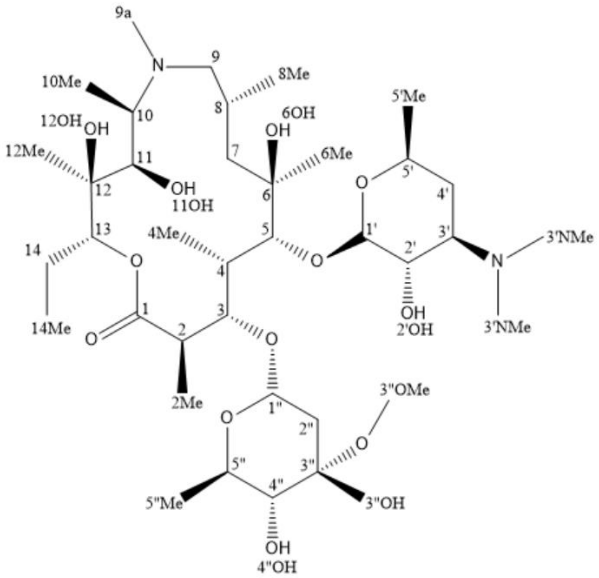
3.2.3.Sinteza 3-[(Z)-{[(benzilkarbamotioil)amino]imino}metil]-2-hidroksibenzojeve kiseline

U okrugloj tikvici otopi se **TSH6** (1 ekvivalent, *m* = 0,05 g) i **FS** (1 ekvivalent, *m* = 0,05 g) u metanolu (15 mL) uz dodatak par kapi katalizatora octene kiseline. Smjesa se miješa na magnetskoj mješalici preko noći, pri čemu nastaje žuta otopina. Metanol se ukloni uparavanjem te se nakon uparavanja u smjesu doda voda (5 mL), pri čemu nastaje žuti talog, tiosemikarbazon 3-[(*Z*)-{[(benzilkarbamotioil)amino]imino}metil]-2-hidroksibenzojeva kiselina, u daljnjem tekstu koristit će se oznaka **FS6**. Talog se profiltrira pomoću Hirschovog lijevka, potom se posuši i snimi NMR spektar na Bruker Avance III HD 400 MGh/54mm Ascend, pri čemu se koristi deuterirano otapalo kloroforma.

3.3. Priprava 4''-aminopropil derivata azitromicina

3.3.1. Zaštita 11 i 12 diola DMF-acetalom

U okrugloj tikvici otopi se azitromicin (1 ekvivalent, *m* = 2,74 g) u kloroformu (30,0 mL) i doda se *N*,*N*-dimetilformamid-dimetilacetal (DMF-DMA, 5 ekvivalenta, *V* = 2,5 mL). Otopina se zagrijava na 60 °C uz miješanje idućih 24 h. Zatim se u otopinu doda još DMF-DMA (1,5 mL) te se nastavi sa zagrijavanjem reakcijske smjese još 5 h. Nastala voda tijekom kemijske reakcije uklanja se pomoću Dean-Starka. Tijek reakcija praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC). Kao nepokretna faza korišten je silikagel nanesen na staklenu pločicu, a kao pokretna faza sustav otapala (**E**$^+$) diklormetan : metanol : amonijak (25%) = 90 : 15 : 1,5. Reaktanti i produkti vizualizirani su prskanjem pločice 10%-tnom otopinom sumporne kiseline u etanolu. Nakon potvrde da su svi reagensi reagirali, dodana je mala količina kloroforma i tetrahidrofurana (40 mL). Nakon toga se smjesa dobro promiješa i ostavi u hladnjaku da se istaloži talog, a potom se tetrahidrofuran ukloni uparavanjem pri čemu nastaje bijeli talog, međuprodukt AZM-DMFA (**M1**). Produkt je izvagan, masa dobivenog produkta je 2531,5 mg.



Slika 14. Struktura azitromicina uz označene lokante.

3.3.2. Zaštita 2'OH skupine acetatnim esterom

M1 se otopi u etil-acetatu (28 mL) te se otopina ohladi na 0 °C. U ohlađenu otopinu se doda acetanhidrid (0,30 mL). Otopina se miješa 5 h na sobnoj temperaturi pri čemu dolazi do nastanka uljaste žute tekućine, međuprodukt AZM-DMFA-AC (**M2**). Produktu je snimljen NMR spektar na uređaju Bruker Avance III HD 400 MGh/54mm Ascend. Za snimanje je korišten deuterirano otapalo kloroforma.

3.3.3. Michaelova adicija na 4" OH skupinu kladinoze

Otopi se **M2** u *t*-butanolu (20 mL), zatim se doda cezijev karbonat (1 ekvivalent, *m* = 1,2554 g) i akrilonitril (4,8 mL). Reakcijska smjesa se miješa na 35 °C preko noći, nakon čega se tijek reakcije prati tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala $\mathbf{E}^+$ (diklormetan : metanol : amonijak = 90 : 15 : 1,5), a za vizualizaciju se koristi tehnika prskanja 10%-tnom sumpornom kiselinom u etanolu. Smjesa se profiltrira i ispere s cikloheksanom i prebaci u izvaganu tikvicu, nakon čega se doda malo acetronitril i otapalo se upari na rotavaporu. Nakon toge se doda diklometan (2,5 mL) i n-heptan (25 mL) te se smjesa ponovno profiltrira. Matičnica se upari na rotavaporu, pri čemu dolazi do nastanka bijelog taloga, AZM-DMFA-AC-4"CN (**M4''CN**).

3.3.4. Redukcija nitrila

Otopi se **M4''CN** (1 ekvivalent, *m* = 771,8 mg), di-tert-butil-dikarbonat (Boc_2O) (2 ekvivalenta, *m* = 374,65 mg) i bezvodni niklov(II) klorid (1 ekvivalent, *m* = 111,23 mg) u hladnom metanolu (8 mL). Bezvodni niklov(II) klorid dobiva se zagrijavanjem niklovog(II) klorida heksahidrata (*m* = 200 mg) u 20 mL toluena na 110 °C uz Dean Starkov nastavak i destilacijom pola reakcijske smjese nakon sat vremena. Preostalo otapalo se upari na rotacijskom uparivaču. U tikvicu se zatim dodaju **M4''CN**, di-tert-butil-dikarbonat i metanol. U reakcijsku smjesu polako se dosipa natrijev borohidrid ($NaBH_4$) (4 ekvivalenta, *m* = 130 mg). Nakon što se otopina prestane pjeniti doda se još 3 ekvivalenta natrijevog borohidrida (*m* = 100 mg). Reakcijska smjesa se miješa idućih 24 h. U reakcijsku smjesu se doda klorovodična kiselina (*c* = 6 mol/dm^3) kako bi se spustio pH smjese na 9. Nakon toga se smjesa ekstrahira s diklometanom (20 mL). U nastalu otopinu doda se mala količina koncentrirane otopine amonijaka te se otopina ekstrahira s etil-acetatom (20 mL) i upari, pri čemu nastaje uljasta žuta tekućina, međuprodukt AZM-DMFA-AC-4"Boc (**M4''-Boc**). Dobiveni međuprodukt snimljen je NMR spektrom, pri čemu je korišteno deuterirano otapalo kloroforma. Zatim slijedi uklanjanje Boc_2O skupine. Nastali međuprodukt i kalijev jodid (2 ekvivalenta, *m* = 167 mg) otopi se u smjesi acetona i vode u omjeru 10 mL : 0,5 mL. Reakcijska smjesa se refluksira na 60 °C idućih 24 h i tijek reakcije se prati na TLC pločici u $\mathbf{E}^+$ sustavu uz korištenje ninhidrina za detekciju amina. Kako bi se otklonila DMF skupina, u reakcijsku smjesu se doda octena kiselina (200 μL) i smjesa se upari dok ne postane suha. Nakon uparavanja smjesa se ekstrahira s etil-acetatom (10 mL), prikupljeni organski sloj se osuši s bezvodnim kalijevim karbonatom te ponovno stavi na uparavanje. Nakon toga se u smjesu doda metanol (20 mL) i smjesa se miješa na 45 °C idućih 12 h. Potom se metanol uklanja iz smjese uparavanjem te se smjesa suspendira u n-heptanu. Zatim se smjesa profiltrira kroz sinter lijevka i n-heptan se ukloni uparavanjem pri čemu dolazi do nastanka bijelog taloga, produkt **M4''**. Produkt je izvagan, masa produkta iznosi 220,12 mg.

3.4. Priprava makrozona i niklova(II) kompleksa makrozona

*3.4.1. Priprava kompleksa **M4''-FS6***

U izvaganoj tikvici otopi se **FS6** (1 ekvivalent, *m* = 20,4 mg) u diklormetanu (25 mL) uz dodatak trietilamina (1,2 ekvivalenta, *V* = 15 μL) te se doda HATU (1,2 ekvivalenta, *m* = 28 mg). Smjesa se miješa jedan sat. Nakon toga se u reakcijsku smjesu doda **M4''** (1 ekvivalent, *m* = 50 mg) i miješa se jedan dan. Upari se diklormetan, pri čemu nastaje žuta otopina. U tikvicu se doda destilirana voda (10 mL), istaloži se žuti talog koji se profiltrira i ispire s etil-acetatom do otapanja. Potom se u matičnicu doda 20 mL etil-acetata te se tri puta ekstrahira sa 15 ml destilirane vode. Skuplja se organski sloj, potom se u frakciju doda 20 mL etil-acetata te se osuši s bezvodnim kalijevim karbonatom. Nakon toga frakcija se prebaci u izvaganu tikvicu te se etil-acetat ukloni uparavanjem, pri čemu nastaje žuta otopina. Tijek reakcije se prati na TLC pločici u $\mathbf{E}^+$ sustavu (diklormetan : metanol : amonijak = 90 : 15 : 1,5), **E1** sustavu (diklormetan : metanol : amonijak = 90 : 9 : 0,5), $\mathbf{E}_3$ sustavu (diklormetan : metanol : amonijak = 90 : 18 : 15) i u sustavu koja se dobiva miješanjem **E1** i $\mathbf{E}^+$ sustava (diklormetan : metanol : amonijak = 90 : 12 : 0,5). Kompleks se dalje pročišćava pomoću tekućinske kromatografije na stupcu te se snime NMR spektri uz korištenje deuteriranog otapala kloroforma.

*3.4.2. Priprava **M4''-FS6-Ni(II)***

U tikvici se otopi **M4''-FS6** (1 ekvivalent, *m* = 15,0 mg) u diklormetanu (10 mL) i $Ni(OAc)_2 \cdot 4H_2O$ (1,2 ekvivalenta) koji je prethodno otopljen u 5 mL metanola i 0,2 mL amonijaka. Smjesa se miješa dva sata i upari. Žuti talog se ispere s 10 mL destilirane vode i tri puta ekstrahira sa 15 mL etil-acetata. Nakon toga se etil-acetat ukloni uparavanjem, pri čemu nastaje žuto smeđi talog (11,0 mg). NMR spektri niklovog(II) kompleksa makrozona snime se uz korištenje otapala DMSO-d6.

3.4.3. Pročišćavanje makrozona

Pripravljeni kompleks **M4''-FS6** pročišćen je pomoću tekućinske kromatografije na stupcu. Korištena je staklena kolona s kapacitetom od 15 mL. Kao nepokretna faza korišten je silikagel,

dok je kao pokretna faza korištena smjesa otapala ψ (diklormetan : metanol : amonijak = 90 : 12 : 0,5) koja se dobiva miješanjem **E1** i $\mathbf{E}^+$ sustava. Uzorak kompleksa **M4''-FS6** se otopi u 2 mL diklormetana i nanese na kolonu pomoću kapalice. Uzorak se pažljivo ispusti uz stijenku kolone, nakon čega se iz kolone ispusti otapalo dok uzorak ne uđe u stupac silikagela. Kad uzorak uđe u stupac silikagela tada se počinje skupljati predfrakcija od 12 mL, a u ostalim frakcijama skuplja se oko 7 mL. Svaka frakcija eluirana s kromatografske kolone analizirana je tankoslojnom kromatografijom. Na TLC pločicu nanosi se uzorak, sadržaj pojedine frakcije uzima se kapilarom i lagano ispusti na pločici koja se potom ostavi u zatvorenoj staklenoj komori. Kao pokretna faza korištena je smjesa otapala u kojoj je omjer otapala diklormetan : metanol : amonijak bio 90 : 12 : 0,5. Uzorak na pločici je detektiran prskanjem 10%-tnom sumpornom kiselinom u etanolu. Ukoliko je detektirana mrlja na pločici odgovarala makrozonu, frakcija je uparena u izvaganoj tikvici te su snimljeni spektri NMR.

3.5. Metode karakterizacije

Molekulske strukture nastalih produkata i međuprodukata potvrđene su spektroskopijom NMR. Snimljeni su spektri: ^{1}H, ^{13}C, COSY, ^{1}H-^{13}C HSQC, ^{1}H-^{13}C HMBC. Svi spektri snimljeni su na Bruker Avance III HD 400 MGh/54mm Ascend NMR spektrometru s 5 mm BBO (engl. broadband) indirektnom Prodigy krio-probom i z-gradijentnom zavojnicom pri 298K. Uzorci su pripremljeni otapanjem 5 mg uzoraka u 550 µL deuteriranog otapala. Korištena otapala su kloroform-d, metanol-d4 i dimetil-sulfoksid (DMSO-d6), a za referentni signal korišten je tetrametilsilan (TMS). Analiza i obrada spektara provedena je u programu *TopSpin 4.1.4.*

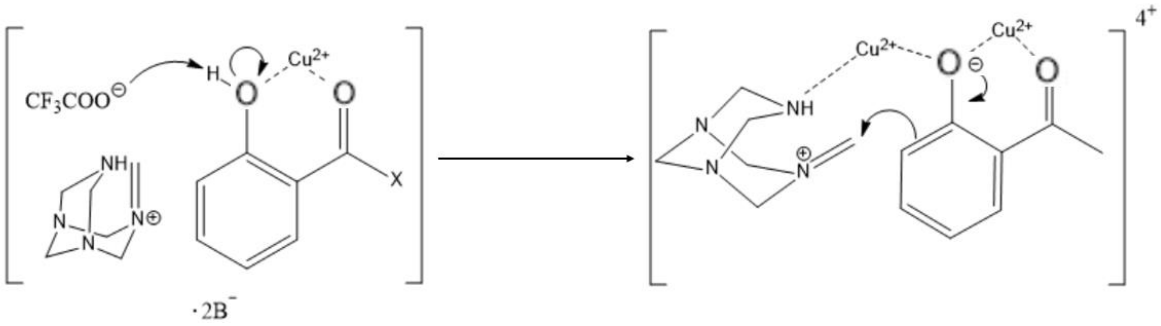
Molekulske strukture polaznih reaktanata i produkata potvrđene su tehnikom prigušene totalne refleksije (engl. *attenuated total reflectance*, ATR). To je tehnika snimanja koja se koristi kod infracrvene spektroskopije, a koja omogućuje da se uzorci ispituju izravno u čvrstom ili tekućem stanju bez daljnje pripreme. Spektri ATR reaktanata i produkata snime se na instrumentu Perkin-Elmer Spectrum Two. Analiza i obrada spektara provedena je u programu *SpectraGryph 1.2.*

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Sinteza i karakterizacija tiosemikarbazona

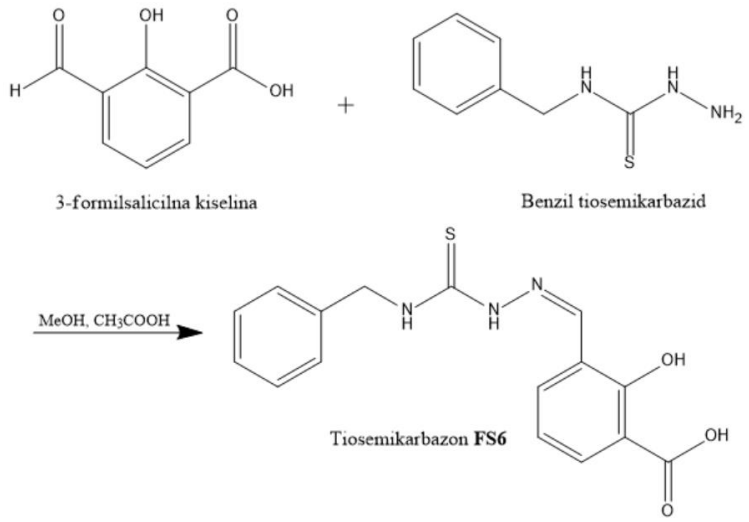
Formilsalicilna kiselina dobivena je modifikacijom Duffove reakcije. Poznata kao i aromatska formilacija heksamina, to je reakcija formilacije koja se koristi u organskoj kemiji za sintezu benzaldehida s heksametilentetraminom (HMTA) kao izvorom formilnog ugljika. Reakcije formilacije su oblik elektrofilne aromatske supstitucije i stoga zahtijevaju aromatske spojeve bogate elektronima, kao što je fenol. Fenol se može lako deprotonirati u fenokside koji su izvrsni nukloefili. Moguća je formilacija na *para*-položaju i na *orto*-položaju u odnosu na supstituent koji donira elektron. Međutim, formilacija se prvenstveno odvija u *orto*-poziciji, osim ako su *orto*-pozicije blokirane, pri čemu se formilacija događa na *para*-poziciji.

Formilsalicilna kiselina dobiva se formilacijom salicilne kiseline s HMTA u trifloroоctenoj kiselini uz dodatak bakrovog(II) sulfata pentahidrata. HMTA se protonira i stvara se elektrofilna vrsta iminijev ion $CH_2^+NR_2$. Salicilna kiselina se deprotonira trifluoroacetatom i nukleofilno napada iminijev ion, a produkt nastane hidrolizom iminijevog kationa u aldehid. Općenito, reakcija formilacije ima niski reakcijski prinos zbog mogućnosti nastanka produkta u *orto*- i *para*-položaju. Zbog toga se u reakciju doda bakrov(II) sulfat pentahidrat kako bi povećao reakcijski prinos i orto/para selektivnost (slika 15.).[34-38]



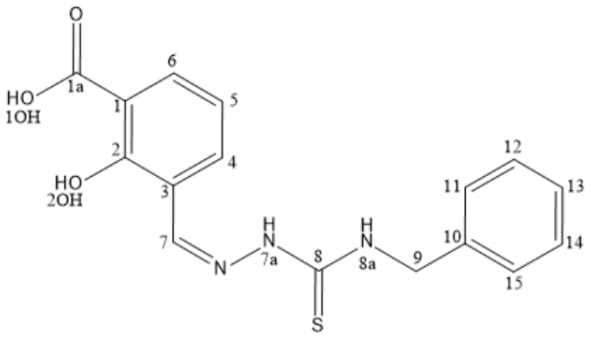
Slika 15. Uloga Cu(II) u Duffovoj reakciji.[34]

Za sintezu tiosemikarbazida kao polazni spoj koristio se benzil-izotiocijanat koji u reakciji s hidrazin monohidratom daje benzil-tiosemikarbazid. Reakcijom formilsalicilne kiseline i benzil-tiosemikarbazida uz octenu kiselinu u metanolu nastaje tiosemikarbazon **FS6**. Na slici 16. prikazana je reakcijska shema dobivanja tiosemikarbazona.

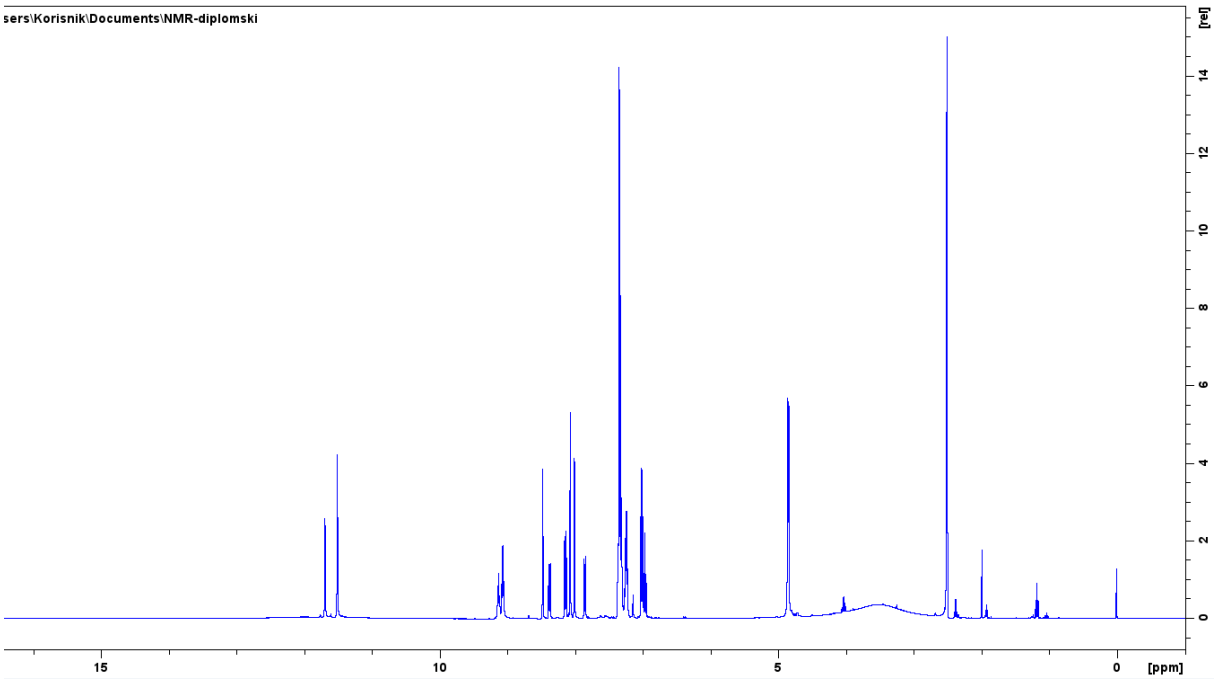


Slika 16. Reakcijska shema dobivanja tiosemikarbazona **FS6**.

Struktura tiosemikarbazona **FS6,** potvrđena je spektroskopijom NMR. Na slici 18. prikazan je njegov spektar ^{1}H NMR. Analizom korelacijskih signala u spektru COSY (Slika 19.) može se utvrditi koji protoni pripadaju pojedinom benzenskom prstenu. Postoje korelacije između aromatskih protona pri 7,24 ppm, 7,31 ppm i 7,35 ppm. Stoga ovi protoni čine isti spinski sustav i pripadaju aromatskom prstenu iz benzil-tiosemikarbazida (**TSH6**). Drugi spinski sustav čine protoni iz aromatskog prstena formilsalicilne kiseline. Vidljive su korelacije između aromatskog protona pri 6,97 ppm s protonima pri 7,85 ppm i 8,38 ppm. Vidljive su i korelacije između protona 9 (4,84 ppm) i 8a (9,09 ppm) te korelacija protona 9 s protonima iz aromatskog prstena **TSH6**. Opažene su i međusobne korelacije između protona 8a i 7a (9,11 ppm). Nadalje, potvrđena je korelacija između pojedinih ugljika i protona kroz jednu vezu pomoću spektra HSQC (Tablica 4.). Struktura salicilne kiseline, formilsalicilne kiseline i tiosemikarbazona **FS6** također je potvrđena infracrvenom spektroskopijom uz prigušenu totalnu refleksiju (ATR). Spektar NMR salicilne kiseline i tiosemikarbazida **TSH6** nalaze se u dodatku (D1-D13).



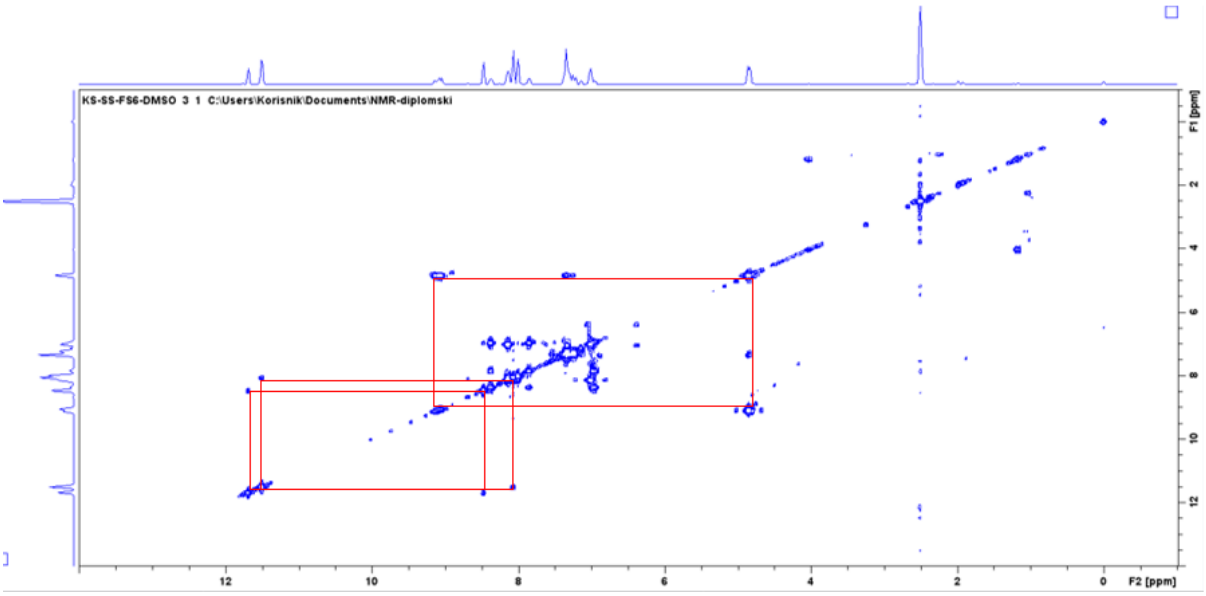
Slika 17. struktura tiosemikarbazona **FS6** uz označene lokante.



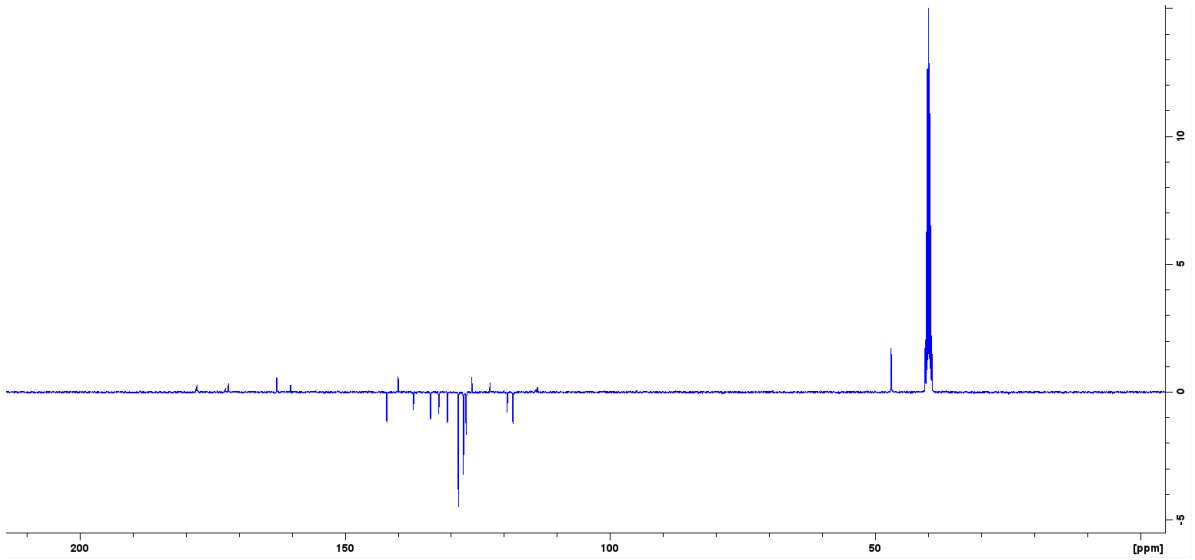
Slika 18. Spektar ^{1}H NMR tiosemikarbazon **FS6** snimljen u DMSO-d_6 pri 298K.

Tablica 4. Asignacija kemijskih pomaka jezgara ^{1}H i ^{13}C tiosemikarbazona **FS6.**

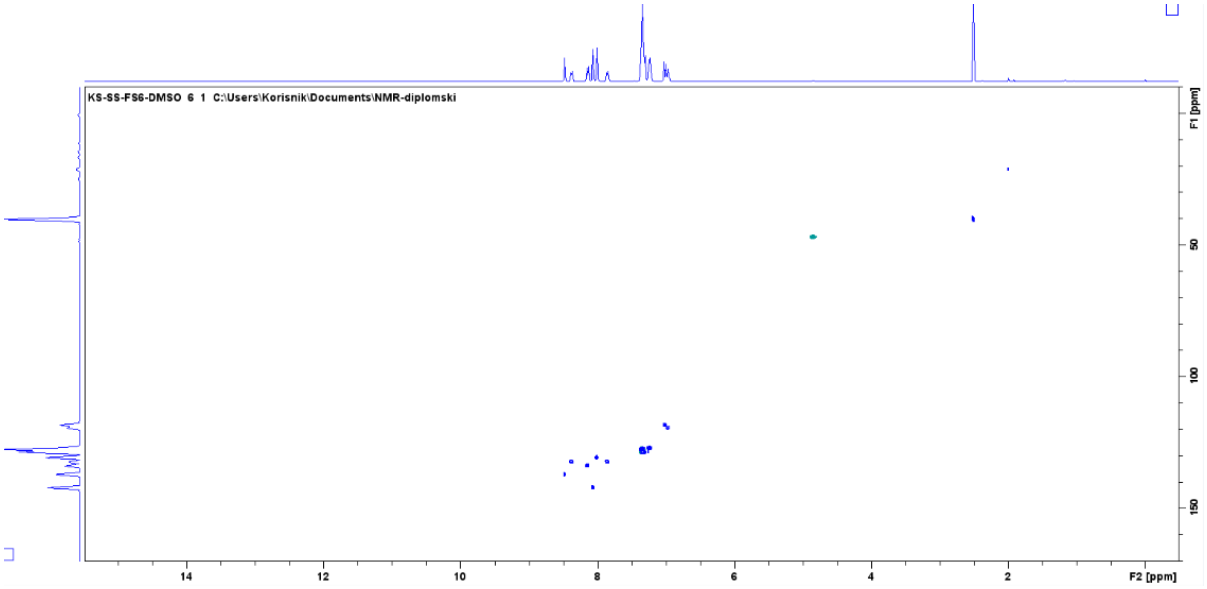
Atom	δ(^{1}H)/ppm	δ(^{13}C)/ppm
1	-	113,5
1a	-	160,4
1 OH	11,71	-
2	-	163,0
2 OH	11,51	-
3	-	140,7
4	6,97	119,4
5	7,85	131,2
6	8,38	132,4
7	8,14	133,6
7a	9,11	-
8	-	177,9
8a	9,09	-
9	4,85	46,5
10	-	139,6
11,15	7,35	127,4
12,14	7,24	126,8
13	7,31	128,6



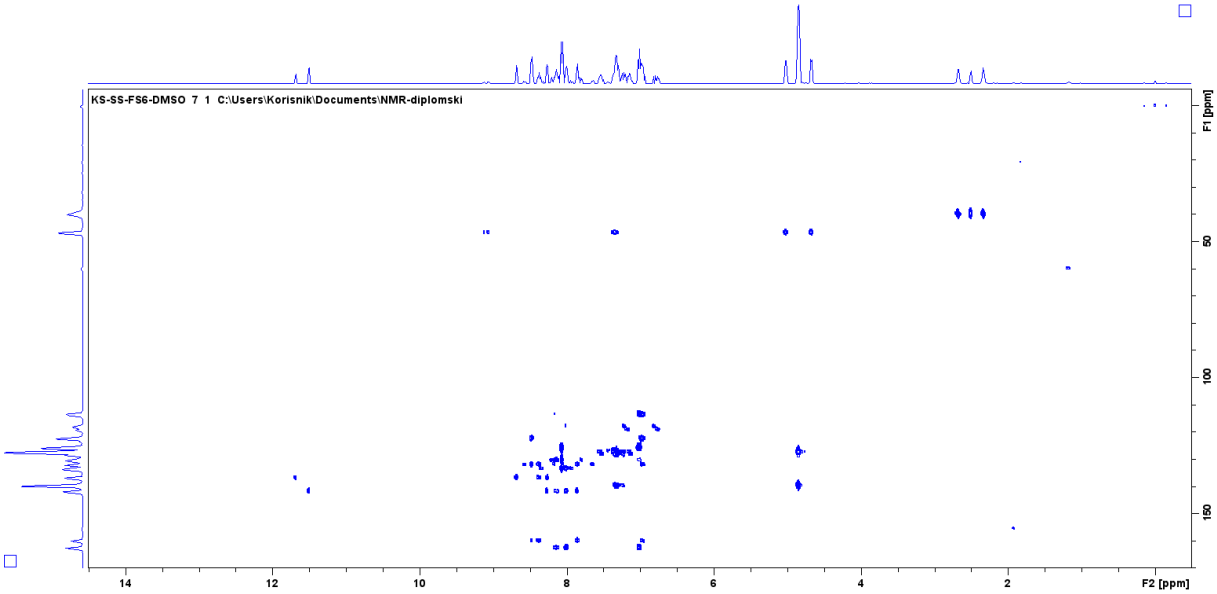
Slika 19. Spektar COSY tiosemikarbazona **FS6** snimljen u DMSO-d_6 pri 298 K.



Slika 20. Spektar DEPT-Q NMR tiosemikarbazona **FS6** snimljen u DMSO-d_6 pri 298K.



Slika 21. Spektar HSQC NMR tiosemikarbazona **FS6** snimljen u DMSO-d_6 pri 298K.



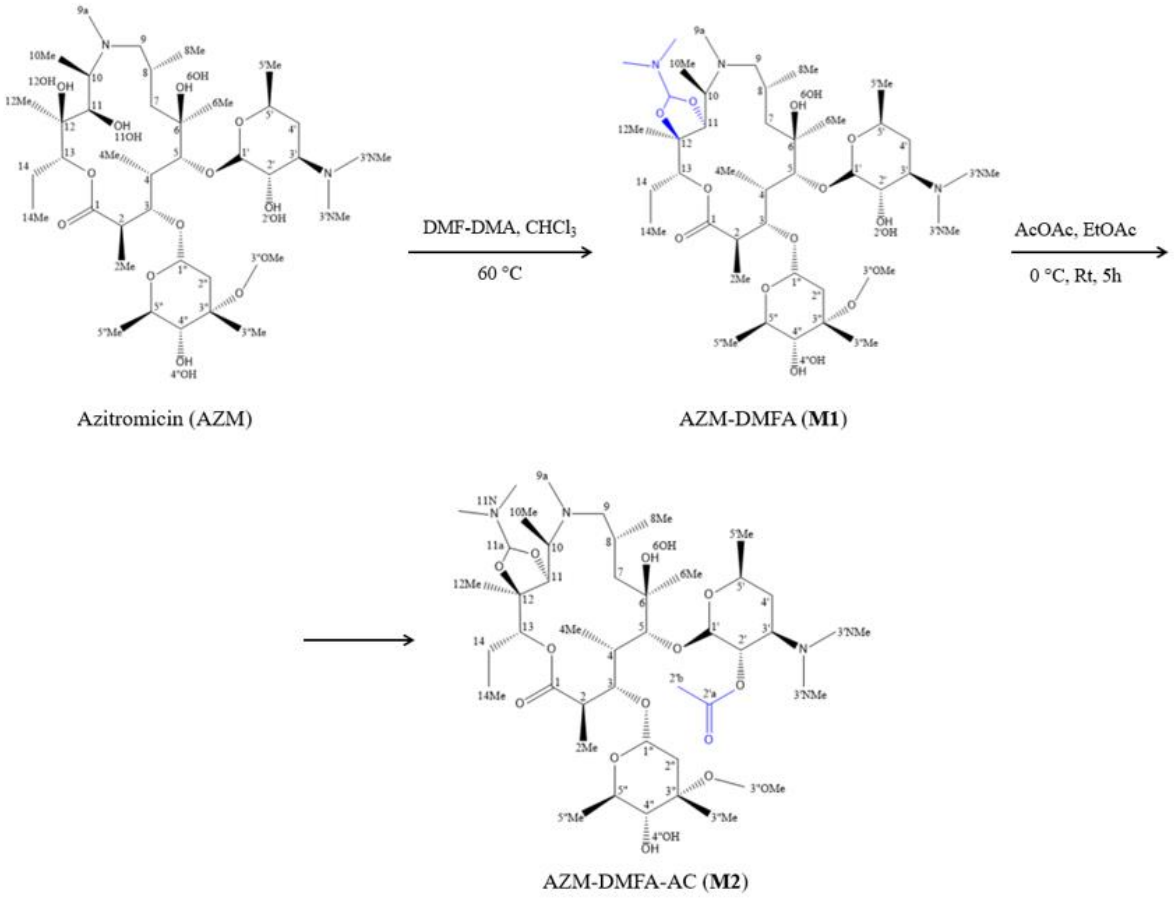
Slika 22. Spektar HMBC NMR tiosemikarbazona **FS6** snimljen u DMSO-d_6 pri 298 K.

4.2. Priprava i karakterizacija 4''-aminopropil derivata azitromicina

*4.2.1. Priprava **M1** i **M2***

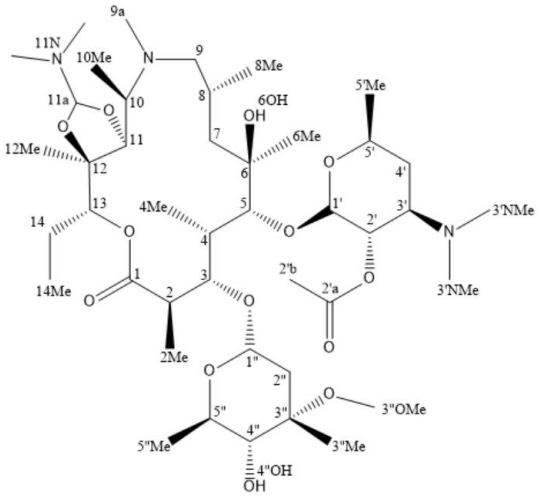
Sinteza 4''-aminopropil derivata azitromicina započinje zaštitom diola na poziciji 11 i 12 koristeći zaštitnu skupinu *N,N*-dimetilformamid-dimetilacetal (DMF-DMA), pri čemu nastaje međuprodukt **M1**. Ova zaštitna skupina je stabilna prema nukleofilnoj reakciji te pri kiselim i bazičnim uvjetima. Za zaštitu skupine 2' OH koristi se anhidrid octene kiseline. Upotrebom

ekvimolarne količine acetanhidrida u etil acetatu kao otapalu dolazi do acetiliranja skupine 2' OH pri čemu nastaje međuprodukt **M2**.

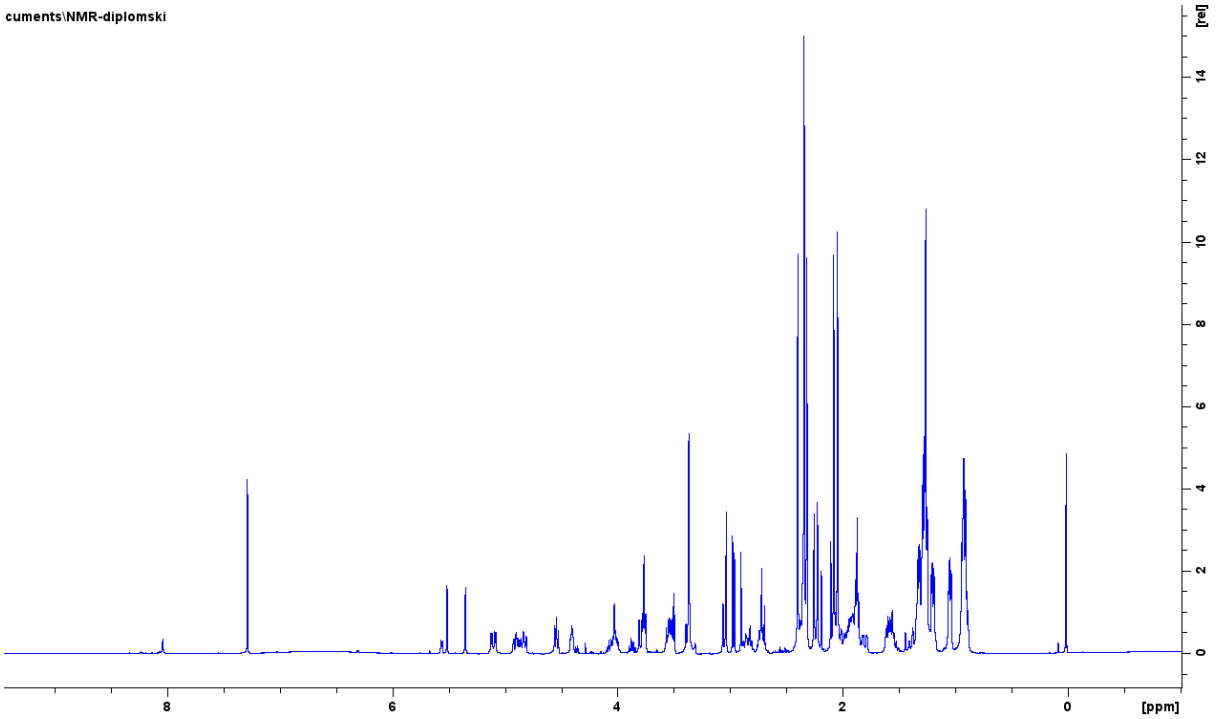


Slika 23. Reakcijska shema dobivanja međuprodukata **M1** i **M2**.

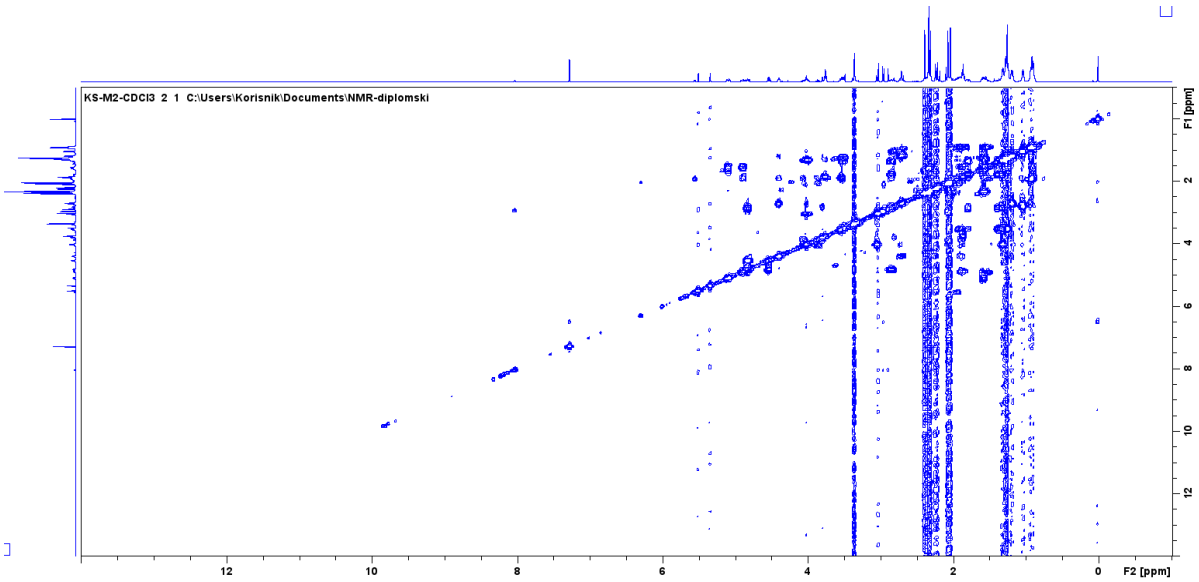
Nakon provedene sinteze, struktura međuprodukta **M2** potvrđena je spektroskopijom NMR, snimljeni su spektri ^{1}H NMR (Slika 25.) i COSY (Slika 26.). U spektru COSY uočava se korelacija između protona 11a (4,82 ppm) i 11NMe_2 (2,83 ppm) što potvrđuje da je diol uspješno zaštićen dimetilformamid acetalom. Također, uočen je pomak pri 1,90 ppm koji odgovara protonu 2'b iz metilne skupine koji potvrđuje da je skupina 2' OH zaštićena.



Slika 24. Struktura **M2** uz označene lokante.



Slika 25. Spektar ^{1}H NMR međuprodukta **M2**, snimljen u $CDCl_3$ pri 298K.



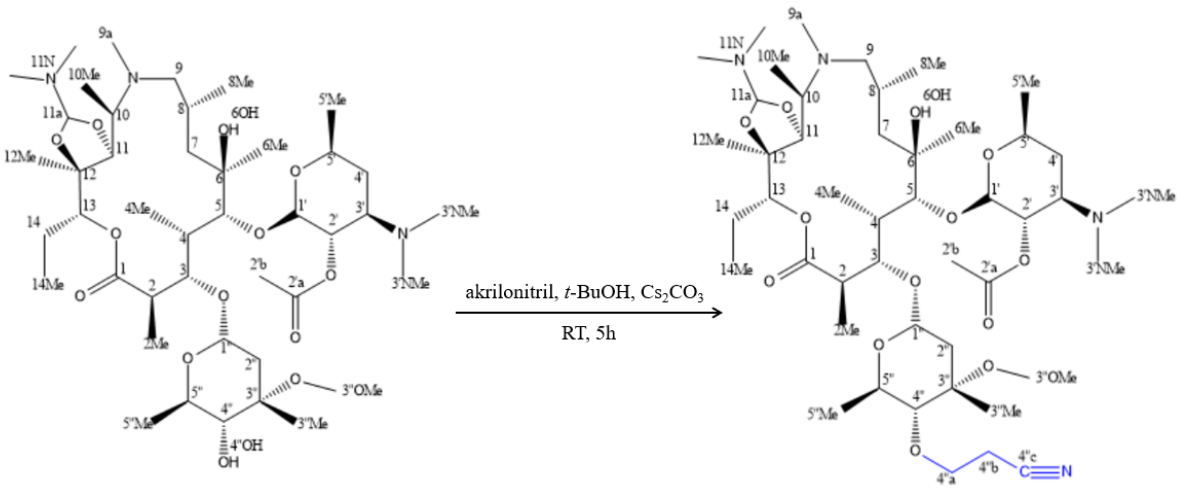
Slika 26. Spektar COSY međuprodukta **M2**, snimljen u $CDCl_3$ pri 298 K.

Tablica 5. Asignacija kemijskih pomaka jezgara ^1H međuprodukta **M2**.

Atom	**δ(^{1}H)/ppm**	**Atom**	**δ(^{1}H)/ppm**
1	-	**13**	4,92
2	2,82	**14**	1,79 ; 2,01
2Me	1,21	**14Me**	0,88
3	4,55	**1'**	4,49
4	2,00	**2'**	5,36
4Me	1,04	**2'a**	-
5	3,77	**2'b**	1,90
6Me	1,26	**3'**	3,27
6OH	2,24	**3'NMe$_2$**	2,83
7	1,14 ; 1,49	**4'**	1,63 ; 2,06
8	1,82	**5'**	4,2
8Me	0,90	**5'Me**	1,29
9	2,45 ; 2,85	**1''**	4,92
9a	2,36	**2''**	1,84 ; 2,20
10	3,30	**3''Me**	1,37
10Me	1,04	**3''OMe**	3,28
11	3,65	**4''**	3,93
11a	4,82	**4''OH**	4,92
11NMe$_2$	2,83	**5''**	4,6
12Me	1,36	**5''Me**	1,29

*4.2.2. Priprava adukta **M4'' CN***

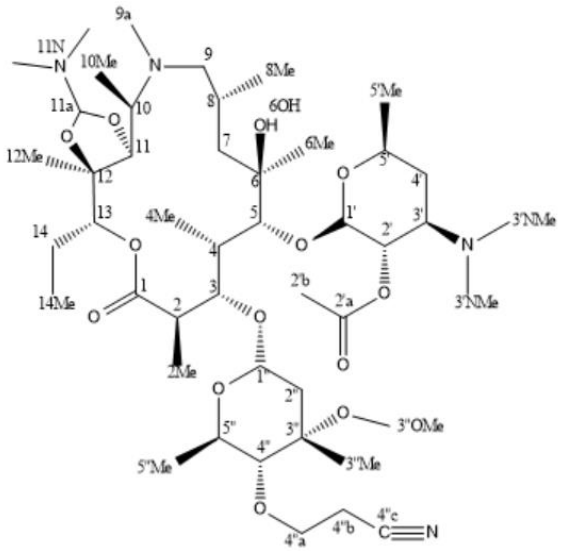
Reakcija **M2** s akrilonitrilom u *t*-butanolu uz prisutnost cezijevog karbonata dovodi do Michaelove adicije na skupinu 4" OH u kladinozi. Općenito, Michaelova adicija alkohola s akrilonitrilom koja dovodi do nastanka adukta je spora. Kako bi se ubrzala Michaelova adicija potrebna je jaka baza. Cezijev karbonat djeluje kao baza i deprotonira OH skupinu 4", dok *t*-butanol služi kao izvor protona, pri čemu nastaje adukt **M4''CN**.[39] Osim cezijeva karbonata, moguće je koristiti i jaku bazu poput natrijevog hidrida koji je sposoban deprotonirati niz Brønstedovih kiselina dajući odgovarajuće natrijeve derivate, ali je jako osjetljiv na vlagu i kisik iz zraka.[29,40] Michaelova adicija alkohola s akrilonitrilom može dovesti do nepoželjne polimerizacije akrilonitrila, a obuhvaća dva koraka. Prvi korak obuhvaća adiciju slobodne hidroksilne skupine na akrilonitril koji daje karbanion na atomu α-C pored nitrilne skupine, a drugi korak je reakcija druge molekule akrilonitrila na karbanionu. Nastajanje konačnog adukta zahtijeva protoniranje karbaniona. Kako bi se karbanion protonirao i izbjegla nepoželjna polimerizacija, uvodi se *t*-butanol kao izvor protona.[41]



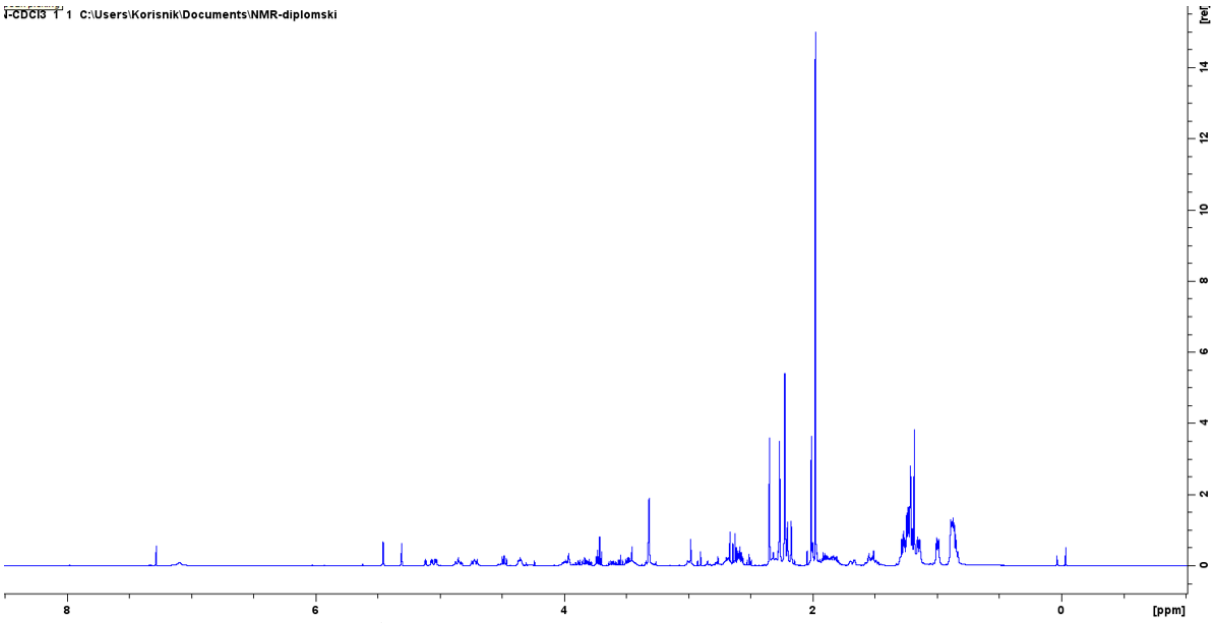
Slika 27. Michaelova adicija akrilonitrila.

Struktura adukta **M4''CN** potvrđena je spektroskopijom NMR. U spektru DEPT-Q opažen je signal kvaternog atoma C pri 116,44 ppm koji odgovara nitrilnom atomu C (Slika 30b.). To potvrđuje da je Michaelova adicija akrilonitrila na skupinu 4" OH bila uspješna. U spektru HMBC (Slika 32.) vidljive su korelacije između nitrilnog atoma C pri 116,44 ppm s protonima H-4"a (3,49 ; 3,83) i 4"b (2,53 ; 2,61) što dodatno potvrđuje uspješno vezanje akrilonitrila na

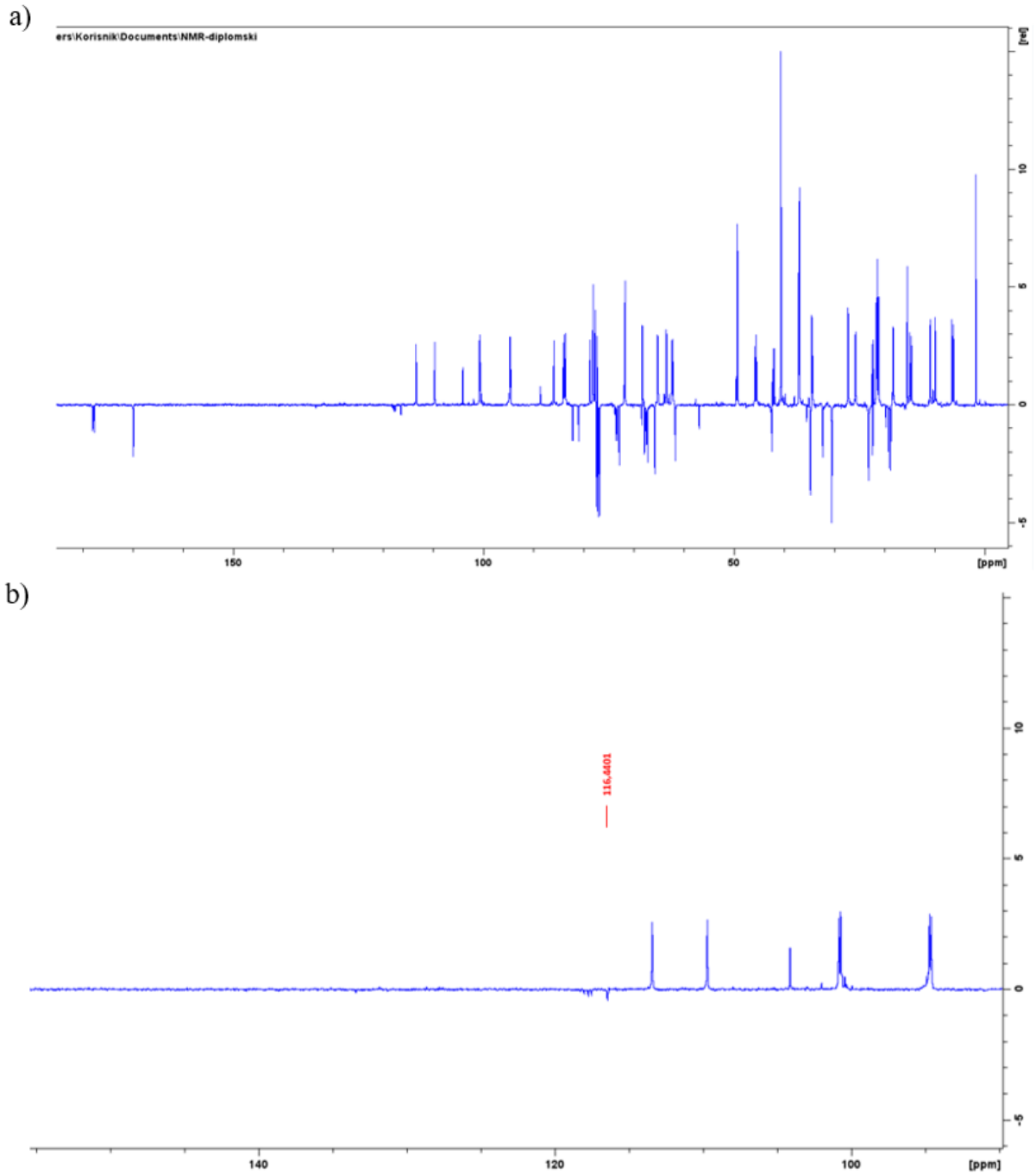
skupinu 4" OH. Korelacije između pojedinih ugljika i protona kroz jednu vezu potvrđuju se pomoću spektra HSQC (Tablica 6.).



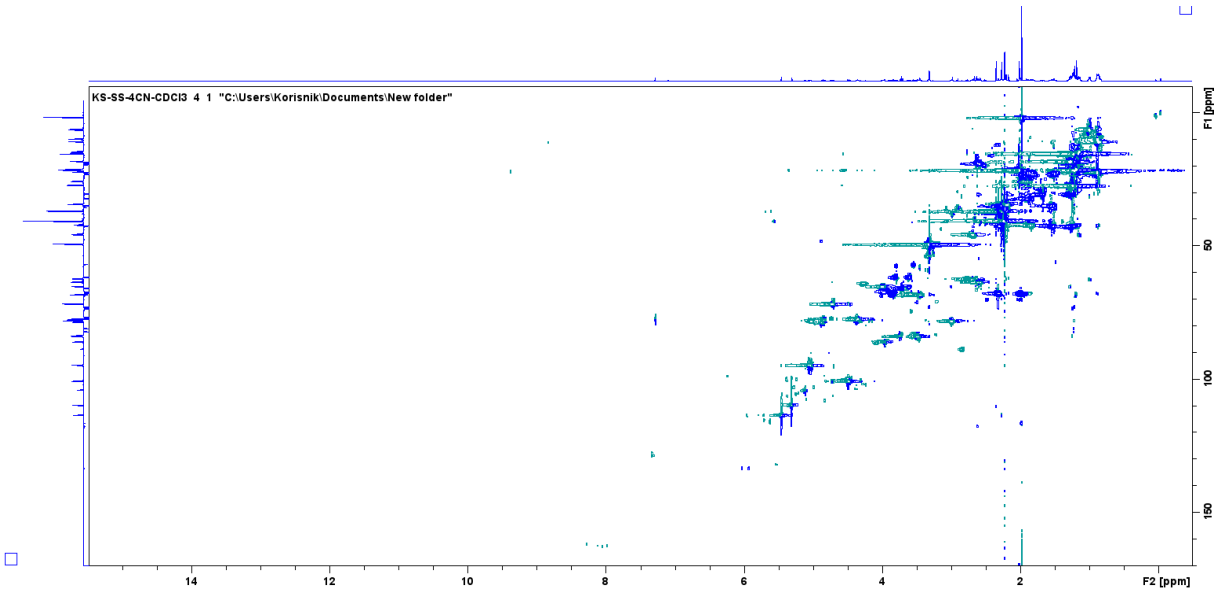
Slika 28. Struktura adukta **M4''CN** uz označene lokante.



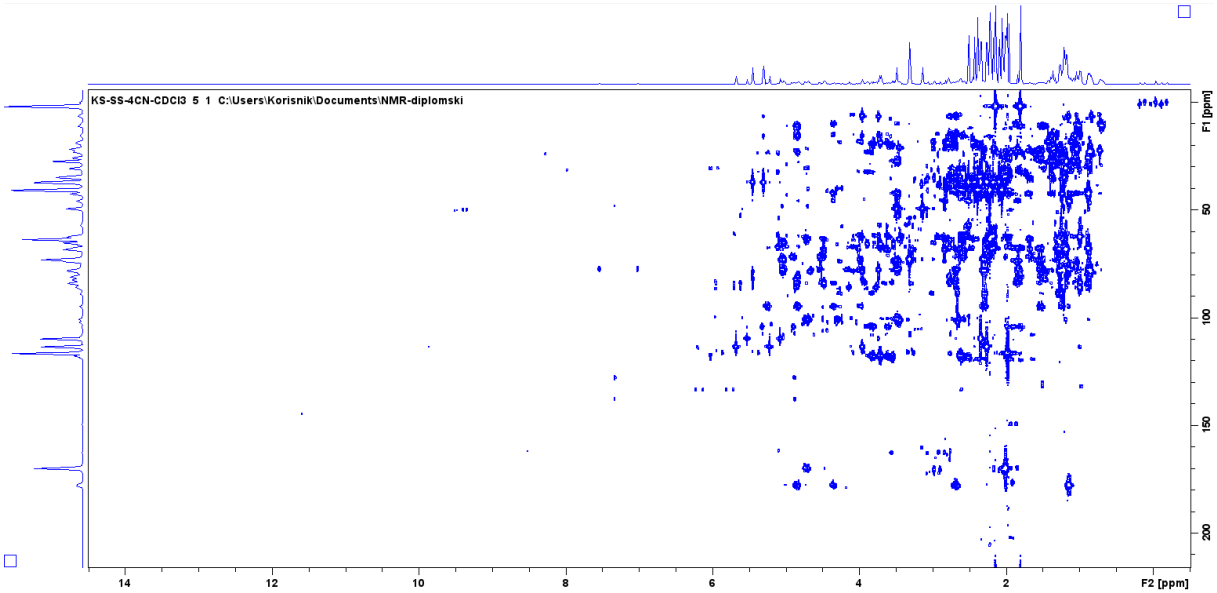
Slika 29. Spektar ^{1}H NMR adukta **M4''CN**, snimljen u $CDCl_3$ pri 298K.



Slika 30. a) spektar DEPT-Q , b) uvećani dio DEPT-Q adukta **M4''CN**, snimljen u $CDCl_3$ pri 298K.



Slika 31. Spektar HSQC adukta **M4''CN** snimljen u $CDCl_3$ pri 298K.



Slika 32. Spektar HMBC adukta **M4''CN** snimljen u $CDCl_3$ pri 298K.

Tablica 6. Asignacija kemijskih pomaka jezgara ^{1}H i ^{13}C adukta **M4''CN**.

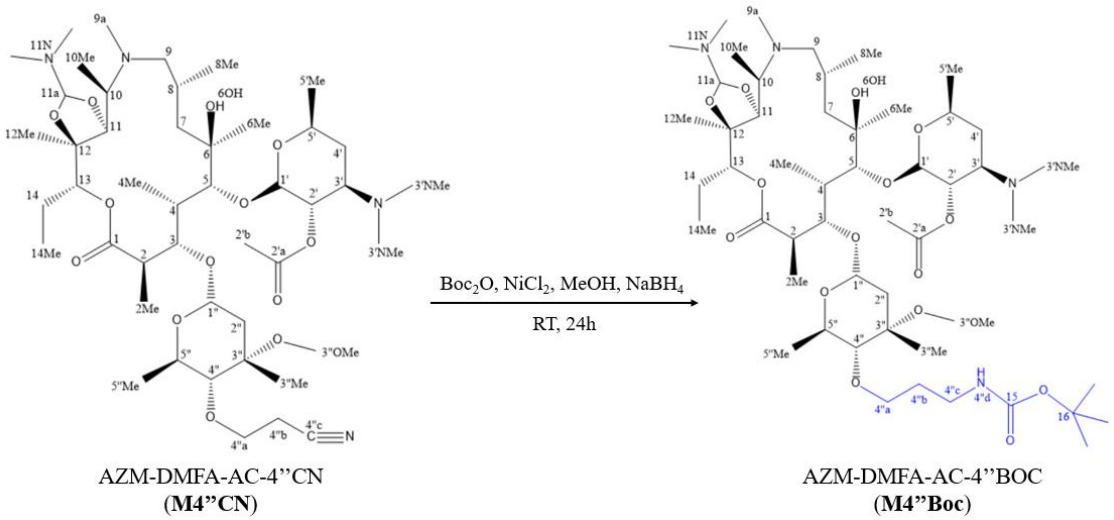
Atom	δ(^{1}H)/ppm	δ(^{13}C)/ppm	Atom	δ(^{1}H)/ppm	δ(^{13}C)/ppm
1	-[a]	177,63	**14**	1,82 ; 2,01	22,44
2	2,25	40,75	**14Me**	0,77	10,04
2Me	0,86	10,88	**1'**	4,50	100,74
3	4,09	84,07	**2'**	4,74	71,81
4	1,90	32,41	**2'a**	-[a]	169,83
4Me	0,98	9,93	**2'b**	1,24	21,10
5	3,96	86,02	**3'**	3,61	61,77
6	-[a]	73,41	**3'NMe$_2$**	2,33	37,16
6Me	1,28	27,3	**4'**	1,56 ; 2,17	34,87

6OH	2,24	-	**5'**	4,71	72,1
7	1,26 ; 1,51	42,36	**5'Me**	1,20	21,53
8	1,93	25,85	**1''**	5,05	94,65
8Me	1,25	19,21	**2''**	2,33	37,16
9	2,61 ; 2,72	62,5	**3''**	-[a]	73,61
9a	2,69	45,64	**3''Me**	1,48	22,37
10	3,54	57,06	**3''OMe**	3,34	49,66
10Me	1,23	15,01	**4''**	3,74	83,92
11	3,51	83,63	**4''a**	3,49 ; 3,83	49,66
11a	5,22	109,77	**4''b**	2,52 ; 2,61	18,78
11NMe$_2$	2,33	37,16	**4''c**	-[a]	116,44
12	-[a]	81,06	**5''**	3,57	74,2
12Me	1,31	15,52	**5''Me**	1,28	18,27
13	3,74	83,7			

[a] - nije asignirano

*4.2.3. Priprava **M4''Boc***

Za redukciju nitrila do amina potrebno je jako redukcijsko sredstvo kao što je natrijev borohidrid. Općenito, natrijev borohidrid ne reducira nitril, ali uz prisutnost soli niklovog(II) klorida generira se niklov borid *in situ* koji je odgovoran za redukciju nitrila te poboljšava reaktivnost i kemoselektivnost metalnog hidrida. Osim toga, niklov borid služi kao katalizator za hidrogeniranje. Redukcija nitrila može se postići i hidrogeniranjem pri tlaku od 5 bara uz korištenje katalizatora platinovog(IV) oksida.[29] Reakcija **M4''CN** s niklovim(II) kloridom u prisutnosti viška natrijevog borohidrida u metanolu dovodi do nastajanja sekundarnog amina. Tijekom redukcije nitrila često dolazi do nepoželjne dimerizacije. Kako bi se spriječila dimerizacija i osiguralo uspješno izoliranje primarnog amina, uvodi se zaštitna skupina di-*tert*-butil-dikarbonat (Boc_2O), pri čemu nastaje međuprodukt **M4''Boc**.[42,43]

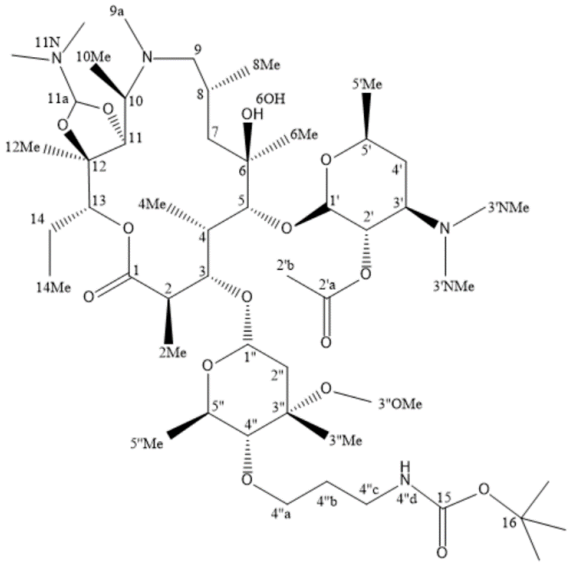


AZM-DMFA-AC-4''CN
(**M4"CN**)

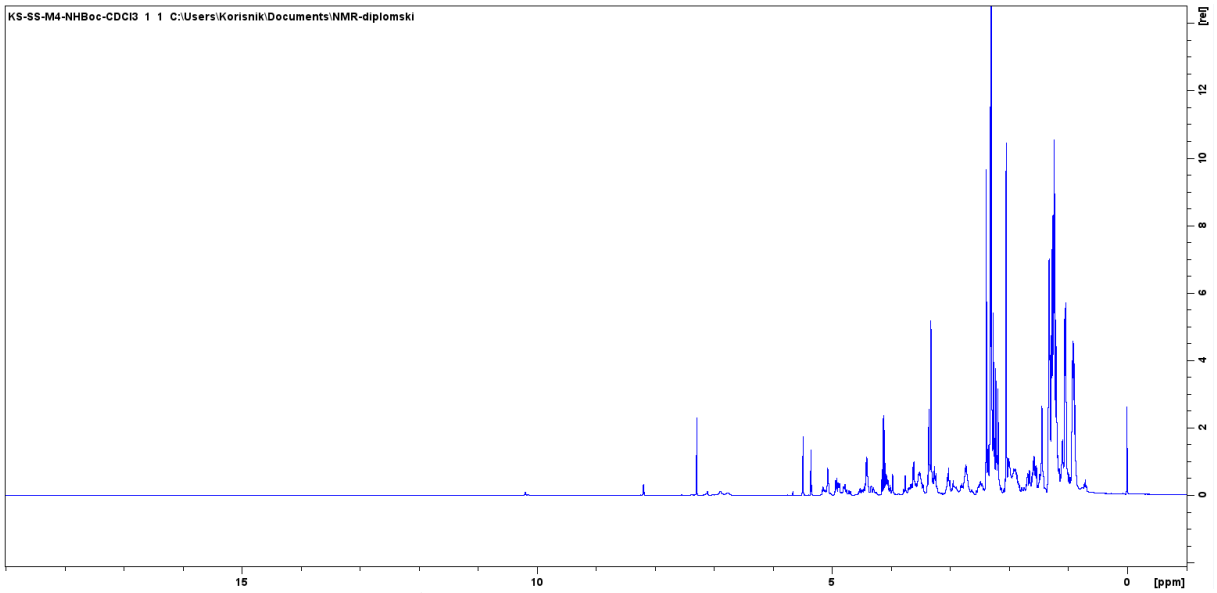
AZM-DMFA-AC-4''BOC
(**M4"Boc**)

Slika 33. Redukcija nitrila.

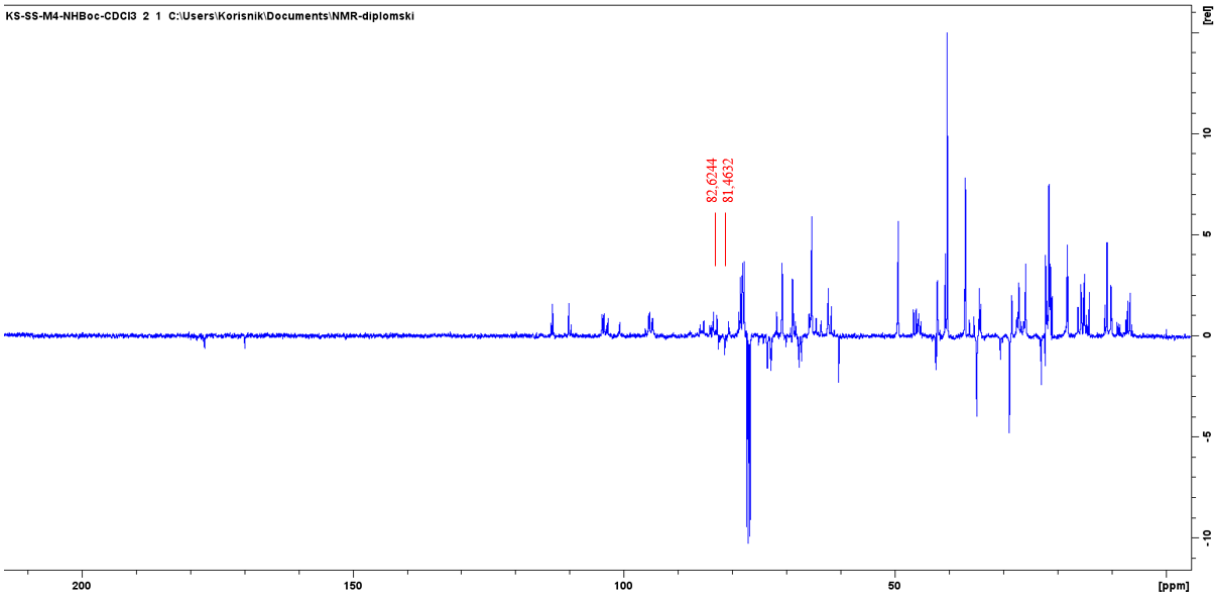
Struktura **M4''Boc** potvrđena je spektroskopijom NMR. U spektru DEPT-Q (Slika 32.) ne opaža se signal kvaternog atoma C pri 116,44 ppm koji odgovara nitrilnom atomu C. No, pojavljuju se signali kvaternog atoma C pri 81,46 ppm i 82,62 ppm. Signal pri 81,46 ppm odgovara atomu C-15 i signal pri 82,62 ppm odgovara atomu C-16. U spektru HMBC, vidljiva je korelacija između ugljika C-4" (82,87 ppm) i dijastereomernih protona H-4"a (3,44 ; 3,58 ppm). Korelacije između pojedinih ugljika i protona kroz jednu vezu potvrđuju se pomoću spektra HSQC (Tablica 7.).



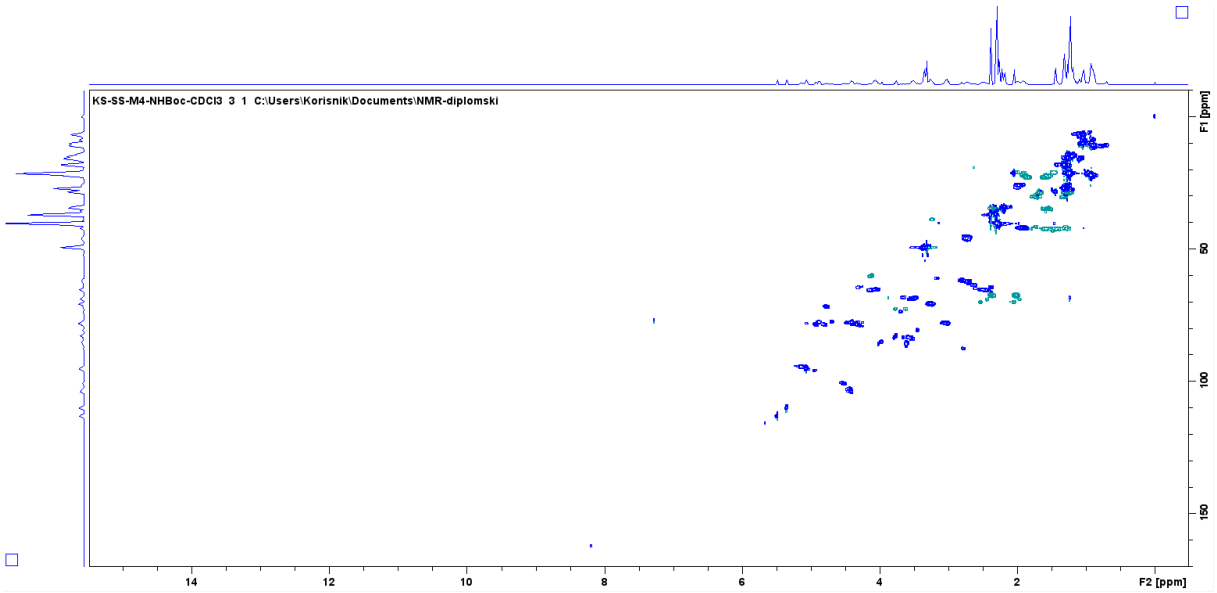
Slika 34. Struktura **M4''Boc** uz označene lokante.



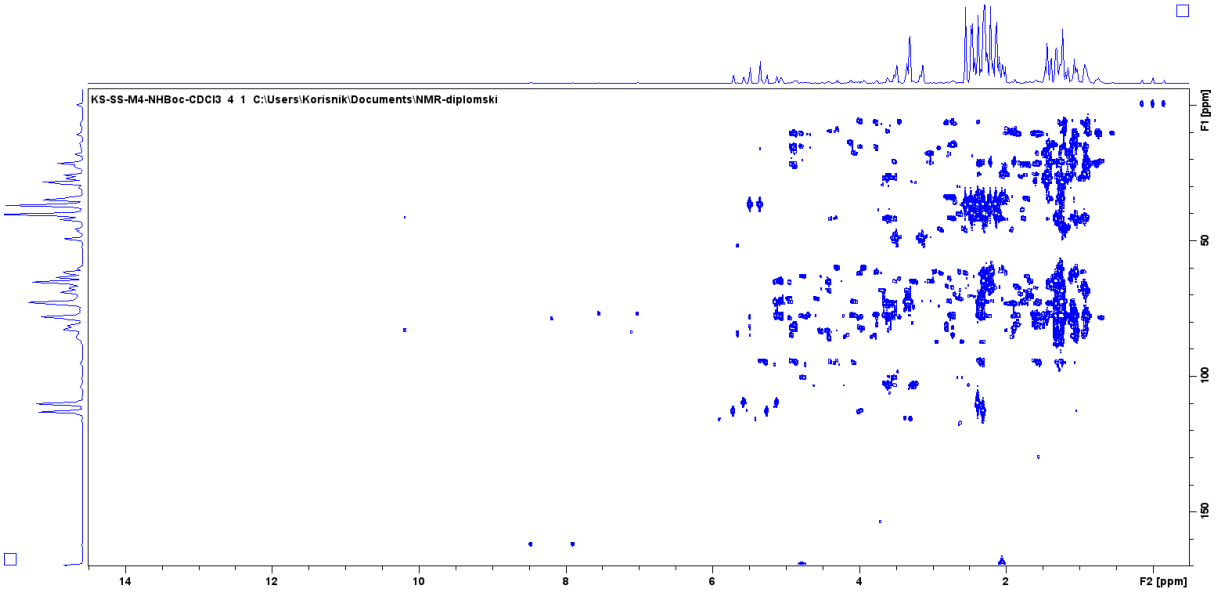
Slika 35. Spektar ^{1}H NMR **M4''Boc**, snimljen u $CDCl_3$ pri 298K.



Slika 36. Spektar DEPT-Q **M4''Boc**, snimljen u $CDCl_3$ pri 298K.



Slika 37. Spektar HSQC **M4''Boc**, snimljen u $CDCl_3$ pri 298K.



Slika 38. Spektar HMBC spoja **M4''Boc**, snimljen u $CDCl_3$ pri 298K.

Tablica 7. Asignacija kemijskih pomaka jezgara ^{1}H i ^{13}C u spoju **M4''Boc**.

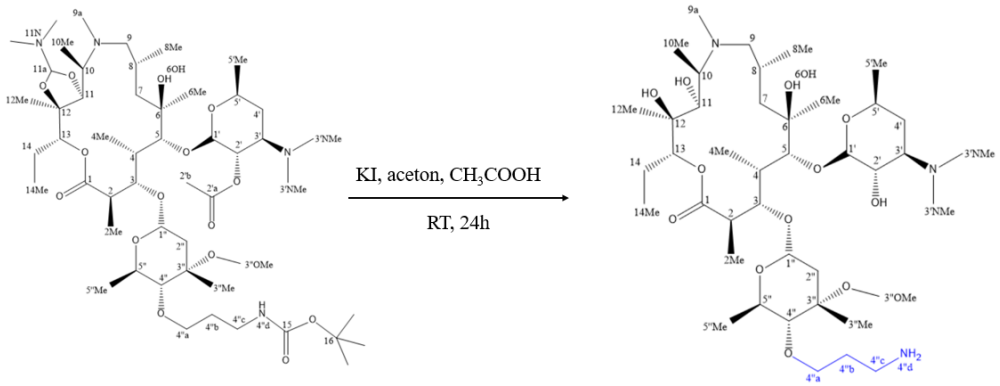
Atom	δ(^{1}H)/ppm	δ(^{13}C)/ppm	Atom	δ(^{1}H)/ppm	δ(^{13}C)/ppm
1	-[a]	177,34	**15**	-[a]	81,46
2	2,29	40,38	**16**	-[a]	82,62
2Me	1,03	9,06	**16Me$_3$**	1,45	28,49
3	4,01	84,17	**1'**	4,96	95,52
4	1,69	30,56	**2'**	5,35	110,24
4Me	1,20	14,72	**2'a**	-[a]	169,87
5	3,62	85,33	**2'b**	2,06	21,64
6	-[a]	73,66	**3'**	2,51	65,36
6Me	1,27	27,19	**3'NMe$_2$**	2,22	37,2

6OH	-[a]	-	**4'**	1,56 ; 2,23	35,49
7	1,43 ; 1,60	42,34	**5'**	4,77	71,89
8	1,99	25,96	**5'Me**	1,31	21,10
8Me	1,41	18,16	**1''**	4,96	95,52
9	2,02 ; 2,38	67,28	**2''**	1,34 ; 1,54	34,98
9a	2,19	34,55	**3''**	-[a]	72,90
10	3,34	49,41	**3''Me**	1,24	21,39
10Me	1,27	14,21	**3''OMe**	3,05	38,4
11	3,58	83,41	**4''**	3,77	82,87
11a	5,50	113,21	**4''a**	3,75 ; 3,16	72,66
11NMe$_2$	2,22	37,2	**4''b**	1,28 ; 1,67	29,8
12	-[a]	82,62	**4''c**	3,25 ; 3,32	49,4
12Me	1,11	15,62	**4''d**	-[a]	-
13	4,82	78,56	**5''**	3,26	70,83
14	1,57 ; 1,85	23,09	**5''Me**	1,27	16,28
14Me	0,91	10,08			

[a] - nije asignirano

*4.2.4. Priprava produkata **M4''***

Za uklanjanje *t*-Boc zaštitne skupine koristi se kalijev jodid. Zagrijavanje **M4''Boc** i kalijevog jodida u smjesi vode i acetona dovodi do potpunog uklanjanja *t*-Boc skupine.[44] Zaštitna skupina DMF na diolu se ukloni uparavanjem i ekstrahiranjem s etil-acetatom, pri čemu nastaje produkt **M4''**.



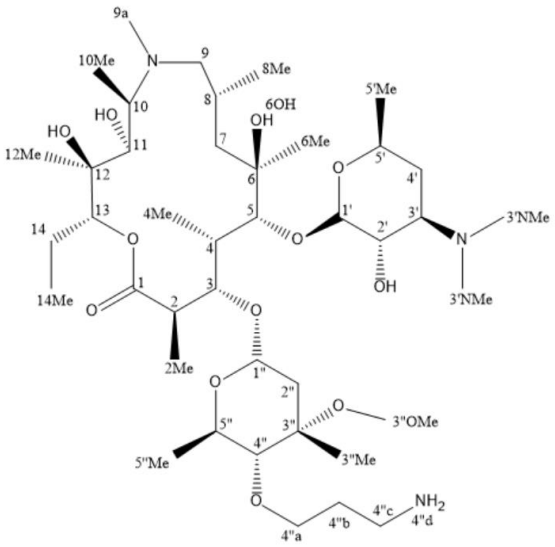
AZM-DMFA-AC-4''Boc
(M4''Boc)

M4''

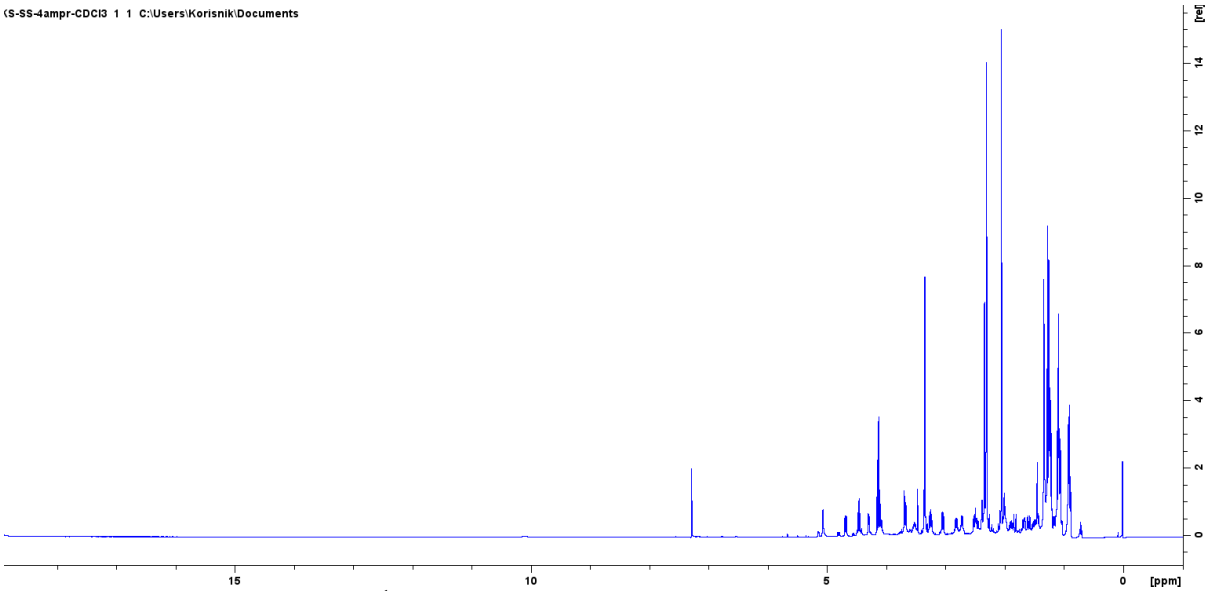
Slika 39. Reakcijska shema dobivanja produkta **M4''**.

Nakon provedene sinteze, struktura 4''-aminopropil derivata azitromicina (**M4''**) potvrđena je spektroskopijom NMR. Pomoću spektra HMBC može se potvrditi da su zaštitne skupine potpuno uklonjene jer nisu opaženi signali koji odgovaraju kvarternom atomu C pri 81,46 ppm (C-15), 11a (113,21 ppm) i H-2'a (169,87 ppm). U spektru HMBC, vidljiva je korelacija između

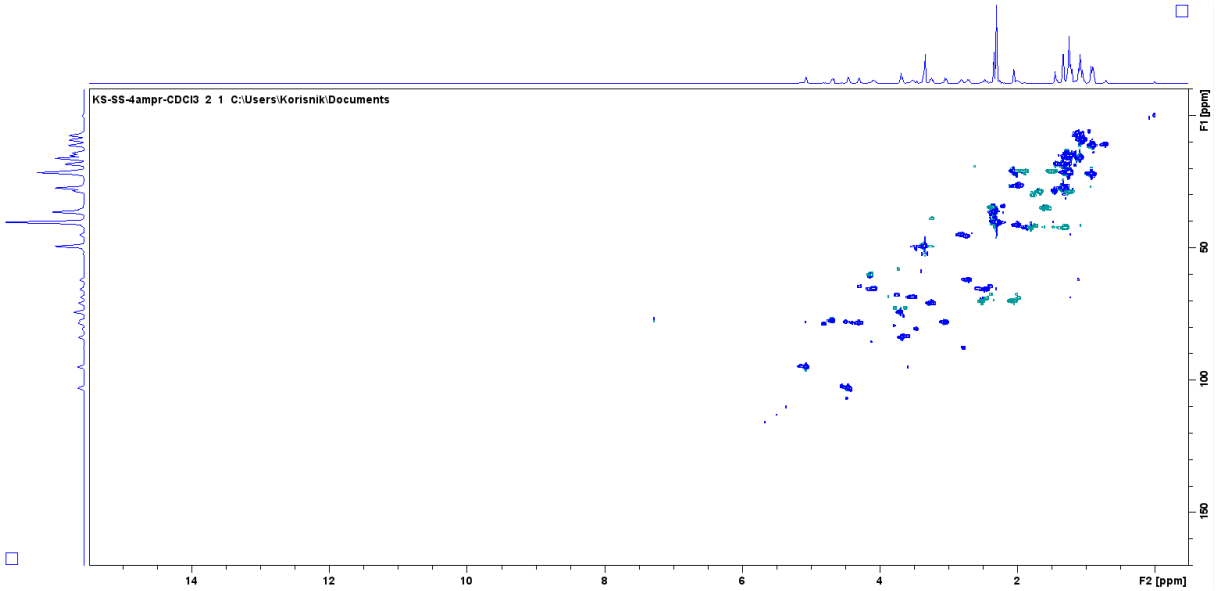
atoma C-4"(87,91) i dijasteromernih protona H-4"a(3,65; 3,76 ppm) te korelacija između C-4"b s protonima H-4"a (3,65; 3,76 ppm) i H-4"c (2,05; 2,51 ppm). Korelacija između pojedinih ugljika i protona kroz jednu vezu potvrđuje se pomoću spektra HSQC (Tablica 8.).



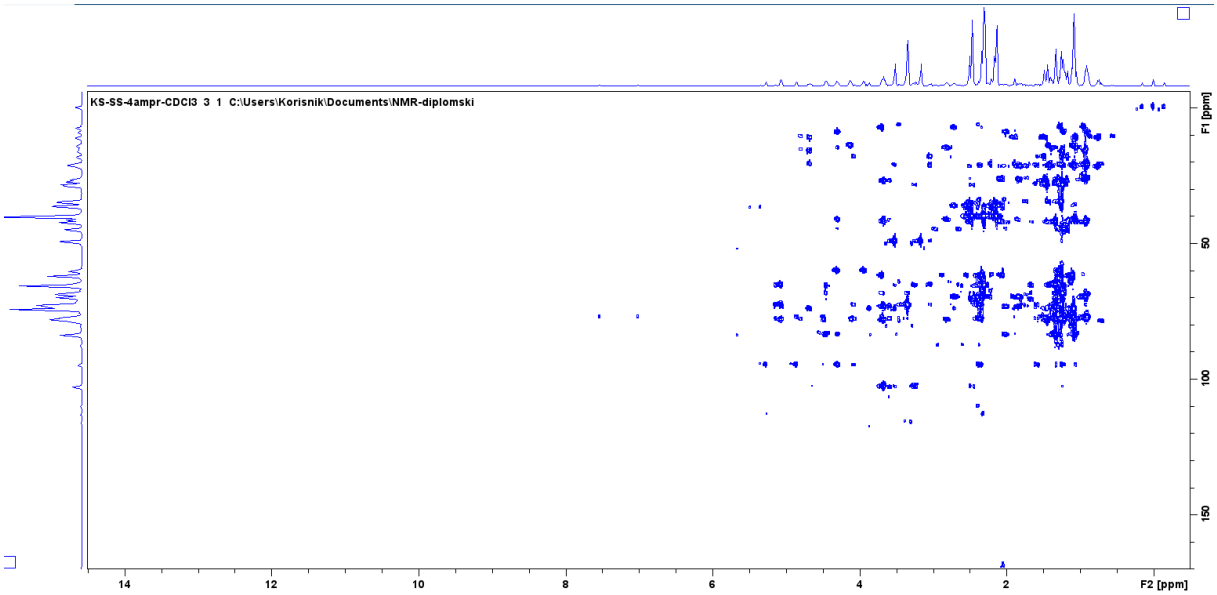
Slika 40. Struktura produkta **M4''** uz označene lokante.



Slika 41. Spektar ^{1}H NMR produkta **M4''**, snimljen u $CDCl_3$ pri 298K.



Slika 42. Spektar HSQC NMR produkta **M4''**, snimljen u $CDCl_3$ pri 298K.



Slika 43. Spektar HMBC NMR produkta **M4''**, snimljen u $CDCl_3$ pri 298K.

Tablica 8. Asignacija kemijskih pomaka jezgara ^{1}H i ^{13}C produkta **M4''**.

Atom	δ(^{1}H)/ppm	δ(^{13}C)/ppm	Atom	δ(^{1}H)/ppm	δ(^{13}C)/ppm
1	-[a]	177,8	**14**	1,89 ; 2,05	21,21
2	2,81	45,15	**14Me**	0,71	10,81
2Me	1,04	9,02	**1'**	4,54	102,46
3	4,48	77,97	**2'**	3,52	68,64
4	1,89	42,15	**2'OH**	-[a]	-
4Me	0,95	6,26	**3'**	2,49	65,7
5	3,59	83,58	**3'NMe$_2$**	2,38	36,96
6	-[a]	76,63	**4'**	1,21 ; 1,29	28,83
6Me	1,33	27,35	**5'**	3,75	67,86

6OH	2,38	-	**5'Me**	1,24	21,58
7	1,81 ; 1,84	42,48	**1''**	3,59	95,13
8	1,98	26,61	**2''**	2,32 ; 2,38	34,89
8Me	0,92	21,95	**3''**	-[a]	72,97
9	2,49 ; 2,53	70,03	**3''Me**	1,27	14,34
9a	2,33	36,51	**3''OMe**	3,24	38,93
10	2,71	62,09	**4''**	2,77	87,91
10Me	1,11	7,52	**4''a**	3,63 ; 3,76	72,86
11	3,68	74,47	**4''b**	1,26 ; 1,68	29,57
11OH	-[a]	-	**4''c**	2,05 ; 2,51	38,34
12	-[a]	74,02	**4''d**	-[a]	-
12Me	1,08	16,01	**5''**	4,08	65,53
12OH	-[a]	-	**5''Me**	1,28	21,44
13	4,66	77,58			

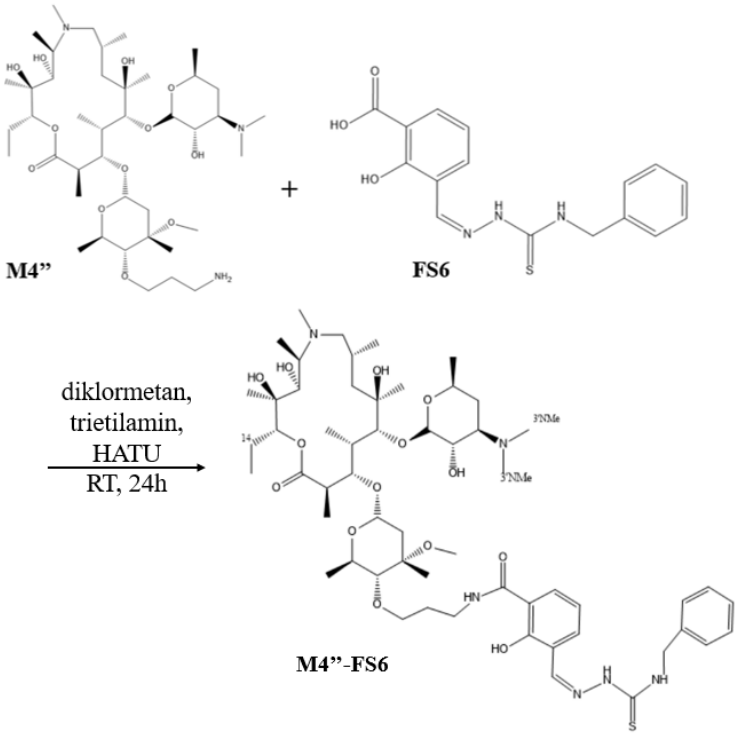
[a] - nije asignirano

4.3. Priprava i karakterizacija makrozona i niklova(II) kompleksa makrozona

*4.3.1. Priprava kompleksa **M4''-FS6***

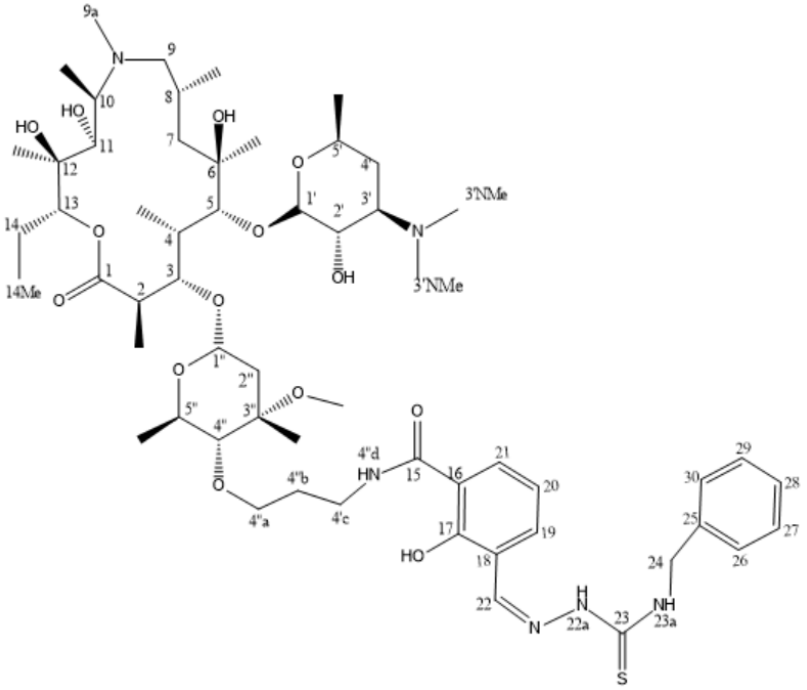
Priprava makrozona obuhvaća reakciju 4"-aminopropilnog derivata azitromicina **M4''** i tiosemikarbazona **FS6** u diklormetanu uz dodatak HATU. Reakcijska shema prikazana je na slici 44. U organskoj sintezi, HATU se koristi za stvaranje amidnih veza, a često se koristi u kombinaciji s bazom kao što je DIPEA ili trietilamin. Tipično se kao otapalo koristi dimetilformamid, ali mogu se koristiti i druga polarna aprotična otapala kao što je diklormetan. Reakcija aciliranja amina, odnosno stvaranje amida obuhvaća dva koraka: (1) reakcija karboksilne kiseline s HATU da se dobije aktiviranini ester, (2) dodavanje nukleofila (amina) u otopinu aktiviranog estera da se dobije acilirani produkt.[45]

Trietilamin se u organskoj kemiji koristi kao baza. Na dušikovom atomu prisutan je slobodni elektronski par koji može reagirati s elektrofilima. U ovoj reakciji taj slobodni elektronski par deprotonirat će karboksilnu skupinu iz molekule tiosemikarbazona. Nastali karboksilatni anion napada HATU i stvara se aktivirani ester. Dodatkom amina (**M4''**), aktivirani ester reagira preko tetraedarskog intermedijera s aminom. Raspadom međuprodukta nastaje amid, makrozon **M4''-FS6** kao konačni produkt aciliranja amina. Makrozon se dalje pročišćava pomoću tekućinske kromatografije na stupcu.

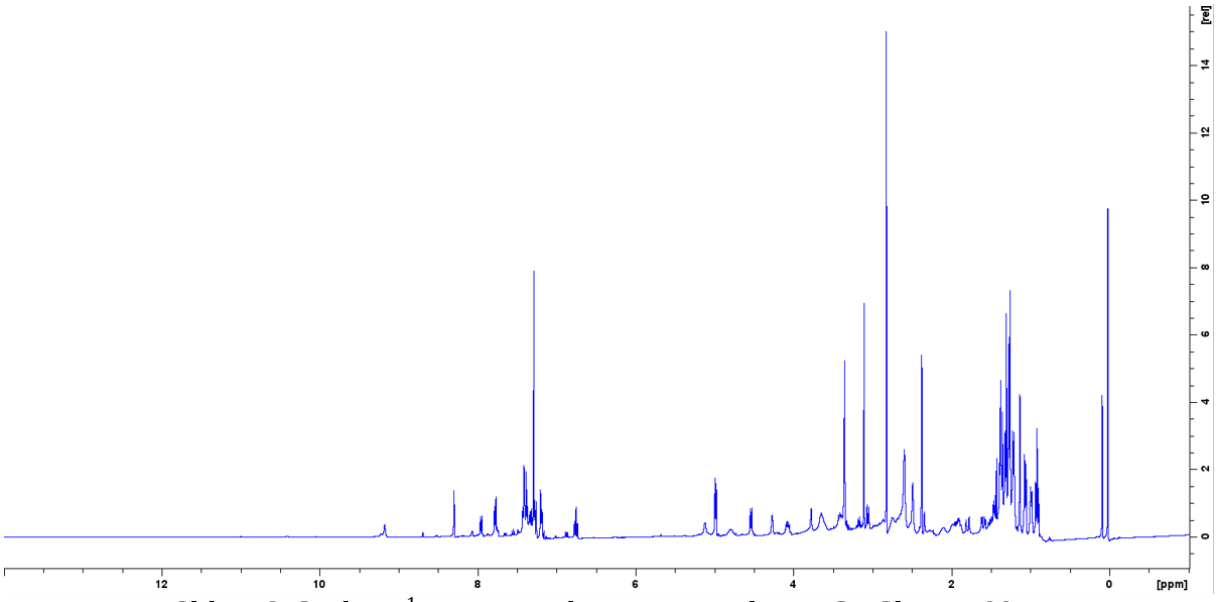


Slika 44. Reakcijska shema dobivanja makrozona.

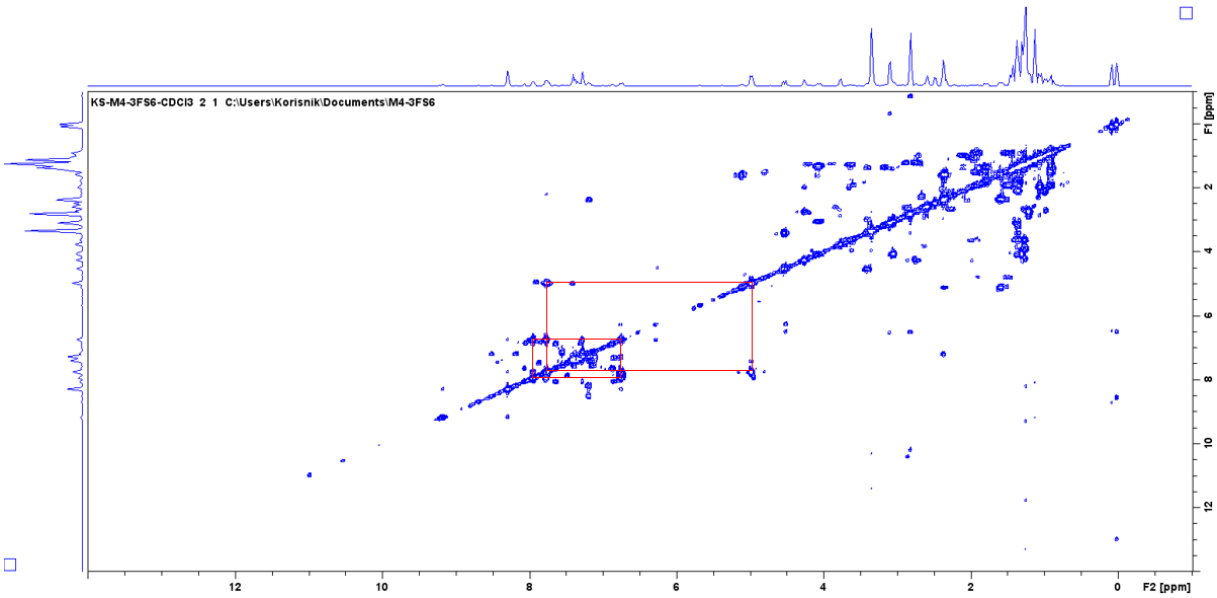
Nakon pročišćavanja makrozona **M4''-FS6** tekućinskom kromatografijom na stupcu, struktura makrozona potvrđena je spektroskopijom NMR. Na slici 46. prikazan je njegov spektar ^{1}H NMR, vidljivi su signali u području od 6,5 do 8,5 ppm koji odgovaraju aromatskom prstenu tiosemikarbazona. Analizom korelacijskih signala spektra COSY može se utvrditi da postoje dva spinska sustava te korelacija između aromatskih protona u pojedinačnom benzenskom prstenu. U spektru su vidljive korelacije između aromatskih protona pri 6,75 ppm (H19), 7,78 i 7,95 ppm (H20, H21). Također, vidljive su korelacije između protona H24 pri 4,95 ppm i 7,42 ppm (H26, H30). Aromatski proton pri 7,42 ppm je u sprezi s protonom pri 7,77 ppm (H27,H29) i 7,89 ppm (H28). Pomoću spektra HMBC (slika 49.) potvrđena je korelacija između pojedinih atoma ugljika i vodika kroz više kemijskih veza. Signal pri 161,7 ppm odgovara kvarternom atomu C-17 te je u slaboj korelaciji s protonima pri 7,95 i 7,78 ppm (H20, H21). Signal pri 4,95 ppm odgovara protonu H24. Taj signal je u korelaciji s aromatskim protonima pri 7,42 ppm (H26, H30). Korelacija između pojedinih ugljika i protona kroz jednu vezu potvrđuje se pomoću spektra HSQC (Tablica 9.).



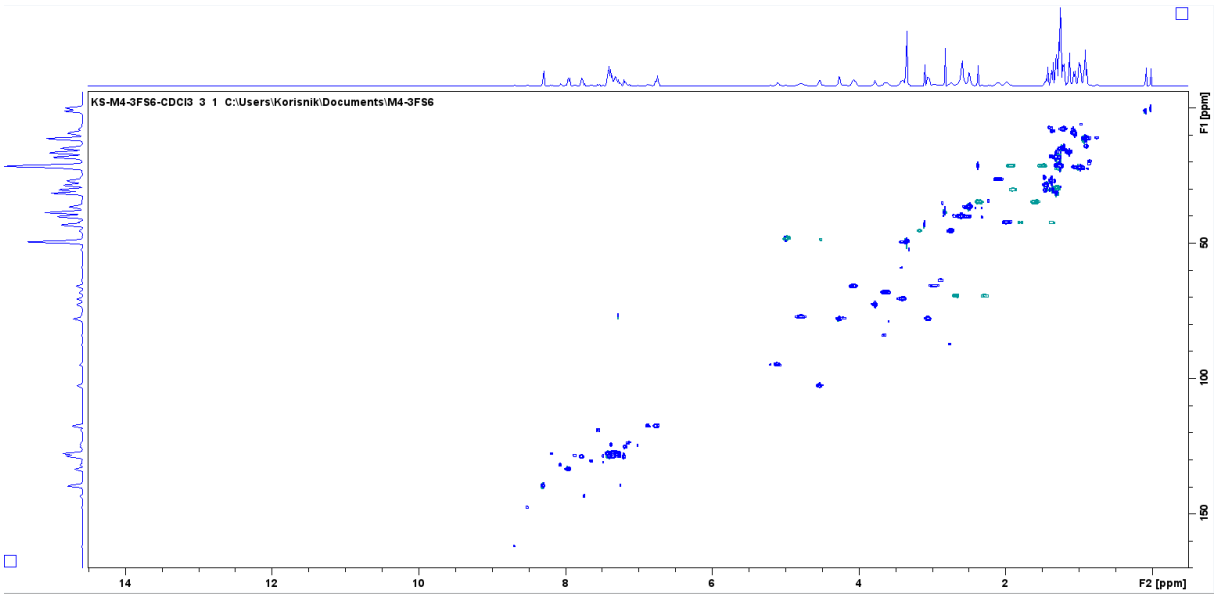
Slika 45. Struktura makrozona uz označene lokante.



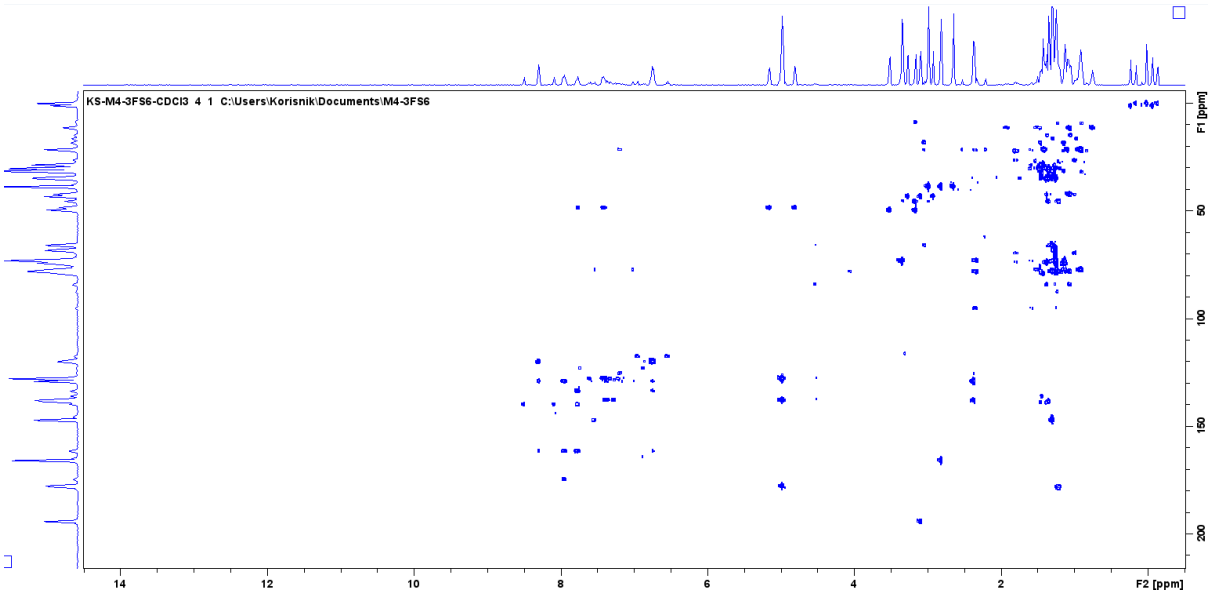
Slika 46. Spektar ^{1}H NMR makrozona, snimljen u $CDCl_3$ pri 298K.



Slika 47. Spektar COSY makrozona, snimljen u $CDCl_3$ pri 298 K.



Slika 48. Spektar HSQC makrozona, snimljen u $CDCl_3$ pri 298 K.



Slika 49. Spektar HMBC makrozona, snimljen u $CDCl_3$ pri 298 K.

Tablica 9. Asignacija kemijskih pomaka jezgara ^{1}H i ^{13}C makrozona **M4''-FS6.**

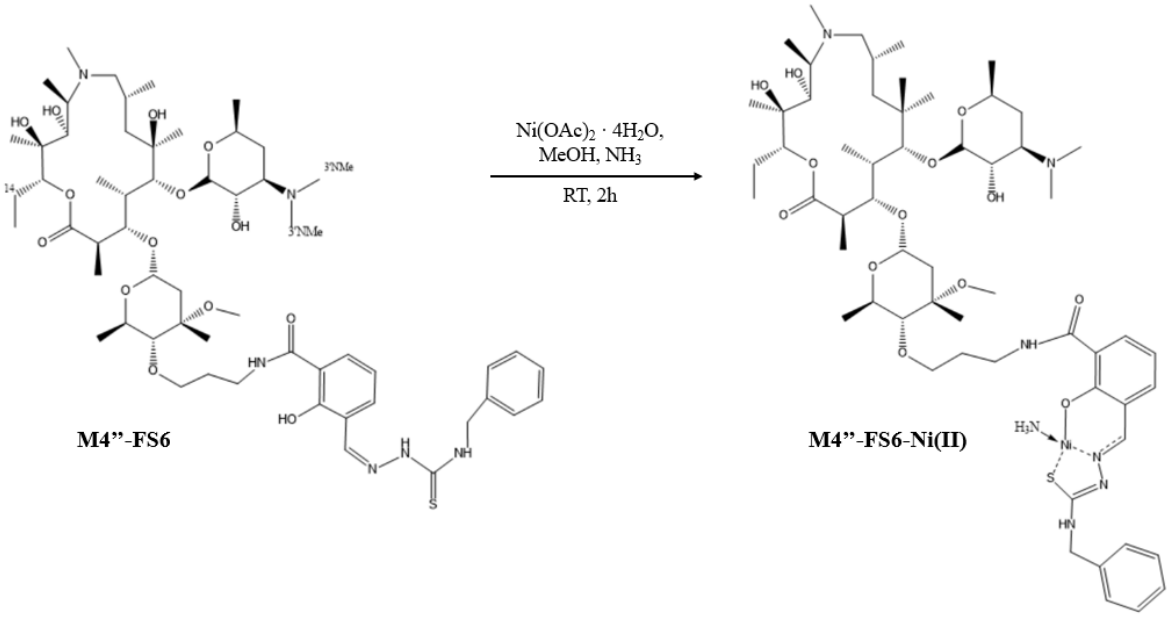
Atom	δ(^{1}H)/ppm	δ(^{13}C)/ppm	Atom	δ(^{1}H)/ppm	δ(^{13}C)/ppm
1	-[a]	177,8	**20**	7,78	134,41
2	2,74	45,21	**21**	7,95	129,33
2Me	1,22	14,93	**22**	8,12	140,55
3	4,72	78,23	**22a**	-[a]	-
4	1,89	30,02	**23**	-[a]	173,42
4Me	1,07	9,02	**23a**	-[a]	-
5	3,41	70,71	**24**	4,95	49,22
6	-[a]	73,22	**25**	-[a]	139,22
6Me	1,39	26,82	**26,30**	7,42	128,26
6OH	-[a]	-	**27,29**	7,77	127,91
7	1,37 ; 1,98	42,15	**28**	7,89	129,06
8	2,09	26,03	**1'**	4,54	65,44
8Me	0,99	21,76	**2'**	3,63	68,12
9	2,27 ; 2,66	69,54	**2'OH**	-[a]	-
9a	2,37	34,47	**3'**	2,98	65,66
10	3,04	65,92	**3'NMe$_2$**	2,35	38,33
10Me	1,21	7,86	**4'**	1,30 ; 1,32	29,77
11	3,78	73,04	**5'**	4,07	65,46
11OH	-[a]	-	**5'Me**	1,26	21,49
12	-[a]	68,93	**1''**	5,11	94,88
12Me	1,14	16,44	**2''**	1,61 ; 2,33	34,58
12OH	-[a]	-	**3''**	-[a]	73,88
13	4,78	77,06	**3''Me**	1,30	18,22
14	1,49 ; 1,92	21,19	**3''OMe**	3,35	50,03
14Me	0,89	14,06	**4''**	4,55	83,12
15	-[a]	174,1	**4''a**	3,71 ; 3,42	66,19

16	-[a]	133,37	**4''b**	1,35 ; 1,89	30,92
17	-[a]	161,73	**4''c**	3,32 ; 3,65	36,67
17OH	8,32	-	**4''d**	-[a]	-
18	-[a]	128,66	**5''**	3,35	49,17
19	6,75	120,85	**5''Me**	1,27	18,09

-[a] – nije asignirano

4.3.2. Priprava M4''-FS6-Ni(II)

Konačan produkt **M4''-FS6-Ni(II)**, pripravljen je reakcijom prethodno pripravljenog makrozona **M4''-FS6** i $Ni(OAc)_2 \cdot 4H_2O$ uz dodatak amonijaka. Tiosemikarbazone u njihovoj strukturi karakterizira prisutnost dušika i sumpora kao dobrih donorskih atoma za formiranje koordinacijske veze s metalnim kationima. Koordiniranjem tiosemikarbazona s niklom(II) dolazi do tautomerije, pri čemu veza C-N postane dvostruka, a veza C=S postane jednostruka. Postoje dva tautomerna oblika tiosemikarbazona, a to je tionski i tiolni.[46,47]

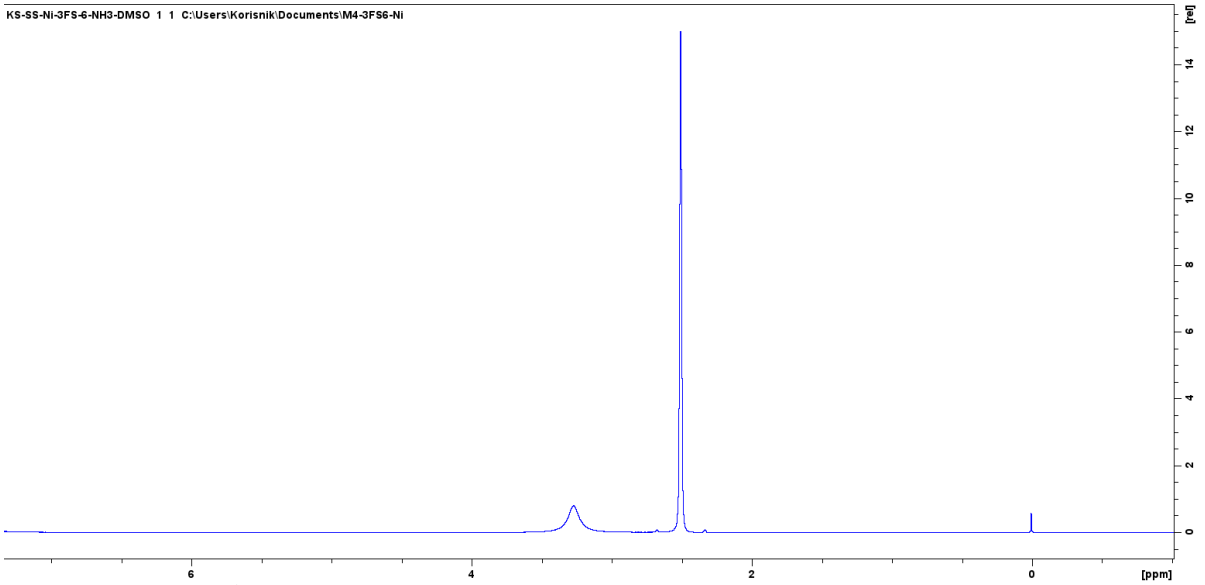


Slika 50. Reakcijska shema dobivanja makrozona **M4''-FS6-Ni(II)**.

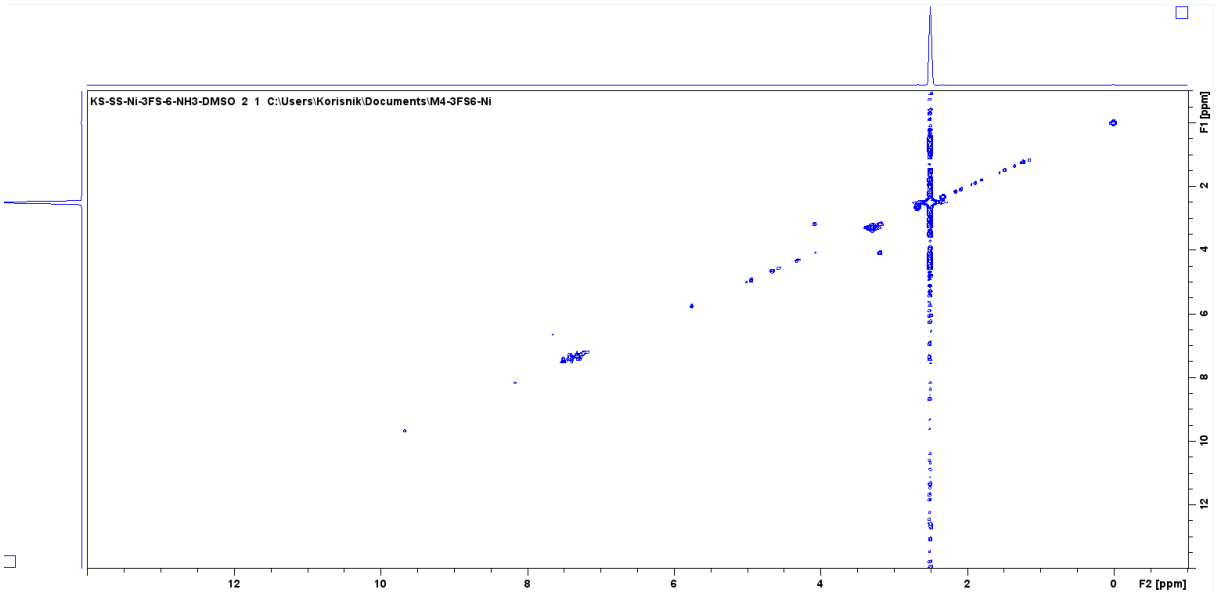
Nikal pripada skupini prvog niza prijelaznih metala s elektronskom konfiguracijom [Ar] $3d^8 4s^2$. Prema elektronskoj konfiguraciji nikal ima dva nesparena d elektrona pa je paramagnetičan, ali je po prirodi feromagnetičan. Karakteristično oksidacijsko stanje nikla je +II, a može imati oksidacijsko stanje +III i +IV. Nikal(II) može imati koordinacijski broj četiri ili šest. Ako je koordinacijski broj četiri i veze su uglavnom kovalentne, tada kompleks ima planarnu

konfiguraciju i dijamagnetičan je (dsp^2). Ako su veze ionske, kompleks ima tetraedarsku konfiguraciju i paramagnetičan je (sp^3). S koordinacijskim brojem šest, struktura spoja je oktaedar. Ako su veze primarno kovalentne, spoj je dijamagnetičan (d^2sp^3), a ako su veze ionske, onda je paramagnetičan (sp^3d^2).[48] Kompleksiranjem nikla s tiosemikarbazonima 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.[49]

Struktura konačnog produkta potvrđena je spektroskopijom NMR. Na temelju spektara ^1H i COSY (Slika 51. i 52.) potvrđeno je da je nikal uspješno koordiniran na tiosemikarbazonskom dijelu. Centralni atom nikla koordinira s ligandom preko atoma dušika, sumpora, kisika i vezan je s jednom molekulom amonijaka. Signali od makrozona nisu uočljivi u ^1H i COSY spektru, iako je koncentracija uzorka bila dovoljno velika. Signali u spektru su jako prošireni što dovodi do zaključka da se radi o paramagnetičnom kompleksu. S obzirom da nema kristalne strukture, koordinacijski broj i geometrijska struktura kompleksa makrozona s niklom nije potvrđena. Struktura kompleksa može biti tetraedar ili oktaedar, ali sasvim sigurno nije kvadratno-planarna. Općenito, spektri NMR paramagnetskih kompleksa karakterizirani su: (a) širokim rasponom kemijskog pomaka, moguće je nekoliko stotina ppm čak i za ^1H NMR i (b) brzim opuštanjem koje dovodi do širokih, a ponekad čak i neuočljivih signala.



Slika 51. Spektar ^1H NMR niklova(II) kompleksa makrozona, snimljen u DMSO-d6 pri 298K.



Slika 52. Spektar COSY niklova(II) kompleksa makrozona, snimljen u DMSO-d6 pri 298 K.

Nespareni elektroni (paramagnetizam) imaju velike magnetske momente i vrijeme relaksacije koje varira od 10^{-13} – 10^{-8} s ovisno o atomskom broju metala i o popunjenosti atomskih orbitala. Nespareni elektroni uzrokuju velike fluktuacije u lokalnim magnetskim poljima koja su promjenjiva za svaku pojedinačnu molekulu. To znači da će skup spinova koji su u fazi imati različite Larmorove frekvencije ovisno o njihovom lokalnom okruženju i orijentaciji. To se očituje kao defaziranje, čija je brzina povezana sa širinom signala na pola maksimuma. Paramagnetske vrste drastično smanjuju vrijeme opuštanja što može biti korisno u slučaju opuštanja T_1, ali kada se T_2 znatno smanji linije postaju pretjerano široke i teško vidljive.[50,51] S obzirom da je niklov(II) kompleks makrozona paramagnetičan, na temelju spektara NMR ^{1}H i COSY ne može se okarakterizirati kompleks. Za karakterizaciju kompleksa može se primijeniti spektroskopija UV-Vis ili spektroskopija FT-IR u području otiska prsta.

§ 5. ZAKLJUČAK

U sklopu ovog diplomskog rada uspješno je pripravljen novi makrozon, konjugat 4"-derivata azitromicina i tiosemikarbazona te njegov kompleks s niklom. Sinteza makrozona se sastoji od nekoliko koraka, a obuhvaća: (a) pripravu tiosemikarbazida iz benzil-izotiocijanata, (b) pripravu tiosemikarbazona reakcijom 3-formil-2-hidroksibenzojeve kiseline i tiosemikarbazida i (c) nastanak makrozona uz formiranje amidne veze između karboksilne skupine tiosemikarbazona i amino skupine 4"-derivata azitromicina. Makrozon je pročišćen tekućinskom kromatografijom na stupcu. Svi pripravljeni spojevi su identificirani i strukturno okarakterizirani pomoću jedno- i dvodimenzijske spektroskopije NMR.

Daljnja istraživanja uključuju određivanje biološke aktivnosti pripravljenog makrozona i njegovog kompleksa s niklom na rezistentne sojeve bakterija te usporedba njegove biološke aktivnosti. Očekuje se da kompleks makrozona s niklom pokaže bolju biološku aktivnost od samog makrozona. Ukoliko aktivnost makrozona i njegovog kompleksa s niklom bude zadovoljavajuća, provest će se istraživanja interakcija makrozona s ribosomom.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (prema potrebi)

COSY – korelacijska spektroskopija

cryo-EM – kriogena elektronska mikroskopija

cryo-ET – kriogena elektronska tomografija

DEPT – engl. distortionless enhancement by polarisation transfer

DOSY – engl. diffusion-ordered NMR spectroscopy

FDA – Američka Agencija za hranu i lijekove

HMBC – engl. heteronuclear multiple bond correlation

HSQC – engl. heteronuclear single quantum coherence

MIC – engl. minimum inhibitory concentration

MLS – makrolidi, linkozamidi, streptogramin

mRNA – engl. messenger ribonukleinska kiselina

NMR – nuklearna magnetna rezonancija

NOE – nuklearni Overhauserov efekt

PRE – engl. paramagnetic relaxation enhancements

RNR – ribonukleinska kiselina

rRNA – ribosomska ribonukleinska kiselina

SPA – engl. single-particle analysis

STD – engl. saturation transfer difference

trNOESY – engl. transferred nuclear Overhauser effect spectroscopy

tRNA – engl. transfer ribonukleinska kiselina

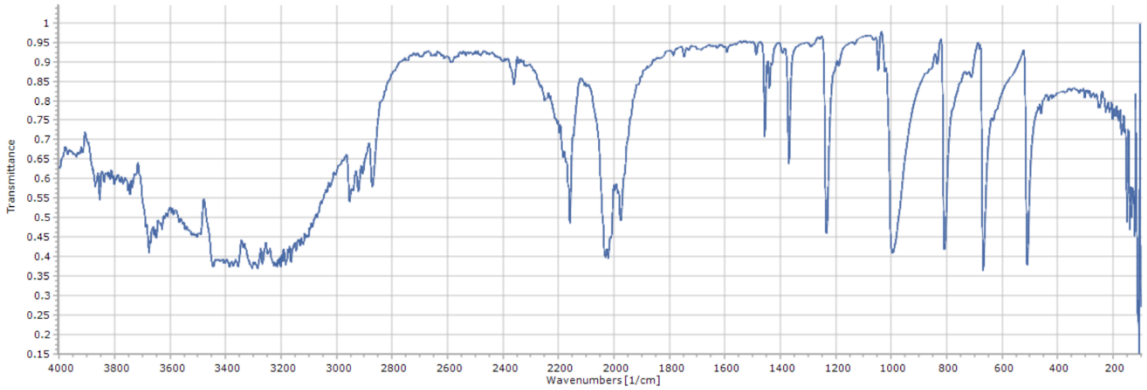
§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. M. R. Keskar, R. M. Jugade, *Anal. Chem. Insights.* **10** (2015) 29-37.
2. A. Kar, **Medicinal Chemistry**. New Delhi: New Age International Limited, Publishers, 2007.
3. T. Mazzei, E. Mini, A. Novelli, P. Periti, *J. Antimicrob. Chemother.* **31** (1993) 1–9.
4. A. Janas, P. Przybylski, *Eur. J. Med. Chem.* **182** (2019) 1-73.
5. G. P Dinos, *Br. J. Pharmacol.* **174** (2017) 2967-2983.
6. T. Golkar, M. Zielinski, A. M. Berghuis, *Front. Microbiol.* **9** (2018) 1-15.
7. D. Jelić, R. Antolović, *Antibiotics*, **5** (2016) 1-13.
8. P. Fernandes, D. Pereira, P. B. Watkins, D. Bertrand, *J. Med. Chem.* **63** (2020) 6462-6473.
9. L. Katz, Ashley, G. W. *Chem. Rev.* **105** (2005), 499−528.
10. Patient Information Leaflet (belupo.hr)
11. N. Vázquez-Laslop, A. S. Mankin, *Trends in Biochemical Sciences*, **43** (2018) 668-682.
12. B.V. Yang, M. Goldsmith, A. Rizzi, *Tetrahedron Lett.* **55 (**1994), 3025–3028.
13. R.Fattori, F. Pelacini, S. Romagnano, G.Fronza, R. Rallo, *J. Antibiot.* **49** (1996), 938–940.
14. T. Jednačak, I. Mikulandra, P. Novak, *Int. J. Mol. Sci.* (2020) 1-26.
15. M. Gaynor, Alexander S. Mankin, *Current Topics in Medicinal Chemistry*. **3** (2003) 949-960.
16. D. Vazquez, *The Macrolide Antibiotics.* New York, Heidelberg, Berlin, (1975), 459-479.
17. D. N. Wilson, *Nat. Rev. Microbiol*. **12** (2014), 35–48.
18. C. Fyfe, T. H. Grossman, K. Kerstein, J. Sutcliffe, *Resistance to macrolide antibiotics in public health pathogens*, 2016.
19. S. Sardari, S. Feizi, A. H. Rezayan, P. Azerang, S. mohammad Shahcheragh, G. Ghavami, A. Habibi, *Iran J. Pharm. Res.***16** (2017) 1128-1140.
20. K. Pičuljan, Struktura i vodikove veze derivata tiosemikarbazona u otopini, Doktorski rad, Prirodoslovno–matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2014., str. 5–11.

21. M. B. Murphy, S. L. Mercer, J. E. Deweese, *Inhibitors and Poisons of Mammalian Type II Topoisomerases*, Nashville, TN, United States, 2017 str. 226-227.
22. S. Eglence-Bakir, *Turk. J. Chem.* **45** (2021) 835-844.
23. A. Dobrova, S. Platzer, F. Bacher, M. N. M. Milunovic, A. Dobrov, G. Spengler, E. A. Enyedy, G. Novitchi, V. B. Arion, *Dalton Trans.* **45** (2016) 13427-13437.
24. J. Garcia-Tojal, R.Gil-Garcia, P. Gomez-Saiz, M.Ugalde, *Curr. Inorg. Chem.* **1** (2011), 189–210.
25. D. S. Kalinowski, D. R.Richardson, *Pharmacol. Rev.* **57** (2005), 547–583.
26. B. M. Zeglis, V. Divilov, J. S. J. Lewis, *Med. Chem.* **54 (**2011), 2391–2398.
27. M-C. Liu, T.-S. Lin, A. C.Sartorelli, *J. Med. Chem.* **35 (**1992), 3612–3611.
28. Makrozoni | Macrozones (pmf.hr) (datum pristupa 22. srpnja 2022.)
29. I. Grgičević, I. Mikulandra, M. Bukvić, M. Banjanac, V. Radovanović, I. Habinovec, B. Bertoša, P. Novak, *Int. J. Antimicrob. Agents.* (2020) 1-5.
30. T. Jednačak, I. Mikulandra, P. Novak, *Int. J. Mol. Sci.* **21** (2020) 1-26.
31. K. S. Wilson, *An introduction to X-Ray Crystallography*, John Wiley & Sons, Ldt. (Ed.), 2018, str. 2.
32. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA, Tiskara Varaždin, Varaždin, 2013.
33. I. Mikulandra, T. Jednačak, B. Bertoša, J. P. Vuković, I. Kušec, P. Novak, *Materials* **14** (2021) 1-10.
34. J. C. Duff, E. J. Bills, *J. Chem. Soc.* (1932) 1987-1988.
35. X. Fu, W. Pu, G. Zhang, *Res Chem Interme*d. **41** (2015) 8147-8158.
36. Duff reaction – Wikipedia (datum pristupa 1.srpnja 2022.)
37. The Duff Reaction: Researching A Modification (ecu.edu) (datum pristupa 1. srpnja 2022.)
38. Y. Ogata, F. Sugiura, *Tetrahedron.* **24** (1968), 5001.
39. www.adichemistry.com/organic/namedreactions/michael/michael-addition-1.html (datum pristupa 7. srpnja 2022.)
40. Sodium hydride – Wikipedia (datum pristupa 15 rujan 2022.)
41. H. Saneyoshi, K. Seio, M. Sekine, *J. Org. Chem.* **25** (2005) 10453-10460.
42. S. Caddick, D.B. Judd, A. K. de K. Lewis, Melanie T. Reich, M. R. V. Williams, *Tetrahedron*. **59** (2003) 5417-5422.

43. J. Khurana, G. Kukreja, *Syn. Commun.* **32** (2002) 1265-1268.
44. J. Ham, K. Choi, J. Ko, H. Lee, M. Jung, *Protein and Peptide Letters.* **5** (1998) 257-256.
45. https://en.wikipedia.org/wiki/HATU (datum pristupa 31. kolovoza 2022.)
46. 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)
47. Z. Afrasiabi, E. Sinn, W. Lin, Y. Ma, C. Campana, J. Inorg. Chem. 99 (2009) 1526–1531.
48. F. Basolo, W. R. Matoush, *J. Am. Chem. Soc.* **75** (1953) 5663-5666.
49. T. S. Lobana, R. Sharma, G.Bawa, S. Khanna, Coord. Chem. Rev. **253** (2009) 977–1055.
50. C. Belle, C. Bougault, Marie-Therese Averbuch, A. Durif, Jean-Loius Pierre, Jean-Mare Latour, L. Le Pape, *J. Am. Chem. Soc.* **123** (2001), 8053–8066.
51. I. Bertini, C. Luchinat, G. Parigi, R. Pierattelli, *ChemBiochem*, **6** (2005) 1536–1549.
52. Fourier Transform Infrared and Ultraviolet-Visible Spectroscopic Characterization of Biofield Treated Salicylic Acid and Sparfloxacin (iomcworld.com) (datum pristupa 3. srpnja 2022.)

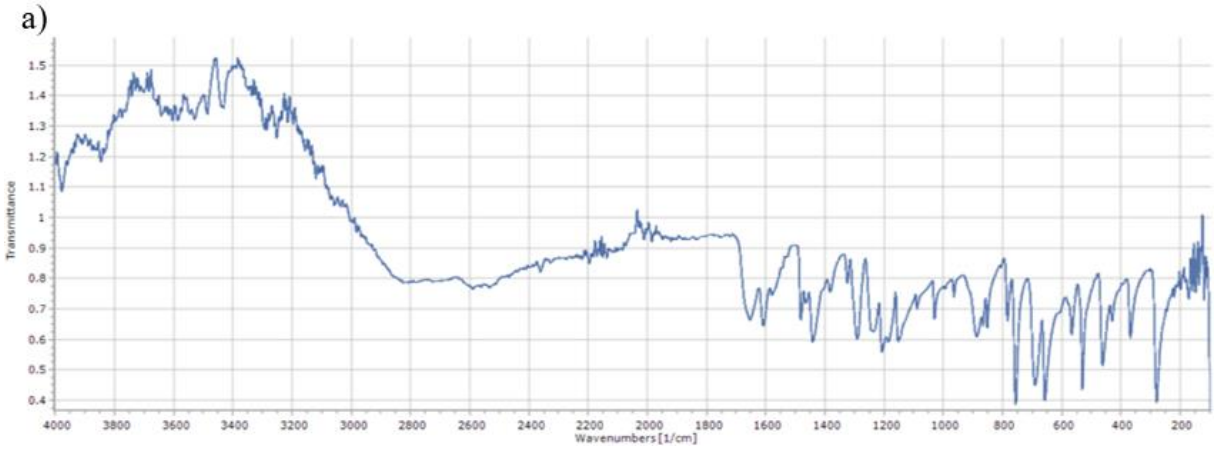
§ 8. DODATAK



D1. ATR spektar heksametilentetramina (HMTA), snimljen pri 298 K.

D2. Asignacija vibracijske vrpce HMTA.

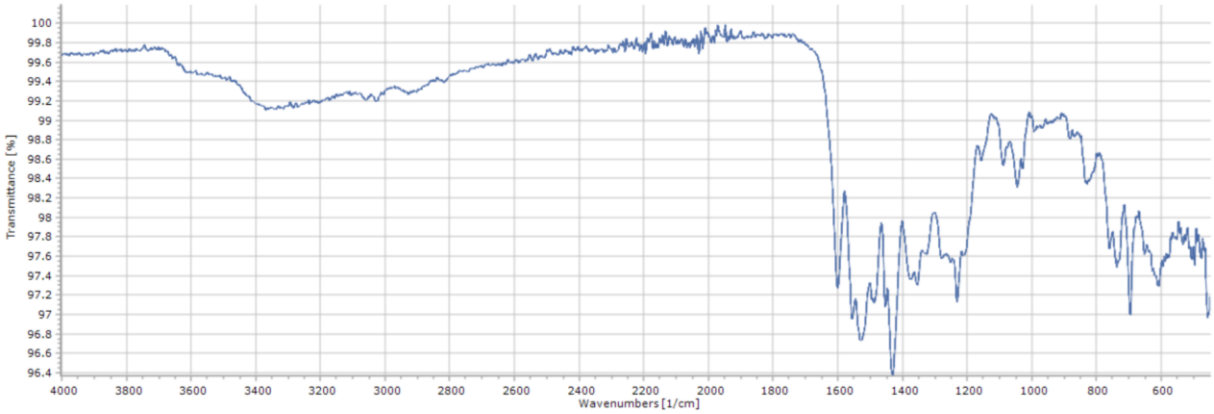
Valni broj / cm^{-1}	**Vibracija**
2921	ν_{as} C-H (CH_2)
2871	ν_s C-H (CH_2)
1369-1234	ν C-N
711	δ_{rc} CH_2



D3. ATR spektar: a) salicilne kiseline i b) formilsalicilne kiseline, snimljen pri 298 K.

D4. Asignacija vibracijske vrpce salicilne kiseline i formilsalicilne kiseline.[52]

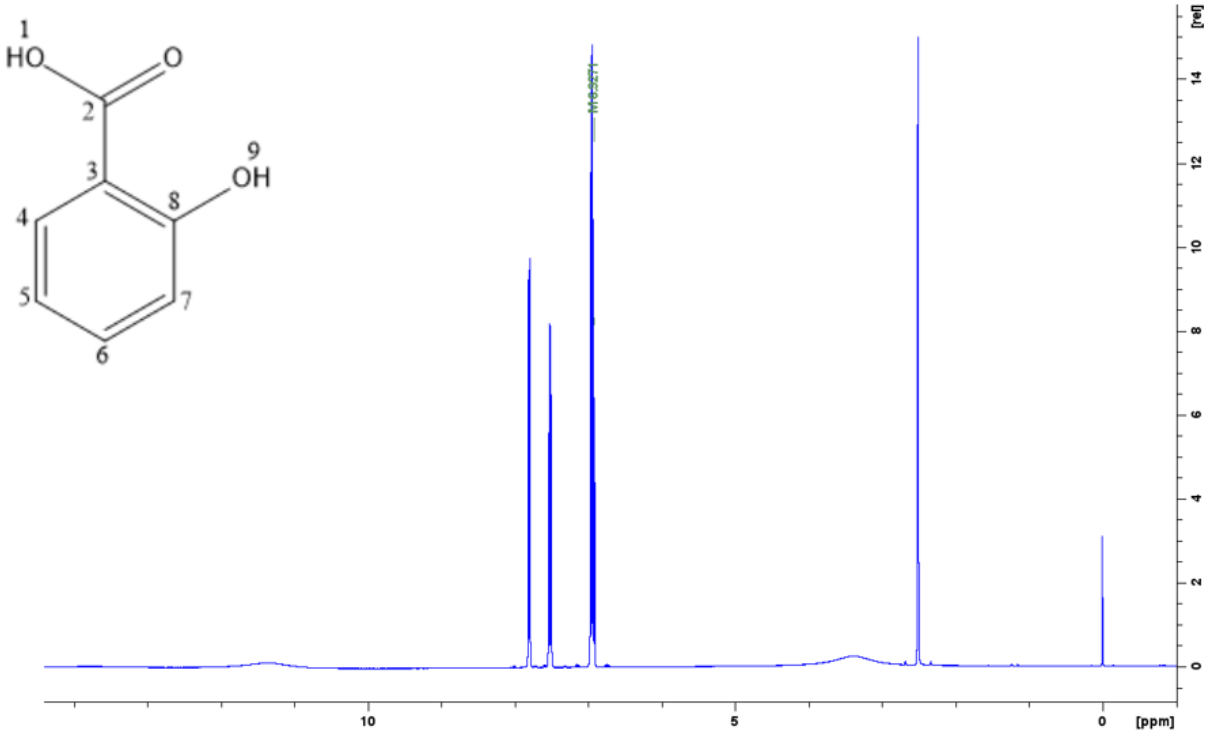
Salicilna kiselina		**Formilsalicilna kiselina**	
Valni broj / cm^{-1}	**Vibracija**	**Valni broj / cm^{-1}**	**Vibracija**
3257	ν O-H (alkohol)	3438	ν O-H (alkohol)
2825-2723	ν C-H	3067-3144	ν =C-H (aromat)
1652-1608	ν C=O (COO^-, asimetrični)	2934 , 2667	ν C-H (aldehid)
1383	ν C=O (COO^-, simetrični)	1652-1605	ν C=O (COO^-, asimetrični)
1481-1441	ν C=C (aromat)	1395	ν C=O (COO^-, simetrični)
1290	ν O-H (fenol)	1439-1432	ν C=C (aromat)
1238	ν C-O	1272	ν O-H (alkohol)
1249-1152	ν C-O-H	1189-1142	ν C-O-H
750-650	δ_{oop} =C-H (aromat)	795-636	δ_{oop} =C-H (aromat)



D5. ATR spektar tiosemikarbazona **FS6,** snimljen pri 298 K.

D6. Asignacija vibracijske vrpce tiosemikarbazona **FS6**.

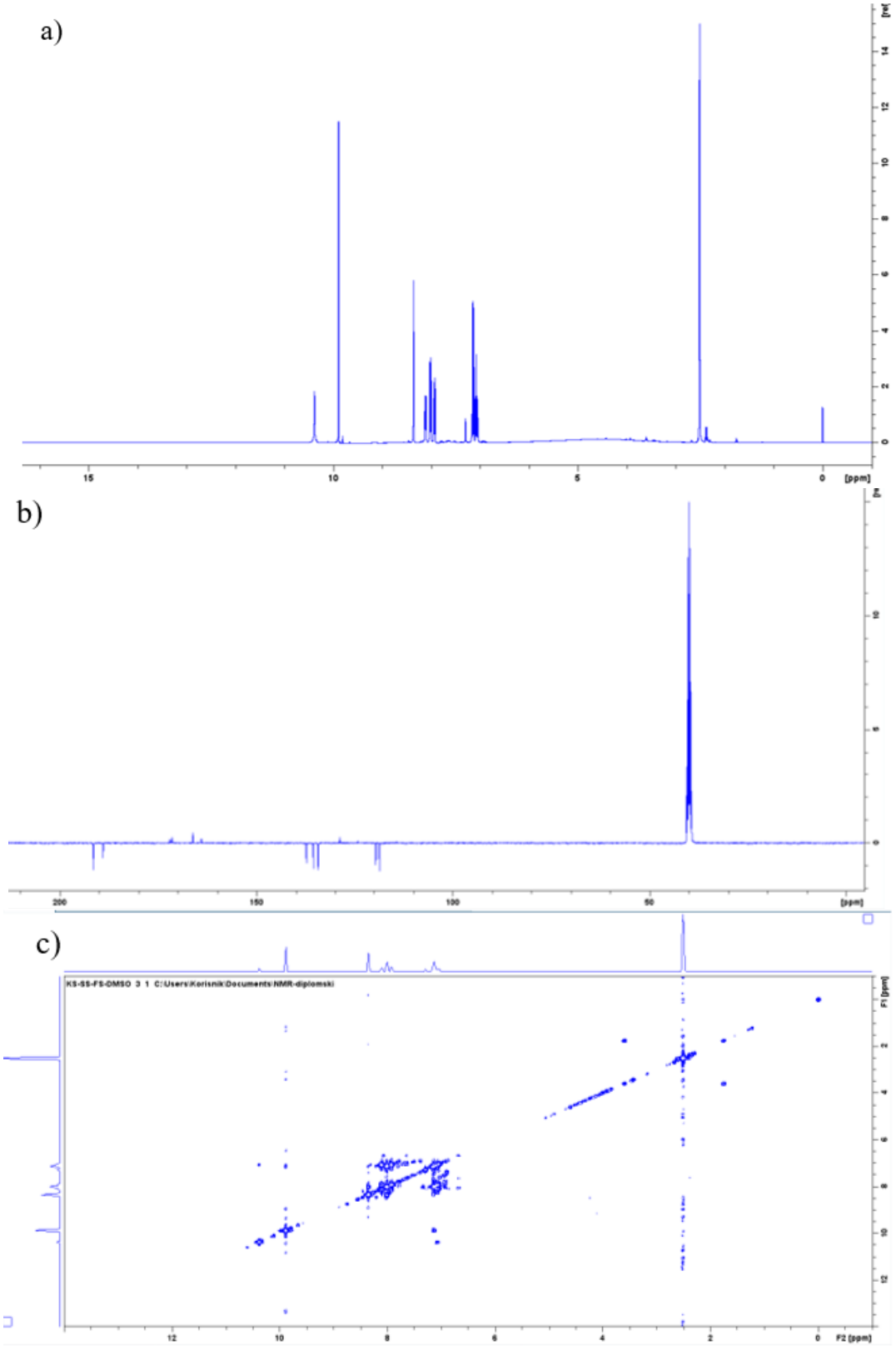
Valni broj / cm^{-1}	**Vibracija**
3369	ν O-H (alkohol)
3028	ν =C-H (aromat)
1600-1530	ν C=O
1523-1432	ν C=C (aromat)
1428	δ_{ip} C-O-H
1349-1233	ν C-O
882-697	δ_{oop} =C-H (aromat)

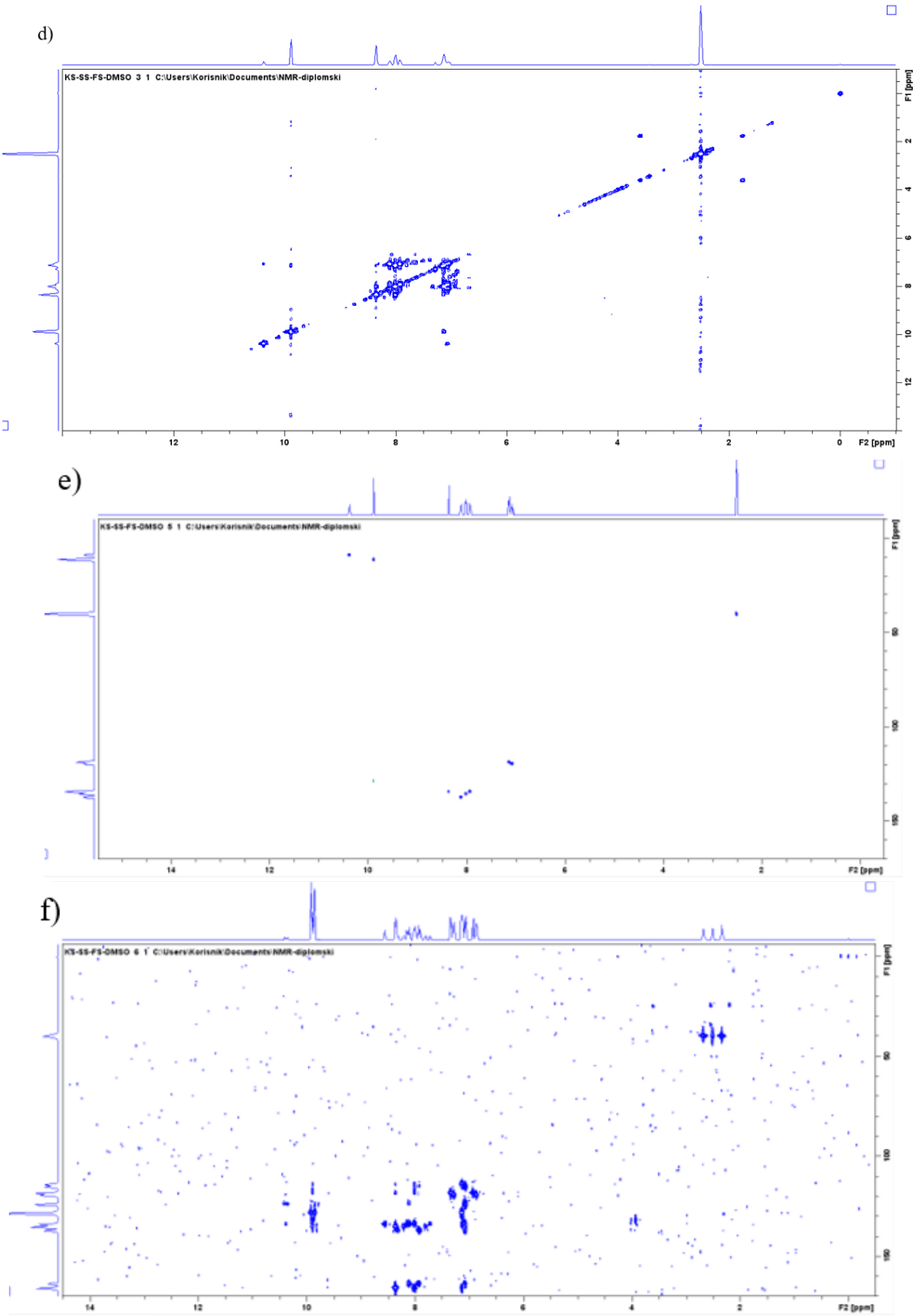


D7. Spektar ^{1}H NMR salicilne kiseline, snimljen u DMSO-d6 pri 298K i struktura salicilne kiseline uz označene lokante.

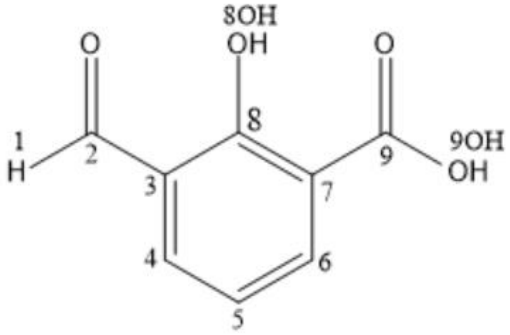
D8. Asignacija kemijskih pomaka ^{1}H NMR salicilne kiseline.

Atom	**δ(^{1}H)/ppm**
1	-
4	7,80
5	6,97
6	7,53
7	6,91
9	-


a)
15
10
5
0
[ppm]
b)
200
150
100
50
[ppm]
c)
KS-SS-FS-DMSO 3 1 C:\Users\Korisnik\Documents\NMR-diplomski
F1 [ppm]
12
10
8
6
4
2
0
F2 [ppm]



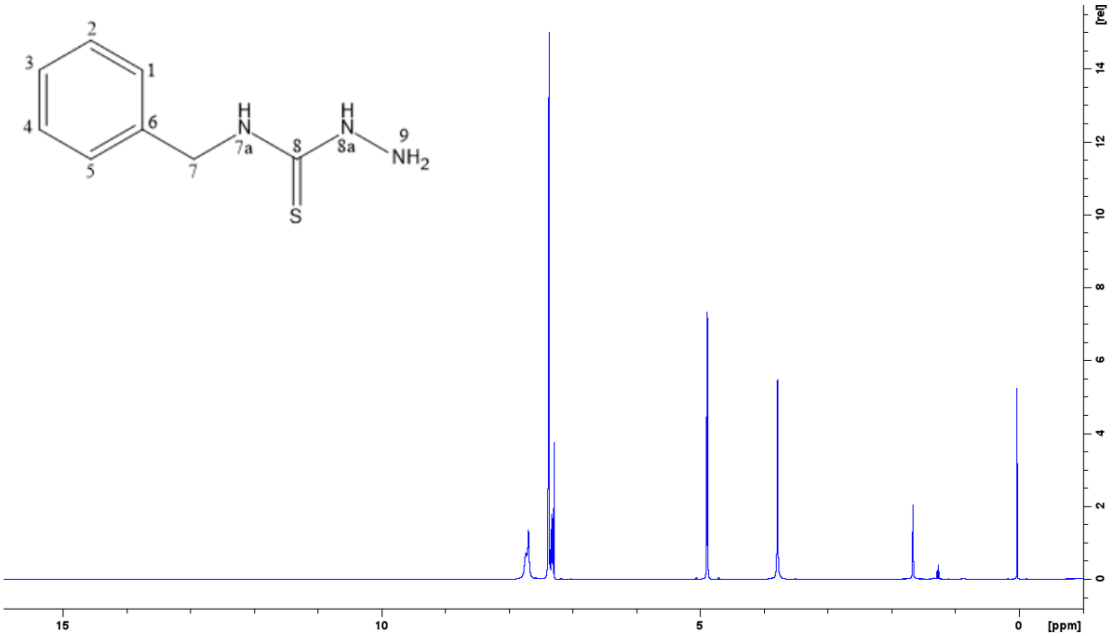
D9. Spektri NMR formilsalicilne kiseline: a) ^{1}H NMR, b) COSY, c) uvećani COSY spektar, d) DEPT-Q, e) HSQC i f) HMBC spektar, snimljeni u DMSO-d_6 pri 298 K.



D10. Struktura formilsalicilne kiseline uz označene lokante.

D11. Asignacija kemijskih pomaka ^{1}H i ^{13}C NMR formilsalicilne kiseline.

Atom	**δ(^{1}H)/ppm**	**δ(^{13}C)/ppm**
1	9,88	-
2	-	191,5
3		124,2
4	7,92	134,2
5	7,07	119,6
6	8,11	137,5
7	-	118,9
8	-	164,7
8OH	7,29	-
9	-	189,1
9OH	10,38	-



D12. Spektar ^{1}H NMR benzil tiosemikarbazida **TSH6** snimljen u $CDCl_3$ pri 298K i struktura spoja **TSH6** uz označene lokante.

D13. Asignacija kemijskih pomaka ^{1}H NMR benzil tiosemikarbazida **TSH6**.

Atom	**δ(^{1}H)/ppm**
1,5	7,37
2,4	7,33
3	7,31
7	3,78
7a	7,28
8a	7,7
9	4,88

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Saranyarat Sanemit

Datum rođenja: 11. siječnja 1999.

Mjesto rođenja: Bangkok

Obrazovanje

2011.–2013.	Osnovna škola Montessori, Zagreb
2013.–2017.	Srednja škola Lucijana Vranjanina, Zagreb
2017.–2020.	Preddiplomski studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2020.-	Diplomski studij kemije, smjer; analitička kemija i biokemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Nagrade i priznanja

2019.	Otvoreni dan Kemijskog odsjeka (Dan i noć na PMF–u)

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. K. Smokrović, E. Hošnjak, S. Sanemit, H. Čipčić-Paljetak, S. Kazazić, I. Mikulandra, P. Novak, Synthesis and characterization of nickel(II) macrozone complexes derived from 4-formylbenzoic acid and 3-formylsalicylic acid, MMCE, Primošten, 2022.