

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra organické a biorganické chemie

Diplomová práce

SYNTÉZA SUBSTITUOVANÝCH ARYLGUANIDINŮ JAKO
POTENCIÁLNÍCH LÉČIV XV

SYNTHESIS OF SUBSTITUTED ARYLGUANIDINES AS POTENTIAL DRUGS

XV

Vedoucí katedry: doc. PharmDr. Jaroslav Roh, Ph.D.

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Karel Palát, CSc.

Hradec Králové, 2021

Katarína Brezinová

Čestné prehlásenie:

Týmto podpisom prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom, všetka literatúra a zdroje použité počas vypracovania práce sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú citované. Práca nebola použitá k získaniu iného titulu.

V Hradci Králové

Katarína Brezinová

Dňa 5.9.2021

Podpis.....

Podakovanie

Rada by som poďakovala vedúcemu diplomovej práce PharmDr. Karlu Palátovi, CSc, za jeho ochotu, čas, trpezlivosť a pomoc počas experimentálnej práce v laboratóriu a aj pri následnom vypracovávaní diplomovej práce. Ďakujem doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za zmeranie NMR spektier a Ivě Vencové za zmeranie IČ spektier.

Taktiež by som rada poďakovala katedre biologických a lekánských vied za vykonanie mikrobiologických testov.

Podakovanie patrí aj mojej kolegyni Eszter Gyurkovicsovej za pomoc pri práci a morálnu podporu.

Abstrakt

Katarína Brezinová

Syntéza substituovaných arylguanidínů jako potenciálních léčiv XV

Diplomová práce

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie

PharmDr. Karel Palát, CSc.

Hradec Králové, 2021

Antimikrobiálna a antifungálna rezistencia sú pojmy, ktoré sú dnes veľmi často skloňované. Nárast bakteriálne rezistných kmeňov na používané antibiotiká je alarmujúci, rovnako ako aj nárast rezistencie u patogénov spôsobujúcich mykotické ochorenia. Vzrastajúci stav rezistencie si vyžaduje syntézu nových látok s antimykotickým a antibakteriálnym účinkom.

V rámci diplomovej práce boli syntetizované dva rozdielne 1,1-dimethyl-2-[3-methyl-4-(alkylsulfanyl)fenyl]guanidínové deriváty a dva rozdielne 2-[3-methyl-4-(alkylsulfanyl)fenyl]guanidínium-nitráty, ktoré sa líšili dĺžkou alkylového reťazca. Tieto látky boli odoslané na antibakteriálne testy na katedru biologických a lekánských vied, farmaceutickej fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy. Látky ukázali antibakteriálnu a antifungálnu aktivitu proti niekoľkým bakteriálnym patogénom porovnateľnú až lepšiu ako použité štandardy.

Syntetizovaná bola aj látka 1,1-dimethyl-2-[5-methyl-2-(decylsulfanyl)fenyl]guanidín, ktorý doplňuje sériu látok nasyntetizovaných v predchádzajúcich rokoch.

V práci bolo celkovo nasyntetizovaných 11 nových látok, ktoré doposiaľ neboli ešte popísané v literatúre.

Abstract

Katarína Brezinová

Synthesis of substituted arylguanidines as potential drugs XV

Diploma thesis

Charles University, Faculty of pharmacy in Hradec Králové

Department of Organic and Bioorganic Chemistry

PharmDr. Karel Palát, CSc.

Hradec Králové, 2021

Antimicrobial and antifungal resistance are terms that are very often used today. The increase in bacterial strains resistant to the antibiotics used is alarming, as is the increase in resistance in pathogens causing mycotic diseases. The increasing state of resistance requires the synthesis of new substances with antifungal and antibacterial activity.

Two different 1,1-dimethyl -2-[3-methyl-4-(alkylsulfanyl)phenyl]guanidinium derivatives, two different 2-[3-methyl-4-(alkylsulfanyl)phenyl]guanidinium nitrates, which differed in alkyl chain length, were synthesized in the thesis work. These substances were sent for antibacterial tests to the Department of Biological and Medical Sciences, Faculty of Pharmacy, Charles University in Hradec Kralove . The substances showed antibacterial and antifungal activity against several bacterial pathogens comparable to or better than the standards used.

The substance 1,1-dimethyl -2-[5-methyl-2-(decylsulfanyl)phenyl]guanidine was also synthesized, which complements a series of substances synthesized in previous years.

A total of 11 new substances were synthesized in this work, which have not yet been described in the literature

Obsah

1.	Úvod a cieľ práce.....	8
2.	Antimikrobiálne a antifungálne látky.....	9
2.1	Antimikrobiálne látky	9
2.2	Antimikrobiálna rezistencia	9
2.3	Antifungálne látky.....	9
2.4	Antifungálna rezistencia.....	10
2.5	Nové látky s antimikróbnu a antifungálnou aktivitou.....	10
2.5.1	Polyanilíniové soli.....	10
2.5.2	Deriváty triazolov.....	11
2.5.3	Deriváty chinolínu s naviazaným pyrazolovým jadrom.....	11
2.5.4	NH analógy ciprofloxacínu	13
2.5.5	Pyrazolothienotriazolo deriváty	14
2.5.6	Ocimum Basilicum.....	14
3.	Poznanky o guanidínoch	16
3.1	Biologická aktivita pentacyklických guanidínov	16
3.2	Hypoglykemický efekt guanidínov	18
3.3	Guanidíny ako potencionálne antimalariká.....	18
3.4	Guanidíny pôsobiace na α -adrenergne receptory	19
4.	Metodika práce	21
4.1	Chemická časť.....	21
4.1.1	Príprava sulfidov	21
4.1.2	Redukcia nitrozlučenín.....	22
4.1.3	Príprava anilinium-chloridov	24
4.1.4	Príprava arylguanidínov	24
4.1.5	Celková schéma syntézy	26
4.2	Mikrobiologická časť	28
4.2.1	Antimikróbne stanovenie	28
4.2.2	Antifungálne stanovenie.....	28
5.	Experimentálna časť.....	29
5.1	Syntéza.....	29
5.1.1	Príprava aktívnej medi [42].....	30
5.1.2	Príprava decyl-(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfidu.....	31
5.1.3	Príprava 2-(decylsulfanyl)-5-methylanilínu	33

5.1.4	Príprava 2-(decylsulfanyl)-5-methylanilium-chloridu	35
5.1.5	Príprava 1,1-dimethyl -2-[2-(decylsulfanyl)-5-methylfenyl]guanidinu	36
5.1.6	Príprava 2-methyl-4-nitrofenyl(undecyl)sulfidu	38
5.1.7	Príprava 3-methyl-4-(undecylsulfanyl)anilinu	40
5.1.8	Príprava 3-methyl-4-(undecylsulfanyl)anilium-chloridu	42
5.1.9	Príprava 1,1-dimethyl -2-[3-methyl-4-(undecylsulfanyl)fenyl]guanidinu	43
5.1.10	Príprava 2-[3-methyl-4-(undecylsulfanyl)fenyl]guanidinium-nitrátu	45
5.1.11	Príprava dodecyl(2-methyl-4-nitrofenyl)sulfidu	46
5.1.12	Príprava 4-(dodecylsulfanyl)-3-methylanilinu	47
5.1.13	Príprava 4-(dodecylsulfanyl)-3-methylanilium-chloridu	49
5.1.14	Príprava 1,1-dimethyl -2-[4-(dodecylsulfanyl)- 3-methylfenyl]guanidinu	50
5.1.15	Príprava 2-[4-(dodecylsulfanyl)-3-methylfenyl]guanidinium-nitrátu	51
5.2	Mikrobiologická časť	53
5.2.1	Antibakteriálna aktivita	54
5.2.2	Antifungálna aktivita	55
6.	Diskusia	56
6.1	Chemické hodnotenie	56
6.2	Mikrobiologické hodnotenie	57
6.2.1	Antibakteriálna aktivita	57
6.2.2	Antifungálna aktivita	57
7.	Záver	58
7.1	Prehľad novosyntetizovaných látok	58
8.	Použitá literatúra	59

1. Úvod a cieľ práce

Liečba bakteriálnych a mykotických ochorení zvyšuje dopyt po novších účinnejších látkach, ktoré budú pôsobiť na patogény a nebudú rozvíjať ich rezistenciu. S tým priamo súvisí potreba hľadať, syntetizovať a testovať nové látky.

Štúdiu zameraných na tento problém je dostatok a ja som sa vo svojej práci zamerala na syntézu substituovaných arylguanidínov. Svojou prácou nadväzujem na predchádzajúce práce kolegov a kolegýň, ktorých nasyntetizované látky mali potenciónálnu antimikróbnu a antifungálnu účinnosť a ja som pripravovala ďalšie z tejto skupiny.

Na začiatku experimentálnej práce som sa snažila dokončiť látku po PharmDr. Ondřejovi Strakovi[1], ktorému sa ju bohužiaľ nepodarilo dosyntetizovať. Ide o látku:

1,1-dimethyl -2-[5-methyl-2-(decylsulfanyl)fenyl]guanidín.

Ďalej som sa pokúsila nasyntetizovať látky:

1,1-dimethyl -2-[3-methyl-4-(undecylsulfanyl)fenyl]guanidín

2-[3-methyl-4-(undecylsulfanyl)fenyl]guanidín

1,1-dimethyl -2-[3-methyl-4-(dodecylsulfanyl)fenyl]guanidín

2-[3-methyl-4-(undecylsulfanyl)fenyl]guanidín

V teoretickej časti som sa rozhodla spraviť rešerš a vyhľadať si štúdie cez portál SciFinder zamerané na syntézu látok a ich analýzu bakteriálnej účinnosti. Popísala som informácie získané zo štúdií o nových antimikróbných a antifungálnych látkach a taktiež som opísala najnovšie poznatky o guanidínoch v rozpätí rokov 2017-2021.

2. Antimikrobiálne a antifungálne látky

2.1 Antimikrobiálne látky

Antimikrobiálne látky sú syntetické alebo prírodné látky, ktoré sú produktmi metabolizmu mikroorganizmov so selektívnou toxicitou proti iným mikroorganizmom. Ich aktivita sa uplatňuje počas eliminácie infekcie spôsobenej patogénnymi organizmami - čo sú väčšinou baktérie, môžu to byť vírusy, huby alebo prvoky[2]. Látky pôsobia bakteriostaticky (zastavujú rast baktérie) alebo bakteriocídne (ukončujú život mikróba). Podľa mechanizmu účinku ich môžeme rozdeliť na látky inhibujúce syntézu bunkovej steny, látky spôsobujúce poruchu cytoplazmatickej membrány patogéna, látky inhibujúce tvorbu bielkovín v ribozómoch, látky inhibujúce tvorbu nukleových kyselín a inhibíciu biotransformačných dejov[3]. Najčastejšie používané antimikrobiálne látky v liečebných metódach sú antibiotiká, ale zaradiť sa sem môžu aj látky preventívneho charakteru a to dezinfekciá a antiseptiká[4].

2.2 Antimikrobiálna rezistencia

S používaním antimikrobiálnych látok súvisí aj rezistencia. Tá tu bola už dávno pred „zlatým vekom antimikrobiotík“ a vzrastá stále viac a viac. Samotný ľudský mikrobióm je rezervoárom pre antimikrobiálnu rezistenciu už pri prvotných stretnutiach s mikróbmami v detskom veku. Je evidentné, že rezistencia sa stala globálnym problémom. Naliehavosť jej riešenia v liečbe ochorení vzrastá v súvislosti s medzinárodným cestovaním, šírením infekcií v nemocniciach, opatrovateľských domoch, s prílišným predpisovaním antibiotík a ich nesprávnym užívaním či už u ľudí alebo hospodárskych zvierat[5].

2.3 Antifungálne látky

Antifungálne látky sú látky, ktoré sú používané k potlačeniu vzniknutých hubových infekcií. Z hľadiska štruktúry predstavujú pomerne širokú zmes zlúčenín, preto je komplikované triediť ich do skupín na základe chemickej podobnosti. Môžeme ich však rozdeliť na špecifické a nešpecifické antimykotiká. Ako nešpecifické sú označované lokálne pôsobiace látky, ktoré denaturujú bielkoviny, ničia bunkovú stenu mikróbov, menia pH a zároveň sú schopné urýchliť obnovu a odlúčenie infikovaných vrstiev epidermy spolu s čiastočkami húb. Okrem plesní účinkujú aj na baktérie a preto je možné ich označovať aj ako antiseptiká s antimykotickým účinkom.[6]

2.4 Antifungálna rezistencia

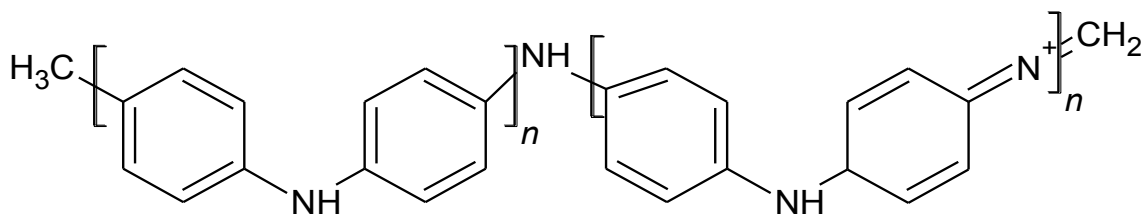
Rovnako ako antimikróbna tak aj antifungálna aktivita sa používaním jednotlivých liečiv znižuje, narastá odolnosť patogénov a vzrastá rezistencia. Medzi najčastejšie a najviac používané antimykotické látky patria azoly a ich deriváty. Rezistencia týchto derivátov začína tým, že sa tvoria toxické zvyšky zo zásahu do syntézy lanosterolu, tie vytvárajú „obal“ a cez ten už niektoré azoly nedokážu pôsobiť[7].

2.5 Nové látky s antimikróbnou a antifungálnou aktivitou

So zrastajúcou rezistenciou je potrebné nájsť a objavovať nové a potenciálne antimikróbne látky. Vyhľadávanie v článkoch v SciFinder ukázalo veľké množstvo potenciálnych mikrobiálnych látok. Ako kľúčové slová boli postupne zadávané pojmy „antifungal activity“, „antibacterial activity“, „antimicrobial activity“ ale počet článkov sa na toto časové obdobie 2017 - 2021 výrazne neznižoval, tak som vyhľadávala podľa „antibacterial, antifungal activity N-compound“ tu sa počet znížil na niekoľko tisíc, tie som si vyfiltrovala podľa „purpose“ na „antibacterial agents“ a „fungicides“, články, ktoré vyhovovali môjmu hľadaniu som spracovala do diplomovej práce..

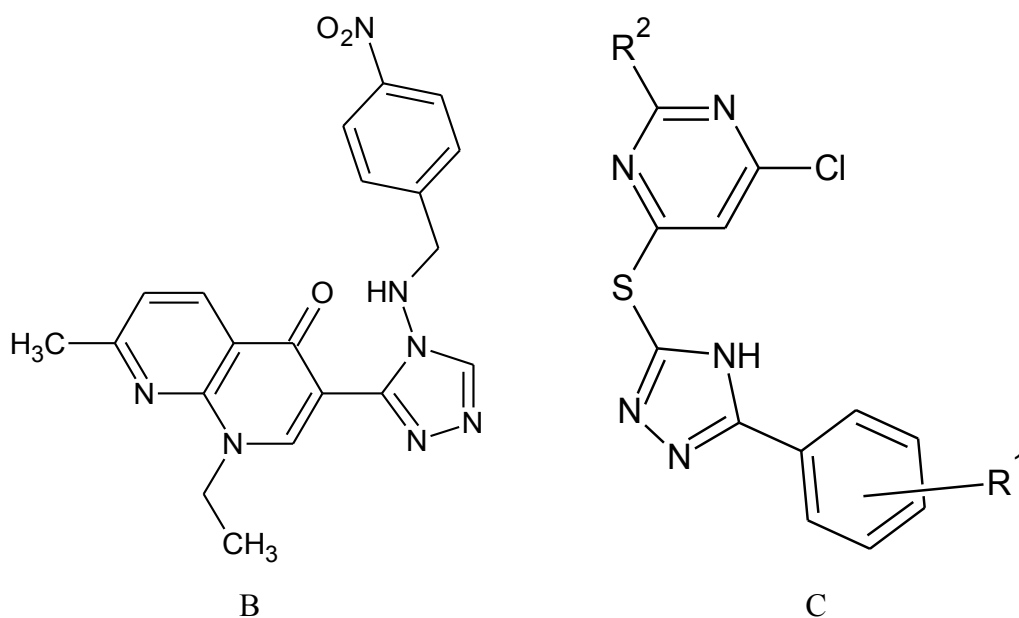
2.5.1 Polyanilíniové soli

Štúdia[8] zameraná na biologickú aktivitu derivátov polyanilíniových solí (A) priniesla kladné výsledky v boji proti G^+ a G^- baktériam a hubovým ochoreniam. Syntetizované boli viaceré soli u všetkých sa preukázala biologická aktivita. Rozdiely boli v jednotlivých rozsahoch v mm inhibičnej zóny. V štúdiu sa taktiež venovali aj uvoľňovaniu solí do organizmu a mechanizmu účinku. V závere je uvedené, že polyanilíniové soli by mohli byť použité v liekových formách s postupným uvoľňovaním ako napr. transdermálne náplaste.



2.5.2 Deriváty triazolov

Deriváty 1,2,4-triazolu majú už známe antirakovinové, antivirotické, antituberkulotické, antifungálne a antibakteriálne účinky. V práci[9] hodnotia a porovnávajú účinnosť hybridizovaných derivátov 1,2,4-triazolov s kumarínmi, β -laktámovým fragmentom, pyrimidínom, pyridínom, chinolínom, chinolónom a chinazolínom. Jednotlivé hybridy sa od seba líšia v zistených hodnotách aktivity, ale účinnosť prevyšuje nad nehybridizovanými derivátmi. Najväčšiu účinnosť proti pozorovaným rezistným patogénom zaznamenali štruktúry (B,C) a práve tieto by mohli byť v budúcnosti predlohou pre ďalšie skúmanie, sú to hybridy 1,2,4-triazolu s chinolónom (B) a pyrimidínom (C).

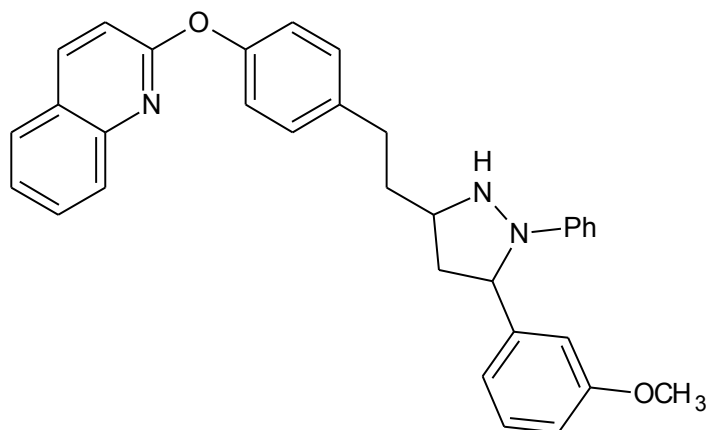


2.5.3 Deriváty chinolínu s naviazaným pyrazolovým jadrom

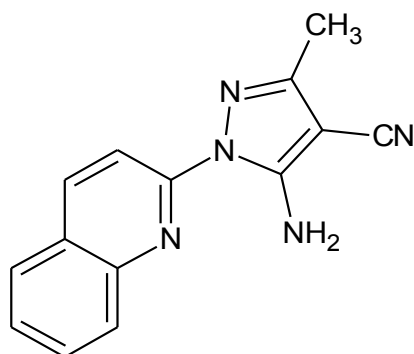
V ďalšej vybranej štúdií[10] porovnávali rôzne nasyntetizované deriváty chinolínu s naviazaným pyrazolom. Syntetizovali 3 rady derivátov a menili pozíciu funkčnej skupiny, zamenili chalkón za pyrazol, menili substituenty a následne zisťovali ich antimikrobiálnu a antifungálnu aktivitu na patogény v porovnaní so známymi látkami.

Sériou syntéz odhalili, že pokiaľ je funkčná skupina u chinolínových derivátov s naviazaným pyrazolidínom na pyrazolovom kruhu chinolínu, zvyšuje to mikrobiálnu aktivitu. V nasledujúcich sériách objavili tiež potencionálne antimikróbne a antifungálne látky v porovnaní so štandardmi. Látka (D) mala v porovnaní s Ampicilínom ako štandardom zaznamenanú vyššiu inhibičnú aktivitu na G^+ baktérie.

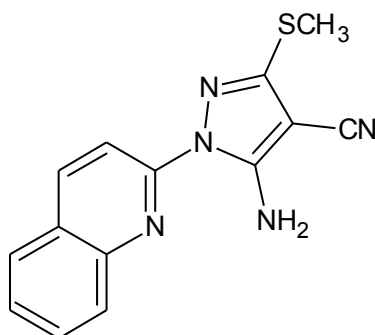
Látka (E) bola substituovaná nitrilovou skupinou do polohy 4 a methylom v polohe 3 na pyrazolovom jadre, čo antimikróbnu aktivitu zvýšilo. Bol syntetizovaný aj derivát s naviazanou methylsulfanylovou skupinou (F) v polohe 3, ale účinnosť nebola nejak výnimočná v porovnaní s ostatnými derivátmi.



D



E



F

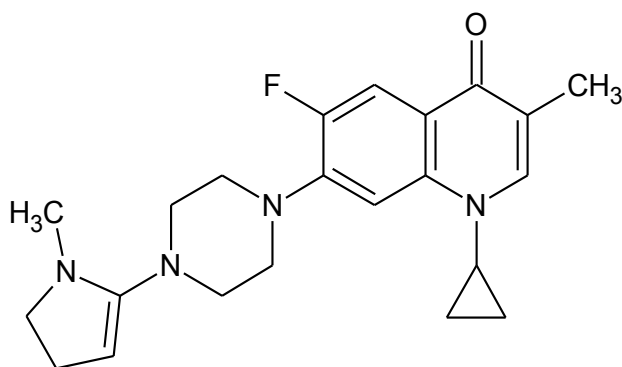
2.5.4 NH analógy ciprofloxacínu

V ďalšej vybranej štúdií[11] sa zamerali na syntézu a biologickú aktivitu niekoľkých NH analógov ciprofloxacínu.

Ciprofloxacín je chemoterapeutikum, ktoré sa radí do 2. generácie chinolónov. Chinolóny sú látky, ktoré inhibujú syntézu DNA, blokujú gyrázu (topoisoméráza IV), ktorá je zodpovedná za správne splietanie a rozpletanie bakteriálnej nukleovej kyseliny počas bunkového cyklu. Ciprofloxacín sa radí ku širospektrým antibiotikám a predpisuje sa na infekcie spôsobené ako G^+ tak G^- baktériami a aj naň vzniká rezistencia.

Autori štúdie[12] ku chinolónu pripojili ako substituenty tieto látky: N-methylpyrol, 1-kyanoguanidín, 1-kyanonaftalén a methyl. U vzniknutých látok boli spravené antibakteriálne testy na antimikrobiálnu, antifungálnu aktivitu a na cytotoxicitu.

Výsledky ukázali, že najväčšiu antimikróbnu aktivitu zaznamenala látka pripravená reakciou s 1-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrol (G) a ostatné látky v porovnaní s ciprofloxacínom nezaznamenali žiadnu väčšiu aktivitu. Antifungálna aktivita bola taktiež významná u látky pripravenej reakciou s N-methylpyrolom. Cytotoxicita pôsobiaca na patogény naopak bola u všetkých testovaných látok o niečo vyššia ako u ciprofloxacínu a preto sa javia ako potenciálne antimikróbne látky[12].



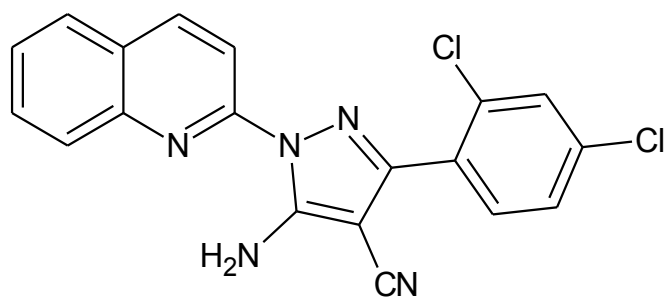
G

2.5.5 Pyrazolothienotriazolo deriváty

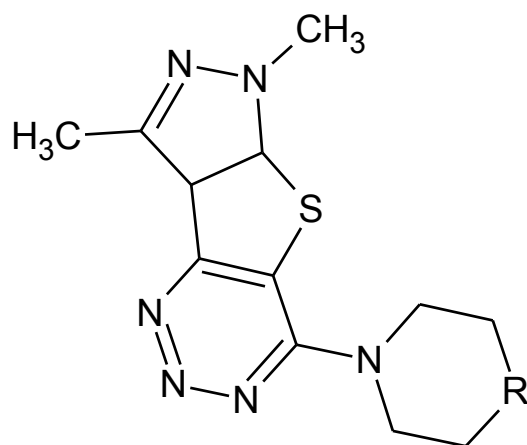
Predposledná zvolená štúdia[13] sa zameriavala na syntézu nových pyrazolothienotriazolo derivátov. Pyrazolové deriváty sú známe pre svoje antibakteriálne, antifungálne, antiflogisticke, antioxidantné, protirakovinové a antivirotické účinky. Syntetizovali viacero zlúčenín, ktoré boli odoslané na testy bakteriálne účinnosti.

Získané výsledky hovoria o potencionálnych látkach so štruktúrou (H₁ a H₂), ktoré v testoch antimikrobiálnej aktivity vyšli účinné voči všetkým testovaným druhom baktérii, líšili sa len rozdielnou plochou v mm inhibičnej zóne.

Antifungálna aktivita nasyntetizovaných látok je najvyššie nameraná u rovnakých látok (H₁ a H₂), ktoré sa znovu líšia len v pôsobnosti na rozdielne spektrum húb.



H₁



H₂

2.5.6 Ocimum Basilicum

Okrem synteticky pripravených látok sa látky s antibakteriálnou a fungálnou aktivitu nachádzajú aj v rastlinách. Z článkov som si vybrala prácu[14] o esenciálnom oleji získanom z *Ocimum Basilicum* z čeľade Lamiaceae a príprave nanoemulzie. Olej

obsahuje veľké množstvo látok, ako napríklad: estragol, linalool, eugenol, linolénovú kyselinu, tetradekánovú kyselinu, hexadekánovú kyselinu, palmitin, stigmasterol a beta-sitosterol.

V práci[15] sú uvádzané jednotlivé účinky esenciálneho oleja ako sú práve antibakteriálne, antimykotické, antiflogistické a antivirotické taktiež pôsobí aj ako antioxidant. Nanoemulzia pôsobila na väčšie spektrum patogénov ako čistý olej.

3. Poznatky o guanidínoch

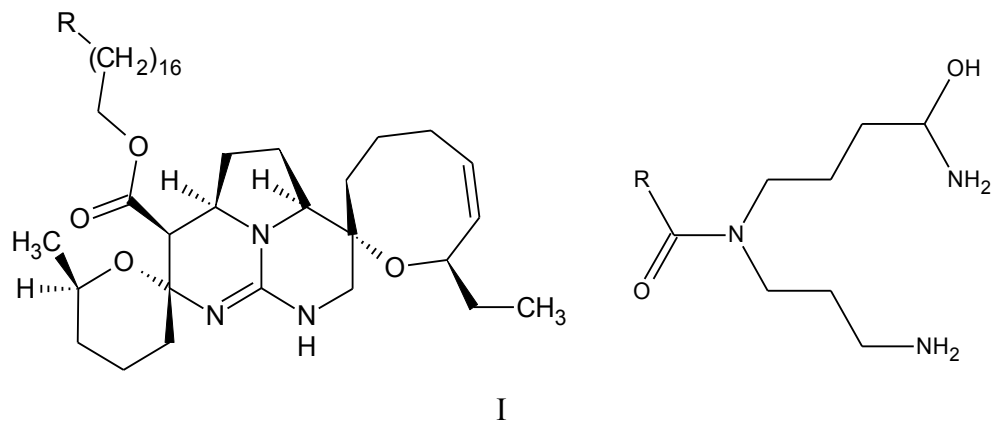
V rámci diplomovej práce som sa venovala snahe nájsť čo najnovšie informácie o biologickej aktivite guanidínov. Z jednotlivých nájdených článkov na Scifinderi som vyselektovala časové rozpätie rokov 2017-2021. Hľadané kľúčové slová boli: „Guanidines“, „antimicrobial activity of guanidines“, „biological activity of guanidines“, „antifungal activity of guanidines“, „antiviral activity of guanidines“, „arylguanidines“, „phenylguanidines“.

3.1 Biologická aktivita pentacyklických guanidínov

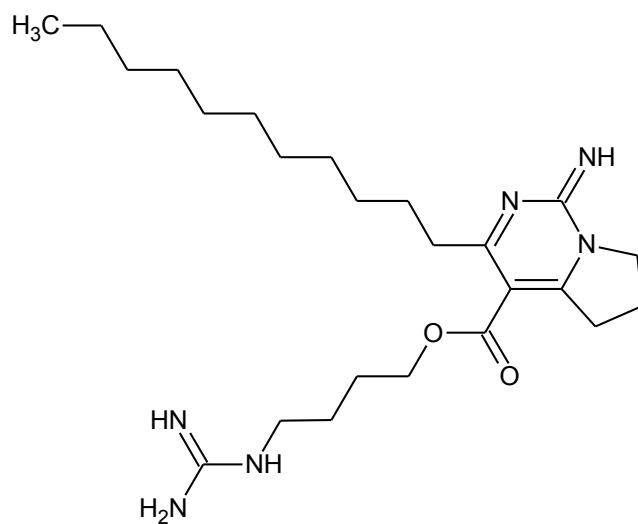
K veľmi častým a zaujímavým zdrojom guanidínov v prírode patrí momentálne podmorský svet. Chemici a biológovia [16] sa snažia preskúmať, čo najviac potencionálnych látok s možným použitím v medicíne.

Ako hlavný zdroj sa rozhodli použiť pentacyklické guanidínové alkaloidy. Jadro je tvorené polycyklickým guanidínom s naviazaným dlhým alkylovým reťazcom. Guanidíny vďaka svojej bazicite ($pK_a=13,6$) ľahko vytvárajú konjugovanú kyselinu a guanidínový kation sa tak viaže s anionickými substrátmi, ako sú napr. karboxyláty alebo fosfáty. Tieto alkaloidy boli izolované najmä z morských húb a iných vodných organizmov. Z huby *Crambe crambe* z druhu *Crambeidae* boli izolované krambescidín (I) a dihydrokrambín A (J) [17] tieto látky pôsobia proti rakovinovým bunkám rady L1210 and HCT-16 taktiež krambescidín pôsobí cytotoxicky aj proti hepatocelulárnemu karcinómu bunkách HepG2 a niekoľkým ďalším líniam rakovinových buniek v submikromolárnej koncentrácii. [18] Taktiež majú antifungálnu, antimikrobiálnu a antimykotickú [19] účinnosť.

Krambescidín (I) sa ukázal aj ako potencionálna látka proti SARS-CoV2 (Covid-19). Z výsledkov štúdie, ktorá začala molekulovým dockingom vyšli ako potencionálne viaceré látky, ktoré by mali zasahovať do 5 proteínov ktoré ovplyvňujú SARS-CoV2. Z vybraných látok sa do úšieho výberu na základe toxicity a ADMET dostali dve látky, u tých bola sledovaná viazanosť na jednotlivé ciele (proteíny) a sledovala sa rýchlosť, zmena štruktúry, energia. Z výsledkom sa dá povedať, že krambescidín a jeho derivát vyhovujú väzobnému miestu jednotlivých proteínáz a zároveň ich reakcia v dockingu je exotermická a teda nie je potrebné dodávať energiu. Látka sa dá považovať ako možné budúce liečivo na Covid-19 [20].

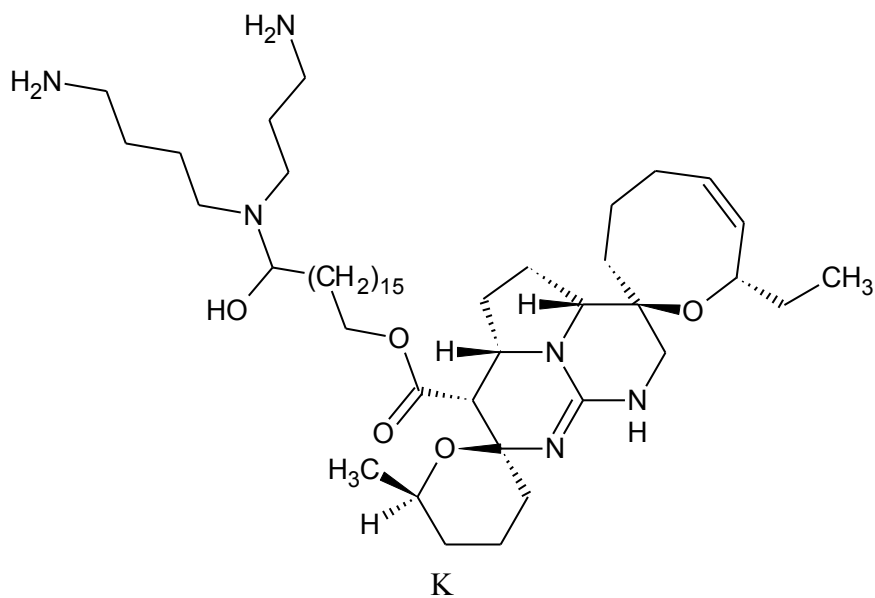


I



J

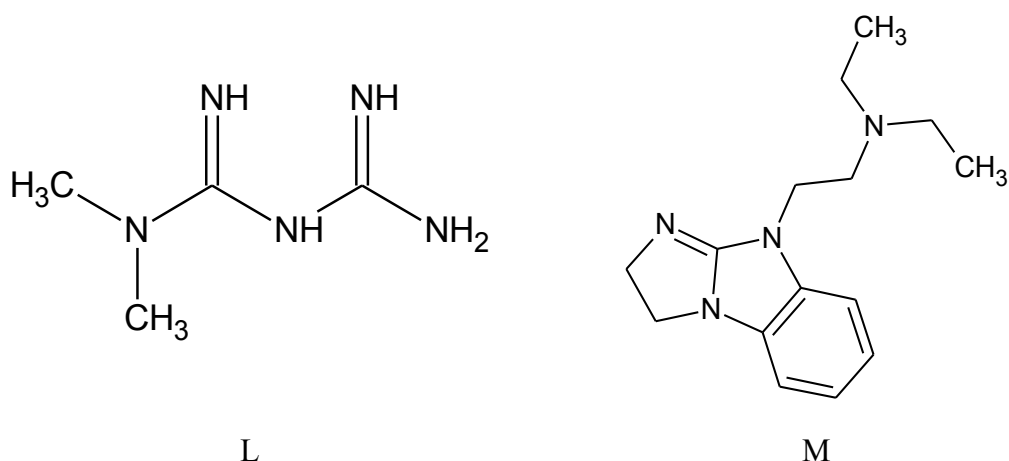
Okrem týchto účinkov sú pentacyklické deriváty guanidínov radené aj tie, ktoré majú účinok proti HIV. Mechanizmus účinku vychádza z inhibície HIV - reverznej transkriptázy, čím bráni ďalšiemu vstupu a šíreniu v tele hostiteľa. Podľa štúdie najväčšiu účinnosť zaznamenal ptilomycalin A (K) a jeho analógy[21].



K

3.2 Hypoglykemický efekt guanidínov

Metformín (L), liek prvej voľby u diabetu melitu typu 2, je biguanidín. V štúdiu sa zamerali na hypoglykemický efekt u niekoľkých derivátov cyklických guanidínov ako imidazo[1,2-*a*]-, pyrimido[1,2-*a*]-, pyrrolo[1,2-*a*]-, triazolo[1,5-*a*]benzimidazol derivátov. Podľa výsledkov z molekulového modelingu a QSAR analýzy by mali byť všetky potencióálne použiteľné látky. Výsledky experimentálnej štúdie a aj následnej preklinickej štúdie na zvieratách dokazujú, že *N*⁹-(diethylamino)ethyl-2,3-dihydroimidazo[1,2-*a*]benzimidazol (M) má potencióálny antidiabetický efekt- stimuluje uvoľňovanie inzulínu, zlepšuje glykémiu, znižuje HbA_{1c}, znižuje trombogénnu aktivitu v krvi a zmierňuje hemoroidy[22]. Daná účinná látka sa nachádza v prípravku diabenol, ktorý nie je dostupný zatiaľ v Českej republike.



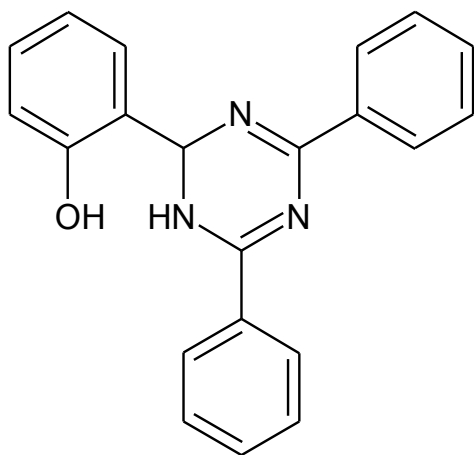
3.3 Guanidíny ako potencióálne antimalariká

Malária je ochorenie spôsobené uštipnutím komára rodu *Anopheles*, ktorým sa do tela dostane parazit *Plasmodium falciparum*, ktorý spôsobuje práve toto ochorenie. Ide o celosvetové ochorenie, ktoré postihuje až 216 miliónov ľudí a usmrť 445 000 pacientov ročne.

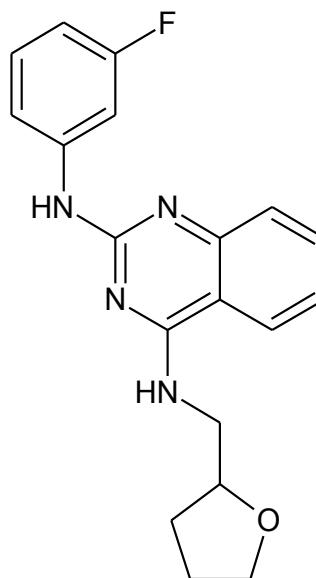
V štúdiu sa snažili nájsť molekuly, ktoré by po spojení štruktúrnej a biologickej stránke pôsobili proti *Plasmodium falciparum*. Pomocou QSAR analýzy našli 12 častí molekúl, z ktorých 6 pôsobilo proti plasmodiu a 6, ktoré pôsobili nepriaznivo proti mikroorganizmu.

Tieto štruktúrne časti boli použité vo virtuálnom screeningu a ten vyhľadal cez 400 000 molekúl, tie boli postupne filrami selektované až kým nebolo vybraných 5 molekúl.

Tieto molekuly boli testované *in vitro* proti sporozoidom a obe látky: 2-(4,6-diphenyl-1,2-dihydro-1,3,5-triazin-2-yl)fenol (N) a N²-(3-flórophenyl)-N⁴-[(oxolan-2-yl)methyl]chinazolin-2,4-diamin (O) pôsobili proti rastu mikróba na mikro aj nanomolekulárnej úrovni. Látka (O) mala zrovnateľné účinky s chlorochínom[23].



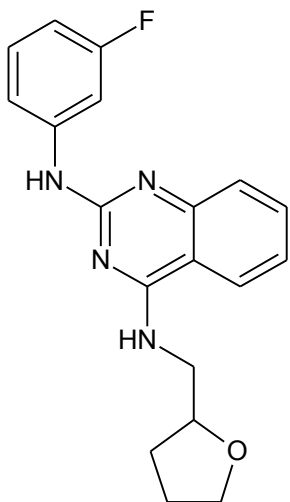
N



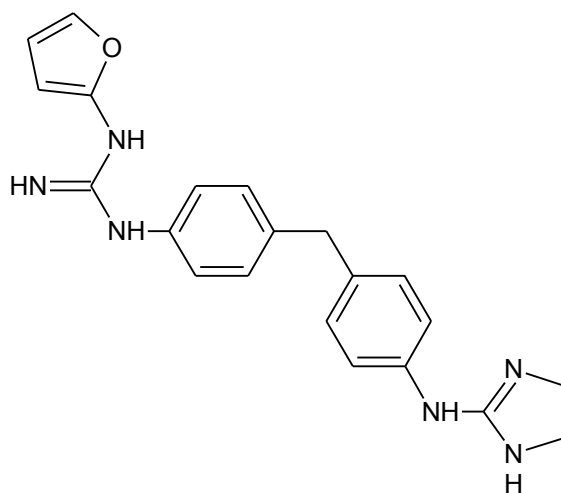
O

3.4 Guanidíny pôsobiace na α -adrenergné receptory

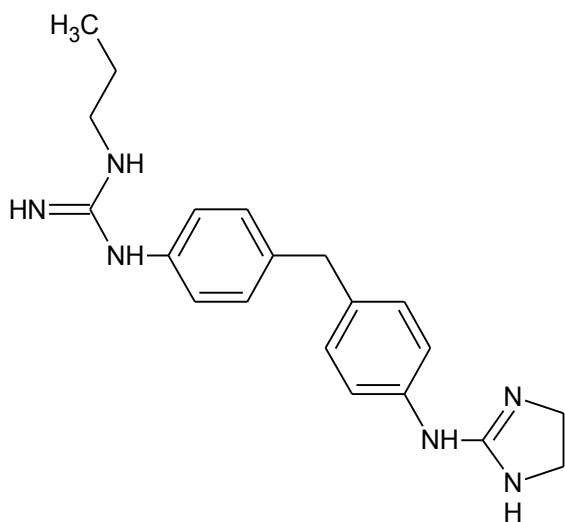
Stále napredujúci výzkum v oblasti neuronálneho pôsobenia liečiv a látok neobišiel ani štúdie ohľadne α 2-adrenergných receptorov. Už z predchádzajúcich štúdií sa vie, že deriváty guanidínov pôsobia agonisticky/antagonisticky na receptory. V štúdií sa zamerali na vytváranie nových molekúl pomocou molekulového dockingu a následnému *in vitro* použitiu ľudských mozgových PFC tkáň, ktorá je dobre známa tým, že má silnú affinitu k α 2 receptorom. Zo všetkých skúšaných látok najlepšie výsledky mali látky, ktoré obsahovali dva spojené fenylguanidíny cez metylénový mostík. (P2-3, Q). Látka (P1) obsahuje guanidín ako súčasť kruhu a spája ďalší fluórfenylový kruh. Látky dosahovali v teste antagonistické ale aj mierne agonistické účinky, zatiaľ, čo látka (Q) len antagonistické[24].



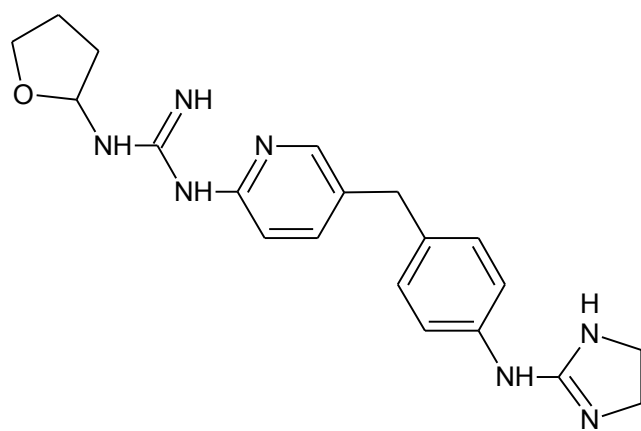
P1



P2



P3



Q

4. Metodika práce

4.1 Chemická časť

Cieľom práce bolo pripraviť nasledujúce látky a následne zistiť ich potencionálnu antifungálnu a antimikrobiálnu aktivitu.

1. 1,1-dimethyl -2-[5-methyl-2-(decylsulfanyl)fenyl]guanidín
2. 1,1-dimethyl -2-[4-methyl-3-(undecylsulfanyl)fenyl]guanidín
3. 2-[4-methyl-3-(undecylsulfanyl)fenyl]guanidinium-nitrát
4. 1,1-dimethyl -2-[4-methyl-3-(dodecylsulfanyl)fenyl]guanidín
5. 2-[4-methyl-3-(undecylsulfanyl)fenyl]guanidinium-nitrát

Syntézou látky 1 bola snaha dosyntetizovať látku a nadviazať na predchádzajúcu diplomovú prácu PharmDr. O. Straku[1], kde východnou látkou bol 4-chlór-3-nitrotoluen. Látky 3-6 mali východnú látku 2-chlór-5-nitrotoluen a bola u nich zisťovaná aj antimikrobiálna a antifungálna aktivita.

Syntéza prebiehala v 4 krokoch. V prvom kroku sa pripravil sulfid reakciou východnej látky a alkanthiolu. V druhom kroku sa redukciou nitroskupiny pripravil amín, ten sa v treťom kroku previedol na anilium-chlorid. V poslednom kroku reakciou s kyanamidom vzniká fenylguanidín, a reakciou s dimethylkyanamidom substituovaný fenylguanidín, ktorý je na guanidínovej skupine dimetylovaný.

4.1.1 Príprava sulfidov

Sulfidy sú zlúčeniny, v ktorých je atóm vodíka v uhlíkovodíku nahradený skupinou -SR. Možno ich považovať za sírne analógy éterov, ale majú významne odlišné chemické vlastnosti. Zatiaľ čo u éterov valenčné elektróny v atóme kyslíka (2p) sú bližšie k jadru, valenčné elektróny v atóme síry sú vzdialenejšie od jadra a teda voľnejšie viazané. Taktiež sa sulfidy ľahšie oxidujú za vzniku sulfoxidov alebo až sulfónov[25].

Pripravené boli nukleofilnou bimolekulárnou substitúciou, kde thiolátový ión reaguje s arylhalogenidom a vzniká sulfid. Reakcia je analógom Williamsovej syntézy éterov.

Pre syntézu látky č.1 bola použitá SCHÉMA 1, pre látky č. 2 - 5 SCHÉMA 2. Sulfidy [26] vznikli reakciou alkanthiolov a substituovaných nitrobenzénov v suchom *N,N*-dimethylformamide, za prítomnosti uhličitanu draselného. Bola použitá aktívna meď[27], ktorá reakciu katalyzovala.

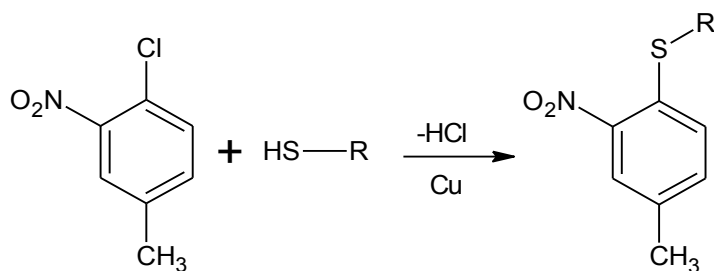


SCHÉMA 1

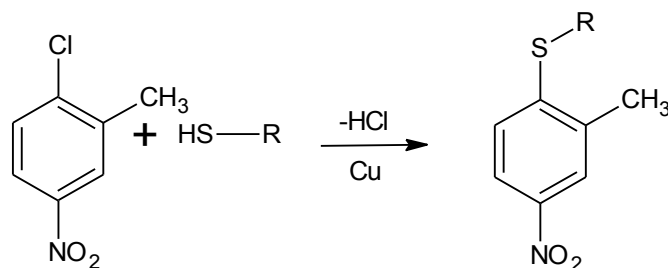


SCHÉMA 2

4.1.2 Redukcia nitrozlúčenín

Redukciou nitrozlúčenín boli pripravené potrebné aromatické amíny. Počas redukcie sú atómy kyslíka nahradzované atómami vodíka. Ide o katalytickú redukciu vodíkom za prítomnosti katalyzátoru. Veľkú rolu zohráva aj pH prostredia. Zatiaľ čo v kyselom prostredí je nitroskupina redukovaná na nitrososkupinu a následne na aminoskupinu SCHÉMA 3, v bazickom prostredí sa tvoria bimolekulárne látky SCHÉMA 4[28]. Ako katalyzátor je možné použiť platínu[29], paládium[30] a Raneyov nikel [31]. Prípadne môže byť ako redukčné činidlo použité železo v kyselom prostredí [32], chlorid cínatý[33], hydrazín a jeho deriváty[34].

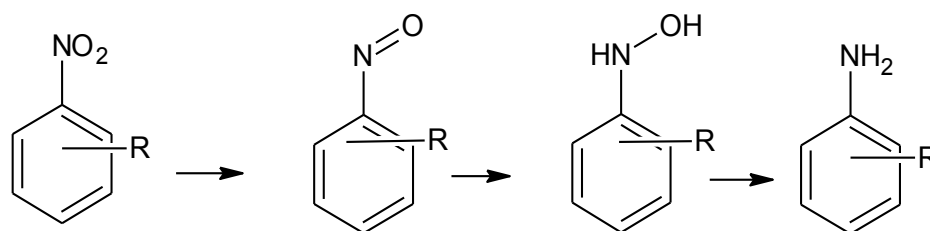


SCHÉMA 3

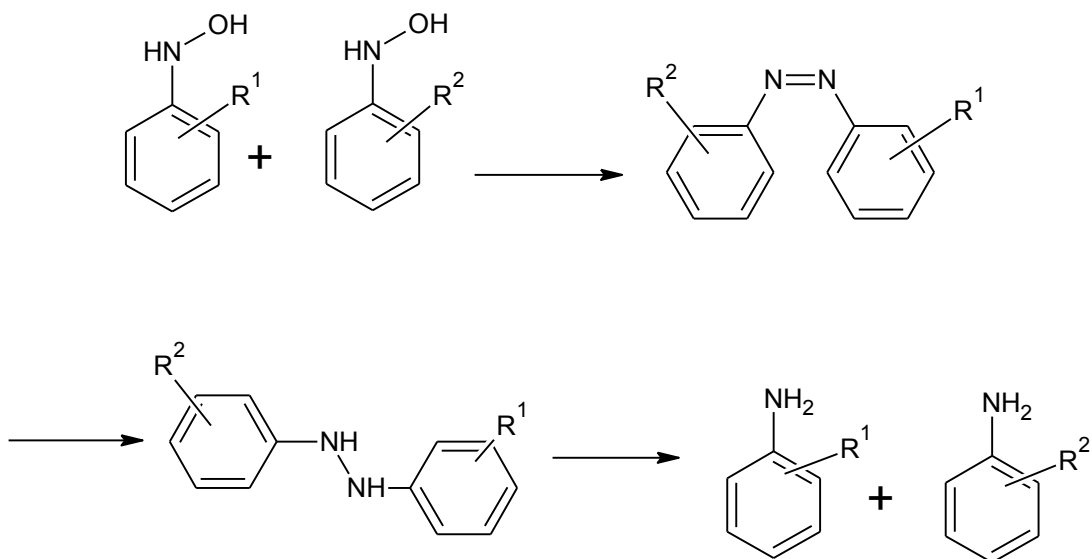


SCHÉMA 4

Syntézy v experimentálnej časti prebiehali podľa: SCHÉMA 5 a SCHÉMA 6. ako redukčné činidlo bol zvolený chlorid cínatý a neutrálne prostredie. Reakcia prebiehala pod ochranou atmosférou dusíka[35]. Neutrálne prostredie by malo znížiť riziko vedľajších reakcií.

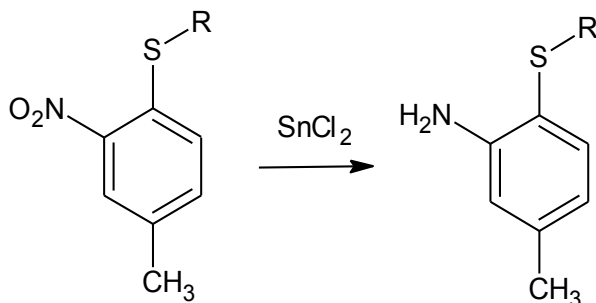


SCHÉMA 5

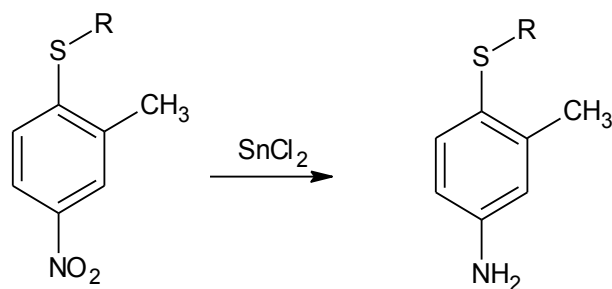


SCHÉMA 6

4.1.3 Príprava anilinium-chloridov

Anilinium-chlorid bol pripravený reakciou amínu rozpusteného v bezvodom éteri s plynným chlorovodíkom SCHÉMA 7 a SCHÉMA 8, ktorý bol privádzaný do reakcie pomocou vyvíjača, kde reagoval chlorid sodný s koncentrovanou kyselinou sírovou [36].

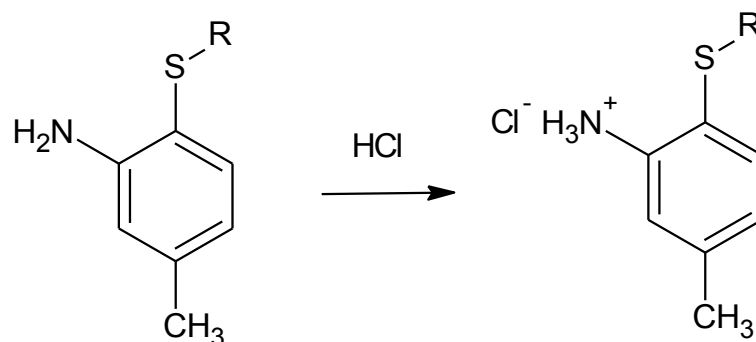


SCHÉMA 7

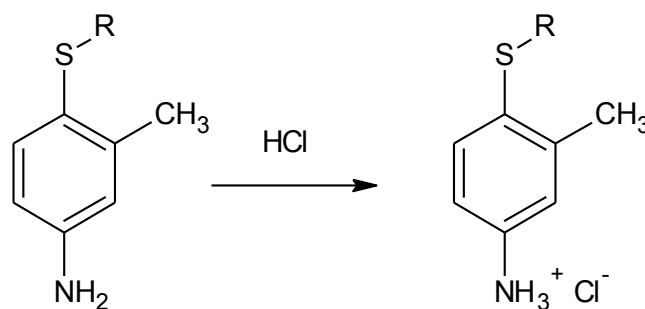


SCHÉMA 8

4.1.4 Príprava arylguanidínov

Na prípravu arylguanidínov bol zvolený postup prípravy v tavenine za normálneho tlaku[37] a mierne kyslého pH 4-5[38], pri pH >5 má tendenciu guanidín dimerizovať[39] a u pH<4 podlieha hydrolyze. Použitá bola reakcia amonium-chloridu so substituovaným kyanamidom SCHÉMA 9.[40], ktorá bola použitá pre látku 1 a SCHÉMA 10 a SCHÉMA 11 pre látky 2 až 5.

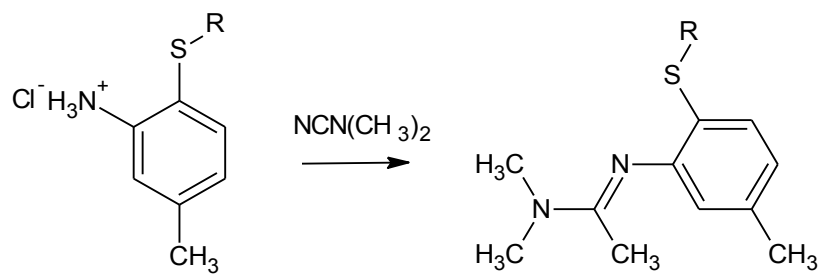


SCHÉMA 9

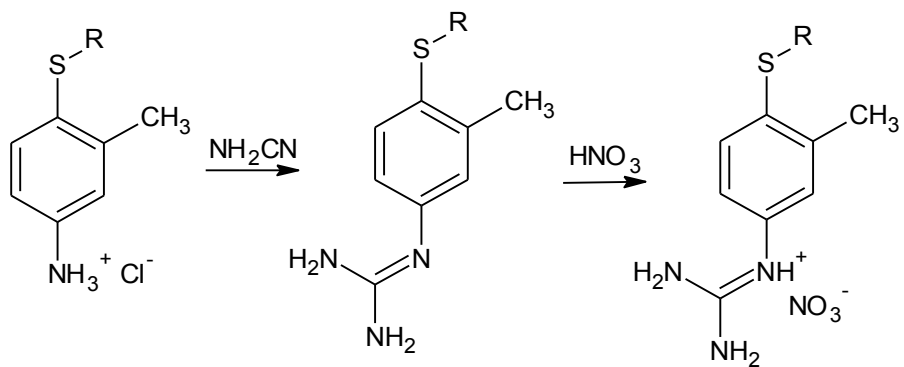


SCHÉMA 10

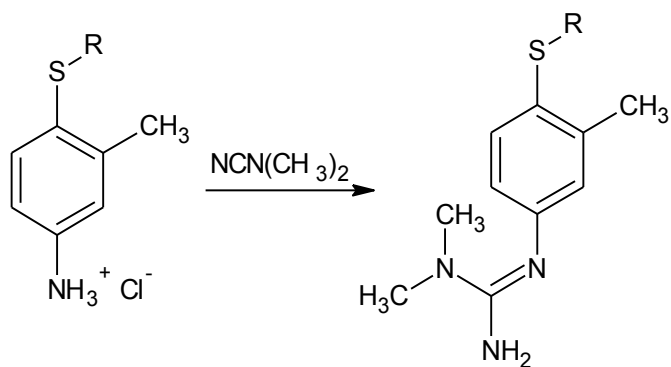


SCHÉMA 11

4.1.5 Celková schéma syntézy

SCHÉMA 12 zobrazuje syntézu látky 1

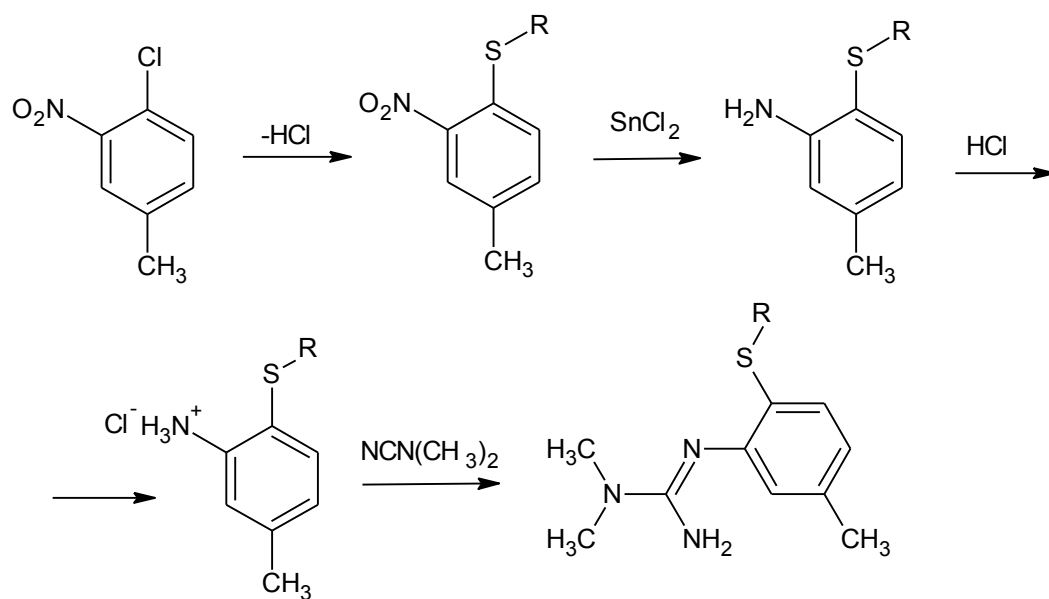


SCHÉMA 12

(SCHÉMA 13) zobrazuje celkovú syntézu látok 2 - 5

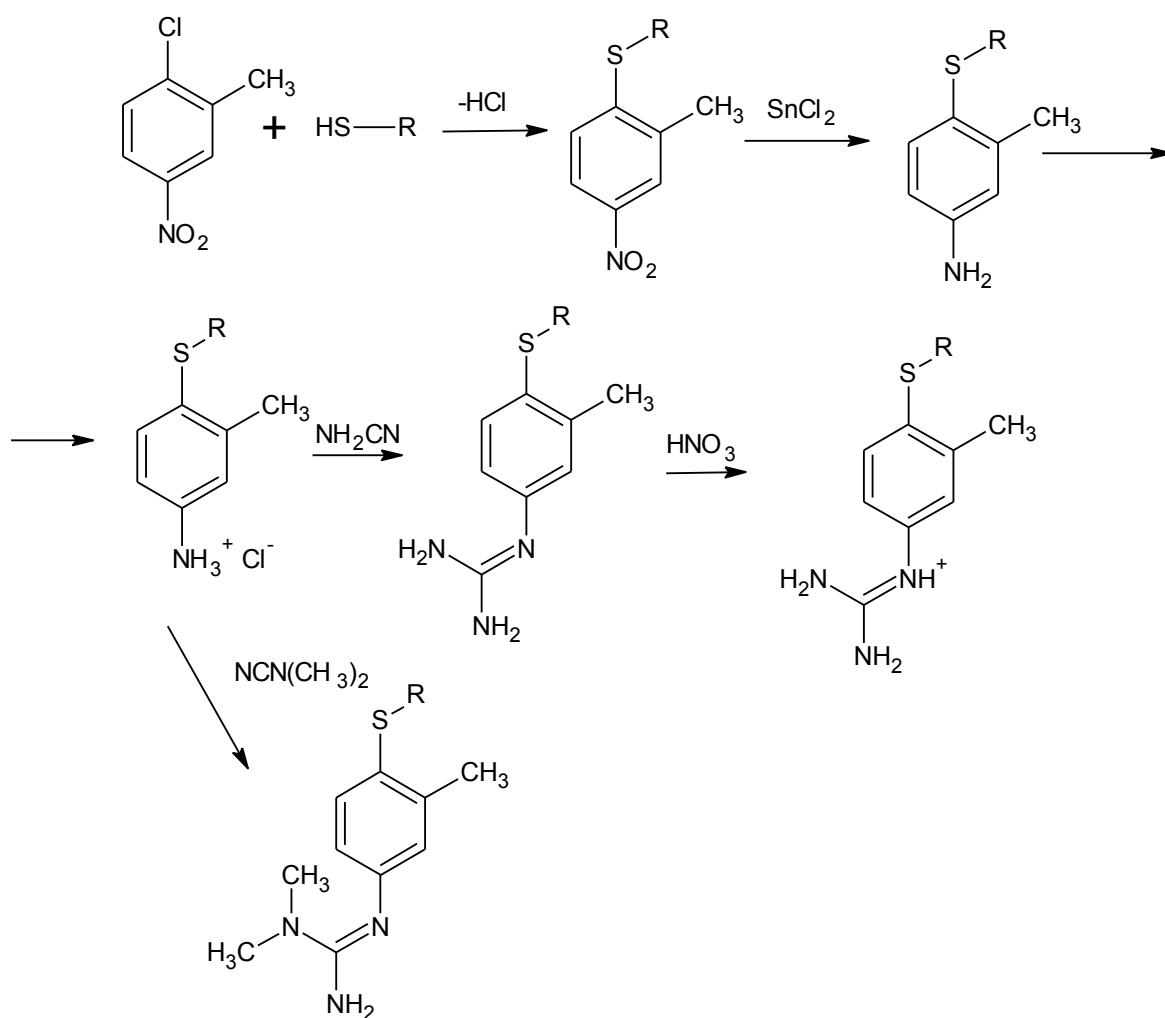


SCHÉMA 13

4.2 Mikrobiologická časť

Ku stanoveniu účinnosti nasyntetizovaných látok bol použitý mikrodilučný bujónový test.

4.2.1 Antimikróbne stanovenie

Táto metóda sa používa ku stanoveniu minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC), ide o najnižšiu možnú koncentráciu, ktorá je dostatočne silná na inhibovanie rastu sledovanej baktérie v mg/ml alebo mg/l, prípadne, a tieto jednotky sú použité aj v práci $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Alebo na stanovenie minimálnej baktericídnej koncentrácie (MBK)- najnižšia nameraná koncentrácia, ktorá v priebehu 24h v *in vitro* v inkubačnej pôde usmrtí sledovaného patogéna udávaná v ml/mg alebo mg/l alebo μmol^{-1} . [41]

Testovanie jednotlivých kmeňov sa robilo na Mueller-Hintonovom bujóne č.2, pH 7,0. Objem média bol 200 μl s 10 μl suspenzie inokula. Inkubácia bola statická, v tme s humidnou atmosférou, Doba inkubácie 24 – 48 h.

Po uplynutí inkubačnej doby sa odčíta vizuálne výsledok a vyhodnotí sa MIC v μmol^{-1} .

4.2.2 Antifungálne stanovenie

Na stanovenie antifungálnej aktivity bol použitý taktiež mikrodilučný bujónový test. Ako metóda bola zvolená mikrodilučná bujónová metóda v dostičkách. Podobne ako u antimikróbnej aktivity

Médium bolo použité RPMI 1640 s glutamánom a 2 % glukóza, ktoré bolo pufované 0,165 mol.l^{-1} MOPS na pH 7,0. Objem média bol 200 μl s 10 μl suspenzie inokula. Inkubačná doba 24 - 48h.

Hodnotenie po uplynutí inkubačnej doby bolo vizuálne MIC = IC₉₅ (95% inhibícia kontroly).

5. Experimentálna časť

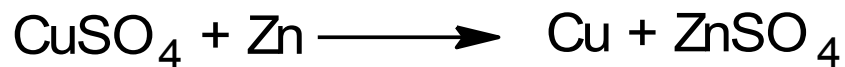
5.1 Syntéza

Infračervené spektrá boli zmerané na jednodrazovom ATR (attenuated total reflectance) nástavci pomocou spektrofotometru Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) v rozmedzí vlnočetov $650\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$. Bol použitý germániový krystal a spektrum merané v rozlíšení 2 cm^{-1} za použitia 128 scanov.

NMR (nukleárna magnetická rezonancia) spektrá boli zmerané pri laboratórnej teplote na prístrojoch Varian VNMR S500 (500 MHz pro ^1H a 126 MHz pro ^{13}C ; Varian Comp., Palo Alto, USA) a JNM-ECZ 600R (600 MHz pro ^1H a 150 MHz pro ^{13}C ; JEOL, Tokio, Japonsko). Ako rozpúšťadlo bol použitý deuterovaný dimethylsulfoxid (DMSO- D_6) alebo chloroform (CDCl_3). Chemické posuny sú uvedené ako hodnoty δ v parts per million (ppm) a boli nepriamo vzťahnuté k tetramethylsilanu ako štandardu pomocou zvyšného signálu rozpúšťadla. Interakčná konštanta (J) je uvedená v Hz, NMR spektrá boli vyhodnotené pomocou programu MestReNova, v.14.2.1 (Mestrelab Research S.L, Santiago de Compostela, Španielsko).

5.1.1 Príprava aktívnej medi [42]

$$M = 63,55 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

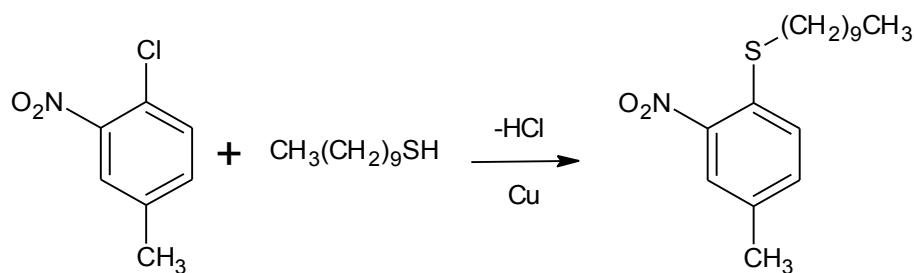


V 200 ml teplej vody sme rozpustili 40,00 g pentahydrátu síranu meďnatého. Po vychladnutí sme postupne pridali 12,00 g práškoveho zinku. Po odfarbení sme zmes dekantovali vodou a následne 3krát s 5% roztokom kyseliny chlorovodíkovej, následne sme dekantovali 5krát s vodou a 3krát s etanolom. Po poslednej dekantácii sme nechali vzniknutú meď pod vrstvičkou etanolu do ďalšieho dňa.

Pred použitím do reakcie sme zmes odfiltrovali, vysušili a ihneď použili potrebné množstvo do reakcie.

5.1.2 Príprava decyl-(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfidu

$$M = 309,47\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$$



V 132 ml bezvodého *N,N*-dimethylformamidu sme rozpustili 16,76 g (0,0961 mol) dekanthiolu. Po rozpustení sme pridali 15,00 g (0,0874 mol) 4-chlór-3-nitrotoluénu, 3,41 g (0,05373 mol) aktívnej medi, 24,94 g (0,1804 mol) bezvodého uhličitanu draselného. Zmes bola zahrievaná za stáleho miešania pri teplote 160 °C po dobu 7 hodín na olejovej lázni pod ochrannou dusíkovou atmosférou.

Priebeh reakcie bol sledovaný pomocou TLC so stacionárnou fázou Silufol UV 254/366 a mobilnou fázou tvorenou zmesou hexán, etanol a triethylamín v pomere 8:1:0,5.

Po prebehnutí reakcie bola zmes ešte za horúca sfiltrovaná. K filtrátu bola po schladnutí pridaná voda do tvorby zákalu. Následne zmes kryštalizovala pri teplote -20 °C po dobu troch dní.

Produkt bol odfiltrovaný a prečistený pomocou rekryštalizácie z ethanolu.

U prečisteného produktu boli zmerané IČ a NMR spektrá.

Praktický výťažok: 23,08g (85 %)

Teplota topenia: 37,2 - 38,0 °C (lit. [1] 35,6 – 36,2 °C)

IČ spektrum- 2964, 2930, 2850, 1608, 1550, 1511, 1463, 1375, 1324, 1295, 1266, 1213, 1165, 1107, 1056, 921, 896, 815

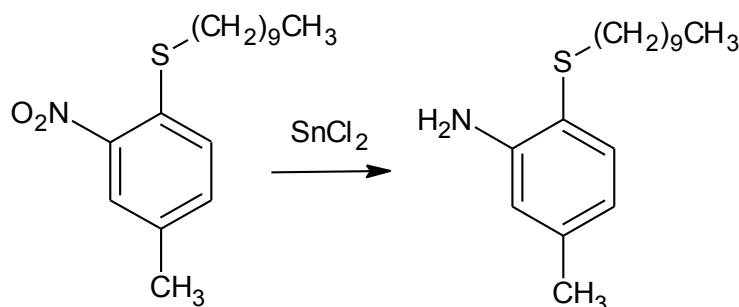
NMR spektrum:

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-D_6$) δ 7.98 (m, 1H, Ar), 7.52 (t, $J = 1.3$ Hz, 2H, Ar), 3.00 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.36 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ar}$), 1.58 (p, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH_2), 1.39 (p, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_2), 1.31 – 1.20 (m, 12H, CH_2), 1.23 (s, 9H), 0.85 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- D_6) δ 146.01, 135.24, 134.93, 132.75, 127.56, 125.59, 31.39, 31.26, 28.88, 28.85, 28.65, 28.49, 28.22, 27.55, 22.06, 19.79, 13.91

5.1.3 Příprava 2-(decylsulfanyl)-5-methylanilinu

$M = 279,48 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



Ku 156 ml bezvodého etanolu sme pridali 12,0 g (0,0388 mol) decyl-(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfidu a 36,80 g (0,1940 mol) chloridu cínatého. Zmes bola za stáleho miešania zahrievaná pri teplote 70 °C po dobu 6 hodín na olejovej lázni pod ochrannou dusíkovou atmosférou.

Priebeh reakcie bol sledovaný pomocou TLC so stacionárnou fázou SILUFOL UV 254/366 a mobilnou fázou tvorenou zmesou hexán, ethanol a triethylamín v pomere 8:1:0,5

Po ukončení reakcie sa zmes nechala vychladnúť. Zalkalizovala sa 5% roztokom hydroxidu sodného (cca 300 ml). Zmes bola 5x vytrepaná do ethylacetátu. Jednotlivé ethylacetátové fázy boli spojené a vysušené bezvodým síranom sodným. Po cca 2 hodinách bol síran sodný odfiltrovaný a zmes bola do sucha oddestilovaná na vákuovej odparke. Produkt reakcie bol následne prečistený rekryštalizáciou pomocou rozpúšťadla ethanol - voda v pomere 2:1. U prečisteného produktu boli zmerané infračervené a NMR spektrá.

Praktický výťažok: 7,6 g (70 %)

Teplota topenia: <20 °C (lit. [1] <15 °C)

IČ spektrum (Ge – ATR, cm⁻¹) : 3450, 3361, 2953, 2923, 2853, 1607, 1487, 1456, 1420, 1377, 1294, 1253, 1175, 1144, 1092, 1037, 944, 795

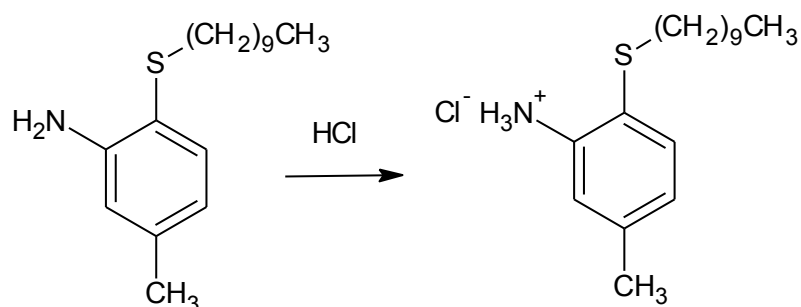
NMR spektrum:

¹H NMR (500 MHz, cdcl₃) δ 7.09 – 7.02 (m, 1H, Ar), 6.41 – 6.23 (m, 2H, Ar), 4.09 (s, 2H, NH₂), 2.48 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH₂-S), 2.04 (s, 3H, CH₃-Ar), 1.34 (p, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH₂) 1.16 (p, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH₂), , 1.11 – 1.02 (m, 12H), 0.68 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (126 MHz, cdCl_3) δ 148.27, 139.92, 136.13, 119.65, 115.64, 115.17, 35.34, 32.04, 29.83, 29.69, 29.44, 29.34, 28.86, 22.82, 21.43, 14.26

5.1.4 Príprava 2-(decylsulfanyl)-5-methylanilinium-chloridu

$M = 280,49 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



V 20 ml bezvodého étheru sme rozpustili 2,5 g (0,0095 mol) 2-(decylsulfanyl)-5-methyl anilinu . Roztok bol umiestnený do vodnej ľadovej lázne a bol sýtený plynným chlorovodíkom. Zmes sa následne ponechala kryštalizovať pri $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Vzniklý produkt bol odfiltrovaný a použitý do ďalšej reakcie. Boli zmerané infračervené a NMR spektrá.

Praktický výt'azok: 2,45g (98 %)

Teplota topenia: $99,4 - 101,2 \text{ }^\circ\text{C}$ (lit. [1] $99,1 - 100,8 \text{ }^\circ\text{C}$)

IČ spektrum ($\text{Ge} - \text{ATR}, \text{cm}^{-1}$): 3025, 2953, 2924, 2852, 2743, 2678, 2563, 2287, 1978, 1579, 1553, 1494, 1477, 1378, 1294, 1258, 1075, 813

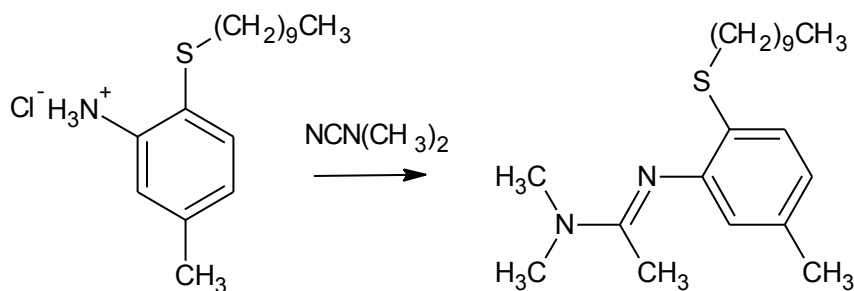
NMR spektrum:

^1H NMR (500 MHz, dms) δ 9.28 (s, 3H, NH_3^+), 7.41 (d, $J = 7.9 \text{ Hz}$, 1H, Ar), 7.26 (d, $J = 1.8 \text{ Hz}$, 1H, Ar), 7.08 – 7.02 (m, 1H, Ar), 2.85 (t, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.27 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ar}$), 1.49 (p, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 2H, CH_2), 1.33 (p, $J = 6.7 \text{ Hz}$, 2H, CH_2), 1.28 – 1.16 (m, 12H, CH_2), 0.84 (t, $J = 6.8 \text{ Hz}$, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, dms) δ 138.36, 135.53, 133.78, 127.28, 124.24, 122.82, 34.57, 33.80, 31.30, 28.94, 28.70, 28.58, 28.06, 22.10, 20.58, 13.93

5.1.5 Príprava 1,1-dimethyl -2-[2-(decylsulfanyl)-5-methylfenyl]guanidinu

M = 363,60g.mol⁻¹



1,00 g (0,003165 mol) 2-(decylsulfanyl)- 5-methylanilinium-chloridu sme zmiešali s 0,27g (0,003831 mol) dimethylkvanamidu. Zmes bola zahrievaná 60 minút pri teplote 110 °C.

Reakcia bola sledovaná pomocou tenkovrstvej chromatografie. Stacionárna fáza SILUFOL UV 254/366 a mobilná fáza zmes hexán, etanol, triethylamín v pomere 8:1:0,5.

Po vychladnutí bola zmes zriedená horúcou vodou a následne zalkalizovaná 5% roztokom hydroxidu sodného (cca 100 ml). zmes bola 3x vytrepaná do ethylacetátu. Ethylacetátové fázy boli spojené a vysušené síranom sodným po dobu 2 hodín. Po odfiltrovaní síranu sodného bola zmes do sucha odparená na vákovej odparke. Produkt bol následne rozpustený v ethanole a ponechaný kryštalizovať. Zmes bola následne oddestilovaná do sucha (keďže produkt nekryštalizoval) a znovu rozpustený v hexáne a ponechaný kryštalizovať pri teplote -20 °C po dobu 3 dni. Následne dosucha oddestilovaný, keďže látka znovu nekryštalizovala a u výslednej medovej látky bola spravená tenkovrstvá chromatografia, ale vyšlo niekoľko škvŕn, látka bola prečistená pomocou stĺpcovej chromatografie na silikagéli ako stacionárnej fáze, za použitia hexánu a ethylacetátu ako mobilných fáz. Získaná látka bola najskôr na vákovej odparke odparená do sucha a následne prekryštalizovaná z hexánu. U produktu v podobe medovej látky boli zmerané infračervené a NMR spektrá.

Praktický výtťažok – 0,75g (75 %)

Teplota topenia- u medovej látky sa teplota topenia nedala určiť

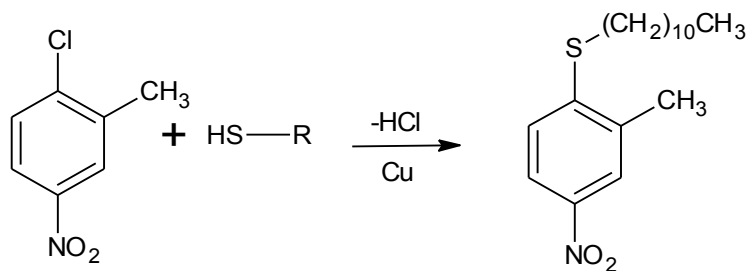
IČ spektrum (Ge – ATR, cm⁻¹): 2954, 2923, 2853, 1658, 1606, 1584, 1488, 1456, 1418, 1339,1295, 1295, 1254,1175, 1144, 1098, 927, 794

NMR spektrum:

^1H NMR (500 MHz, dms o) δ 7.09 (dd, $J = 9.3, 7.9$ Hz, 1H, Ar), 6.63 (d, $J = 73.6$ Hz, 2H, Ar), 4.11 (s, 2H), 3.46 (qd, $J = 7.0, 5.0$ Hz, 4H,), 3.10 (d, $J = 1.3$ Hz, 9H,), 2.92 (s, 4H, $\text{CH}_3\text{-N}$), 2.76 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.21 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ar}$), 1.57 – 1.46 (m, 2H, CH_2), 1.37 (m, 2H, CH_2), 1.32-1.19 (m, 14H, CH_2), 1.08 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H, CH_3), 0.90 – 0.84 (m, 3H, CH_3).

5.1.6 Príprava 2-methyl-4-nitrofenyl(undecyl)sulfidu

$M = 323,49 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



V 80 ml bezvodého *N,N*-dimethylformamidu sme rozpustili 11,0 g (0,0584 mol) undekanthiolu. Po rozpustení sme rozpustili 8,5 g (0,0500 mol) 2-chlór-5-nitrotoluénu, 1,88 g (0,0136 mol) aktívnej medi, 13,76 g (0,1000 mol) bezvodého uhličitanu draselného. Zmes bola zahrievaná za stáleho miešania pri teplote 160°C po dobu 7 hodín v olejovom kúpeli pod ochrannou dusíkovou atmosférou.

Priebeh reakcie bol sledovaný pomocou TLC so stacionárnou fázou SILUFOL UV 254/366 a mobilnou fázou tvorenou zmesou hexán, etanol a triethylamín v pomere 8:1:0,5.

Po prebehnutí reakcie bola zmes ešte za horúca sfiltrovaná. K filtrátu bola po schladnutí pridaná voda do tvorby zákalu. Následne sa zmes nechala kryštalizovať pri teplote - 20 °C po dobu troch dní.

Produkt bol odfiltrovaný a prečistení pomocou rekryštalizácie z ethanolu.

U prečisteného produktu boli zmerané infračervené a NMR spektrá.

Praktický výtťažok: 14,43g (90 %)

Teplota topenia: 41,3 - 41,8 °C

IČ spektrum (Ge – ATR, cm^{-1}) : 2950, 2917, 2848, 1597, 1577, 1505, 1464, 1384, 1342, 1305, 1266, 1201, 1193, 1061, 1038, 923, 888, 825

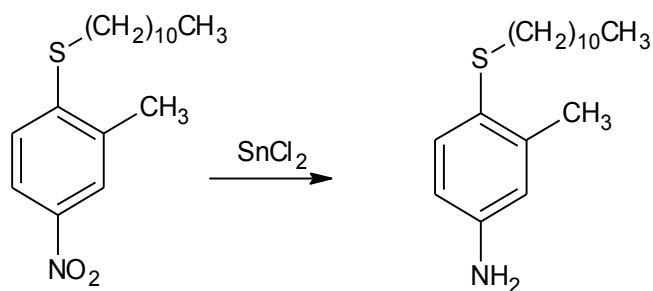
NMR spektrum:

^1H NMR (500 MHz, dmso) δ 8.05 – 7.98 (m, 2H, Ar), 7.47 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, Ar), 3.10 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.35 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ar}$), 1.68 (p, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH_2), 1.45 (p, $J = 6.9$ Hz, 2H, CH_2), 1.35 – 1.20 (m, 14H, CH_2), 0.86 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, dmsO) δ 146.72, 143.84, 135.76, 124.52, 123.48, 120.97, 30.86, 30.67, 28.54, 28.50, 28.43, 28.23, 28.08, 27.79, 27.66, 21.62, 19.04, 13.40.

5.1.7 Príprava 3-methyl-4-(undecylsulfanyl)anilínu

$M = 293,51 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



Ku 65 ml bezvodého etanolu sme pridali 5,00 g (0,0155 mol) 2-methyl-4-nitrofenyl(undecyl)sulfidu a 14,30 g (0,0754 mol) chloridu cínateho. Zmes bola za stáleho miešania zahrievaná pri teplote 70°C po dobu 6 hodín v olejovom kúpeli pod ochrannou atmosférou dusíka.

Priebeh reakcie bol sledovaný pomocou TLC so stacionárnou fázou SILUFOL UV 254/366 a mobilnou fázou tvorenou zmesou hexán, etanol a triethylamín v pomere 8:1:0,5.

Po ukončení reakcie sa zmes nechala vychladnúť. Zalkalizovala sa 5% roztokom hydroxidu sodného (cca 300 ml). Zmes bola 5x vytrepávaná do ethylacetátu. Jednotlivé ethylacetátové fázy boli spojené a vysušené bezvodým síranom sodným. Po cca 2 hodinách bol síran sodný odfiltrovaný a zmes bola do sucha oddestilovaná na vákuovej odparke. Produkt reakcie bol následne prečistený rekryštalizáciou pomocou rozpúšťadla ethanol, voda v pomere 2:1. U prečisteného produktu boli zmerané infračervené a NMR spektrá.

Praktický výťažok: 2,5g (55 %)

Teplota topenia: 42,1 - 44,1 °C

IČ spektrum (Ge – ATR, cm^{-1}) : 3390, 3310, 2947, 2917, 2850, 1629, 1596, 1571, 1482, 1471, 1453, 1376, 1307, 1283, 1252, 1180, 1056, 873

NMR spektrum:

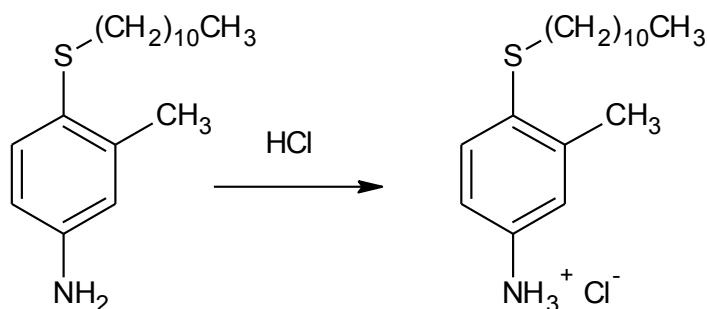
¹H NMR (500 MHz, dmsO) δ 7.05 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, Ar), 6.45 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, Ar), 6.36 (dd, $J = 8.3, 2.6$ Hz, 1H, Ar), 5.10 (s, 2H, NH₂), 2.60 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂-S),

2.24 (s, 3H, CH₃-Ar), 1.42 (p, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂), 1.36 – 1.26 (m, 2H, CH₂), 1.28 – 1.18 (m, 14H, CH₂), 0.85 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, dmsO) δ 148.48, 140.57, 134.70, 118.53, 115.61, 112.24, 35.06, 31.34, 29.02, 28.98, 28.79, 28.76, 28.66, 28.07, 22.14, 20.55, 18.55, 13.94.

5.1.8 Příprava 3-methyl-4-(undecylsulfanyl)anilium-chloridu

$M = 329,97 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



V 15 ml bezvodého étheru sa rozpustili 2,0 g (0,0068mol) 3-methyl-4-(undecylsulfanyl)anilinu. Roztok bol umiestnený do vodnej ľadovej lázne a bol sýteným plynným chlorovodíkom. Zmes sa následne ponechala kryštalizovať pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzniklý produkt bol odfiltrovaný a použitý do ďalšej reakcie. Boli zmerané infračervené a NMR spektrá.

Praktický výtťažok: 1,96g (98 %)

Teplota topenia: $99,5 - 101,3\text{ }^{\circ}\text{C}$

IČ spektrum (Ge – ATR, cm^{-1}) : 3495, 3325, 2955, 2920, 2851, 2608, 1605, 1568, 1531, 1481, 1465, 1449, 1378, 1299, 1254, 1107, 1059, 807

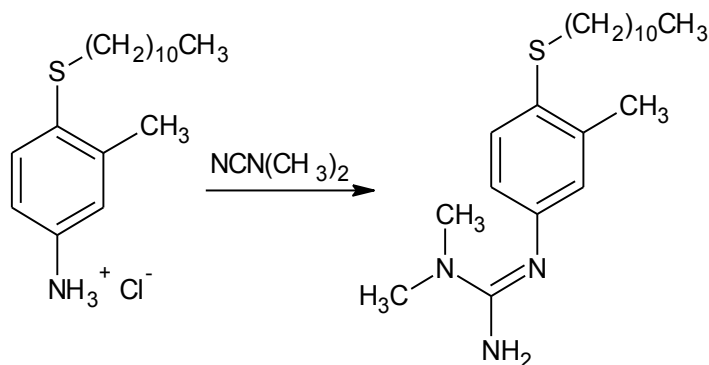
NMR spektrum:

^1H NMR (500 MHz, dms) δ 10.37 (s, 3H, NH_3^+), 7.33 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, Ar), 7.24 – 7.17 (m, 2H, Ar), 2.92 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.25 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ar}$), 1.57 (p, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH_2), 1.38 (p, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2), 1.29 – 1.17 (m, 14H, CH_2), 0.87 – 0.80 (m, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, dms) δ 137.36, 136.12, 129.13, 127.47, 124.45, 121.45, 39.94, 31.68, 31.52, 29.22, 29.17, 28.95, 28.80, 28.45, 22.32, 19.95, 14.13.

5.1.9 Príprava 1,1-dimethyl -2-[3-methyl-4-(undecylsulfanyl)fenyl]guanidínu

M = 363,60g.mol⁻¹



0,8 g (0,0024 mol) 3-methyl-4-(undecylsulfanyl)anilinium-chloridu sme zmiešali s 0,21 g (0,0030 mol) dimethylkvanamidu. Zmes bola zahrievaná 60 minút pri teplote 110 °C.

Reakcia bola sledovaná pomocou tenkovrstvej chromatografie. Stacionárna fáza SILUFOL UV 254/366 a mobilná fáza zmes hexán, etanol, triethylamín v pomere 8:1:0,5.

Po vychladnutí bola zmes zriedená horúcou vodou a následne zalkalizovaná 5% roztokom hydroxidu sodného (cca 50 ml). Zmes bola 3x vytrepaná do ethylacetátu. Ethylacetátové fázy boli spojené a vysušené síranom sodným po dobu 2 hodín. Po odfiltrovaní síranu sodného bola zmes do sucha odparená na vákuovej odparke. Produkt bol následne prekryštalizovaný 2x z ethanolu. U produktu boli zmerané infračerené a NMR spektrá.

Praktický výt'azok: 52g (47 %)

Teplota topenia: 5,5 - 39,7 °C

IČ spektrum (Ge – ATR, cm⁻¹) : 3462, 3191, 2958, 2921, 2852, 1634, 1583, 1475, 1465, 1426, 1308, 1055

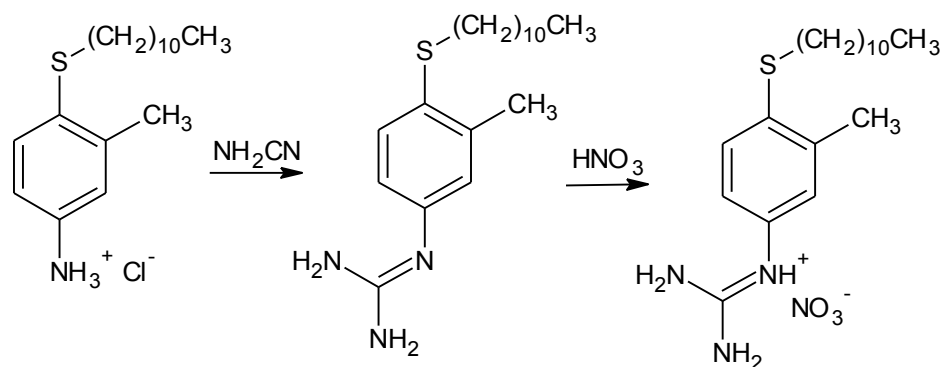
NMR spektrum:

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆) δ 9.19 (s, 1H, NH), 7.58 (s, 1H, Ar), 7.37 – 7.28 (m, 1H, Ar), 7.08 – 7.01 (m, 1H, Ar), 3.66 (s, 1H, NH), 3.06 (s, 6H, CH₃-N), 2.93 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂-S), 2.27 (s, 3H, CH₃-Ar), 1.58 (p, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 1.40 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 1.32 – 1.16 (m, 14H, CH₂), 0.88 – 0.81 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- D_6) δ 155.27, 137.18, 133.75, 133.53, 127.68, 125.99, 122.75, 38.50, 31.61, 31.28, 28.97, 28.93, 28.69, 28.55, 28.36, 28.20, .22.08, 19.88, 13.94

5.1.10 Příprava 2-[3-methyl-4-(undecylsulfanyl)fenyl]guanidinium-nitrátu

$M = 412,59 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



0,80 g (0,0024 mol) 3-methyl-4-(undecylsulfanyl)anilinium-chloridu sme zmiešali s 0,13 g (0,0031 mol) kyanamidu. Zmes bola zahrievaná 40 minút pri teplote $110 \text{ }^\circ\text{C}$.

Reakcia bola sledovaná pomocou tenkovrstvej chromatografie. Stacionárna fáza SILUFOL UV 254/366 a mobilná fáza zmes hexán, etanol, triethylamín v pomere 8:1:0,5.

Po schladnutí bola zmes nariedená teplou vodou a okyslená kyselinou dusičnou a nechaná kryštalizovať v chlade. Kryštály boli vákuovo odfiltrované a následne prekryštalizované z destilovanej vody okyselené kyselinou dusičnou. U produktu boli zmerané infračervené a NMR spektrá.

Praktický výtťažok: 0,45g (50 %)

Teplota topenia: $65,1 - 67,3 \text{ }^\circ\text{C}$

IČ spektrum (Ge – ATR, cm^{-1}) : 3463, 2956, 2917, 2852, 1700, 1666, 1641, 1622, 1473, 1394, 1327, 1247, 1181, 1125, 1064, 1044, 1027, 889

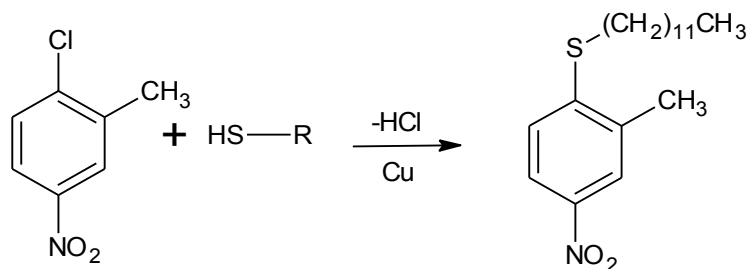
NMR spektrum:

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 9.45 (s, 1H, NH^+), 7.32 (d, $J = 8.3 \text{ Hz}$, 1H, Ar), 7.28 (s, 4H, NH_2), 7.11 – 7.03 (m, 2H, Ar), 2.94 (t, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.27 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ar}$), 1.59 (p, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 2H, CH_2), 1.40 (p, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 2H, CH_2), 1.30 - 1.20 (m, 14H, CH_2), 0.85 (t, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 156.36, 137.78, 135.08, 132.60, 128.00, 126.94, 123.68, 31.99, 31.82, 29.51, 29.46, 29.23, 29.09, 28.88, 28.74, 22.63, 20.37, 14.49.

5.1.11 Príprava dodecyl(2-methyl-4-nitrofenyl)sulfidu

$M = 337,52 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



V 140 ml bezvodého *N,N*-dimethylformamidu sme rozpustili 19,46 g (0,0961 mol) dodekanthiolu. Po rozpustení sme pridali 15,00 g (0,0874 mol) 2-chlór-5-nitrotoluénu, 2,58g (0,0406 mol) aktívnej medi, 22,32 g (0,1615 mol) bezvodého uhličitanu draselného. Zmes bola zahrievaná za stáleho miešania pri teplote 160 °C po dobu 11 hodín v olejovej lázni pod ochrannou dusíkovou atmosférou.

Priebeh reakcie bol sledovaný pomocou TLC so stacionárnou fázou SILUFOL UV 254/366 a mobilnou fázou tvorenou zmesou hexán, etanol a triethylamín v pomere 8:1:0,5.

Po prebehnutí reakcie bola zmes ešte za horúca sfiltrovaná. K filtrátu bola po schladnutí pridaná voda do tvorby zákalu. Následne sa zmes nechala kryštalizovať pri teplote - 20 °C po dobu troch dní.

Produkt bol odfiltrovaný a prečistený pomocou rekryštalizácie z ethanolu.

U prečisteného produktu boli zmerané infračervené a NMR spektrá.

Praktický výtťažok: 19,65 g (67 %)

Teplota topenia: 43,3 - 48,3 °C

IČ spektrum (Ge – ATR, cm^{-1}) : 2954, 2919, 2852, 1595, 1577, 1500, 1470, 1436, 1385, 1338, 1309, 1301, 1268, 1245, 1192, 1147, 1062, 1040

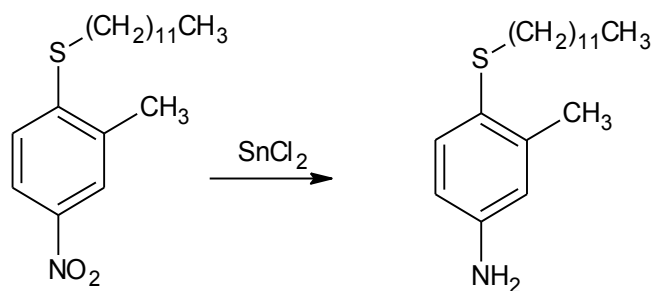
NMR spektrum:

^1H NMR (500 MHz, dmsO) δ 8.05 – 7.98 (m, 2H, Ar), 7.46 (dd, $J = 8.6, 2.4$ Hz, 1H, Ar), 3.13 – 3.06 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.35 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ar}$), 1.67 (p, $J = 7.7$ Hz, 2H, CH_2), 1.45 (p, $J = 6.6$ Hz, 2H, CH_2), 1.36 – 1.20 (m, 16H), 0.86 (t, $J = 2.0$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, dmsO) δ 146.73, 143.84, 135.76, 124.52, 123.49, 120.97, 30.87, 30.67, 28.58, 28.56, 28.50, 28.43, 28.24, 28.08, 27.79, 27.66, 21.63, 19.04, 13.41.

5.1.12 Příprava 4-(dodecylsulfanyl)-3-methylanilinu

M = 307,54 g.mol⁻¹



Ku 100 ml bezvodého etanolu sme pridali 8,00 g (0,0237 mol) dodecyl(2-methyl-4-nitrofenyl)sulfidu a 22,40 g (0,1181 mol) chloridu cínatého. Zmes bola za stáleho miešania zahrievaná pri teplote 70 °C po dobu 7 hodín v olejovej lázni pod ochrannou atmosférou dusíka.

Priebeh reakcie bol sledovaný pomocou TLC so stacionárnou fázou SILUFOL UV 254/366 a mobilnou fázou tvorenou zmesou hexán, etanol a triethylamín v pomere 8:1:0,5.

Po ukončení reakcie sa zmes nechala vychladnúť. Zalkalizovala sa 5% roztokom hydroxidu sodného (cca 300 ml). Zmes bola 5x vytrepaná do ethylacetátu. Jednotlivé ethylacetátové fázy boli spojené a vysušené bezvodým síranom sodným. Ďalší deň bol síran sodný odfiltrovaný a zmes bola do sucha oddestilovaná na vákuovej odparke. Produkt reakcie bol následne prečistený rekryštalizáciou pomocou rozpúšťadla ethanol, voda pomere 2:1. U prečisteného produktu boli zmerané infračervené a NMR spektrá.

Praktický výtťažok: 7,50 g (82 %)

Teplota topenia: 43,5 - 45,1 °C

IČ spektrum (Ge – ATR, cm⁻¹) : 3390, 3308, 3205, 2944, 2913, 2849, 1630, 1597, 1571, 1482, 1472, 1465, 1452, 1308, 1382, 1373, 1340, 1253

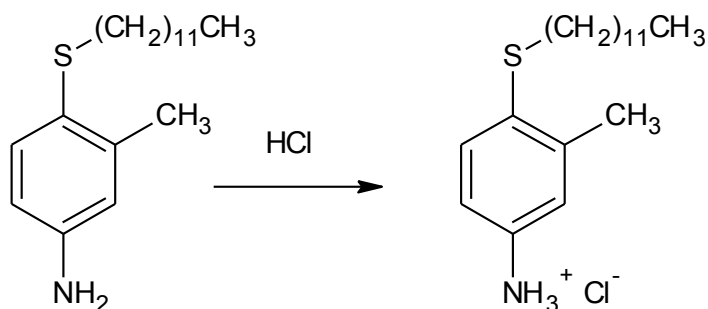
NMR spektrum:

¹H NMR (500 MHz, cdcl₃) δ 7.21 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar), 6.56 (dd, *J* = 2.6, 0.7 Hz, 1H, Ar), 6.48 (dd, *J* = 8.2, 2.6 Hz, 1H, Ar), 3.61 (s, 2H, NH₂), 2.70 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂-S), 2.37 (s, 3H, CH₃-Ar), 1.55 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂) 1.38 (p, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 1.32 – 1.22 (m, 16H), 0.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, cdCl_3) δ 145.87, 141.56, 134.38, 123.48, 117.07, 113.34, 35.68, 32.06, 29.78, 29.77, 29.73, 29.67, 29.49, 29.37, 28.98, 22.83, 20.97, 14.26.

5.1.13 Příprava 4-(dodecylsulfanyl)-3-methylanilium-chloridu

$M = 344,0 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



V 20 ml bezvodého étheru sme rozpustili 2,00 g (0,00650 mol) 4-(dodecylsulfanyl)-3-methylanilinu. Roztok bol umiestnený do vodnej ľadovej lázne a bol sýtený plynným chlorovodíkom. Zmes sa následne ponechala kryštalizovať pri $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Produkt bol odfiltrovaný a použitý do ďalšej reakcie. Boli zmerané IČ a NMR spektrá.

Praktický výtťažok: 2,05g (93 %)

Teplota topenia: $98,9 - 101,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$

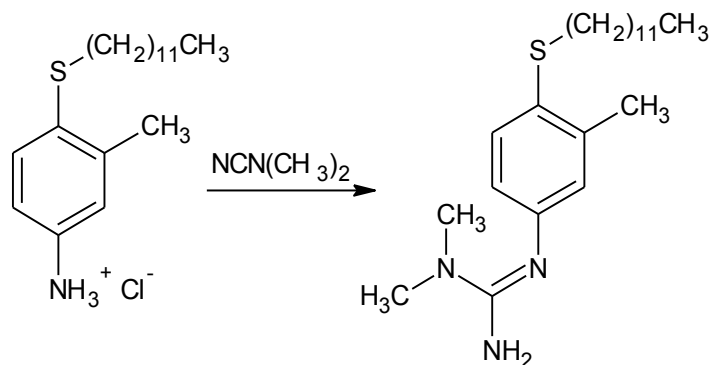
IČ spektrum (Ge – ATR, cm^{-1}) : 2955, 2919, 2852, 2665, 2559, 1599, 1550, 1527, 1493, 1480, 1379, 1340, 1296, 1246, 1172, 1097, 1062, 812

NMR spektrum :

^1H NMR (500 MHz, dms) δ 7.34 (d, $J = 9.0 \text{ Hz}$, 1H, Ar), 7.16 (p, $J = 2.2 \text{ Hz}$, 2H, Ar), 2.90 (t, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.30 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ar}$), 1.58 (p, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 2H, CH_2), 1.40 (p, $J = 6.9 \text{ Hz}$, 2H, CH_2), 1.32-1.21 (m, 16H), 0.86 (t, $J = 6.8 \text{ Hz}$, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, dms) δ 137.74, 134.07, 130.74, 128.55, 123.26, 120.14, 32.12, 30.89, 28.59, 28.54, 28.50, 28.26, 28.15, 27.80, 21.64, 19.49, 13.43.

5.1.14 Príprava 1,1-dimethyl -2-[4-(dodecylsulfanyl)- 3-methylfenyl]guanidinu
M = 377,63g.mol⁻¹



0,70 g (0,0021 mol) 4-(dodecylsulfanyl)- 3-methylanilinium-chloridu sme zmiešali s 0,18 g (0,0043 mol) dimethylkyanamidu. Zmes bola zahrievaná 60 minút pri teplote 110 °C.

Reakcia bola sledovaná pomocou tenkovrstvej chromatografie. Stacionárna fáza SILUFOL UV 254/366 a mobilná fáza zmes hexán, etanol, triethylamín v pomere 8:1:0,5.

Po vychladnutí bola zmes zriedená horúcou vodou a následne zalkalizovaná 5% roztokom hydroxidu sodného (cca 50 ml). Zmes bola 3x vytrepaná do ethylacetátu. Ethylacetátové fázy boli spojené a vysušené síranom sodným po dobu 2 hodín. Po odfiltrovaní síranu sodného bola zmes do sucha odparená na vákuovej odparke. Produkt bol následne prekryštalizovaný opakovane z ethanolu. U produktu boli zmerané infračervené a NMR spektrá.

Praktický výtťažok: 0,41 g (45 %)

Teplota topenia: 62,2 - 62,8 °C

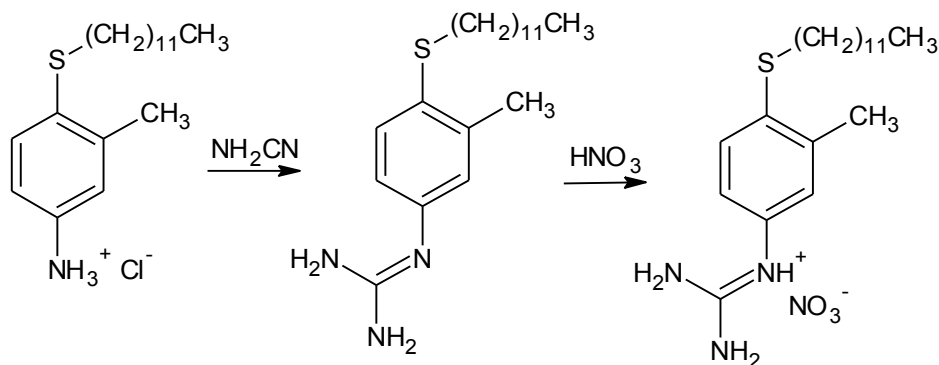
IČ spektrum (Ge – ATR, cm⁻¹): 3443, 2920, 2850, 1634, 1544, 1330, 1060, 658, 636, 621, 606

NMR spektrum:

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆) δ 9.48 (s, 1H, NH₂), 9.21 (s, 1H, NH₂), 7.91-6.99 (m, 3H, Ar), 3.10 – 3.01 (m, 6H, CH₃-N), 2.95 – 2.89 (m, 2H, CH₂-S), 2.32 (s, 1H, CH₃-Ar), 2.26 (s, 1H, CH₃-Ar), 1.58 (p, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 1.46-1.36 (m, 2H, CH₂), 1.32-1.14 (m, 16H, CH₂), 0.84 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃).

5.1.15 Príprava 2-[4-(dodecylsulfanyl)-3-methylfenyl]guanidinium-nitrátu

$M = 398,56 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



0,70 g (0,0021 mol) 4-(dodecylsulfanyl)-3-methylanilinium-chloridu sme zmiešali s 0,11 g (0,0027 mol) kyanamidu. Zmes bola zahrievaná 40 minút pri teplote $110 \text{ }^\circ\text{C}$.

Reakcia bola sledovaná pomocou tenkovrstvej chromatografie. Stacionárna fáza SILUFOL UV 254/366 a mobilná fáza zmes hexán, etanol, triethylamín v pomere 8:1:0,5.

Po schladnutí bola zmes nariedená teplou vodou a okyslená kyselinou dusičnou a nechaná kryštalizovať v chlade. Kryštály boli vákuovo odfiltrované a následne prekryštalizované z destilovanej vody okyselené kyselinou dusičnou. U produktu boli zmerané infračervené a NMR spektrá.

Praktický výťažok: 0,39g (49 %)

Teplota topenia: $63,1 - 65,3 \text{ }^\circ\text{C}$

IČ spektrum (Ge – ATR, cm^{-1}): 3520, 3462, 3415, 3367, 2959, 2920, 2850, 1671, 1660, 1623, 1482, 1472, 1394, 1337, 1248, 820

NMR spektrum:

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 9.50 (s, 1H, NH^+), 7.31 (d, $J = 7.9 \text{ Hz}$, 1H Ar + 4H NH_2), 7.10 – 7.03 (m, 2H, Ar), 2.93 (t, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.27 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ar}$), 1.59 (p, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 2H, CH_2), 1.40 (p, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 2H, CH_2), 1.31-1.16 (m, 16H), 0.85 (t, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- D_6) δ 155.84, 137.27, 134.51, 132.10, 127.50, 126.35, 123.09, 31.51, 31.32, 29.04, 29.03, 28.98, 28.95, 28.72, 28.58, 28.37, 28.23, 22.11, 19.83, 13.96.

5.2 Mikrobiologická časť

	Názov nasyntetizovanej látky	Štruktúra
A	2-[3-methyl-4-(undecylsulfanyl)fenyl]guanidinium-nitrát	
B	2-[4-(dodecylsulfanyl)-3-methylfenyl]guanidinium-nitrát	
C	1,1-dimethyl -2-[3-methyl-4-(undecylsulfanyl)fenyl]guanidin	
D	1,1-dimethyl -2-[4-(dodecylsulfanyl)-3-methylfenyl]guanidin	

Látky boli poslané na mikrobiologické testy aby sa zistila ich potencióálna antimikrobiálna a antifungálna aktivita.

5.2.1 Antibakteriálna aktivita

Antimikrobiálna aktivita bola testovaná na kmeňoch:

SA-*Staphylococcus aureus*

EC-*Esterichia coli*

MRSA- *methicil rezistentný*

KP- *Klebsiella pneumoniae*

Staphalococcus aureus

ACI- *Acinetobacter baumannii*

SE- *Staphylococcus epidermis*

PA- *Pseudomonas aeruginosa*

EF- *Enterococcus feacali*

Ako štandardy boli použité **NEOM-** *neomycin* a **BAC-** *bacitracin*.

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₉₅ (μmol.l ⁻¹)					
		A	B	C	D	BAC	NEOM
SA	24h	500	>500	3,9	31,25	3,9	15,62
	48h	>500	>500	7,81	31,25	3,9	31,25
MRSA	24h	500	>500	3,9	31,25	0,98	15,62
	48h	>500	>500	7,81	31,25	0,98	31,25
SE	24h	500	>500	1,87	31,25	3,9	15,62
	48h	>500	>500	3,9	31,25	7,81	31,25
EF	24h	500	>500	15,62	31,25	250	31,25
	48h	>500	>500	31,25	31,25	250	31,25
EC	24h	250	>500	>500	31,25	0,98	>500
	48h	500	>500	>500	62,5	0,98	>500
KP	24h	62,5	>500	250	31,25	0,98	>500
	48h	62,5	>500	500	62,5	0,98	>500
ACI	24h	250	>500	500	31,25	-	-
	48h	250	>500	>500	31,25	-	-
PA	24h	250	>500	>500	250	7,81	>500
	48h	250	>500	>500	250	15,6	>500

5.2.2 Antifungálna aktivita

Antifungálna aktivita bola testovaná na kmeňoch:

CA- *Candida albicans*

AF- *Aspergillus fumigatus*

CK- *Candida krusei*

AFla- *Aspergillus flavus*

CP- *Candida parapsilosis*

AC- *Absidia corymbifera*

CT- *Candida tropicalis*

TI- *Trichophyton interdigitale*

Ako štandard boli použité **DOD-** *dodin* a **KET-** *ketokonazol*

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC($\mu\text{mol.l}^{-1}$)					
		A	B	C	D	DOD	KET
CA	24h	7,81	15,62	7,81	15,62	7,81	<0,24
	48h	15,62	15,62	7,81	15,62	7,81	<0,24
CK	24h	7,81	15,62	7,81	7,81	3,91	0,98
	48h	15,62	15,62	7,81	15,62	3,91	0,98
CP	24h	7,81	15,62	7,81	7,81	-	-
	48h	15,62	15,62	7,81	15,62	-	-
CT	24h	7,81	15,62	7,81	15,62	3,91	1,95
	48h	15,62	15,62	7,81	15,62	3,91	3,91
AF	24h	15,62	15,62	7,81	125	7,81	7,81
	48h	31,25	31,25	15,62	125	15,63	7,81
AFla	24h	15,62	62,5	15,62	250	-	-
	48h	31,25	62,5	31,25	500	-	-
AC	24h	15,62	62,5	15,62	125	62,5	31,25
	48h	31,25	62,5	31,25	125	62,5	31,25
TI	72h	15,62	62,5	15,62	31,25	15,63	0,98
	120h	31,25	125	15,62	62,5	15,63	0,98

6. Diskusia

6.1 Chemické hodnotenie

Príprava fenyylguanidínov prebiehala v štyroch krokoch. Syntetizovaných bolo niekoľko látok.

Látka 1 - 1,1-dimethyl-2-[2-(decylsulfanyl)-5-methylfenyl]guanidín mala ako východzu látku 4-chlor-3-nitrotoluén. Pokúšala som sa ju dosyntetizovať podľa návodu od predchodcu, ale ako jemu sa ani mne ju nepodarilo vykryštalizovať. Zostala v banke ako medová látka a tak bola odoslaná aj na spektrá. Napriek niekoľkým pokusom o kryštalizáciu z rôznych rozpúšťadiel (ethanol, ethanol : voda, hexán) látka stále nekryštalizovala, i keď podľa hodnotenia TLC mala už len jednu viditeľnú škvrnu. Aj tak sa nám nepodarilo pripraviť čistú látku, ale zostávala stále ako medová látka v banke. Z dôvodu toho, že látka zostala v medovej podobe nebola ani odoslaná na mikrobiologické testy.

Podľa návodu som pokračovala aj u látok decyl(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfid, 2-(decylsulfanyl)-5-methyl-anilín, 2-(decylsulfanyl)-5-methyl-anilium-chlorid, ktoré som porovnala s predchádzajúcou diplomovou prácou [1]. U mojej nitrolátky je vyššia teplota topenia, čo mohli spôsobiť nečistoty, ktoré aj napriek rekryštalizácii na TLC neboli vidieť. Anilínové a anilium-chloridové látky sú si v hodnotách teplôt topenia podobné. U 2-(decylsulfanyl)-5-methyl-anilínu sa látku nedarilo prekryštalizovať, pretože sa topila už pri izbovej teplote.

Látky 2 - 11 boli pripravené z 5-methyl-2-nitrotoluénu. Výsledné 4 látky boli niekoľkokrát prekryštalizované a následne odoslané na NMR a IČ spektrá.

Prvý krok – príprava alkyl-(2-methyl-4-nitrofenyl)sulfid derivátov prebiehala najľahšie a výťažky reakcie sa pohybovali v hodnotách 66 – 90 %. Jednotlivé produkty reakcie boli niekoľkokrát prečistené rekryštalizáciou z etanolu. Kryštalizácia prebiehala bez problémov.

Druhý krok syntézy- príprava 4-methyl-3-(alkylsulfanyl)anilínu redukciou z látky vzniknutej v prvom kroku, bola obťažnejšia. Ostatné látky vzniknuté v druhom kroku sa podarilo prečistiť rekryštalizáciou z etanolu. Výťažky reakcií- 55- 83%.

Tretí krok príprava hydrochloridu prebiehal takmer 100 % Výťažky reakcií boli 93- 98%.

Posledný krok syntézy- príprava 1,1-dimethyl -2-[3-methyl-4-(dodecylsulfanyl)fenyl]guanidinu bola u všetkých 3 syntéz pomerne zložitá na kryštalizáciu. Látka 1 je popísaná vyššie. Látky 2 a 4 sa po prečistení rekryštalizáciou podarilo získať v čistej forme a ich výťažky boli v rozmedzí 45-75%. Problém s kryštalizáciou mohol byť spôsobený nečistotami.

Syntéza látok 2 a 5 pomocou kyanamidu mala výťažky reakcií 49-60%. Výsledné produkty boli prevádzané na nitrátové soli z dôvodu zlej kryštalizácie. Po prevedení látky kryštalizovali a boli následne prečistené.

6.2 Mikrobiologické hodnotenie

6.2.1 Antibakteriálna aktivita

Výsledky testov na antimikrobiálnu aktivitu ukazujú, že nasyntetizované látky majú nižšiu až porovnateľnú hodnotu MIC ako použité štandardy. Látka C- 1,1-dimethyl -2-[3-methyl-4-(undecylsulfanyl)fenyl]guanidin, zaznamenal nižšiu MIC oproti štandardu antibiotika „Bacitracín“ a podľa výsledkov by mohla byť potenciónálna antibakteriálna látka proti *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermis*.

Proti použitému štandardu „Neomycín“ boli pozorované nižšie MIC u látky C: 1,1-dimethyl -2-[4-methyl-3-(undecylsulfanyl)fenyl]guanidin u *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, a látka B je v všetkých patogénov MIC lepšia alebo porovnateľná so štandardom.

6.2.2 Antifungálna aktivita

Výsledky testov na antifungálnu aktivitu zisťovanu u nasyntetizovaných látok ukazujú vyššiu hodnotu MIC ako štandardy. U látky C: 1,1-dimethyl -2-[4-methyl-3-(undecylsulfanyl)fenyl]guanidin sú podľa výsledkov nižšie alebo porovnateľné hodnoty MIC ako štandard DOD, ale vyššie ako štandard KET. Javí sa ako účinná antifungálna látka proti všetkým sledovaným patogénom, v porovnaní s DOD štandardom okrem pathogénom *Candida krusei* a *Candida tropicalis*, pri ktorých má hodnotu MIC vyššiu. Preto by daná látka mohla byť potenciónálnym zdrojom ďalších štúdií.

7. Záver

7.1 Prehľad novosyntetizovaných látok

1. 1,1-dimethyl -2-[2-(decylsulfanyl)-5-methylfenyl]guanidin
2. 1,1-dimethyl -2-[3-methyl-4-(undecylsulfanyl)fenyl]guanidin
3. 2-[3-methyl-4-(undecylsulfanyl)fenyl]guanidinium-nitrát
4. 1,1-dimethyl -2-[4-(dodecylsulfanyl)-3-methylfenyl]guanidin
5. 2-[3-methyl-4-(undecylsulfanyl)fenyl]guanidinium-nitrát
6. 2-methyl-4-nitrofenyl(undecyl)sulfid
7. 3-methyl-4-(undecylsulfanyl)anilin
8. 3-methyl-4-(undecylsulfanyl)anilium-chlorid
9. dodecyl-(2-methyl-4-nitrofenyl)sulfid
10. 4-(dodecylsulfanyl)-3-methylanilin
11. 4-(dodecyl-sulfanyl)-3-methylanilium-chlorid

Tieto syntetizované látky neboli doposiaľ popísané v literatúre.

Všetky pripravené látky boli popísané pomocou infračervených spektier a nukleárnej magnetickej rezonancie.

Látky číslo 2 – 5, boli odoslané na biologické testy a vykazovali aktivitu ako mikrobiálnu tak antifungálnu.

8. Použitá literatúra

- [1] O. Straka, "Syntéza substituovaných arylguanidínů jako potencionálních léčiv XIII," Diplomová práce, Katedra organické a bioorganické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Hradec Králové, 2018, p. 33-35
- [2] Babečková M. a kol., "Antimikrobiálne látky," Slovenská akadémia vied, 1999. <https://beliana.sav.sk/heslo/antimikrobialne-latky> (accessed Aug. 13, 2021).p. 15
- [3] Martínková J. a kol., Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů. Praha: Grada Publishing, a.s., 2018, p.387-393
- [4] Beran V., Franko B., "Nové antimikrobiálne látky," in Bakalárska práce, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická 2019, p. 15.
- [5] L. Brinkac, A. Voorhies, A. Gomez, and K. E. Nelson, "The Threat of Antimicrobial Resistance on the Human Microbiome," *Microb. Ecol.*, vol. 74, no. 4, pp. 1001–1008, 2017, doi: 10.1007/s00248-017-0985-z.
- [6] Hampl F., Paleček J.: Farmakochemie. 1. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2002. Str. 253-260. ISBN 80-7080-495-5
- [7] Faria-Ramos I, Farinha S, Neves-Maia J, et al. Development of cross-resistance by *Aspergillus fumigatus* to clinical azoles following exposure to prochloraz, an agricultural azole. *BMC Microbiol.* 2014;14:155. Published 2014 Jun 11. doi:10.1186/1471-2180-14-155.
- [8] C. Dhivya, S. A. A. Vandarkuzhali, and N. Radha, "Antimicrobial activities of nanostructured polyanilines doped with aromatic nitro compounds," *Arab. J. Chem.*, vol. 12, no. 8, p. 3785–3798, 2019, doi: 10.1016/j.arabjc.2015.12.005.
- [9] F. Gao, T. Wang, J. Xiao, and G. Huang, "Antibacterial activity study of 1,2,4-triazole derivatives," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 173, p. 274–281, 2019, doi: 10.1016/j.ejmech.2019.04.043.
- [10] M. F. El Shehry, M. M. Ghorab, S. Y. Abbas, E. A. Fayed, S. A. Shedid, and Y. A. Ammar, "Quinoline derivatives bearing pyrazole moiety: Synthesis and biological evaluation as possible antibacterial and antifungal agents," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 143, pp. 1463–1473, 2018, doi: 10.1016/j.ejmech.2017.10.046.

- [11] Aldred, Katie J et al. "Mechanism of quinolone action and resistance." *Biochemistry* vol. 53,(2014): 1565-74. doi:10.1021/bi5000564
- [12] M. G. Rabbani and M. R. Islam, "Synthesis and Characterization of Some NH-Analogues of Ciprofloxacin on Antibacterial, Antifungal, and Cytotoxic Activities," *J. Sci. Res.*, vol. 12, no. 3, p. 349–362, 2020, doi: 10.3329/jsr.v12i3.42804.
- [13] A Convenient Synthesis, Reactions and Biological Activity of Some New 6H-Pyrazolo[4',3':4,5]thieno[3,2-d][1,2,3]triazine Compounds as Antibacterial, Anti-Fungal and Anti-Inflammatory Agents [accessed Sep 08 2021].," *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 29, No. 12, p. 2482-2495, 2018.
- [14] O. Politeo, M. Jukic, and M. Milos, "Food Chemistry Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L .) compared with its essential oil," *Food Chemistry*" vol. 101, p. 379–385, 2007, doi: 10.1016/j.foodchem.2006.01.045.
- [15] Sundararajan B, Moola AK, Vivek K, Kumari BDR. Formulation of nanoemulsion from leaves essential oil of *Ocimum basilicum* L. and its antibacterial, antioxidant and larvicidal activities (*Culex quinquefasciatus*). "*Microb Pathog*". 2018 Dec;p. 475-485. doi: 10.1016/j.micpath.2018.10.017
- [16] " J. Gupta, "Biological activities of marine guanidine alkaloids," *Mater. Today Proc.*, vol. 37, no. Part 2, p. 3246–3250, 2020, doi:10.1016/j.matpr.2020.09.095.
- [17] A. Jares-ErijmanRyuichi Sakai, and Kenneth L. Rinehart, Crambescidins: new antiviral and cytotoxic compounds from the sponge *Crambe crambe*, *The Journey of Organic Chemistry*, no. 1, p. 5712–5715, 1991, <https://doi.org/10.1021/jo00019a049>
- [18] J. A. Rubiolo, M. Roel, M. R. Vieytes, and O. Thomas, "Mechanism of cytotoxic action of crambescidin-816 on human liver-derived tumour cells," *Chem. Res. Toxicol.* 2013, 26, p. 1655–1667, 2014, doi: 10.1111/bph.12552.
- [19] Y. Shi, Y. Moazami, and J. G. Pierce, "Structure, synthesis and biological properties of the pentacyclic guanidinium alkaloids," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 25, no. 11. p. 2817–2824, 2017, doi: 10.1016/j.bmc.2017.03.015.

- [20] A. El-Demerdash et al., “Comprehensive virtual screening of the antiviral potentialities of marine polycyclic guanidine alkaloids against sars-cov-2 (Covid-19),” *Biomolecules*, vol. 11, no. 3, p. 1–25, 2021, doi: 10.3390/biom11030460.
- [21] C. G. Moore, P. J. Murphy, H. L. Williams, A. T. McGown, and N. K. Smith, “Synthetic studies towards ptilomycalin A: total synthesis of crambescidin 359,” *Tetrahedron*, vol. 63, no. 47, p. 11771–11780, 2007, doi: 10.1016/j.tet.2007.08.055.
- [22] D. A. Pasov, Alexander A., Vassiliev, Pavel M., Lenskaya, Karina V., Anisimova, Vera A., Kuzmenko, Tatyana A., Morkovnik, Anatolii S., Kosolapov, Vadim A. and Babkov, “Hypoglycemic potential of cyclic guanidine derivatives,” *Pure Appl. Chem.* vol. 89, no. 8, p. 1007–1016, 2017.
- [23] B. J. Neves et al., “Deep Learning-driven research for drug discovery: Tackling malaria,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 16, no. 2, p. 1–21, 2020, doi: 10.1371/journal.pcbi.1007025.
- [24] M. McMullan et al., “Di-aryl guanidinium derivatives : Towards improved a 2-Adrenergic affinity and antagonist activity,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, ISSN 0223-5234, vol. 209, 2021, doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112947.
- [25] F. Devínsky et al., *Organická chémie*. Martin: Osveta, 2001, p.460-462.
- [26] M. Uher, K. Antos a L. Floch , “Synthesis and infrared spectra of p-isothiocyanatophenyl alkyl sulfides and p-isothiocyanatophenyl alkyl sulfones,” *Sb. Pr. Chem. Fak. SVST*, p. 23–28, 1967.
- [27] M. Rajsner, J. Metysova, E. Svatek, F. Miksik, M. Protiva, Neurotropicand psychotropic agents. LXXVIII. The 2- and 3-fluoro derivativesof clorotepin and related compounds. The 6- and 7-fluoro derivativeof chlorprothixene, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 40 (1975)719–737
- [28] H. e. a. Becker: *Organická synthesesa (Organikum)*: Academia, Praha 1971, p. 546
- [29] D. R. Levering, F. L. Morritz a E. Lieber: The Promoter Effect of Platinic Chloride on Raney Nickel. I. General Effects on Type W-6 Catalyst, *Journal of the American Chemical Society*, 1950, 72(3), p.1190–1194.

- [30] J. G. Young, W. H. Hartung a H. H. Daniels: Palladium catalysis. VI. The reproducibility of palladium-charcoal catalysts, *Journal of Organic Chemistry*, 1953, 18, p.229-234.
- [31] H. Gilman a D. L. Esmay: The Cleavage of Heterocycles with Raney Nickel and with Lithium, *Journal of the American Chemical Society*, 1953, p.2947–2949.
- [32] A. T. Fuller, I. M. Tonkin a J. Walker: Chemotherapeutic agents of the sulphone type. Part II. Sulphones related to benzamidine and benzylamine, *Journal of the Chemical Society*, 1945, p. 633.
- [33] R. Baltzly a C. Ferry: New Compounds. Some Mono- and Disubstituted Guanidines, *Journal of the American Chemical Society*, 1942, 64(9), p.2231–2232..
- [34] E. Wiberg a A. Jahn: Über die hydrierende Wirkung ätherischer Lösungen von Aluminiumwasserstoffhalogeniden, *Zeitschrift für Naturforschung*, 1952, 7(9-10),p. 581. .
- [35] F. D. Bellamy a K. Ou: Selective reduction of aromatic nitro compounds with stannous chloride in nonacidic and nonaqueous medium, *Tetrahedron Letters*, 1984, 25(8),p. 839-42. .
- [36] K. Palat, V. Jesina, V. Dusek a C. Vrba: Studies on local anesthetics. XXV. Basic esters of diphenylcarbamic acids. II, *Česko-Slovenská Farmacie*, 1959, p.8.
- [37] R.H. McKee, On the oxygen ethers of the ureas: methyl- and ethylisourea, *Am. Chem. J.* 26 (1901), p. 209–264
- [38] R. Waditschatka, “Process for the production of guanidine derivatives,” US 5276186, 1994.
- [39] R. Lihotzky, Cyanamid. In: Ullmans: *Encyklopadie der technischem chemie*. 1979, p. 642-645
- [40] A. G. Schering-Kahlbaum, “Procédé de préparation de guanidine substitué,” FR 659004, 1928.
- [41] [https://www.jfmed.uniba.sk/fileadmin/jlf/Pracoviska/ustav-mikrobiologie-a-
imunologie/distanca_vyuka/slov_13_Mikr._prakt._ATB.pdf](https://www.jfmed.uniba.sk/fileadmin/jlf/Pracoviska/ustav-mikrobiologie-a-imunologie/distanca_vyuka/slov_13_Mikr._prakt._ATB.pdf) (accessed Aug. 02, 2021).

[42] Ľ. Krasnec, M. Marko., Základy preparatívnej organickej chémie I. Bratislava:
Slovenské vydavateľstvo technickej literatúry, 1962,p. 144