

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA ORGANICKÉ A BIOORGANICKÉ CHEMIE**



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**SYNTEZA A HODNOCENÍ POTENCIÁLNÍCH ANTIMIKROBIÁLNÍCH SLOUČENIN NA  
BÁZI TERPENŮ**

**ZUZANA KLEKAROVÁ**

Vedoucí bakalářské práce: doc. PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.

**HRADEC KRÁLOVÉ 2024**

## **Prohlášení**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením doc. PharmDr. Mgr. Martina Krátkého, Ph.D. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 6. 9. 2024

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce panu doc. PharmDr. Mgr. Martinu Krátkému, Ph.D., za vřelý přístup a vedení bakalářské práce. Také děkuji Mgr. Enikě Šikorové, zejména za věnovaný čas a trpělivost při práci v laboratoři. Dále děkuji paní laborantce Idě Dufkové a PharmDr. Ondřeji Jand'ourkovi, Ph.D., z Katedry biologických a lékařských věd za zdárný průběh a stanovení antimikrobiální aktivity.

Práce byla podpořena z prostředků projektů Národního institutu virologie a bakteriologie (Program EXCELES, ID: LX22NPO5103) – financováno Evropskou unií – Next Generation EU a Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NW24-05-00549.

# Obsah

Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
1. Úvod.....	8
2. Teoretická část.....	10
2.1. Antibiotická rezistence.....	10
2.1.1. Příčiny vzniku rezistence.....	10
2.1.2. Mechanismus rezistence.....	11
2.1.3. Nová antibiotika.....	11
2.2. Terpeny – struktura, výskyt vlastnosti.....	12
2.2.1. Obecná charakteristika.....	12
2.2.2. Klasifikace.....	12
2.2.2.1 Monoterpeny.....	12
2.2.2.2 Seskviterpeny.....	13
2.2.2.3 Diterpeny.....	14
2.2.2.4 Triterpeny.....	14
2.2.2.5 Tetraterpeny.....	15
2.2.3 Význam pro člověka.....	16
2.2.4 Antimikrobiální účinky terpenů.....	17
2.2.4.1 Grampozitivní bakterie.....	18
2.2.4.2 Gramnegativní bakterie.....	20
2.2.4.3 Mykobakterie.....	21
2.2.4.4 Houby.....	22
2.3 Antimikrobiální aminokyselinové deriváty.....	22
3 Cíle práce.....	25
4 Experimentální část.....	26
4.1 Chemická část.....	26
4.1.1 Obecná metodika.....	26
4.2.1 Syntéza esterů (ZK1-ZK6) a jejich charakterizace.....	27
4.2.1.1 Obecný postup.....	27
4.2.1.2 Charakterizace připravených látek.....	28
4.2.2 Syntéza esterů aminokyselin a charakterizace.....	34
4.2.2.1 Postup.....	34
4.2.2.2 Charakterizace.....	35

4.2	Biologická část.....	44
4.2.1	Stanovení antibakteriální aktivity .....	44
4.2.2	Stanovení antimykotické aktivity.....	44
4.2.3	Stanovení antifungální aktivity .....	45
5	Výsledky a diskuze .....	47
6	Závěr .....	51
7	Seznam zkratk .....	52
8	Seznam obrázků .....	54
9	Seznam tabulek .....	55
10	Seznam použité literatury .....	56

## Abstrakt

Antibiotika jsou jedním z nejdůležitějších lékařských objevů. Antibiotická rezistence je s nimi neodmyslitelně spjata a lidstvo se s ní musí vypořádávat již od počátku používání antibiotik. Šíří se zejména neuváženým užíváním antibiotických přípravků. Jedním ze způsobů, jak rezistenci předcházet, je objevovat nové třídy antibiotik, na které jsou stále citlivé i rezistentní kmeny. Mezi látky s potenciálním antimikrobiálním působením patří přírodní terpeny a jejich deriváty, modifikované pro vyšší účinnost.

Pro zvýšení antimikrobiálních účinků terpenů bylo různou modifikací molekuly chlorthymolu syntetizováno 14 sloučenin, které byly následně testovány na svou antibakteriální, antimykotickou a antifungální aktivitu. Antibakteriální aktivitu prokázaly pouze dvě látky, a to 4-chlor-2-isopropyl-5-methylfenyl-[(benzyloxy)karbonyl]-*L*-valinát (ZK-7a) a 4-chlor-2-isopropyl-5-methylfenyl-isonikotinát (ZK-5) s minimální inhibiční koncentrací (MIC) 125–500  $\mu\text{mol/l}$ .

Slabá inhibiční aktivita se ukázala také vůči houbám, kdy 4-chlor-2-isopropyl-5-methylfenyl-[(benzyloxy)karbonyl]-*L*-valinát (ZK-7a) byl aktivní proti všem osmi testovaným kmenům s MIC 125–500  $\mu\text{mol/l}$ . Většina ostatních látek dokázala inhibovat pouze *Trichophyton interdigitale* s MIC 125–250  $\mu\text{mol/l}$ .

Nejlepší výsledky dosáhly sloučeniny při antimykobakteriálním testování, kdy většina syntetizovaných látek inhibovala růst *Mycobacterium kansasii* s MIC 7,61-62,5  $\mu\text{g/ml}$ . Nejdolnější pak zůstalo *Mycobacterium avium*, kde testované sloučeniny dosáhly vyšších hodnot MIC mezi 62,5 a 125  $\mu\text{g/ml}$  a dvě sloučeniny neúčinkovaly vůbec.

**Klíčová slova:** antibiotická rezistence, antimikrobiální sloučeniny, chlorthymol, mykobakterie, syntéza, terpeny

# Abstract

Antibiotics are one of the most important medical discoveries. Antibiotic resistance is intrinsically linked to them, and mankind has had to deal with it since the beginning of antibiotic use. It spreads mainly through the reckless use of antibiotic drugs. One way to prevent resistance is to discover new classes of antibiotics to which resistant strains are still susceptible. Among the substances with potential antimicrobial activity are terpenes based on a molecule of natural origin, modified for greater efficacy.

To improve antimicrobial effects of terpenes, 14 compounds were synthesized by various modifications of the chlorothymol molecule and subsequently tested for their antibacterial, antimycobacterial and antifungal activities. Only two compounds showed antibacterial activity, namely 4-chloro-2-isopropyl-5-methylphenyl-[(benzyloxy)carbonyl]-L-valinate (ZK-7a) and 4-chloro-2-isopropyl-5-methylphenyl-isonicotinate (ZK-5) with minimum inhibitory concentration (MIC) 125–500  $\mu\text{mol/l}$ .

Weak inhibitory activity was also shown against fungi, with 4-chloro-2-isopropyl-5-methylphenyl-[(benzyloxy)carbonyl]-L-valinate (ZK-7a) being active against all eight strains tested with an MIC of 125–500  $\mu\text{mol/l}$ . Most of the other compounds were only able to inhibit *Trichophyton interdigitale* with MICs of 125–250  $\mu\text{mol/l}$ .

The best results were found in antimycobacterial testing, where most of the synthesized compounds inhibited the growth of *Mycobacterium kansasii* with MIC 7.61–62.5  $\mu\text{g/ml}$ . *Mycobacterium avium* was the most resistant with higher concentrations of antibiotics with MICs between 62.5 and 125  $\mu\text{g/ml}$  and two compounds had no effect.

**Keywords:** antibiotic resistance, antimicrobial compounds, chlorothymol, mycobacteria, synthesis, terpenes

# 1. Úvod

Antibiotika bývají právem označována jako největší lékařský objev 20. století. Od prvních dní zachraňují miliony životů nejen při léčbě infekčních onemocnění, ale díky nim mohou být realizovány různé lékařské postupy, jako je léčba rakoviny, transplantace orgánů nebo otevřené operace srdce. Ačkoli antibiotika zažila největší nárůst popularity v minulém století, o jejich účincích se vědělo již před 2000 lety Číně, Řecku nebo Srbsku, kdy se plesnivými chleby obkládaly hnisavé rány. Před více než 100 lety pak světlo světa spatřila prolečiva na bázi arsenu salvarsan a neosalvarsan, vyvinutá Paulem Ehrlichem pro léčbu infekcí způsobených *Treponema pallidum*. Postupně však byly nahrazeny sulfonamidy (první širokospektrá antibiotika) a následně penicilinem. Objev penicilinu a objevení jeho beta-laktamové struktury umožnily syntézu polysyntetických derivátů. Následovaly objevy dalších, nových tříd antibiotik a od 40. do 60. let 20. století nastal zlatý věk antibiotik. [1]

Antibiotika lze dělit do různých tříd podle mnoha parametrů. Například na základě chemické struktury (beta-laktamy, tetracykliny, makrolidy, sulfonamidy aj.); podle spektra účinnosti (s úzkým spektrem, širokospektrá nebo antibiotika s rozšířeným spektrem účinku); nebo podle mechanismu účinku (beta-laktamy působí inhibicí syntézy buněčných stěn bakterií, oproti tomu makrolidy a tetracykliny potlačují růst buněk inhibicí syntézy bakteriálních proteinů, sulfonamidy jsou širokospektrá antibiotika, která inhibují produkci kyseliny tetrahydrofólové, potřebné pro syntézu nukleových kyselin atd.). [2]

Jsou využívána nejen pro léčbu lidských pacientů, ale i jako preventivní nebo růst podporující přípravky v živočišné výrobě a poptávka po nich stále roste. Užívání antibiotik lidmi vykazovalo od roku 2000 do roku 2015 nárůst o 65 %, do roku 2030 se předpokládalo zvýšení spotřeby na 200 %. Navíc lidé ani zvířata nedokážou antibiotika plně metabolizovat, proto jsou původní sloučeniny nebo jejich metabolity přenášeny do odpadů, a jelikož je ani čistírna odpadních vod nedokážou eliminovat, jsou následně vyplaveny do okolního prostředí (podzemní a povrchové vody, půda), kde mohou působit toxicky například na rostliny, u kterých mohou potlačovat klíčení semen a prodlužování kořenů nebo snižovat výnos. Dalším rizikem je volné šíření genů antibiotické rezistence. Je proto snaha objevovat způsoby degradace a odstranění antibiotik, a tím zmírňovat a kontrolovat znečištění životního prostředí. Mezi nadějně způsoby se řadí biodegradace. [2]



Jelikož se v budoucnu stále počítá s antibiotiky jako běžnými léčivy a rezistence vůči nim se stále rychle šíří nejen kvůli jejich nadužívání, nedokonalému odbourávání v organismech i životním prostředí, ale také kvůli globalizaci. Je zapotřebí aktivně vyhledávat nové struktury látek, které budou dostatečně účinné a které by působily i vůči odolnějším kmenům.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Antibiotická rezistence

#### 2.1.1. Příčiny vzniku rezistence

K užívání antibiotik se neodmyslitelně pojí termín rezistence. Jedná se o přirozený jev, jehož rozvoj podporuje více faktorů. [3] Kmeny začínají ztrácet citlivost vůči dříve funkčnímu přípravku, to má za následek opožděnou adekvátní antibiotickou léčbu, zátěž organismu postupně více léčivý a zvyšující se morbiditu a mortalitu. [4]

První rezistence na penicilin byla popsána v roce 1940, ve stejném roce, kdy teprve započalo jeho klinické používání. První reakcí na vznik rezistence byla snaha o objevení nových, účinných tříd. Pomyslný seznam dosud neobjevených antibiotik však není nekonečný a již v 70. letech 20. století nastal problém s rychle vyčerpanými možnostmi a následným nedostatkem nových přípravků, který trvá dodnes. Proces vývoje nových léčiv je velice nákladný a existuje pouze málo programů, které se snaží neudržitelnému stavu nedostatku antibiotik zabránit (např. Iniciativa 10 x '20). [3]

Za hlavní příčinu rozšíření získané odolnosti bakterií se považuje nadužívání antimikrobních látek. Jejich spotřeba by měla být úměrná výskytu infekčních onemocnění bakteriálního původu. Avšak v České republice bylo minimálně 40 % antibiotik předepsáno na primárně virová onemocnění. [5] To má za následek, že antibiotická odolnost se nerozšiřuje pouze u nosokomiálních infekcí, ale týká se i těch komunitních. Již dnes je známo několik kmenů bakterií, které jsou plně rezistentní vůči určitým skupinám antibiotik. Pravděpodobně nejznámějším příkladem je *Staphylococcus aureus* rezistentní na methicilin, pro který byla zavedena zkratka MRSA. [6] Pro léčbu MRSA infekcí se běžně používá vankomycin, objevují se ale případy, kdy mají kmeny *S. aureus* sníženou citlivost k vankomycinu (vankomycin-intermediální *Staphylococcus aureus*, VISA) nebo jsou dokonce rezistentní (vankomycin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, VRSA). [7] Bakterií se snadným rozvojem rezistence je *Pseudomonas aeruginosa*, například vůči karbapenemům. [8] V Pákistánu byla zaznamenána u *Salmonella typhi* odolnost vůči azithromycinu získaná kvůli nekontrolovanému vydávání léčiv. [9] Bakterie s vysokou virulencí a nejvíce rostoucí multirezistencí sdružuje zkratka ESKAPE, řadíme do ní *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter* spp. [4], [6]

### 2.1.2. Mechanismus rezistence

Mechanismus vzniku rezistence u G<sup>+</sup> bakterií se liší podle místa jejího vzniku (na buněčné stěně, při syntéze proteinů na ribozomech aj.). U této skupiny pozorujeme dva hlavní typy mechanismů, kterými se bakterie brání: při prvním organismy produkují enzymy  $\beta$ -laktamázy, které antibiotikum odbourají; druhým způsobem je snížení afinity a citlivosti proteinu vázajícího penicilin (PBP), tedy cílového místa antibiotik, pozměněním genů pro PBP nebo získáním exogenní DNA (deoxyribonukleová kyselina) především ve formě plazmidů. Bakterie získávají rezistenci i vůči glykopeptidům, jako jsou vankomycin nebo teikoplanin, které inhibují poslední fázi syntézy buněčné stěny. Pokud ale bakterie získá klast *van* genu (př. *VanA*, *VanB*), sníží se vazebná afinita ke glykopeptidům. Makrolidy inhibují syntézu proteinů navázáním na ribozomální podjednotku 50S. Rezistence vzniká buď efluxními systémy, methyloací, nebo mutací 23S RNA a proteinu L4. Podobně je tomu tak s oxazolidinony (př. linezolid): ty se také váží na 50S a inhibují syntézu proteinů, ale rezistence je způsobena mutací v 23S RNA a G2576T v DNA. [10]

### 2.1.3. Nová antibiotika

Ve vývoji nových účinných látek se často vrací k již dříve známým léčivům, od kterých se z různých důvodů opustilo a nyní se využívají jejich deriváty. Například plazomicin ze skupiny aminoglykosidů oproti ostatním látkám ze své skupiny nevykazuje nefrotoxicitu ani ototoxicitu a zachovává si spektrum účinku proti stafylokokům a gramnegativním tyčkám. Využití nalezne při léčbě komplikovaných močových infekcí. [11] Ojedinelé nejsou ani nové kombinace dvou účinných látek. Například širokospektrý cefalosporin ceftolozan s vysokou účinností proti *Pseudomonas aeruginosa* a některým druhům z kmenů rezistentních k ceftazidimu, piperacilinu a karbapenemům, se kombinuje s tazobaktamem. Tazobaktam disponuje inhibicí  $\beta$ -laktamáz, což v kombinaci s ceftolozanem tvoří účinný lék proti producentům širokospektré  $\beta$ -laktamázy typu ESBL (extended-spectrum  $\beta$ -lactamase). Ceftolozan/tazobaktam byl registrován v roce 2014 pro terapii infekcí způsobených G<sup>+</sup>/G<sup>-</sup> bakteriemi.

Spojením ceftazidim/avibaktam vznikl nadějný lék pro infekce močových cest a infekce nitrobršňní, způsobené *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* nebo enterokoky patřící do kategorie MDR. Avibaktam je molekulou inhibující  $\beta$ -laktamázy. [11], [12] Ačkoli je návrat ke známým látkám či jejich kombinace účinná cesta, není dlouhodobě udržitelná, proto je snaha, nalézt látky nové, ne pouze odvozeniny od již známých skupin.

Jedním z možných adeptů jsou syntetické peptidy, které působí přímo na bakteriální membránu. A jejich účinnost se prokázala i na multirezistentních kmenech. Navíc uměle vytvořené peptidy mají výhodu lepší aktivity, nižší cytotoxicity a proteolýzy. [13] Další strategií je využití terpenů jako látek přírodního původu, které jsou známé pro svou bohatou škálu účinků, proto se uvažuje i o jejich potenciálním klinickém využití jako antimikrobních látek. [14]

## 2.2. Terpeny – struktura, výskyt vlastnosti

### 2.2.1. Obecná charakteristika

Terpeny jsou látky přírodního původu, syntetizované v rostlinách a bakteriích. V rostlinách vznikají jako sekundární metabolity, kde hrají svou roli jako např. atraktanty nebo naopak jako látky obranné. Přirozeně se vyskytují ve volné, anebo v menším množství v glykosidové formě. Jsou těkavé, proto se z rostlin snadno získávají jako rostlinné silice, nejčastěji pomocí destilace s vodní parou. Lidé se je naučili využívat v potravinářství pro jejich příjemnou vůni a chuť nebo ve farmacii, kde jsou známé jejich antibakteriální nebo protinádorové účinky, proto jsou označovány jako „bioaktivní“ sloučeniny. [15]

### 2.2.2 Klasifikace

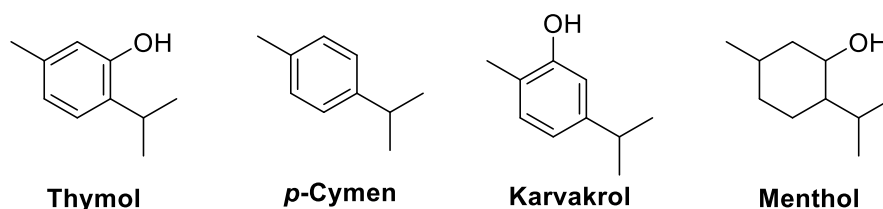
Základní stavební jednotkou je isopren, plynný uhlovodík s molekulovým vzorcem  $C_5H_8$ . Dle počtu izoprenových jednotek a jejich organizaci jsou terpeny rozřazovány do skupin (hemi-, mono-, seskvi-, di-, tri-, tetraterpeny, polyterpeny). [16], [17]

#### 2.2.2.1 Monoterpeny

Monoterpeny mají dvě isoprenoidní jednotky, základní sumární vzorec je  $C_{10}H_{16}$ . Nachází se ve všech organismech, ale syntetizují se v krytosemenných rostlinách, houbách či bakteriích. [15], [17] Jako hlavní složka esenciálních olejů jsou nositeli charakteristických rostlinných vůní. [16] Řadí se sem např. pineny, karveol, kafir, menthol, limonen. [17], [18] Kromě lákání opylovačů jsou součástí i dalších bioaktivních látek (viz níže). [16]

Zástupcem monoterpenů s aktuálně vysokým potenciálem využití v medicíně a farmacii je thymol (2-isopropyl-5-methylfenol; **Obr. 1**). Jeho účinky v současné době sleduje řada studií. Známa je jeho antibakteriální i protiplísňová aktivita nebo jeho využití jako lokální anestetikum nebo antioxidant. Jeho hlavním přírodním zdrojem je mateřídouška tymián (*Thymus vulgaris* L.) a vyskytuje se zejména v esenciálních olejích. [19] Tymián je také

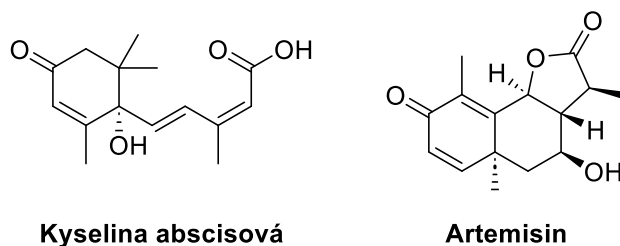
bohatým zdrojem cymenu. *p*-Cymen (1-methyl-4-[1-methylethyl]benzen; **Obr. 1**) je alkyly substituovaný aromatický uhlovodík. Je též biologicky aktivní, snižuje oxidační stres a vykazuje prozánětlivou aktivitu. [20] Podobně jako thymol se získává derivát cymenu, karvakrol (2-methyl-5-[1-methylethyl]fenol; **Obr. 1**), který též pochází z tymiánu nebo majoránky (*Majorana hortensis* L.). Vyskytuje se v esenciálních olejích a taktéž disponuje pro lidi prospěšnými vlastnostmi, působí proti zánětu. [21] Menthol (2-isopropyl-5-methylcyklohexan-1-ol; **Obr. 1**) je cyklický monoterpenový alkohol, hlavní složky silice máty (*Mentha* spp.). [22] Je známý pro své využití v potravinářství i farmacii.



Obrázek 1 - Biologicky aktivní monoterpeny

#### 2.2.2.2 Seskviterpeny

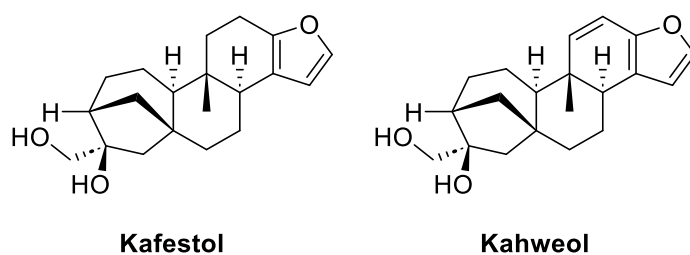
Seskviterpeny se skládají ze tří isoprenoidních jednotek (obecný sumární vzorec  $C_{15}H_{24}$ ), ve srovnání s monoterpeny jsou tedy stabilnější. V živých organismech působí jako ochranný mechanismus nebo pomocí feromonů lákají u rostlin hmyz pro opylování nebo u savců (slonů) partnera. Zásadní roli v rostlinách hrají jako růstové hormony, např. kyselina abscisová (**Obr. 2**) je důležitá při vývoji, klíčení, buněčném dělení a signalizaci. V lidském organismu působí jako prozánětlivý cytokin nebo stimuluje uvolnění inzulínu z pankreatu. [16] Mezi další zástupce se řadí artemisin (**Obr. 2**) z pelyňku ročního (*Artemisia annua* L.), postihující široké spektrum životního cyklu *Plasmodium* spp., čímž se prokázal jako účinnější antimalarikum než první klinicky používané antimalarikum chinin. [18]



Obrázek 2 - Biologicky aktivní seskviterpeny

### 2.2.2.3 Diterpeny

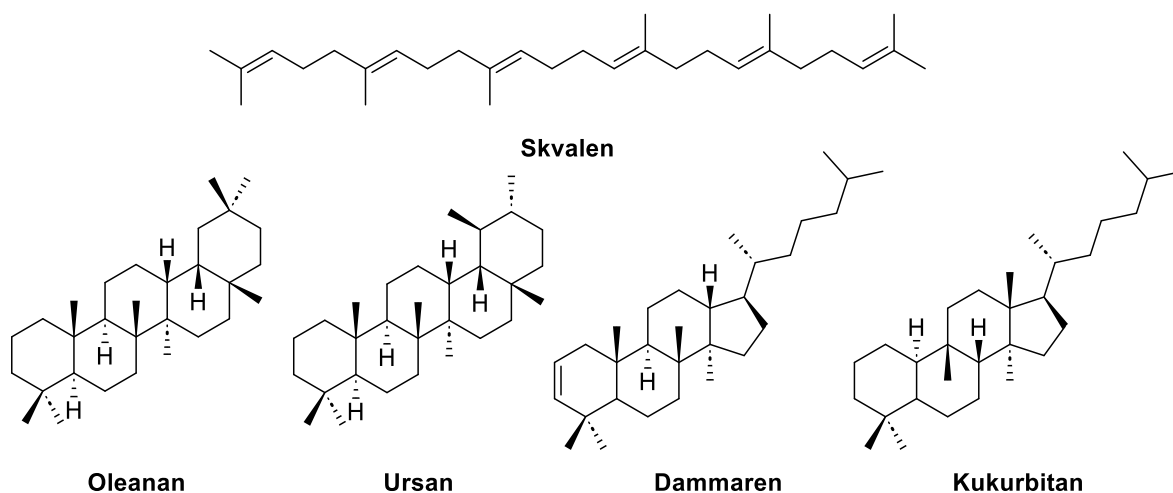
Jsou odvozené ze čtyř izoprenových jednotek, (obecný sumární vzorec  $C_{20}H_{32}$ ). Na rozdíl od monoterpenů nejsou těkavé. Zahrnují různé formy: lineární, bi-, tetra-, penta- a makrocyclické. [17] Diterpeny též působí jako růstové hormony a regulují klíčení či kvetení. Vykazují také inhibiční aktivitu vůči patogenním mikrobům a plevelům. [17] Významnými zástupci jsou kafestol a kahweol (**Obr. 3**), diterpenické alkoholy z oleje z kávových zrn. Předpokládá se, že jejich antioxidační a protizánětlivé účinky mají za následek snížené riziko výskytu deprese u žen, rakoviny prostaty u mužů, mrtvice či cukrovky. [16]



Obrázek 3 - Diterpeny

### 2.2.2.4 Triterpeny

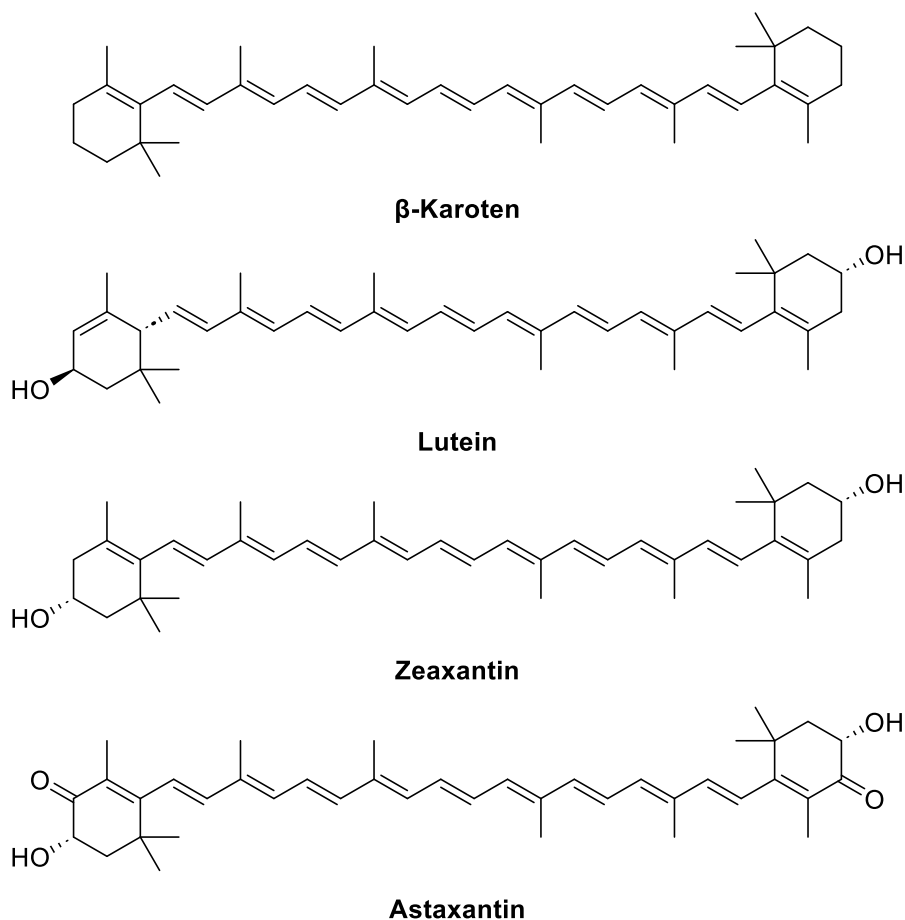
Triterpeny vznikají spojením dvou molekul seskviterpenů, a obsahují tedy 30 atomů uhlíku. [17] Přirozeně se vyskytují u rostlin i živočichů. Jejich prekurzorem je skvalen (**Obr. 4**) a jeho deriváty mohou vytvářet tetracyklické a pentacyklické molekuly. [14] Triterpeny jsou především alkoholy, aldehydy a karboxylové kyseliny. Řadíme sem i steroly a fytosteroly díky jejich cyklopentanoperhydrofenanthrenové struktuře. [17] V rostlinách a živočiších jsou odvozeny od kyseliny mevalonové jako prekurzory steroidů. Některé saponiny jsou steroidní molekuly podobné hormonům, pění a disponují detoxikačními i detergentními účinky a také napomáhají při hojení ran. [16], [23] Mezi další zástupce triterpenů se řadí oleanan, ursan nebo tetracyklické dammaran a kukurbitan (**Obr. 4**). [23]



Obrázek 4 - Triterpeny

### 2.2.2.5 Tetraterpeny

Tetraterpeny neboli karotenoidy se nachází v různých druzích hub, rostlin a bakterií, kde jsou zodpovědné za červené až žluté zbarvení. Skládají se z 8 izoprenových jednotek s molekulovým vzorcem  $C_{40}H_{56}$ . Většinou jsou vysoce nenasycené a je obtížné je izolovat a čistit. [16] Mezi jejich hlavní role patří ochrana rostlin před volnými radikály a zachycování světla (pomocná fotosyntetická barviva). [17] Nejznámějším zástupcem je  $\beta$ -karoten (**Obr. 5**), v potravinářství používaný jako přírodní barvivo a antioxidant. V lidském těle slouží jako prekurzor vitamínu A [24], a jelikož si savci nedokážou karotenoidy sami syntetizovat, musí jej přijímat potravou v různých druzích ovoce a zeleniny (kiwi, kapusta, špenát aj.). [25] Dalším zástupcem je lutein (**Obr. 5**), karotenoid oranžové barvy používaný jako přísada do hospodářských krmiv. Dalšími jsou například zeaxantin, astaxantin (**Obr. 5**). [24]



*Obrázek 5 - Tetraterpeny*

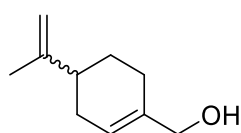
### 2.2.3 Význam pro člověka

Lidé čerpají z blahodárných účinků terpenů i jejich silic v některých příkladech již staletí, ať už jako preventivních prostředků, nebo jako součást terapie psychických i fyzických nemocí. Například menthol se běžně užívá proti nachlazení či nadýmání [15], [19]. Významné jsou také protinádorové účinky, které byly pozorovány zejména u monoterpenů perillyl alkoholu, geraniolu, inhibujícího *in vitro* rozvoj leukémie nebo karcinomu tlustého střeva, a karvonu (**Obr. 6**) jako možné prevence nádorového bujení karcinomu plic, jater i slinivky. Opět se liší různým mechanismem účinku. Perillyl alkohol (**Obr. 6**) inhibuje syntézu ubiquinonu (mitochondriální přenašeč signálů) a konverzi lathosterolu na cholesterol (součást buněčných membrán). Obě molekuly jsou stěžejní při buněčném dělení, proto při snížení jejich koncentrace může docházet ke zamezení nádorového bujení. [15] Geraniol (**Obr. 6**) ovlivňuje řadu fyziologických procesů, jako je právě buněčné dělení, metabolismus či apoptóza. Blokuje G1 fázi buněčného cyklu Michigan Cancer Foundation (MCF)-7 linie

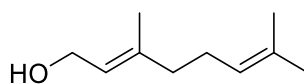


rakoviny prsu, a tím i růst tumorózních buněk. [26] Geraniol spolu s mentholem a perillyl alkoholem inhibují biosyntézu a urychlují degradaci 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reduktázy (HMG-CoA), klíčového enzymu mevalonátového systému pro syntézu prekurzorů seskviterpenů. [15], [26] Pozorována je i protizánětlivá aktivita u paeoniflorinu (**Obr. 6**), monoterpenového glykosidu získaného z kořene pivoňky, kde se zjistilo, že jsou schopny inhibovat tvorbu zánětlivého faktoru oxidu dusnatého (NO), interleukinu-6 (IL-6) a tumor nekrotizujícího faktoru (TNF- $\alpha$ ) vyvolanou lipopolysacharidy (LPS). Inhibice korelovala s dávkou. Podobné účinky vykazovaly i výtažky z *Tripterygium wilfordii* (trojkřídlec Wilfordův) nebo ženšenu (*Panax* sp.).

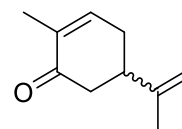
Terpeny disponují další rozmanitou bioaktivitou, za zmínku stojí jejich antivirové a antimalarické účinky (artemisin) nebo prevence kardiovaskulárních onemocnění (karvakrol) nebo se mohou podílet na snižování hladiny krevního cukru (karvakrol). [15], [18], [21], [26]



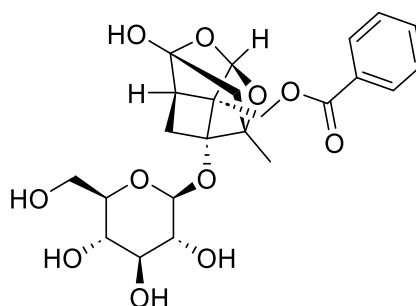
**Perillyl alkohol**



**Geraniol**



**Karvon**



**Paeoniflorin**

Obrázek 6 - Terpeny významné pro člověka

## 2.2.4 Antimikrobiální účinky terpenů

Přírodní terpeny jsou již z dřívějška známé pro své antimikrobiální účinky. Negativní dopad mají zejména na funkci a strukturu antimikrobiálních membrán a buněčných stěn. Účinnost se liší podle složení a chiralit. [27] Mohou být považované jako alternativa dnešních syntetických antimikrobiálních látek a byly americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv

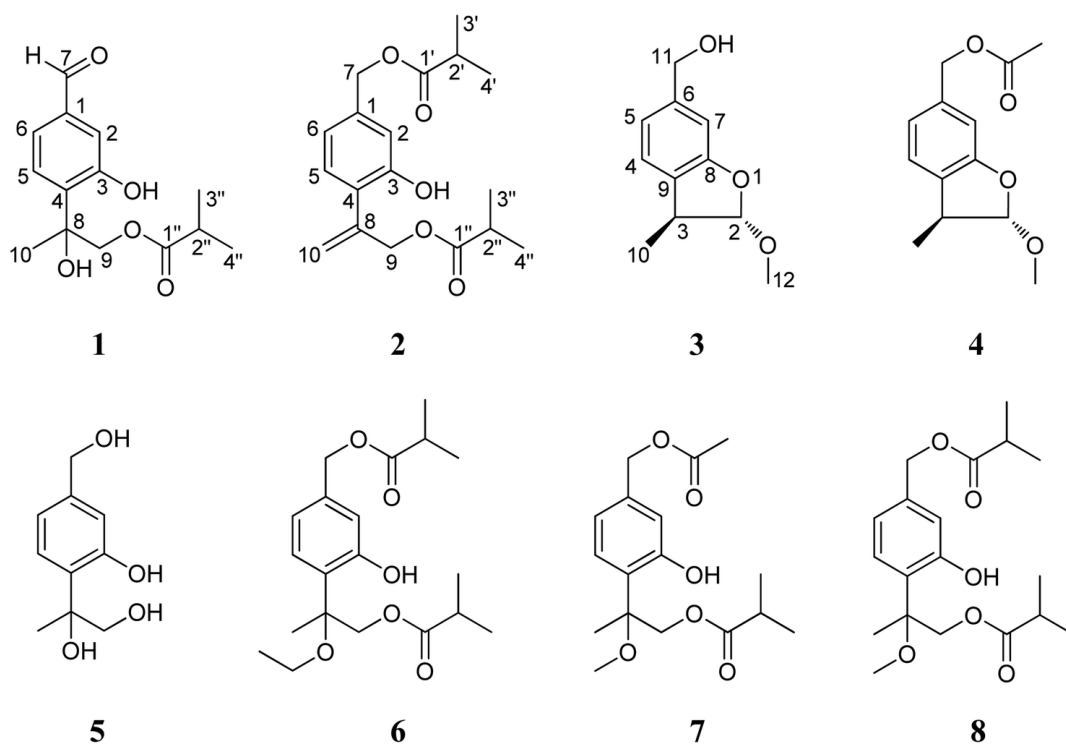
(Food and Drug Administration, FDA) klasifikovány „obecně uznávané jako bezpečné“ (Generally Recognized as Safe, GRAS). [28]

#### 2.2.4.1 Grampozitivní bakterie

Karvakrol (0,03 %) při testování dokázal při kombinaci s 8 různými antibiotiky zvrátit 11 z 18 rezistentních izolátů MDR (multiple drug resistant) *Staphylococcus* spp. z kravského mléka, ovčího abscesu a lidských vzorků rezistenci zpět na citlivé nebo středně citlivé. [29] Konkrétně pak pro *Staphylococcus aureus* odpovídala hodnota MIC (minimální inhibiční koncentrace) 200 µg/ml. [28] Antimikrobiální účinky prokázal i vůči streptokokům běžně se vyskytujícím v lidské ústní dutině a způsobujícím záněty. Hodnoty MIC pro *Streptococcus mutans* a *S. sanguinis* byly shodně 93,4 µg/ml. Hodnota MBC (minimální baktericidní koncentrace) byla 373,4 µg/ml. [30] Při mechanismu účinku hraje důležitou roli hydroxylová skupina, díky ní karvakrol interaguje s dvouvrstevnou buněčnou membránou bakterií a vměstnává se zde mezi řetězce mastných kyselin, což membránu destabilizuje, zvýší její propustnost, čímž se naruší iontový gradient, a buňka umírá. Při interakci karvakrolu s buněčnou membránou dochází ke zkracování rozvětvených řetězců mastných kyselin, které buňku chrání např. před oxidačním stresem. Je však prokázáno na příkladu *Staphylococcus aureus*, že s rostoucí koncentrací karvakrolu roste i poměr nerozvětvených mastných kyselin ku rozvětveným mastným kyselinám, a tudíž i náchylnost buňky k antibiotikům. S antibakteriální aktivitou karvakrolu může také souviset schopnost navázat se do malého žlábků DNA, kde důležitou roli hrají vodíkové vazby. Pro zlepšení účinku je také žádoucí snížené pH. [31] Thymol samostatně proti různým druhům *Staphylococcus* spp. a *Streptococcus* spp. prokazoval hodnoty MIC 0,1–0,2 mg/ml. [32] Konkrétně pro *Staphylococcus aureus* pak hodnota MIC byla 150 µg/ml. [28] Karvakrol i thymol měly antibakteriální aktivitu i vůči přirozeně se vyskytujícím laktobacilům (*Lactobacillus acidophilus*, *L. reuteri* a *L. salivarius*), ale několikanásobně nižší než u patogenních bakterií (MIC 1500 µg/ml). Dále také vůči *Clostridium perfringens* bylo pro oba shodně MIC 375 µg/ml. [33]

Ve snaze o zvýšení účinnosti thymolu byla jeho molekula modifikována na tři nové deriváty (**Obr. 7**): 7-formyl-9-isobutyryloxy-8-hydroxythymol (**1**), 7,9-di-isobutyryloxy-8,10-dehydrothymol (**2**) a 2 $\alpha$ -methoxyl-3 $\beta$ -methyl-6-methylol-2,3-dihydrobenzofuran (**3**). Stejně jako u těchto modifikovaných derivátů byla testována antimikrobní aktivita vůči třem G+ kmenům také u pěti již známých izolovaných sloučenin (**Obr. 7**) z nadzemních částí invazní

rostliny *Ageratina adenophora* – 2 $\alpha$ -methoxyl-3 $\beta$ -methyl-6-(acetyl-*O*-methyl)-2,3-dihydrobenzofuran (**4**), 7,8,9-trihydroxythymol (**5**), 7,9-di-isobutyryloxy-8-ethoxythymol (**6**), 7-acetoxy-9-isobutyryloxy-8-methoxythymol (**7**) a 7,9-di-isobutyryloxy-8-methoxythymol (**8**). Ze všech sloučenin nejlepších výsledků (**Tab. 1**) dosáhly sloučeniny **1** a **5**, které byly srovnatelné s pozitivní kontrolou kanamycin-sulfátu (KS). Naopak u sloučeniny **8** nebyla detekována žádná antimikrobní aktivita. Taktéž bylo provedeno testování s G- bakterie (*E. coli*, *Salmonella enterica*), avšak zde se antimikrobní aktivita ukázala pouze u sloučenin 1 a 5 s MIC 15,6  $\mu$ g/ml. [34]



Obrázek 7 - Biologicky aktivní deriváty thymolu [34]

Hodnoty MIC sloučenin 1–8 proti třem G+ kmenům [µg/ml]			
Sloučeniny	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
1	7,8	3,9	7,8
2	>100	62,5	>100
3	31,3	31,3	62,5
4	31,3	62,5	62,5
5	7,8	7,8	15,6
6	62,5	62,5	62,5
7	>100	62,5	62,5
8	>100	>100	>100
KS	1,9	3,9	3,9
KS = kanamycin-sulfát, referenční sloučenina			

Tabulka 1 - Terpeny aktivní proti G+ bakteriím

#### 2.2.4.2 Gramnegativní bakterie

Jako antibiotikum zabírající na G- bakterie se ukázaly karvakrol i thymol, přičemž thymol byl účinnější při inhibici *E. coli* s MIC 187,5 µg/ml (MIC pro karvakrol 375 µg/ml). Oproti tomu u *Salmonella enteritidis* byla citlivost pro thymol slabší (MIC 750 µg/ml), ale pro karvakrol výrazně lepší 187,5 µg/ml. Pro *Salmonella typhimurium* a *Salmonella pullorum* měli MIC stejné, a to 375 µg/ml. [33] Směsí karvakrolu a thymolu bylo docíleno MIC 200 µg/ml proti *Salmonella enteritidis*. [28] Thymol nejen že funguje samostatně, ale lze ho kombinovat s již používanými antibiotiky. Například s kolistinem (polymyxin E), který se běžně užívá při léčbě infekcí způsobených MDR kmeny nebo infekcí G- bakteriemi rezistentními na karbapenem. V různých kombinacích kolistinu s thymolem došlo ke snížení MIC u bakterií *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter cloacae*. [35]

Mezi látky negativně ovlivňující růst bakterie *Pseudomonas aeruginosa* se zařadily karveol a citronellol, oba s MIC 512 µg/ml. Karveol působil proti *Pseudomonas aeruginosa* také synergicky s chloramfenikolem nebo ciprofloxacinem. [36]

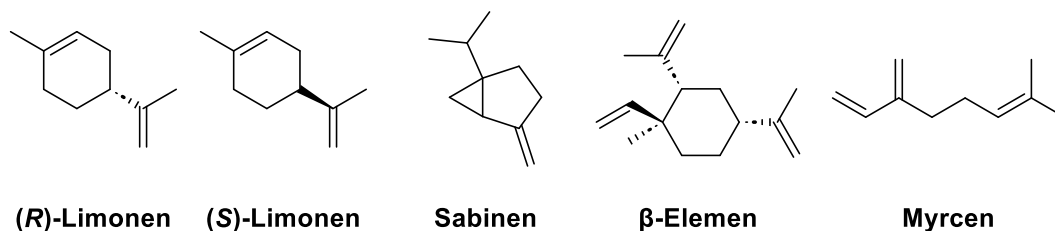
### 2.2.4.3 Mykobakterie

Antimikrobiální aktivitu vykazují terpeny z esenciálních olejů také vůči mykobakteriím (*Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium bovis*). Účinnost prokázaly *p*-cymen, menthol, thymol, karvakrol. Mezi nejlépe hodnocené se zařadil thymol spolu s karvakrolem. Jejich hodnoty MIC pro *Mycobacterium tuberculosis* 2,02 (karvakrol) a 0,78 µg/ml (thymol) byly několikanásobně nižší oproti např. mentholu (MIC 61,66µg/ml.) Nejefektivněji proti oběma kmenům působily sloučeniny obsahující fenolovou skupinu. Důležitá je také konformace šestičlenného kruhu, protože ačkoli ho menthol i thymol obsahují, účinnost je rapidně odlišná, menthol má nižší jak antimikrobiální, tak cytotoxickou aktivitu. Svou roli hraje i umístění hydroxylové skupiny vzhledem k většímu alifatickému řetězci, kterou můžeme porovnat u thymolu (v poloze *meta*) a karvakrolu (v poloze *ortho*), kdy je opět thymol účinnější. [37]

Ačkoli samy o sobě vykazují antibakteriální účinky, mohou (*R*)-limonen, (*S*)-limonen, sabinen, β-elemen a myrcen ve spojení s běžnými antituberkulotiky zvyšovat účinnost a zároveň tedy snižovat potřebu množství užívaných antibiotik (**Obr. 8**). Kombinací (*R*)-limonenu, β-elemenu, myrcenu a sabinenu s ATB se podařilo snížit MIC ATB pro *Mycobacterium tuberculosis* (z 3,9 na 0,475 µg/ml pro ethambutol, z 15 na 0,475 µg/ml pro isoniazid a z 0,475 na 0,237 µg/ml pro rifampicin). Limonen projevil synergický účinek se všemi testovanými antibiotiky (MIC se snížil z 16 na 0,475 ug/ml pro ethambutol, z 16 na 0,237 ug/ml pro rifampicin a z 32 na 0,475 ug/ml pro isoniazid). [27]

Limonen sice při testování nabýval nejvyšších hodnot MIC, ale působil tuberkulostaticky. Díky interakci s cytoplazmatickými membránami bakterií, narušení její integrity a inhibici respiračních enzymů. [27]

Struktura také ovlivnila výsledky při samostatném testování aktivity terpenů, jako výhodnější se oproti karbonylové prokázala aromatická struktura. Naopak počet cyklických a dvojných vazeb nehrál významnou roli. [27]



Obrázek 8 – Terpeny aktivní vůči mykobakteriím

#### 2.2.4.4 Houby

Antifungální aktivita byla testována u dříve známých antimikrobiálně působících látek thymolu a karvakrolu. Míra inhibice růstu plísně *Botrytis cinerea* byla úměrná růstu koncentrace terpenů. MIC pro thymol byla 65 mg/l a MFC (minimální fungicidní koncentrace) 100 mg/l. Pro karvakrol pak MIC odpovídala 120 µl/l a MFC 140 µl/l. [38]

Karvakrol dovedl inhibovat růst houby *Trichophyton rubrum* již při nižších koncentracích MIC 32 µg/ml. [30]

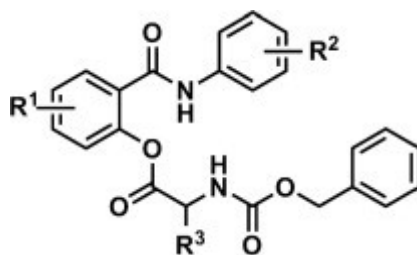
Z *Artemisia vestita* bylo izolováno sedm seskviterpenoidů, z nichž byly tři nové eudesmanolidy (artemivestinolid D-F) a jeden nový guaianolid (artemivestinolid G). Všechny sedm látek mělo potenciální účinek vůči *Plutella xylostella* s hodnotami EC<sub>50</sub> (polovina maximální účinné koncentrace) v rozmezí 25,3-42,1 µg/cm<sup>2</sup>. Kromě toho některé seskviterpenoidy působily i přímo antifungálně. Sloučeniny artemivestinolid D [(1*R*,6*S*,7*S*,10*R*,11*S*)-1-isobutyryloxyeudesma-4(5)-en-12,6-olid] a dehydrocostus laktone inhibovaly růst *Plutella xylostella* při MIC 128 mg/l. U *Botrytis cinerea* působily hned čtyři sloučeniny se shodnou MIC: artemivestinolid D, artemivestinolid E [(1*R*, 6*S*, 7*S*, 10*R*, 11*S*)-1-methakryloyloxy-eudesma-4(5)-en-12,6-olid], artemivestinolid G [(1*R*, 4*R*, 5*R*, 6*R*, 7*R*, 8*S*)-15-ethoxymethyl-2-oxo-8-hydroxy-guaia-10(14),11(13)-dien-12,6-olid], dihydroestafiaton (MIC 256 mg/l). A růst *Fusarium oxysporum* potlačovaly dehydrocostus laktone a artemivestinolid F [(1*R*, 5*R*, 6*S*, 7*S*, 10*S*, 11*S*)-1-isobutyryloxy-eudesma-4(15)-en-12,6-olid (MIC 256 mg/l)]. [39] Mezi další příklady látek s prokázanou antifungální aktivitou patří směs triterpenů – spinasterolu a 22,23-dihydrospinasterolu – extrahovaných z listů rostliny *Citrullus colocynthis*. Účinnost byla porovnávána podle inhibice růstu mycelia u tří patogenních hub *Magnaporthe grisea*, *Rhizoctonia solani* a *Phytophthora infestans*. Nejlepší výsledky se ukázaly u *R. solani*, kde hodnota ED<sub>50</sub> (dávka pro 50% inhibici růstu) dosahovala hodnot 129,56 µg/ml, slabší účinek pak směs ukázala u *M. grisea*, kdy hodnota ED<sub>50</sub> byla 206,09 µg/ml. Zanedbatelnou hodnotu pak směs poskytla u *P. infestans* s ED<sub>50</sub> 1093 µg/ml. [40]

### 2.3 Antimikrobiální aminokyselinové deriváty

Fenolová hydroxylová skupina patří v léčivech k jedné z nejvyužívanějších funkčních skupin, ať už to jsou antibiotika, protinádorové látky nebo další. [41] Ačkoli je přítomnost

fenolických hydroxylů nezbytná pro účinek antibiotik, mohla by mít dráždivé účinky. Proto ve snaze zlepšení vlastností látek začalo docházet k jejich úpravám, kdy je pomocí esterifikace skupina dočasně kryta. Dojde tak ke změně fyzikálně-chemických vlastností, což má za následek vyšší účinnost, zlepšenou rozpustnost, biologickou dostupnost a průnik biologickými bariérami nebo nižší toxicitu. Pokud jsou pro esterifikaci použity aminokyseliny, mohly by usnadnit možnost zacílení léčiv jako systému pro podávání léčiv. [42] Proto jsou ideálními adepty pro využití jako prodrug léčiva, která mají díky maskované hydroxylové skupině vyšší lipofilitu, a lépe tak prochází např. do centrální nervové soustavy. [41] Současným trendem je vytváření např. nových aminokyselinových esterů salicylanilidů (*N*-fenyl-2-hydroxy-benzamidy), které prokazují svou antimykobakteriální aktivitu, a pak také zejména vůči G<sup>+</sup> kmenům v koncentraci od 0,25 µg/ml. Jejich mechanismus účinku spočívá v inhibici dvousložkových regulačních systémů bakterií mechanismem souvisejícím s rozpojením oxidativní fosforylace. Salicylanilidy jsou také selektivními inhibitory produkce interleukinu-12p40, který hraje svou specifickou roli při iniciaci, expanzi a kontrole buněčné odpovědi na infekci tuberkulózy. Také spojení esterů halogenovaných salicylanilidů a *N*-acetyl-L-fenylalaninu se ukázalo jako funkční kombinace pro rozšíření palety vysoce aktivních antimikrobních látek. [42] Další řada salicylanilidových esterů *N*-chráněných aminokyselin prokázala aktivitu proti *Mycobacterium tuberculosis* a osmi kmenům hub, a to nejvíce k *Aspergillus fumigatus*, *Absidia corymbifera* a *Trichophyton mentagrophytes*. Nejvyšší antimikrobní aktivita proti *M. tuberculosis* byla pozorována u (*S*)-4-chlor-2-(4-trifluormethylfenylkarbamoyl)-fenyl-2-benzyloxy-karbonylamino-propionátu (99% inhibice, MIC = 3,13 µg/ml) a (*S*)-4-chlor-2-(3-chlorfenylkarbamoyl)fenyl-2-benzyloxy-karbonylamino-propionátu (97% inhibice, MIC = 3,13 µg/ml). Jedním z faktorů vysoké antituberkulotické aktivity je methyl jako malý substituent nebo nepřítomnost substituentu R<sup>3</sup> (**Obr. 9**). Substituce R<sup>3</sup> objemnější skupinou např. benzyl nebo isopropyl, byla spojena s výrazně nižší úrovní aktivity. Jako dalším důležitým parametrem ovlivňujícím aktivitu je stereoizomerie, jednotlivé enantiomery vykazují značný rozdíl ve své antituberkulózní aktivitě. Naopak lipofilita se ukázala až jako sekundární parametr. Látky s rozdílným

stupněm lipofility dosahovaly podobné úrovně aktivity. [43]



Obrázek 9 -Ester *N*-benzyloxykarbonylamino kyseliny salicylanilidů

Co se týče vztahu mezi strukturou a aktivitou proti *M. tuberculosis*, nejvýhodnější byla na salicylovém kruhu substituce 4-brom/chlor, relativně nezávisle na substituci anilinového kruhu. Optimální zbytky na pozicích 3 a 4 anilinového kruhu jsou 4-CF<sub>3</sub> (v kombinaci se substituovanou salicylovou částí molekuly) a 3,4-Cl<sub>2</sub>. Naopak monosubstituce chlorem na pozici 3 a 4 poskytovala minimální přínos ve srovnání s ostatními. Pro vývoj nových antituberkulotik se kromě esterů salicylanilidů *N*-acetyl-L-fenylalaninu, prováděla studie s estery kyseliny octové, ty však nevykazovaly takovou aktivitu. [42]



### **3 Cíle práce**

Cílem práce je přiblížení problematiky antibiotické rezistence a její řešení pomocí vyhledání nových antimikrobních přípravků, a to zejména na bázi přírodních terpenů. Teoretická část popisuje poznatky o terpenech jako antimikrobních látkách a jejich využití v praxi a zároveň podat přehled substituentů, které by navyšovaly antimikrobní účinnost terpenů.

Cílem experimentální části je praktická příprava a charakteristika potenciálních antimikrobních látek na bázi terpenů, odvozených od chlorthymolu a následné testování jejich antimikrobiální aktivity vůči G<sup>+</sup>, G<sup>-</sup> bakteriím, mykobakteriím a houbám.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Chemická část

#### 4.1.1 Obecná metodika

Všechny chemikálie použité bez dalších úprav pro syntézu a analýzu byly zakoupené od firem Apollo Scientific Ltd (Stockport, Velká Británie), Lach-Ner (Neratovice, České republiky), Merck KGaA (Darmstadt, Německo) a VWR/Avantor (Stříbrná Skalice, Česká republika).

Struktura všech připravených látek byla potvrzená pomocí  $^1\text{H}$  NMR a  $^{13}\text{C}$  NMR analýzy. NMR spektra (500 MHz nebo 600 MHz pro  $^1\text{H}$ ; 126 nebo 151 MHz pro  $^{13}\text{C}$ ) byly změřeny v deuterovaném dimethylsulfoxidu ( $\text{DMSO-}d_6$ ) při laboratorní teplotě na přístrojích Varian VNMR S500 (Varian Comp., Palo Alto, CA, USA) a JEOL JNM-ECZ 600R (JEOL, Akishima, Tokso, Japonsko) – doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc. Hodnoty chemických posunů ( $\delta$ ) jsou vyjádřené v partes per milion (ppm) a spektra jsou vnitřně kalibrovaná na reziduální signál aprotického rozpouštědla vůči tetramethylsilanu ( $\text{DMSO-}d_6$ : 2,50 pro  $^1\text{H}$ , 39,60 pro  $^{13}\text{C}$ ). Hodnoty interakčních konstant ( $J$ ) jsou uvedené v Hz. NMR spektra byla vyhodnocena v programu MestReNova 15.0.1 (Mestrelab Research Santiago de Compostela, Španělsko).

Infračervená spektra byla měřena na spektrometru Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) v rozmezí  $600\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ , měření probíhalo technikou ATR na krystalu germania. Spektra byla změřena paní Ivou Vencovskou.

Elementární analýza byla provedena pomocí přístroje Vario MICRO Cube Element Analyser (Elementar Analysensysteme, Hanau, Německo). Vypočítané i změřené hodnoty jsou zadané v procentech.

Teploty tání byly změřeny na přístroji Büchi 5.545 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Švýcarsko) v otevřené skleněné kapiláře. Získané hodnoty byly vyjádřeny jako interval a nebyly korigované.

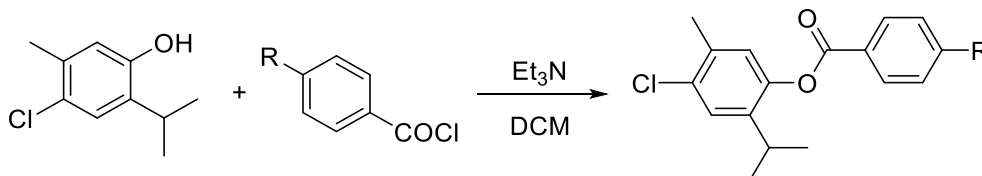
Retenční faktory ( $R_f$ ) připravených sloučenin a průběhy reakcí byly monitorované pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC – Thin Layer Chromatography); tenké vrstvy byly zakoupené od firmy Merck Millipore (Darmstadt, Německo), hliníková deska byla potažena silikagelem Merck 60 F254 o tloušťce 0,2 mm. Vizualizace byla uskutečněna pomocí UV záření ( $\lambda = 254\text{ nm}$ ). Jako mobilní fáze (MF) pro vyvíjení TLC desek a také pro kolonovou chromatografii byla použita směs hexan/ethyl-acetát v objemovém

poměru 8:2. Pro kolonovou chromatografii byl použit silikagel Merck Kieselgel 60 Å (0.040–0.063 mm) (Merck KGaA, Darmstadt, Německo).

Vzorce reakčních schémat byly navrženy v programu ChemDraw Professional 22.2 (PerkinElmer Inc., MA, USA).

## 4.2.1 Syntéza esterů (ZK1-ZK6) a jejich charakterizace

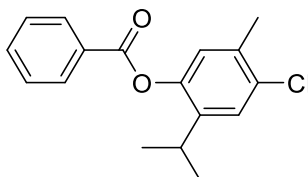
### 4.2.1.1 Obecný postup



2 mmol chlorthymolu (369 mg) byly rozpuštěny v 8 ml dichlormethanu (DCM) a následně byly přidány 3 mmol triethylaminu (8 ml). Reakční směs se ochladila v ledové lázni a poté bylo přidáno 2,6 mmol chloridu příslušné kyseliny. Reakční směs se ponechala míchat 2 hodiny do kompletní konverze na produkt (indikace pomocí TLC). Následně byl DCM odpařen za sníženého tlaku, surový produkt byl rozpuštěn v ethyl-acetátu a směs byla extrahována nasyceným roztokem Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2'50 ml) a nasyceným roztokem NaCl (1'50 ml). Organická vrstva byla vysušena stáním nad bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pevný podíl byl odfiltrován, filtrát odpařen za sníženého tlaku za vzniku krystalů, případně olejovitých produktů. V případě potřeby (sloučeniny ZK-3, ZK-4, ZK-6) bylo provedeno přečištění pomocí sloupcové chromatografie. Připravené sloučeniny byly charakterizovány pomocí NMR, IR spekter, teploty tání a hodnot R<sub>f</sub>.

#### 4.2.1.2 Charakterizace připravených látek

##### 4-chlor-2-isopropyl-5-methylfenyl-benzoát (ZK-1)



Sumární vzorec	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> ClO <sub>2</sub>
Relativní molekulová hmotnost	288,77
Vzhled	bílá pevná látka
Výtěžek	79 %
Teplota tání	63,0–65,3 °C
R <sub>f</sub>	0,84

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>): δ 8.16 – 8.13 (2H, m, H<sub>2B</sub>, H<sub>6B</sub>), 7.77 (1H, t, *J* = 7.4 Hz, H<sub>4B</sub>), 7.64 (2H, q, *J* = 8.3 Hz, H<sub>3B</sub>, H<sub>5B</sub>), 7.42 (1H, s, H<sub>3A</sub>), 7.24 (1H, s, H<sub>6A</sub>), 2.95 (1H, hept, *J* = 6.9 Hz, CH), 2.31 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.15 (6H, d, *J* = 6.9 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>): δ 165.13, 146.99, 140.05, 134.79, 134.63, 131.37, 130.30, 129.69, 129.07, 127.45, 125.77, 27.63, 23.03, 19.63.

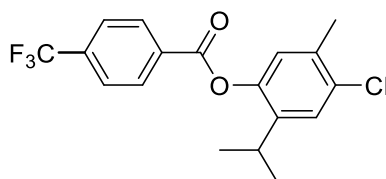
**IR** (ATR): 2983, 2966, 2925, 2868, 1735, 1689, 1681, 1602, 1585, 1508, 1488, 1452, 1390, 1375, 1365, 1340, 1315, 1263, 1240, 1179, 1156, 1115, 1081, 1061, 1026, 1002, 983, 912, 879, 770, 735, 705, 685, 669, 657, 650, 623, 604 cm<sup>-1</sup>.

#### Elementární analýza:

Vypočteno C, 70.71; H, 5.93;

Nalezeno C, 70.75; H, 5.86

4-chlor-2-isopropyl-5-methylfenyl-4-(trifluormethyl)benzoát (ZK-2)



Sumární vzorec:	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> ClF <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
Relativní molekulová hmotnost:	356,77
Vzhled	olejovitá látka
Výtěžek	76 %
Teplota tání	--
R <sub>f</sub>	0,93

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>): δ 8.37 – 8.31 (2H, m, H<sub>2B</sub>, H<sub>6B</sub>), 8.03 – 7.97 (2H, m, H<sub>3B</sub>, H<sub>5B</sub>), 7.43 (1H, s, H<sub>3A</sub>), 7.29 (1H, s, H<sub>6A</sub>), 2.96 (1H, hept, *J* = 6.9 Hz, CH), 2.31 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.14 (6H, d, *J* = 6.9 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>): δ 164.04, 146.69, 139.89, 134.04 (q, *J* = 31.9 Hz), 133.91, 132.80, 131.56, 131.16, 130.57, 127.47, 126.61 (q, *J* = 3.8 Hz), 125.55, 124.10 (q, *J* = 272.8 Hz), 27.49, 22.97, 19.57.

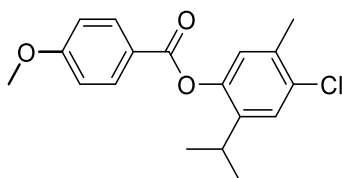
**IR** (ATR): 2966, 2930, 2873, 1745, 1697, 1587, 1514, 1488, 1445, 1412, 1392, 1377, 1366, 1327, 1307, 1287, 1265, 1256, 1238, 1167, 1157, 1121, 1113, 1076, 1068, 1016, 982, 899, 863, 821, 785, 771, 761, 731, 666, 650, 632 cm<sup>-1</sup>.

**Elementární analýza:**

Vypočteno C, 60.60; H, 4.52; O, 8.97;

Nalezeno C, 60.52; H, 4.58; O, 8.93

4-chlor-2-isopropyl-5-methylfenyl-4-methoxybenzoát (ZK-3)



Sumární vzorec:	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> ClO <sub>3</sub>
Relativní molekulová hmotnost:	318,80
Vzhled	bílá pevná látka
Výtěžek	73 %
Teplota tání	97,0–100,2 °C
R <sub>f</sub>	0,67

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>): δ 8.07 – 8.04 (2H, m, H<sub>2B</sub>, H<sub>6B</sub>), 7.36 (1H, s, H<sub>3A</sub>), 7.16 (1H, s, H<sub>6A</sub>), 7.12 – 7.08 (2H, m, H<sub>3B</sub>, H<sub>5B</sub>), 3.84 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 2.90 (1H, hept, *J* = 7.0 Hz, CH), 2.26 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.10 (6H, d, *J* = 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>): δ 164.74, 164.44, 147.09, 140.10, 134.53, 132.53, 131.18, 127.38, 125.87, 121.13, 114.99, 56.22, 27.66, 23.02, 19.61.

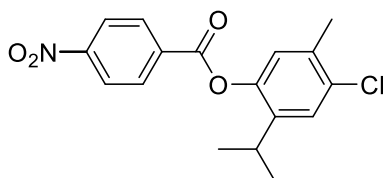
**IR** (ATR): 2966, 2629, 2839, 1728, 1684, 1635, 1605, 1541, 1513, 1488, 1456, 1442, 1422, 1391, 1375, 1367, 1340, 1305, 1268, 1255, 1240, 1183, 1170, 1157, 1117, 1073, 1060, 1027, 1007, 982, 899, 858, 819, 766, 730, 696, 658, 604 cm<sup>-1</sup>.

**Elementární analýza:**

Vypočteno C, 67.82; H, 6.01;

Nalezeno C, 67.75; H, 6, 12

4-chlor-2-isopropyl-5-methylfenyl-4-nitrobenzoát (ZK-4)



Sumární vzorec:	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> ClNO <sub>4</sub>
Relativní molekulová hmotnost:	333,77
Vzhled	žluté krystaly
Výtěžek	84%
Teplota tání	103,3–105,1 °C
R <sub>f</sub>	0,81

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>): δ 8.42 – 8.36 (2H, m, H<sub>3B</sub>, H<sub>5B</sub>), 8.35 – 8.33 (2H, m, H<sub>2B</sub>, H<sub>6B</sub>), 7.40 (1H, s, H<sub>3A</sub>), 7.26 (1H, s, H<sub>6A</sub>), 2.93 (1H, hept, *J* = 6.9 Hz, CH), 2.27 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.11 (6H, d, *J* = 6.9 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>): δ 163.75, 151.28, 146.71, 139.92, 134.75, 134.48, 131.71, 127.55, 125.60, 125.51, 124.72, 27.49, 23.04, 19.65.

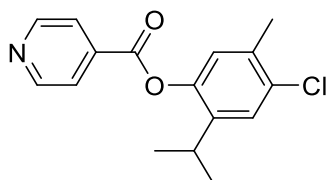
**IR** (ATR): 3116, 3082, 2965, 2631, 2871, 1743, 1693, 1608, 1522, 1491, 1437, 1411, 1391, 1351, 1321, 1257, 1238, 1156, 1117, 1077, 1063, 1015, 983, 903, 875, 858, 836, 781, 772, 737, 715, 650, 639, 631 cm<sup>-1</sup>.

**Elementární analýza:**

Vypočteno C, 61.18; H, 4.83;

Nalezeno C, 61.05; H, 4.89

4-chlor-2-isopropyl-5-methylfenl-isonikotinát (ZK-5)



Sumární vzorec:	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> ClNO <sub>2</sub>
Relativní molekulová hmotnost:	289,76
Vzhled	bílá pevná látka
Výtěžek	62 %
Teplota tání	96,9–98,0 °C
R <sub>f</sub>	0,23

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>): δ 8.88 – 8.85 (2H, m, H<sub>2B</sub>, H<sub>6B</sub>), 7.99 – 7.97 (2H, m, H<sub>3B</sub>, H<sub>5B</sub>), 7.40 (1H, s, H<sub>3A</sub>), 7.26 (1H, s, H<sub>6A</sub>), 2.92 (1H, hept, *J* = 6.9 Hz, CH), 2.27 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.11 (6H, d, *J* = 6.9 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>): 164.15, 151.63, 146.64, 139.91, 136.40, 134.76, 131.72, 127.57, 125.53, 123.45, 27.53, 23.04, 19.66.

IR (ATR): 2967, 2932, 2870, 1741, 1594, 1564, 1558, 1509, 1488, 1451, 1410, 1391, 1367, 1341, 1324, 1260, 1240, 1213, 1156, 1119, 1103, 1088, 1070, 1061, 1009, 991, 982, 907, 880, 857, 844, 775, 752, 735, 724, 704, 683, 664, 655, 630 cm<sup>-1</sup>.

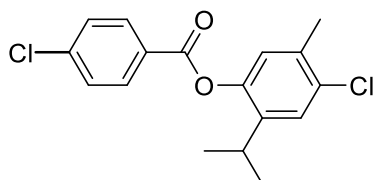
**Elementární analýza:**

Vypočteno C, 66.32; H, 5.57;

Nalezeno C, 66.43; H, 5.67



4-chlor-2-isopropyl-5-methylfenyl-4-chlorbenzoát (ZK-6)



Sumární vzorec:	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Relativní molekulová hmotnost:	323,21
Vzhled	bílá pevná látka
Výtěžek	40 %
Teplota tání	98,0–99,3 °C
R <sub>f</sub>	0,93

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.12 – 8.09 (2H, m, H<sub>2B</sub>, H<sub>6B</sub>), 7.67 – 7.64 (2H, m, H<sub>3B</sub>, H<sub>5B</sub>), 7.38 (1H, s, H<sub>3A</sub>), 7.21 (1H, s, H<sub>6A</sub>), 2.90 (1H, hept, *J* = 7.0 Hz, CH), 2.26 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.10 (6H, d, *J* = 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>): δ 164.34, 146.84, 139.99, 139.80, 134.66, 132.17, 131.49, 129.88, 127.93, 127.48, 125.69, 27.59, 23.03, 19.63.

IR (ATR): 2963, 2928, 1733, 1594, 1489, 1444, 1402, 1390, 1377, 1365, 1342, 1258, 1242, 1200, 1173, 1156, 1118, 1106, 1092, 1067, 1036, 1015, 984, 908, 883, 854, 847, 777, 752, 741, 726, 683, 650, 640, 630 cm<sup>-1</sup>.

**Elementární analýza:**

Vypočteno C, 63.17; H, 4.99;

Nalezeno C, 63.20; H, 5.08

## 4.2.2 Syntéza esterů aminokyselin a charakterizace

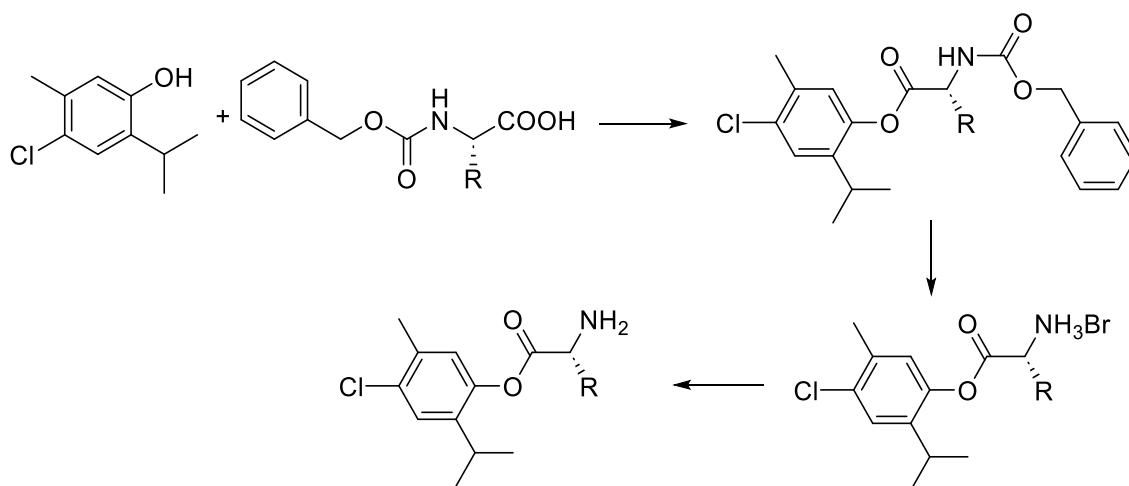
### 4.2.2.1 Postup

#### Steglichova esterifikace (ZK-7a-10a)

4 mmol chráněné aminokyseliny (AMK), 4,4 mmol chlorthymolu (920 mg) a 0,4 mmol 4-(dimethylamino)pyridinu (DMAP; 48 mg) byly rozpuštěny v 20 ml DCM, směs byla ochlazená v ledové lázni na 0 °C a pak bylo najednou přidáno 6 mmol *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimid hydrochloridu (1150 mg) (**Obr. 10**). Po 1 hodině bylo chlazení přerušeno a reakční směs byla ponechána reagovat dalších 24 hodin za laboratorní teploty. Monitorování reakce probíhalo za pomoci TLC, soustava *n*-hexan/ethyl-acetát 9:1 <sup>v/v</sup>. Následně byla reakční směs extrahována nasyceným roztokem Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2'50 ml), 1M roztokem HCl (2x 50 ml) a nasyceným roztokem NaCl (1'50 ml) a organická vrstva byla poté vysušena stáním nad bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Pevný podíl byl následně odfiltrován a filtrát byl odpařen za sníženého tlaku. Surové produkty byly přečištěny pomocí sloupcové chromatografie (MF *n*-hexan/ethyl-acetát 9:1 <sup>v/v</sup>). Připravené sloučeniny byly charakterizovány pomocí NMR, IR spekter, teploty tání a hodnot *R<sub>f</sub>*.

#### Odchránění AMK a vytěsnění hydrobromidové soli (ZK-7b-10b)

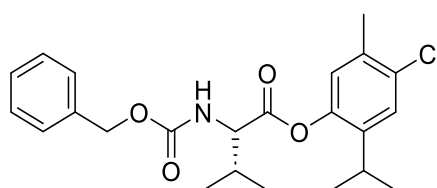
K 1 mmol látky **ZK-7a-10a** bylo postupně přikapáno 6 ml 33% roztoku HBr v kyselině octové. Směs se míchala na magnetické míchačce po dobu 30 minut, kdy bylo možné pozorovat uvolňování CO<sub>2</sub> a zabarvení reakční směsi na hnědo. Následně bylo přidáno 20 ml studeného diethyl etheru (DEE). Vzniklý precipitát byl odfiltrován a promyt DEE (3'15 ml). Izolované krystaly byly následně suspendovány v 10 ml suchého DCM a bylo přidáno 0,95 mmol triethylaminu (0,13 ml) a reakční směs se nechala míchat při pokojové teplotě. Po 30 minutách míchání byla reakční směs převedena do dělicí nálevky a extrahována demineralizovanou vodou (2'50 ml) a nasyceným roztokem NaCl. Organická vrstva byla vysušena stáním nad bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, tuhé části byly odfiltrovány a filtrát byl odpařen za sníženého tlaku. Připravené sloučeniny byly charakterizovány pomocí NMR, IR spekter, teploty tání a hodnot *R<sub>f</sub>*.



Obrázek 10 – Syntéza esterů aminokyselin

#### 4.2.2.2 Charakterizace

##### 4-chlor-2-isopropyl-5-methylfenyl-[(benzyloxy)karbonyl]-L-valinát (ZK-7a)



Sumární vzorec:	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> ClNO <sub>4</sub>
Relativní molekulová hmotnost:	417,93
Vzhled	olejovitá látka
Výtěžek	76 %
Teplota tání	-
R <sub>f</sub>	0,75

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.41 (1H, s, NH), 7.95 (1H, s, H<sub>3</sub>), 7.38 – 7.33 (5H, m, CH<sub>2</sub>-Ph), 6.96 (1H, s, H<sub>6</sub>), 5.11 (1H, d, *J* = 12.6 Hz, CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>-Ph), 5.06 (1H, d, *J* = 12.6 Hz, CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>-Ph), 4.19 – 4.15 (1H, m, NH-C'H-), 2.95 (1H, hept, *J* = 6.8 Hz, Ar-CH), 2.27 (3H, s, Ar-CH<sub>3</sub>), 2.25 – 2.19 (1H, m, C'H<sub>3</sub>-C'H-C'H<sub>3</sub>), 1.11 – 1.06 (6H, m, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 1.04 – 1.00 (6H, m, C'H<sub>3</sub>-C'H-C'H<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 170.95, 156.71, 146.29, 139.80, 137.02, 134.22, 131.00, 128.52, 128.05, 127.98, 127.00, 124.69, 65.86, 60.33, 29.64, 26.51, 22.79, 19.22, 18.50.

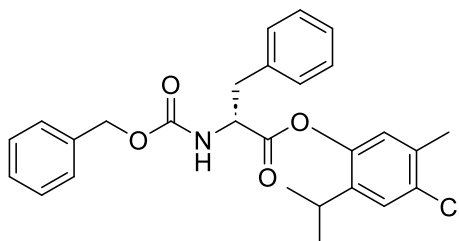
**IR (ATR):** 3351, 2966, 2874, 1760, 1727, 1647, 1563, 1509, 1487, 1455, 1391, 1374, 1339, 1307, 1266, 1240, 1178, 1155, 1115, 1094, 1069, 1045, 1027, 967, 916, 882, 850, 801, 775, 737, 698, 977, 652, 637, 629, 623, 605  $\text{cm}^{-1}$ .

**Elementární analýza:**

Vypočteno C, 66.10; H, 6.75; N, 3.35

Nalezeno C, 66.19; H, 6.64; N, 3.42

4-chlor-2-isopropyl-5-methylfenyl-[(benzyloxy)karbonyl]-L-fenylalaninát (ZK-8a)



Sumární vzorec:	C <sub>27</sub> H <sub>28</sub> ClNO <sub>4</sub>
Relativní molekulová hmotnost:	465,97
Vzhled	bílá pevná látka
Výtěžek	46 %
Teplota tání	79,2–80,3 °C
R <sub>f</sub>	0,67

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 8.13 – 8.07 (1H, m, NH), 7.39 – 7.23 (m, 11H, CH<sub>2</sub>-Ph, C'H<sub>2</sub>-Ph', H3), 6.83 – 6.78 (1H, m, H6), 5.08 – 5.04 (2H, m, CH<sub>2</sub>-Ph), 3.33 – 3.19 (2H, m, C'H<sub>2</sub>-Ph), 2.87 – 2.81 (1H, m, CH), 2.25 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.08 – 1.03 (6H, m, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 171.40, 156.56, 146.60, 140.13, 137.47, 137.28, 134.37, 131.28, 129.74, 128.81, 128.79, 128.30, 128.11, 127.25, 127.18, 124.94, 66.05, 56.17, 36.67, 26.76, 23.06, 19.54.

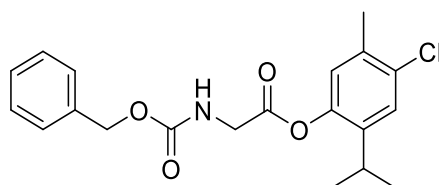
**IR** (ATR): 3353, 2963, 1777, 1688, 1587, 1525, 1507, 1499, 1486, 1466, 1454, 1428, 1388, 1372, 1358, 1331, 1278, 1242, 1213, 1194, 1173, 1156, 1142, 1118, 1099, 1068, 1049, 1030, 1010, 989, 965, 941, 918, 912, 892, 873, 849, 839, 788, 748, 734, 698, 652, 638, 629, 621 cm<sup>-1</sup>.

**Elementární analýza:**

Vypočteno C, 69.60; H, 6.06

Nalezeno C, 69.58; H, 6,02

4-chlor-2-isopropyl-5-methylfenyl-[(benzyloxy)karbonyl]-L-glycinát (ZK-9a)



Sumární vzorec:	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>4</sub>
Relativní molekulová hmotnost:	375,85
Vzhled	olejovitá látka
Výtěžek	49 %
Teplota tání	-
R <sub>f</sub>	0,46

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.86 (1H, t, *J* = 6.1 Hz, NH), 7.35 – 7.28 (6H, m, CH<sub>2</sub>-Ph, H3), 7.00 (1H, s, H6), 5.04 (2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.05 (2H, d, *J* = 6.2 Hz, NH-CH<sub>2</sub>-CO), 2.91 (1H, hept, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 2.24 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.07 (6H, d, *J* = 6.8 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 169.79, 157.13, 146.62, 140.16, 137.41, 134.52, 131.34, 128.89, 128.40, 128.27, 127.43, 125.28, 66.22, 42.96, 27.09, 23.16, 19.60.

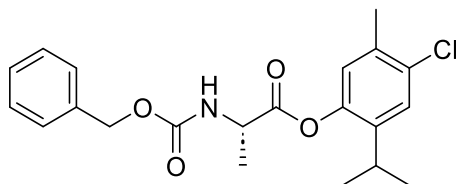
IR (ATR): 3345, 2964, 2932, 1775, 1712, 1695, 1532, 1494, 1485, 1456, 1406, 1393, 1371, 1341, 1286, 1257, 1243, 1157, 1114, 1070, 1053, 1008, 981, 971, 946, 923, 910, 883, 864, 846, 836, 784, 776, 761, 731, 720, 700, 661, 654, 626, 615 cm<sup>-1</sup>.

**Elementární analýza:**

Vypočteno C, 63.91; H, 5.90; N, 3.73

Nalezeno: C, 63.94; H, 5.87; N, 3.70

4-chlor-2-isopropyl-5-methylfenyl-[(benzyloxy)karbonyl]-L-alaninát (ZK-10a)



Sumární vzorec:  $C_{21}H_{24}ClNO_4$

Relativní molekulová hmotnost: 389,88

Vzhled olejovitá látka

Výtěžek 74 %

Teplota tání -

$R_f$  0,69

$^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7.97 (1H, s, H3), 7.34 – 7.27 (5H, m,  $CH_2$ -Ph), 6.95 (1H, s, H6), 5.07 – 5.01 (2H, m,  $CH_2$ -Ph), 4.37 – 4.31 (1H, m,  $C'H$ - $C'H_3$ ), 2.91 (1H, hept,  $J = 7.0$  Hz,  $CH_3$ - $CH$ - $CH_3$ ), 2.24 (3H, s, Ar- $CH_3$ ), 1.42 (3H, d,  $J = 7.3$  Hz,  $C'H$ - $C'H_3$ ), 1.09 – 1.04 (6H, m,  $CH_3$ - $CH$ - $CH_3$ ).

$^{13}C$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  172.40, 156.52, 146.75, 140.13, 137.39, 134.53, 131.32, 128.88, 128.40, 128.32, 127.32, 125.16, 66.15, 50.18, 26.99, 23.05, 19.58, 17.19.

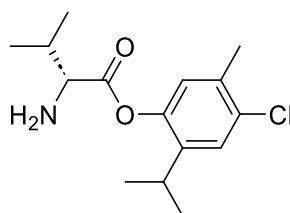
IR (ATR): 3332, 2978, 2960, 2879, 1771, 1689, 1525, 1488, 1456, 1389, 1360, 1330, 1308, 1264, 1242, 1211, 1158, 1148, 1128, 1100, 1068, 1041, 1030, 1012, 1005, 990, 972, 940, 901, 875, 862, 841, 786, 775, 743, 717, 697, 662, 654, 648, 636, 623, 617, 610  $cm^{-1}$ .

**Elementární analýza:**

Vypočteno C, 64.70; H, 6.21; O, 16.41

Nalezeno C, 64.65; H, 6.30; O, 16.32

4-chlor-2-isopropyl-5-methylfenyl-L-valinát (ZK-7b)



Sumární vzorec: C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>ClNO<sub>2</sub>

Relativní molekulová hmotnost: 283,80

Vzhled polotuhá látka

Výtěžek 7 %

Teplota tání -

R<sub>f</sub> 0,53

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.33 (1H, s, H<sub>3</sub>), 6.97 (1H, s, H<sub>6</sub>), 3.38 (1H, d, *J* = 5.4 Hz, NH<sub>2</sub>-C'H-CO), 2.91 (1H, hept, *J* = 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 2.24 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2.03 (1H, pd, *J* = 6.8, 5.4 Hz, C'H-C'H<sub>3</sub>), 1.10 – 1.07 (6H, m, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 0.97 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, C'H-C'H<sub>3</sub>), 0.91 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, C'H-C'H<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 174.66, 146.85, 140.15, 134.49, 131.16, 127.28, 125.28, 60.32, 32.13, 26.96, 23.25, 19.96, 19.60, 17.81.

IR (ATR): 3271, 3065, 2963, 2929, 2873, 1747, 1704, 1697, 1658, 1633, 1542, 1506, 1486, 1469, 1454, 1398, 1376, 1341, 1253, 1227, 1168, 1121, 1070, 1045, 1009, 995, 918, 881, 849, 808, 758, 717, 682, 660, 652, 645, 620 cm<sup>-1</sup>.

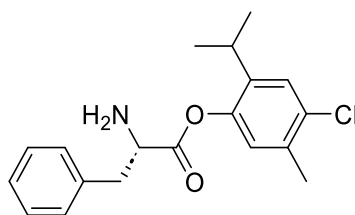
**Elementární analýza:**

Vypočteno C, 63.48; H, 7.81; N, 4.94;

Nalezeno C, 63.42; H, 7.93; N, 4.93



4-chlor-2-isopropyl-5-methylfenyl-L-fenylalaninát (ZK-8b)



Sumární vzorec:	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>2</sub>
Relativní molekulová hmotnost:	331,84
Vzhled	polotuhá látka
Výtěžek	21 %
Teplota tání	-
R <sub>f</sub>	0,55

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  7.37 – 7.21 (6H, m, H<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-Ph), 6.80 (1H, s, H<sub>6</sub>), 3.88 (1H, t, *J* = 7.2 Hz, CH), 3.05 – 2.91 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.65 (1H, hept, *J* = 6.8 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 2.24 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.04 – 0.99 (6H, m, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  174.10, 146.41, 139.85, 137.94, 133.93, 130.75, 129.49, 128.40, 126.86, 126.60, 124.76, 56.21, 55.07, 26.39, 22.83, 22.78, 19.25.

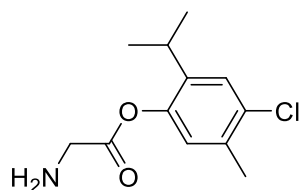
**IR** (ATR): 3029, 2964, 2927, 2870, 1756, 1675, 1659, 1605, 1576, 1496, 1487, 1455, 1391, 1375, 1338, 1253, 1241, 1155, 1117, 1069, 1031, 1010, 983, 881, 852, 806, 755, 700, 664, 658, 638, 630, 620 cm<sup>-1</sup>.

**Elementární analýza:**

Vypočteno C, 68.77; H, 6.68; O, 9.64

Nalezeno C, 68.65; H, 6.74; O, 9.72

4-chlor-2-isopropyl-5-methylfenyl-L-glycinát (ZK-9b)



Sumární vzorec:	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> ClNO <sub>2</sub>
Relativní molekulová hmotnost:	241,71
Vzhled	polotuhá látka
Výtěžek	30 %
Teplota tání	-
R <sub>f</sub>	0,33

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.37 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 7.00 (1H, s, H<sub>3</sub>), 6.67 (1H, s, H<sub>6</sub>), 3.76 – 3.71 (1H, m, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.67 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.08 (1H, hept, *J* = 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 2.14 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.08 (6H, d, *J* = 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 166.63, 153.67, 134.57, 133.29, 126.55, 123.26, 117.91, 44.88, 26.70, 22.83, 19.79.

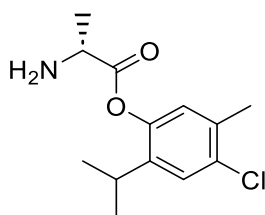
IR (ATR): 3298, 3195, 3050, 2964, 2926, 2873, 1749, 1697, 1629, 1533, 1501, 1483, 1471, 1445, 1398, 1378, 1364, 1342, 1253, 1228, 1163, 1120, 1103, 1071, 1035, 1010, 995, 916, 882, 840, 808, 757, 726, 659, 647, 620 cm<sup>-1</sup>.

**Elementární analýza:**

Vypočteno C, 59.63; H, 6.67; N, 5.79;

Nalezeno C, 59.60; H, 6.68; N, 5.84

4-chlor-2-isopropyl-5-methylfenyl-L-alaninát (ZK-10b)



Sumární vzorec:	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> ClNO <sub>2</sub>
Relativní molekulová hmotnost:	255,74
Vzhled	polotuhá látka
Výtěžek	28 %
Teplota tání	-
R <sub>f</sub>	0,35

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.38 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 7.00 (1H, s, H<sub>3</sub>), 6.67 (1H, s, H<sub>6</sub>), 3.86 (1H, m, CHNH<sub>2</sub>), 3.08 (1H, hept, *J* = 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 2.14 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.21 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, CHCH<sub>3</sub>), 1.08 (6H, d, *J* = 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 169.58, 153.67, 134.57, 133.29, 126.55, 123.25, 117.91, 50.32, 26.70, 22.83, 19.79, 19.03.

IR (ATR): 3075, 2964, 2872, 2607, 1747, 1674, 1588, 1506, 1488, 1455, 1434, 1411, 1375, 1362, 1319, 1301, 1253, 1222, 1166, 1119, 1070, 1033, 1014, 994, 962, 921, 882, 849, 825, 771, 758, 728, 673, 659, 646, 621 cm<sup>-1</sup>.

**Elementární analýza:**

Vypočteno C, 61.05; H, 7.09; N, 5.48;

Nalezeno C, 60.98; H, 7.13; N, 5.50

## 4.2 Biologická část

### 4.2.1 Stanovení antibakteriální aktivity

U všech připravených sloučenin byla stanovena antibakteriální aktivita proti osmi klinicky významným kmenům. Jednalo se o čtyři G+ kmeny: *Staphylococcus aureus* (SA), subsp. aureus ATCC 29213, CCM 4223, methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), subsp. aureus ATCC 43300, CCM 4750, *Staphylococcus epidermidis* (SE), ATCC 12228, CCM 4418, *Enterococcus faecalis* (EF), ATCC 29212, CCM 4224, a čtyři G- kmeny: *Escherichia coli* (EC), ATCC 25922, CCM 2954, *Klebsiella pneumoniae* (KP), ATCC 10031, CCM 4415, *Acinetobacter baumannii* (ACI), ATCC 19606, DSM 30007 a *Pseudomonas aeruginosa* (PA), ATCC 27853, CCM 3955.

Antibakteriální aktivita byla stanovena pomocí mikrodiluční bujonové metody v destičkách dle standardu EUCAST [44]. Každá jamka v mikrodiluční destičce obsahovala 200 µl media a 10 µl suspenze inokula. Jako medium byl použit Mueller Hintonův bujon č. 2 (CAMHB) o pH 7,0. Inokulum odpovídalo velikosti 0,5 dle stupnice McFarlanda [ $1,5 \cdot 10^8$  CFU (colony forming units)/ml]. Inkubace proběhla při teplotě  $35 \pm 2$  °C po dobu 24–48 h, inkubace byla statická, ve tmě a humidní atmosféře. Testovaná látka byla rozpuštěna v DMSO a její výsledná koncentrace byla 0,49–500 µmol/l. Po inkubaci testovaných látek s osmi klinicky významnými kmeny byl proveden odečet MIC (µmol/l). Jako standard bylo použito beta-laktamové antibiotikum piperacilin (PIP). Hodnota MIC odpovídá 95 % inhibovaných bakterií. Inhibice růstu bakterií byla stanovena vizuálně.

Testování provedla Ida Dufková z Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

### 4.2.2 Stanovení antimykotické aktivity

Aktivita proti mykobakteriím byla stanovena za pomoci pěti kmenům mykobakterií, a to konkrétně *Mycolicibacterium smegmatis* ATCC 607 (DSM 43465), *Mycolicibacterium aurum* ATCC 23366 (DSM 43999), *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii* a *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra ATCC 9431 (ITM-M006710).

Metoda pro stanovení aktivity byla použita opět mikrodiluční bujonová metoda na 96-jamkové mikrotitrační destičce. V každé jamce bylo kultivační médium, kterým byl Middlebrook agar 7H9 s 0,4 % glycerolu a 10 % růstového doplňku Middlebrook OADC. Suspenze inokula byla upravena na hodnotu 1,0 dle stupnice McFarlanda a zředěna bujónem

1:10 (pro *M. tuberculosis*) nebo 1:20 (pro rychle rostoucí mykobakterie). Jednotlivé sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO a následně byl přidán Middlebrookův bujón tak, aby koncentrace testovaných sloučenin činila 2000 µg/ml. Finální koncentrace byly získány dvojkovým ředěním a odpovídaly 3,91–2000 µg/ml. Koncentrace DMSO nepřesáhla 2,5 % a neovlivnila růst mykobakterií. Jako standard byl použit isoniazid (INH), který byl rozpuštěn v demineralizované vodě.

Podmínky inkubace byly definovány při 37 °C, statická inkubace ve tmě. Čas inkubace se pro jednotlivé kmeny lišil: *M. smegmatis* 48 hodin, *M. tuberculosis* 120 hodin, ostatní kmeny 72 hodin, po této době inkubace bylo do všech jamek destičky přidáno barvivo připravené rozpuštěním sodné soli resazurinu v deionizované vodě (0,01 %) a 10% vodného roztoku Tween 80. Mikrotitrační destička byla inkubována po dobu 2,5–24 hod podle druhu patogenu. MIC byla po této době inkubace odečtena vizuálně na základě změny barvy jamek. Růžově zbarvená jamka značí neaktivní sloučeninu, modré zbarvení jamky znamená aktivní sloučeninu. Zahrnuty byly i pozitivní a negativní růstové kontroly. Všechny experimenty byly provedeny v duplikátech.

Antimykobakteriální aktivitu stanovil PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D., z Katedry biologických a lékařských věd FaF UK v HK.

### 4.2.3 Stanovení antifungální aktivity

U připravených sloučenin byla dále sledována jejich antifungální aktivita vůči osmi klinicky relevantním kmenům patogenních hub. Jednalo se o čtyři kmeny kvasinek: *Candida albicans* (CA) ATCC 24433, CCM 8320, *Candida tropicalis* (CT) ATCC 750, CCM 8264156, *Candida krusei* (CK) ATCC 6258, CCM 8271, *Candida parapsilosis* (CP) ATCC 22019, CCM 8260, a čtyři kmeny vláknitých hub: *Aspergillus fumigatus* (AF) ATCC 204305, *Aspergillus flavus* (AFla) CCM 8363305, *Absidia corymbifera* (AC) CCM 8077 a *Trichophyton interdigitale* (TI) ATCC 9533, CCM 8377. Ke stanovení antifungální aktivity byla opět použita mikrodiluční bujónová metoda v destičkách dle standardů EUCAST [44], každá jamka s obsahem 200 µl média a 10 µl suspenze inokula. Jako médium byl použit RPMI-1640 s glutaminem a 2% glukózou a pH bylo upraveno na 7,0 za použití 3-(*N*-morfolino)propansulfonové kyseliny o 0,165M koncentraci. Výsledné inokulum mělo velikost 0,5-2×10<sup>5</sup> CFU/ml. Teplota inkubace byla 35±2 °C (v případě TI 25–28 °C), trvala 24–48 h (v případě TI 5–7 dní), probíhala staticky, ve tmě a při humidní atmosféře. Jako standard bylo použito triazolové antimykotikum

flukonazol (FLU). Inhibice růstu hub byla odečtena vizuálně.

Hodnoty MIC stanovila Ida Dufková z Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

## 5 Výsledky a diskuze

Chlorthymol byl jako výchozí sloučenina zvolen na základě biologické aktivity thymolu a faktu, že halogenace molekul v řadě případů zvyšuje antimikrobní aktivitu.

Pro testování bylo připraveno 14 sloučenin z výchozí molekuly chlorthymolu: ZK-1, ZK-2, ZK-3, ZK-4, ZK-5, ZK-6, ZK-7a, ZK-8a, ZK-9a, ZK-10a, ZK-7b, ZK-8b, ZK-9b, ZK-10b, z nichž je 13 originálních. Pouze ester s kyselinou benzoovou byl popsán na konci 19. století [45]. Estery ZK-1–ZK-5 byly připraveny reakcí komerčně dostupných příslušných chloridu 4-substituovaných benzoových kyselin a kyseliny isonikotinové chlorthymolem v přítomnosti base. U esterů s  $\alpha$ -aminokyselinami ZK-7a–ZK-10b byly nejprve připraveny estery s *Z*-chráněnými aminokyselinami, a to Steglichovou esterifikací karbodiimidem v přítomnosti DMAP, čímž vznikly látky ZK-7a–ZK-10a, které sloužily jako reaktanty pro přípravu ZK-7b–ZK-10b, kdy byla nejprve acidolyticky odbourána chránicí skupina, a pak byla vzniklá sůl reakcí s bazí převedena na ester s volnou aminoskupinou.

Výtěžky benzoátů a isonikotínátů (ZK-1–ZK-6) byly dostačující (40–84 %), chráněné estery ZK-7a–10 stále dosahovaly podobných výsledků (46–74 %), avšak při odchránění solí k vyšším ztrátám a tím i k nižším výsledkům (7–30 %). Nejvyšší hodnota byla u ZK-4 (nitrobenzoát) s výsledkem 83 %. Nejnižšího výtěžku dosáhla látka ZK-7b se substituovaným valínátem a to 7 %, nízké hodnoty vykazoval i fenylalaninát, glycinát a alaninát. Ke ztrátám výtěžnosti došlo pravděpodobně při přenášení produktu z laboratorních nádob, jelikož se jednalo o malá množství.

Antimikrobiální aktivita připravených látek byla otestována za pomoci mikrodiluční bujónové metody. Testování proběhlo pro zjištění antibakteriální, antifungální a antimykotické aktivity.

Výsledky antibakteriálního testování, popisuje tabulka č. 2, pro testování byly použity čtyři G<sup>+</sup> kmeny: SA, MRSA, SE, EF a čtyři G<sup>-</sup> kmeny: EC, KP, ACI, PA. Přičemž významnější účinky prokázala sloučenina ZK-7a (Tab. 2), ester se *Z*-L-valinem, a to vůči SA, MRSA, EF shodně s MIC 125  $\mu\text{mol/l}$  a s MIC 250  $\mu\text{mol/l}$  pro SE a KP. Látka ZK-5 také SA a EF při MIC 500  $\mu\text{mol/l}$ , SE pak při MIC 125  $\mu\text{mol/l}$ . V porovnání s výchozí molekulou chlorthymolu (Cl-THY), byly nově připravené estery obecně méně účinné, pouze ve třech případech byla MIC poloviční, a to u ZK-7a vůči MRSA a EF a ZK-5 vůči SA se shodnou hodnotou MIC 125  $\mu\text{mol/l}$  (Cl-THY 250  $\mu\text{mol/l}$ ). Krom ZK-5 s ZK-7a nebyla pozorována žádná inhibiční aktivita. Látky ZK-7b, ZK-8b, ZK-9b, ZK-10b nebylo možné testovat, jelikož nebyly při testování dostatečně rozpustné v rozpouštědle DMSO.

Kód/ kmen		MIC/IC <sub>95</sub> [μmol/l]										
		ZK-1	ZK-2	ZK-3	ZK-4	ZK-5	ZK-6	ZK-7a	ZK-8a	ZK-9a	ZK-10a	Cl-THY
SA	24 h	>500	>500	>500	>500	500	>500	125	>500	>500	>500	125
	48 h	>500	>500	>500	>500	500	>500	250	>500	>500	>500	250
MRSA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	125	>500	>500	>500	250
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250	>500	>500	>500	250
SE	24 h	>500	>500	>500	>500	125	>500	250	>500	>500	>500	250
	48 h	>500	>500	>500	>500	250	>500	250	>500	>500	>500	250
EF	24 h	>500	>500	>500	>500	500	>500	125	>500	>500	>500	250
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250	>500	>500	>500	250
EC	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250
KP	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250	>500	>500	>500	250
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500	>500	>500	250
ACI	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250
PA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250
<i>Staphylococcus aureus</i> (SA), MRSA, <i>Staphylococcus epidermidis</i> (SE), <i>Enterococcus faecalis</i> (EF), <i>Escherichia coli</i> (EC), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (KP), <i>Acinetobacter baumannii</i> (ACI) a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA). Chlorthymol (Cl-THY)												

Tabulka 2 - Antibakteriální aktivita terpenů

Antimykobakteriální aktivita byla otestována vůči 5 kmenům: *Mycolicibacterium smegmatis*, *Mycolicibacterium aurum*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii* a *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra (**Tab. č.3**). Jako standardy byla použita 3 léčiva: isoniazid, rifampicin a ciprofloxacín. Vůči *Mycolicibacterium avium* byla zaznamenána aktivita minimální (od 62,5 μg/ml), v případě ZK-7a a ZK-8a žádná, pouze chlorthymol působil při nižší koncentraci MIC při 31,25 μmol/l. V porovnání s INH (1000 μg/ml) byly koncentrace účinných terpenů nízké.



Podobná situace platila i pro *Mycolicibacterium smegmatis*, kdy nejnižší MIC odpovídalo 15,625 µg/ml, a to u ZK-5 a Cl-THY. Nejvýraznější inhibice růstu byla pozorována u *Mycobacterium kansasii*, kdy nejnižší MIC dosáhly u ZK-3 a ZK-4 7,81 µg/ml, stejně tak u Cl-THY.

MIC [µg/ml]									
Kód/ kmen	ZK-1	ZK-2	ZK-3	ZK-4	ZK-5	ZK-6	ZK-7a	ZK-8a	ZK-9a
<i>M. smegmatis</i>	≥ 500	125	≥ 500	31,25	<b>15,625</b>	62,5	250	≥ 500	31,25
<i>M. aurum</i>	31,25	31,25	31,25	<b>15,625</b>	<b>7,81</b>	31,25	500	≥ 500	<b>15,625</b>
<i>M. avium</i>	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	125	≥ 500	≥ 500	62,5
<i>M. kansasii</i>	<b>15,625</b>	<b>15,625</b>	<b>7,81</b>	<b>7,81</b>	<b>15,625</b>	<b>15,625</b>	62,5	31,25	31,25
<i>M. tbc,</i> <i>H<sub>37</sub>Ra</i>	125	125	250	<b>31,25</b>	62,5	250	≥ 500	≥ 500	62,5
	<b>ZK-10a</b>	<b>ZK-7b</b>	<b>ZK-8b</b>	<b>ZK-9b</b>	<b>ZK-10b</b>	<b>Cl-THY</b>	<b>INH</b>	<b>RIF</b>	<b>CIP</b>
<i>M. smegmatis</i>	62,5	31,25	62,5	62,5	62,5	<b>15,625</b>	15,625	25	0,125
<i>M. aurum</i>	62,5	<b>15,625</b>	31,25	<b>15,625</b>	<b>15,625</b>	<b>3,91</b>	3,91	0,39	0,015625
<i>M. avium</i>	125	62,5	62,5	125	62,5	<b>31,25</b>	1000	0,78	1,56
<i>M. kansasii</i>	<b>15,625</b>	<b>15,625</b>	62,5	62,5	31,25	<b>7,81</b>	6,25	0,05	0,25
<i>M. tbc.</i> <i>H<sub>37</sub>Ra</i>	250	<b>31,25</b>	62,5	125	62,5	62,5	0,25	0,003125	0,25
Chlorthymol (Cl-THY), isoniazid (INH), rifampicin (RIF), ciprofloxacin (CIP)									

Tabulka 3 - Antimykobakteriální aktivita terpenů

Vliv látek na růst hub je popsán tab. č. 4. Byla testována aktivita látek pro čtyři kmeny kvasinek: CA, CT, CK, CP a čtyři kmeny vláknitých hub: AF, AFla, ACa, TI. Podobně jako u bakterií se neúčinnější ukázal ester se Z-L-valinem ZK-7a, který působil inhibiči u všech kmenů. Inhibiči ještě dokázala navodit látka ZK-4 pro CK a CP s MIC 500 µmol/l. Všechny testované sloučeniny krom ZK-8a a ZK-10a inhibovaly růst TI MIC při 125 µmol/l u ZK-1,2,3,7 a MIC 250 µmol/l pro estery ZK-4, 5, 6, 9a. V tomto případě účinnější zůstala výchozí molekula chlorthymolu. Látky ZK-7b, ZK-8b, ZK-9b, ZK-10b nebylo možné testovat, jelikož nebyly rozpustné v rozpouštědle DMSO.

		MIC/IC <sub>95</sub> [μmol/l]										
Kód/ kmen		ZK-1	ZK-2	ZK-3	ZK-4	ZK-5	ZK-6	ZK-7a	ZK-8a	ZK-9a	ZK-10a	Cl-THY
<b>CA</b>	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>	>500	>500	>500	<b>250</b>
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>	>500	>500	>500	<b>250</b>
<b>CK</b>	24 h	>500	>500	>500	<b>500</b>	>500	>500	<b>500</b>	>500	>500	>500	<b>250</b>
	48 h	>500	>500	>500	<b>500</b>	>500	>500	<b>500</b>	>500	>500	>500	<b>250</b>
<b>CP</b>	24 h	>500	>500	>500	<b>500</b>	>500	>500	<b>500</b>	>500	>500	>500	<b>250</b>
	48 h	>500	>500	>500	<b>500</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250
<b>CT</b>	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>	>500	>500	>500	<b>250</b>
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>	>500	>500	>500	>250
<b>AF</b>	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>	>500	>500	>500	<b>250</b>
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>	>500	>500	>500	>250
<b>AFla</b>	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>	>500	>500	>500	<b>250</b>
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>
<b>AC</b>	24 h	>500	>500	>500	500	>500	>500	<b>250</b>	>500	>500	>500	<b>125</b>
	48 h	>500	>500	>500	500	>500	>500	<b>500</b>	>500	>500	>500	<b>250</b>
<b>TI</b>	24 h	<b>125</b>	<b>125</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>250</b>	<b>250</b>	<b>125</b>	>500	<b>250</b>	>500	<b>125</b>
	48 h	<b>125</b>	<b>125</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>250</b>	<b>250</b>	<b>125</b>	>500	<b>250</b>	>500	<b>125</b>

*Candida albicans* (CA), *Candida tropicalis* (CT), *Candida krusei* (CK), *Candida parapsilosis* (CP), *Aspergillus fumigatus* (AF), *Aspergillus flavus* (AFla), *Absidia corymbifera* (AC) CCM 8077, *Trichophyton interdigitale* (TI), chlorthymol (Cl-THY)

Tabulka 4 - Antifungální aktivita terpenů

## 6 Závěr

Antibiotická rezistence je v současné době obrovskou hrozbou pro veřejné zdraví. Je třeba řešit nejen její následky, ale také zamezit příčinám jejího vzniku a následného masivního šíření. Možným řešením je objevovat nová antibiotika účinkující zejména proti multirezistentním kmenům organismů. Jako jednou z cest se ukazují látky přírodního původu, jakou jsou terpeny.

Připravené terpeny se ukázaly účinné zejména vůči mykobakteriím, kdy nejlépe působily látky 4-chlor-2-isopropyl-5-methylfenyl-4-nitrobenzoát (ZK-4) a 4-chlor-2-isopropyl-5-methylfenyl-isonikotinát (ZK-5). Naopak účinek proti bakteriím a houbám byl minimální a pouze 4-chlor-2-isopropyl-5-methylfenyl-[(benzyloxy)karbonyl]-*L*-valinát (ZK-7a) úspěšně růst testovaných mikroorganismů inhiboval, ačkoli při poměrně vysokých koncentracích.

V plánu je testování cytotoxicity připravených sloučenin, abychom určili jejich selektivitu, zejména vůči mykobakteriím.

## 7 Seznam zkratek

- AC – *Absidia corymbifera*  
ACI – *Acinetobacter baumannii*  
AF – *Aspergillus fumigatus*  
AFla – *Aspergillus flavus*  
CA – *Candida albicans*  
CAMHB – Cation-Adjusted Mueller–Hinton Broth, Mueller Hintonův bujón  
CFU – colony forming units, jednotka tvořící kolonii  
CK – *Candida krusei*  
CI-THY – chlorthymol  
CP – *Candida parapsilosis*  
CT – *Candida tropicalis*  
DCM – dichlormethan  
DEE – diethylether  
DMAP – 4-(dimethylamino)pyridin  
DMSO-*d*<sub>6</sub> – deuterovaný dimethylsulfoxid  
DNA – deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina  
EC – *Escherichia coli*  
EC50 – Half maximal effective concentration, polovina maximální účinné koncentrace  
ED50 – The median effective dose, dávka pro 50% inhibici růstu  
EDC.HCl – *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimid hydrochlorid  
EF – *Enterococcus faecalis*  
ESBL – extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, širokospektré  $\beta$ -laktamázy  
ESKAPE – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter* spp.  
EUCAST – The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing,  
FDA – Food and Drug Administration, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv  
FLU – flukonazol  
G- – gramnegativní bakterie  
G+ – grampozitivní bakterie  
GRAS – Generally Recognized as Safe, všeobecně považovaná za bezpečná  
IL-6 – interleukin-6

INH – isoniazid  
IR spektrum – infrared spectrum, infračervené spektrum  
KP – *Klebsiella pneumoniae*  
KS – kanamycin sulfát  
LPS – lipopolysacharidy  
MBC – minimum bactericidal concentration, minimální baktericidní koncentrace  
MCF – Michigan Cancer Foundation  
MDR – multiple drug resistant  
MF – mobilní fáze  
MFC – minimum fungicidal concentration, minimální fungicidní koncentrace  
MIC – minimum inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace  
MRSA – methicilin resistant *Staphylococcus aureus*  
NMR – nuclear magnetic resonance, nukleární magnetická rezonance  
PA – *Pseudomonas aeruginosa*  
PBP – penicillin binding protein, protein vázající penicilin  
PIP – piperacilin  
R<sub>f</sub> – retenční faktor  
RNA – Ribonucleic acid, ribonukleová kyselina  
SA – *Staphylococcus aureus*  
SE – *Staphylococcus epidermidis*  
TI – *Trichophyton interdigitale*  
TLC – Thin Layer Chromatography, chromatografie na tenké vrstvě  
TNF- $\alpha$  – Tumor necrosis factor- $\alpha$ , tumor nekrotizující faktor- $\alpha$   
VISA – vancomycin.intermediate *Staphylococcus aureus*, vankomycin-intermediální *Staphylococcus aureus*

## 8 Seznam obrázků

Obrázek 1 - Biologicky aktivní monoterpeny.....	13
Obrázek 2 - Biologicky aktivní seskviterpeny.....	13
Obrázek 3 - Diterpeny.....	14
Obrázek 4 - Triterpeny.....	15
Obrázek 5 - Tetraterpeny.....	16
Obrázek 6 - Terpeny významné pro člověka.....	17
Obrázek 7 - Biologicky aktivní deriváty thymolu.....	19
Obrázek 8 – Terpeny aktivní vůči mykobakteriím.....	21
Obrázek 9 - Ester N-benzyloxykarbonylaminokyselin salicylanilidů.....	24
Obrázek 10 – Syntéza esterů aminokyselin.....	35

## 9 Seznam tabulek

Tabulka 1 - Terpeny aktivní proti G <sup>+</sup> bakteriím .....	20
Tabulka 2 - Antibakteriální aktivita terpenů .....	48
Tabulka 3 - Antimykobakteriální aktivita terpenů .....	49
Tabulka 4 - Antifungální aktivita terpenů .....	50

## 10 Seznam použité literatury

- [1] M. I. Hutchings, A. W. Truman, and B. Wilkinson, “Antibiotics: past, present and future,” *Curr Opin Microbiol*, vol. 51, pp. 72–80, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.mib.2019.10.008.
- [2] Q. Yang *et al.*, “Antibiotics: An overview on the environmental occurrence, toxicity, degradation, and removal methods,” *Bioengineered*, vol. 12, no. 1, pp. 7376–7416, Jan. 2021, doi: 10.1080/21655979.2021.1974657.
- [3] F. Spagnolo, M. Trujillo, and J. J. Dennehy, “Why Do Antibiotics Exist?,” *mBio*, vol. 12, no. 6, Dec. 2021, doi: 10.1128/mBio.01966-21.
- [4] M. Huemer, S. Mairpady Shambat, S. D. Brugger, and A. S. Zinkernagel, “Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives,” *EMBO Rep*, vol. 21, no. 12, Dec. 2020, doi: 10.15252/embr.202051034.
- [5] Ph. D. doc. MUDr. Helena Žemličková, “Přehledové články,” *Pediatr.praxi*, vol. 16, no. 5, 2015, [Online]. Available: [www.pediatricpropraxi.cz](http://www.pediatricpropraxi.cz)
- [6] A. Baran, A. Kwiatkowska, and L. Potocki, “Antibiotics and Bacterial Resistance—A Short Story of an Endless Arms Race,” *Int J Mol Sci*, vol. 24, no. 6, p. 5777, Mar. 2023, doi: 10.3390/ijms24065777.
- [7] K. Eva, “Increasing antibiotic resistance and rational use of antibiotics; Vyrůstající rezistence k antibiotikům a racionální antibiotická terapie,” 2019. [Online]. Dostupné na: [www.praktickelekarenstvi.cz](http://www.praktickelekarenstvi.cz)
- [8] J. P. Horcajada *et al.*, “Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections,” *Clin Microbiol Rev*, vol. 32, no. 4, Sep. 2019, doi: 10.1128/CMR.00031-19.
- [9] O. A. Shaikh, Z. Asghar, R. M. Aftab, S. Amin, G. Shaikh, and A. J. Nashwan, “Antimicrobial resistant strains of *Salmonella typhi*: The role of illicit antibiotics sales, misuse, and self-medication practices in Pakistan.,” *J Infect Public Health*, vol. 16, no. 10, pp. 1591–1597, Oct. 2023, doi: 10.1016/j.jiph.2023.08.003.
- [10] B. Jubeh, Z. Breijyeh, and R. Karaman, “Resistance of Gram-Positive Bacteria to Current Antibacterial Agents and Overcoming Approaches,” *Molecules*, vol. 25, no. 12, p. 2888, Jun. 2020, doi: 10.3390/molecules25122888.



- [11] Ph. D. MUDr. Otakar Nyč, “Novinky a trendy v antibiotické léčbě,” *Interní medicína pro praxi*, vol. 19, no. 3, pp. 142–144, 2017.
- [12] L. Součková and A. Ruzsíková, “Nová antibiotika v klinické praxi a výzkumu,” 2016. [Online]. Dostupné na: [www.klinickafarmakologie.cz/KlinFarmakolFarm2016;30](http://www.klinickafarmakologie.cz/KlinFarmakolFarm2016;30)
- [13] K. Browne *et al.*, “A New Era of Antibiotics: The Clinical Potential of Antimicrobial Peptides,” *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 19, p. 7047, Sep. 2020, doi: 10.3390/ijms21197047.
- [14] M. Chudzik, I. Korzonek-Szlacheta, and W. Król, “Triterpenes as potentially cytotoxic compounds,” 2015, *MDPI AG*. doi: 10.3390/molecules20011610.
- [15] M. Dvořáková, I. Valterová, and T. Vaněk, “Monoterpeny v rostlinách,” 2011.
- [16] D. Cox-Georgian, N. Ramadoss, C. Dona, and C. Basu, “Therapeutic and Medicinal Uses of Terpenes,” *Medicinal Plants*.
- [17] V. Ninkuu, L. Zhang, J. Yan, Z. Fu, T. Yang, and H. Zeng, “Biochemistry of terpenes and recent advances in plant protection,” Jun. 01, 2021, *MDPI*. doi: 10.3390/ijms22115710.
- [18] M. E. Bergman, B. Davis, and M. A. Phillips, “Medically useful plant terpenoids: Biosynthesis, occurrence, and mechanism of action,” 2019, *MDPI AG*. doi: 10.3390/molecules24213961.
- [19] A. Marchese *et al.*, “Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature,” *Food Chem*, vol. 210, pp. 402–414, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.04.111.
- [20] A. Marchese *et al.*, “Update on Monoterpenes as Antimicrobial Agents: A Particular Focus on p-Cymene,” *Materials*, vol. 10, no. 8, p. 947, Aug. 2017, doi: 10.3390/ma10080947.
- [21] M. Imran *et al.*, “Therapeutic application of carvacrol: A comprehensive review,” *Food Sci Nutr*, vol. 10, no. 11, pp. 3544–3561, Nov. 2022, doi: 10.1002/fsn3.2994.
- [22] H. Zhao *et al.*, “Peppermint essential oil: its phytochemistry, biological activity, pharmacological effect and application,” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 154, p. 113559, Oct. 2022, doi: 10.1016/j.biopha.2022.113559.
- [23] J. Nazaruk and M. Borzym-Kluczyk, “The role of triterpenes in the management of diabetes mellitus and its complications,” Aug. 27, 2015, *Kluwer Academic Publishers*. doi: 10.1007/s11101-014-9369-x.

- [24] J. Avila-Roman, S. Garda-Gil, A. Rodriguez-Luna, V. Motilva, and E. Talero, “Anti-inflammatory and anticancer effects of microalgal carotenoids,” *Mar Drugs*, vol. 19, no. 10, Oct. 2021, doi: 10.3390/md19100531.
- [25] B. R. Hammond and L. M. Renzi, “Carotenoids,” *Advances in Nutrition*, vol. 4, no. 4, pp. 474–476, 2013, doi: 10.3945/an.113.004028.
- [26] W. Yang, X. Chen, Y. Li, S. Guo, Z. Wang, and X. Yu, “Advances in Pharmacological Activities of Terpenoids,” 2020. doi: 10.1177/1934578X20903555.
- [27] E. Sieniawska, M. Swatko-Ossor, R. Sawicki, K. Skalicka-Woźniak, and G. Ginalska, “Natural Terpenes Influence the Activity of Antibiotics against Isolated Mycobacterium tuberculosis,” *Medical Principles and Practice*, vol. 26, no. 2, pp. 108–112, Mar. 2017, doi: 10.1159/000454680.
- [28] C. Heckler, V. Sant’Anna, A. Brandelli, and P. S. Malheiros, “Combined effect of carvacrol, thymol and nisin against Staphylococcus aureus and Salmonella Enteritidis,” *An Acad Bras Cienc*, vol. 93, no. suppl 4, 2021, doi: 10.1590/0001-3765202120210550.
- [29] A. H. Abed *et al.*, “Carvacrol Essential Oil: A Natural Antibiotic against Zoonotic Multidrug-Resistant Staphylococcus Species Isolated from Diseased Livestock and Humans.,” *Antibiotics (Basel)*, vol. 10, no. 11, Oct. 2021, doi: 10.3390/antibiotics10111328.
- [30] I. Fernández-Babiano, M. L. Navarro-Pérez, C. Pérez-Giraldo, and M. C. Fernández-Calderón, “Antibacterial and Antibiofilm Activity of Carvacrol against Oral Pathogenic Bacteria,” *Metabolites*, vol. 12, no. 12, p. 1255, Dec. 2022, doi: 10.3390/metabo12121255.
- [31] A. Marchese *et al.*, “The natural plant compound carvacrol as an antimicrobial and anti-biofilm agent: mechanisms, synergies and bio-inspired anti-infective materials,” *Biofouling*, vol. 34, no. 6, pp. 630–656, Jul. 2018, doi: 10.1080/08927014.2018.1480756.
- [32] L. Corona-Gómez, L. Hernández-Andrade, S. Mendoza-Elvira, F. M. Suazo, D. I. Ricardo-González, and D. Quintanar-Guerrero, “In vitro antimicrobial effect of essential tea tree oil( *Melaleuca alternifolia* ), thymol, and carvacrol on microorganisms isolated from cases of bovine clinical mastitis,” *Int J Vet Sci Med*, vol. 10, no. 1, pp. 72–79, Dec. 2022, doi: 10.1080/23144599.2022.2123082.
- [33] E. Du, L. Gan, Z. Li, W. Wang, D. Liu, and Y. Guo, “In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with Clostridium perfringens,” *J Anim Sci Biotechnol*, vol. 6, no. 1, p. 58, Dec. 2015, doi: 10.1186/s40104-015-0055-7.

- [34] M. Zhang *et al.*, “Thymol derivatives with antibacterial and cytotoxic activity from the aerial parts of *Ageratina adenophora*,” *RSC Adv*, vol. 11, no. 10, pp. 5755–5761, 2021, doi: 10.1039/D0RA08885D.
- [35] Z. Yao *et al.*, “Thymol Increases Sensitivity of Clinical Col-R Gram-Negative Bacteria to Colistin,” *Microbiol Spectr*, vol. 10, no. 4, Aug. 2022, doi: 10.1128/spectrum.00184-22.
- [36] M. H. Pereira de Lira, G. Fernandes Queiroga Moraes, G. Macena Santos, F. Patrício de Andrade Júnior, F. De Oliveira Pereira, and I. Oliveira Lima, “Synergistic antibacterial activity of monoterpenes in combination with conventional antimicrobials against Gram-positive and Gram-negative bacteria,” *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, vol. 19, no. 2, p. 258, Sep. 2020, doi: 10.9771/cmbio.v19i2.33665.
- [37] S. Andrade-Ochoa *et al.*, “Quantitative structure-activity relationship of molecules constituent of different essential oils with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*,” *BMC Complement Altern Med*, vol. 15, no. 1, Sep. 2015, doi: 10.1186/s12906-015-0858-2.
- [38] J. Zhang, S. Ma, S. Du, S. Chen, and H. Sun, “Antifungal activity of thymol and carvacrol against postharvest pathogens *Botrytis cinerea*,” *J Food Sci Technol*, vol. 56, no. 5, pp. 2611–2620, May 2019, doi: 10.1007/s13197-019-03747-0.
- [39] Y.-H. Ding, H.-T. Wang, S. Shi, Y. Meng, J.-C. Feng, and H.-B. Wu, “Sesquiterpenoids from *Artemisia vestita* and Their Antifeedant and Antifungal Activities,” *Molecules*, vol. 24, no. 20, p. 3671, Oct. 2019, doi: 10.3390/molecules24203671.
- [40] M. Ahmed *et al.*, “Antioxidant, antifungal, and aphicidal activity of the triterpenoids spinasterol and 22,23-dihydrospinasterol from leaves of *Citrullus colocynthis* L.,” *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, p. 4910, Mar. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-08999-z.
- [41] J. M. Ferriz and J. Vinsova, “Prodrug Design of Phenolic Drugs,” *Curr Pharm Des*, vol. 16, no. 18, pp. 2033–2052, Jun. 2010, doi: 10.2174/138161210791293042.
- [42] M. Krátký, J. Vinšová, V. Buchta, K. Horvati, S. Bösze, and J. Stolaříková, “New amino acid esters of salicylanilides active against MDR-TB and other microbes,” *Eur J Med Chem*, vol. 45, no. 12, pp. 6106–6113, Dec. 2010, doi: 10.1016/j.ejmech.2010.09.040.
- [43] A. Imramovský, J. Vinšová, J. M. Ferriz, V. Buchta, and J. Jampílek, “Salicylanilide esters of N-protected amino acids as novel antimicrobial agents,” *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 19, no. 2, pp. 348–351, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.bmcl.2008.11.080.

- [44] “EUCAST - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing,.” Accessed: Sep. 05, 2024. [Online]. Dostupné na: <https://www.eucast.org/>
- [45] Bocchi, *Gazzetta Chimica Italiana*, II., vol. 26. 1896.