# ANTIBAKTERIJSKA I ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST DERIVATA RODANINA SINTETIZIRANIH KNOEVENAGELOVOM KONDENZACIJOM U EUTEKTIČKOM OTAPALU KOLIN-KLORID/UREA

**Ivkić, Marijana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:838641

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

*Repository / Repozitorij:*

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij Biologija i kemija; smjer: nastavnički

Marijana Ivkić

# Antibakterijska i antioksidativna aktivnost derivata rodanina sintetiziranih Knoevenagelovom kondenzacijom u eutektičkom otapalu kolin-klorid/urea

Diplomski rad

Osijek, 2018.

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA** **Diplomski rad**
**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjel za biologiju**
**Diplomski sveučilišni studij Biologija i kemija; smjer: nastavnički**
**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti
**Znanstveno polje:** Biologija

# ANTIBAKTERIJSKA I ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST DERIVATA RODANINA SINTETIZIRANIH KNOEVENAGELOVOM KONDENZACIJOM U EUTEKTIČKOM OTAPALU KOLIN-KLORID/UREA

**Marijana Ivkić**

**Rad je izrađen na:** Zavodu za primijenjenu kemiju i ekologiju Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek te na Zavodu za biokemiju i ekofiziologiju biljaka Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

**Mentor:** Dr.sc. Valentina Pavić, doc.
**Komentor:** Dr.sc. Maja Molnar, izv.prof.

**Kratak sažetak diplomskog rada**
Derivati rodanina su heterociklički organski spojevi koji pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti. Uzrok tih aktivnosti su mnogostruke mogućnosti strukturalnih modifikacija kako rodanina tako i njegovih derivata. U svrhu optimizacije primjene derivata rodanina u farmaceutskoj industriji istražuju se i sintetski putovi koji udovoljavaju zahtjevima *zelene kemije* poput biorazgradivosti, ekonomičnosti i netoksičnosti. U ovom radu je sintetizirana serija derivata rodanina mehanizmom Knoevenagelove kondenzacije s različitim aromatskim aldehidima u *zelenom*, eutektičkom otapalu sastava kolin-klorid/urea. Sintetiziranim spojevima su ispitane *in vitro* ukupna antioksidativna aktivnost DPPH metodom te *in vitro* antibakterijska aktivnost metodom razrjeđivanja bujona uz određivanje minimalne inhibitorne koncentracije.

**Broj stranica:** 55
**Broj slika:** 21
**Broj tablica:** 6
**Broj literaturnih navoda:** 85
**Broj priloga:** 2
**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** derivati rodanina, eutektičko otapalo, antioksidativna aktivnost, antibakterijska aktivnost

**Datum obrane:** 16. studenoga 2018. godine

**Stručno povjerenstvo za obranu:**
1. dr.sc. Irena Labak, doc., predsjednik
2. dr.sc. Valentina Pavić, doc., član, mentor
3. dr.sc. Mirna Velki, doc., član
4. dr.sc. Rosemary Vuković, doc., zamjena člana

**Rad je pohranjen:** na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

**BASIC DOCUMENTATION CARD** **Master thesis**

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Department of Biology**
**Graduate university study programme in Biology and Chemistry Education**
**Scientific Area:** Natural science
**Scientific Field:** Biology

# ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF RHODANINE DERIVATES SYNTHESISED BY KNOEVENAGEL CONDENSATION IN DEEP EUTECTIC SOLVENT CHOLINE CHLORIDE/UREA

**Marijana Ivkić**

**Thesis performed at:** Department of Applied Chemistry and Ecology, Faculty of Food Technology and at Subdepartment of Plant Ecophysiology and Biochemistry, Department of Biology, University of Josip Juraj Strossmayer Osijek

**Supervisor:** Valentina Pavić, PhD, Assistant Professor
**Cosupervisor:** Maja Molnar, PhD, Asociate Professor

**Short abstract**
Rhodanine derivates are heterocyclic organic compounds which exhibit a wide range of biological activities. The reason behind that is a large number of structural modification possibilities of both rhodanine and its derivates. For the optimization of rhodanine derivates application in the pharmacological industry, synthetic pathways that adhere to the requitrments of *green chemistry* such as biodegradbility, economics and non-toxicity, are also being investigated. In this paper a series of rhodanine derivates were synthesised by the Knoevenagel condensation mechanism with various aromatic aldehydes in a *green*, deep eutectic solvent composed of choline chloride and urea. Total antioxidant activity, measured by DPPH method *in vitro*, and antibacterial activity, measured by broth dilution method with determination of minimum inhibitory concentracion *in vitro*, were also determined for synthesised compounds.

**Number of pages:** 55
**Number of figures:** 21
**Number of tables:** 6
**Number of references:** 85
**Number of supplements:** 2
**Original in:** Croatian

**Key words:** rhodanine derivates, deep eutectic solvent, antioxidative activity, antibacterial activity

**Date of the thesis defence:** 16th November 2018

**Reviewers:**
1. Irena Labak, PhD, Assistant Professor, chair
2. Valentina Pavić, PhD, Assistant Professor, supervisor, member
3. Mirna Velki, PhD, Assistant Professor, member
4. Rosemary Vuković, PhD, Assistant Professor, member

**Thesis deposited:** on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

*Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Valentini Pavić i komentorici izv. prof. dr. sc. Maji Molnar na stručnom vodstvu, savjetima i vremenu kojeg su poklonile tijekom istraživanja i izrade ovog diplomskog rada.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na bezgraničnoj podršci, razumijevanju, strpljenju… učinili su godine studiranja najljepšim dijelom moga života.*

*Najveću zahvalu upućujem dragom Bogu, bez Njega ništa!*

Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom „Zelene tehnologije u sintezi heterocikličkih spojeva“ (UIP-2017-05-6593).

## Poopis oznaka, kratica i simbola

| | |
|---|---|
| °C | Celzijev stupanj |
| AA | engl. *ascorbic acid* (askorbinska kiselina) |
| AIDS | engl. *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (Sindrom stečene imunodeficijencije) |
| CLSI | engl. *The Clinical & Laboratory Standards Institute* (Institut za kliničke i laboratorijske standarde) |
| DES | engl. *Deep Eutectic Solvent* (eutektičko otapalo) |
| DMSO | engl. *dimethyl sulfoxide* (dimetil-sulfoksid) |
| DNA | engl. *deoxyribonucleic acid* (deoksiribonukleinska kiselina) |
| DPPH | engl. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) |
| IUPAC | engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry* (Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju) |
| $M$ | molarna masa tvari |
| MIC | engl. *Minimum Inhibitory Concentration* (minimalna inhibitorna koncentracija) |
| MRSA | engl. M*ethicilin-resistant Staphylococcus aureus* (meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus*) |
| $n$ | množina tvari |
| NADPH | engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) |
| PBS | engl. *Phosphate Buffer Saline* (fosfatni pufer) |
| pKa | negativni logaritam baze 10 konstante disocijacije kiseline |
| $R_1NH_2$ | opća formula amina |
| $R_2CHO$ | opća formula aldehida |
| $R_f$ | faktor zaostajanja |
| ROS | engl. *Reactive Oxygen Species* (reaktivne kisikove jedinke) |
| TBAB | engl. *tetrabutylammonium bromide* (tetrabutilamonijev bromid) |
| TLC | engl. *thin-layer chromatography* (tankoslojna kromatografija) |
| $T_t$ | temperatura tališta |
| UK | Ujedinjeno Kraljevstvo |
| USA | engl. *United States of America* (Sjedinjene Američke Države) |
| $\eta$ | reakcijsko iskorištenje |

# Sadržaj


**1. Uvod ..... 2**

**1.1. Rodanin ..... 2**

1.1.1. Struktura i svojstva rodanina ..... 2

1.1.2. Dobivanje rodanina ..... 3

1.1.3. Sinteza derivata rodanina ..... 3

1.1.3.1. Knoevenagelova kondenzacija ..... 3

1.1.3.2. Holmbergova metoda ..... 3

1.1.4. Biološka aktivnost rodanina i njegovih derivata ..... 4

**1.2. Eutektička otapala ..... 5**

1.2.1. Zelena kemija ..... 5

1.2.2. Eutektička otapala ..... 5

1.2.3. Svojstva eutektičkih otapala ..... 6

1.2.4. Priprema eutektičkih otapala ..... 7

1.2.5. Eutektičko otapalo kolin-klorid/urea ..... 7

**1.3. Antioksidativna aktivnost ..... 8**

1.3.1. Oksidativni stres i antioksidansi ..... 8

1.3.2. Metode određivanja antioksidativne aktivnosti ..... 9

1.3.2.1. DPPH metoda ..... 9

1.3.2.2. Fosfomolibden metoda ..... 9

**1.4. Antibakterijska aktivnost ..... 10**

1.4.1. Opće značajke bakterija ..... 10

1.4.2. Metode određivanja antibakterijske aktivnosti ..... 10

1.4.2.1. Metoda razrjeđivanja bujona (engl. *Broth dilution method*) ..... 11

1.4.2.2. Disk difuzijska metoda (engl. *Agar disk-diffusion method*) ..... 11

**1.5. Cilj rada ..... 11**

**2. Materijali i metode ..... 13**

**2.1. Opći podatci ..... 13**

**2.2. Sinteza spojeva na bazi rodanina ..... 14**

2.2.1. Priprema eutektičkog otapala ..... 14

2.2.2. Sinteza spojeva na bazi rodanina reakcijom Knoevenagelove kondenzacije ..... 14

2.2.3. Shematski prikaz zadatka ..... 15

**2.3. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti sintetiziranih spojeva ..... 15**

**2.4. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti sintetiziranih spojeva ..... 16**
2.4.1. Pripremanje hranjive podloge za nasađivanje bakterija ..... 16
2.4.2. Pripremanje tekuće hranjive podloge ..... 16
2.4.3. Nasađivanje, uzgajanje i čuvanje bakterijskih kultura ..... 16
2.4.4. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije ..... 16
**3. Rezultati ..... 19**
**3.1. Sintetizirani spojevi ..... 19**
**3.2. Antioksidativna aktivnost sintetiziranih spojeva ..... 32**
**3.3. Antibakterijska aktivnost sintetiziranih spojeva ..... 33**
**4. Rasprava ..... 35**
**4.1. Sinteza derivata rodanina ..... 35**
**4.2. Antioksidativna aktivnost sintetiziranih derivata rodanina ..... 37**
**4.3. Antibakterijska aktivnost sintetiziranih derivata rodanina ..... 38**
**5. Zaključci ..... 41**
**6. Metodički dio ..... 43**
**6.1. Priprema za nastavni sat za 1. razred srednje škole (gimnazijski program) ..... 43**
**7. Popis literature ..... 47**
**7.1. Internetski izvori ..... 55**

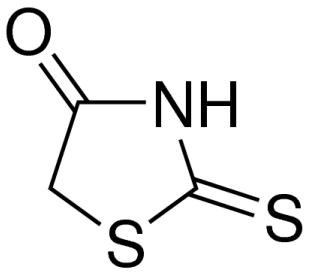
# 1. UVOD

# 1. Uvod

## 1.1. Rodanin

### 1.1.1. Struktura i svojstva rodanina

Rodanin (prema IUPAC-u: *2-sulfaniliden-1,3-tiazolidin-4-on*) je peteročlana heterociklička molekula s tiazolnom jezgrom te tiokso i karbonilnom grupom vezanima na prsten (Patel i Kumari 2016). Strukturi rodanina je pridruženo nekoliko tautomera pri čemu je tautomer prikazan na Slici 1 najstabilniji (Al-Sehemi i El-Gogary 2009). Poznata je također i struktura kristala rodanina koji su građeni u obliku planarnih dimera povezanih vodikovim vezama (Weng Ng 2007).




Slika 1: Struktura rodanina (preuzeto i prilagođeno prema Weng Ng 2007)

Osnovna fizikalno-kemijska svojstva rodanina prikazana su u Tablici 1. Svijetlo žuti kristalni prah rodanina je slabo topljiv u hladnoj, ali dobro topljiv u ključaloj vodi, kao i u metanolu, etanolu, eteru, amonijaku te zagrijanoj octenoj kiselini (Windholz i sur. 1983). Prilikom zagrijavanja rodanin se raspada na otrovne pare dušikovih i sumporovih oksida. Uz to, ukoliko se zagrijavanje provodi ubrzano, kristali mogu eksplodirati (Sax 1984). Rodanin reagira s kiselinama pri čemu nastaju hidrogen sulfidi dok u reakcijama rodanina s alkalijskim metalima, hidridima i drugim reducirajućim tvarima nastaju toplina i vodik (Web 1). Rodanin može tvoriti i četiri vodikove veze pri čemu može biti donor i akceptor vodika (Al-Sehemi i El-Gogary 2009).

Tablica 1: Osnovna fizikalno-kemijska svojstva rodanina (Web1)

| **RODANIN** | | | |
|---|---|---|---|
| kemijska formula | $C_3H_3NOS_2$ | temperatura tališta | 168,5°C |
| molarna masa | 133,183 g/mol | gustoća | 0,868 g/cm$^3$ |
| formalni naboj | 0 | pKa (25 °C) | 5,52 |

### 1.1.2. Dobivanje rodanina

Rodanin je 1877. godine otkrio poljski kemičar i liječnik Marceli Nencki reakcijom amonijevog tiocijanata i kloroctene kiseline u vodi. S obzirom na svojstva koja je pokazivao tada ga je nazvao rodanoičnom kiselinom (njem. *Rhodaninsäure*) (Nencki 1877). Iako je rodanin otkriven na ovaj način, u suvremenoj se kemiji najčešće sintetizira iz ugljikova disulfida, amonijaka i kloroctene kiseline pri čemu uspjeh ukupne reakcije ovisi o osiguravanju međuprodukta - amonijevog ditiokarbamata - visoke čistoće (Redemann i sur. 1947).

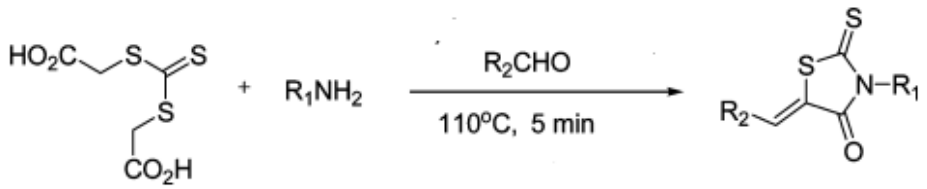
### 1.1.3. Sinteza derivata rodanina

#### 1.1.3.1. Knoevenagelova kondenzacija

Knoevenagelova kondenzacija je modificirana reakcija aldolne kondenzacije. Temelji se na reakciji nukleofilne adicije između aldehida ili ketona i aktivirane metilenske skupine koja u prisutnosti bazičnog katalizatora može biti deprotonirana. Pri tome nastaje rezonantno stabiliziran enolat koji reagira s ionom imina, produktom iz reakcije aldehida ili ketona i bazičnog katalizatora, što rezultira nastankom nove C-C veze. Reakcija je obično praćena spontanom dehidratacijom pri čemu nastaje nezasićen produkt (March 2007; Knoevenagel 1898). Rodanin lako kondenzira s različitim alifatskim, aromatskim i heterocikličkim aldehidima. Međutim, analogne reakcije rodanina i ketona su manje istraživane (Allan i sur. 1958).

#### 1.1.3.2. Holmbergova metoda

Holmbergova metoda se temelji na reakciji između bis(karboksi-metil)-tritiokarbonata i primarnih amina pri čemu nastaju odgovarajući N-supstituirani derivati rodanina. Mediji u kojima se reakcija najčešće odvija jesu voda ili etanol. Holmbergovu metodu je moguće kombinirati i s reakcijom Knoevenagelove kondenzacije pri čemu iz bis(karboksi-metil)-tritiokarbonata, amina ($R_1NH_2$) i aldehida ($R_2CHO$) nastaju 3,5-disupstituirani derivati rodanina (Slika 2). Na ovaj način moguće je kombinirati heterocikličke ili aromatske aldehide te alifatske, aromatske i feniletilamine (Radi i sur. 2010).

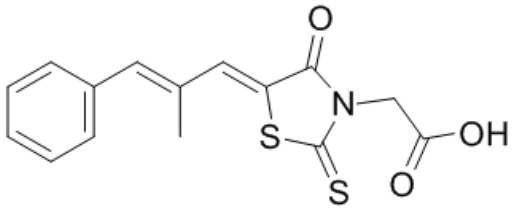



Slika 2: Reakcija kombinirane Holmergove metode i Knoevenagelove kondenzacije (preuzeto i prilagođeno prema Radi i sur. 2010)

### 1.1.4. Biološka aktivnost rodanina i njegovih derivata

Heterociklički spojevi su u prirodi prisutni u obliku alkaloida, nukleinskih kiselina, bjelančevina, hormona, vitamina i drugih biološki važnih spojeva. Upravo zato imaju vodeću ulogu u farmaceutskoj industriji. Među heterocikličkim molekulama rodanin posljednih godina privlači posebnu pažnju. Naime, derivati rodanina pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti što je posljedica mogućnosti mnogih strukturalnih modifikacija kako rodanina tako i njegovih derivata (Patel i Kumari 2016). Neke od tih aktivnosti su: antibakterijska (Hardej i sur. 2010), antidijabetska (Tomašić i Mašič 2009), antifungalna (Sortino i sur. 2007), antihelmentička (McGuire i sur. 1966), anti-HIV (Patel i Kumari 2016), antikancerogena (Ramesh i sur. 2014), antimalarična (Kumar i sur. 2007), antioksidativna (Khare i Kapoor 2016), antituberkularna (Dixit i sur. 2012), kardiotonična (Radi i sur. 2009) i protuupalna (Irvine i sur. 2008).

Iako je biološka aktivnost derivata rodanina poznata od početka 20. stoljeća, znanstvene studije su rijetko predlagale konkretne mehanizme djelovanja i unutarstanične odgovore na iste što je presudno za daljnja istraživanja i razvoj. To je važno jer derivati rodanina mogu reagirati nepredvidivo sa staničnim komponentama pri čemu značajan problem mogu predstavljati neselektivne reakcije Michaelove adicije sa staničnim proteinima te interakcije s prijelaznim metalima koji su komponente različitih staničnih sustava (Tomašić i Mašič 2012). Unatoč tome, rodanini su klasificirani kao nemutageni (Hotta i sur. 2006). Štoviše, Epalrestat (prema IUPAC-u: *2-[(5Z)-5-[(E)-2-metil-3-fenilprop-2-eniliden]-4-okso-2-sulfaniliden-1,3-tiazolidin-3-il] octena kiselina)* (Slika 3), lijek na bazi rodanina, jedini je lijek na tržištu koji inhibra enzim aldoza reduktazu, prvi enzim poliolnog puta (Tomašić i Mašič 2009).




Slika 3: Struktura Epalrestata (Web 2)

Aldoza reduktaza u normalnim uvjetima neutralizira toksične aldehide pretvarajući ih u inaktivne alkohole. Međutim, pojava hiperglikemije, koja prati dijabetes tipa II, pojačava aktivnost ovog enzima što dovodi do povećanja unutarstanične razine sorbitola – jednog od uzročnika metaboličkih promjena kojima su posljedice neuropatija i retinopatija.

Pretvaranje glukoze u sorbitol prati i povećana potrošnja kofaktora NADPH čime stanica postaje podložnija oksidativnom stresu (Nishikawa i sur. 2000). Stoga, inhibirajući aldoza reduktazu, Epalrestat značajno ublažava simptome dijabtesa tipa II (Hotta i sur. 2006).

## 1.2. Eutektička otapala

### 1.2.1. Zelena kemija

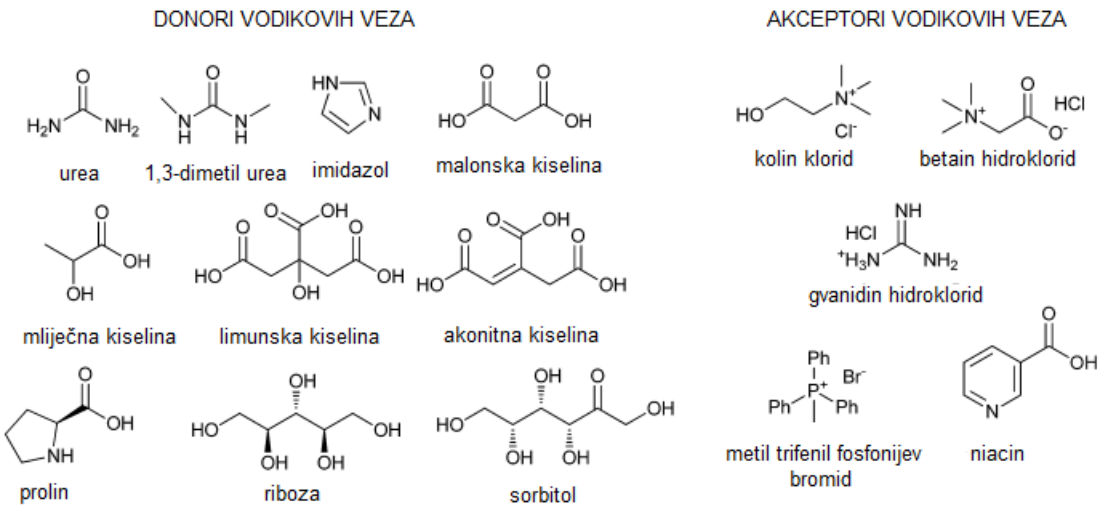
Otapala imaju značajnu ulogu u mnogim granama industrijske proizvodnje. Pri tome se značajno ističu u kemijskim sintezama (otapanje reaktanata, ekstrakcija i pročišćivanje produkata) gdje vrlo često čine najveći udio reakcijske smjese. Premda klasična organska otapala imaju brojne prednosti, sve više predstavljaju ekološki i sigurnosni izazov stoga ne začuđuje da je pronalaženje novih, nekonvencionalnih otapala sve više predmet znanstvenih istraživanja (Khandelwal i sur. 2016). Tu *zelena kemija* zauzima posebno mjesto istražujući istovremeno inovativne, ekonomične, energetski učinkovite i ekološki prihvatljive procese proizvodnje u dostupnim, netoksičnim, biorazgradivim, nezapaljivim, obnovljivim i ekonomski pristupačnim otapalima. Važno je naglasiti da savršeno *zeleno otapalo* ne postoji, međutim među mnogima su se 2001. godine pojavila eutektička otapala, koja se zbog fizikalno-kemijskih i bioloških svojstava, uz ekonomičnu i jednostavnu pripravu, smatraju novom generacijom *zelenih otapala* (Bubalo i sur. 2016).

### 1.2.2. Eutektička otapala

Eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents,* DES) se definiraju kao sustavi sastavljeni od najmanje dvije komponente – akceptora i donora vodikovih veza, a koji tvore novu, eutektičku smjesu koja ima nižu temperaturu tališta u odnosu na pojedinačne komponente. Eutektička otapala se mogu opisati i formulom:

$$Cat^{+}X^{-}\,zY$$

gdje je $Cat^{+}$kation amonijevih, fosfonijevih ili sulfonijevih soli, $X^{-}$ je halogenidni anion soli, te Y Lewisova ili Brønstedova baza pri čemu je *z* broj molekula Y. Kombiniranjem različitih donora i akceptora vodikovih veza (Slika 4) moguće je dobiti velik broj potencijalnih eutektičkih otapala. Osnovne interakcije između komponenata eutektičkog otapala jesu vodikove veze koje su i uzrok specifičnih svojstava eutektičkih otapala. Uz vodikove veze, između komponenata povremeno postoje i elektrostatske te van der Waalsove sile (Tomé i sur. 2018).




Slika 4: Strukture donora i akceptora vodikovih veza koji se koriste u sintezi eutektičkih otapala (preuzeto i prilagođeno prema Liu i sur. 2015)

1.2.3. Svojstva eutektičkih otapala

Iako poznata već desetljećima, eutektička otapala su postala predmetom znanstvenih istraživanja tek početkom ovoga stoljeća. Razlog tomu su brojne odlike poput niske toksičnosti, visoke biorazgradivosti, mogućnosti recikliranja, dostupnosti, niske zapaljivosti, niske hlapljivosti te atomske ekonomičnosti – sve početne komponente su uključene u konačnoj smjesi (Alonso i sur. 2016). Osim navedenog eutektička se otapala odlikuju i specifičnim fizikalno-kemijskim svojstvima.

*Temperatura tališta eutektičkih otapala*

Jedno od najznačajnijih svojstava, o kojem ovisi i mogućnost primjene eutektičkih otapala, jest značajno niža temperatura tališta smjese u odnosu na pojedinačne komponente koje ju čine (Florindo i sur. 2014). Primjerice, temperatura tališta eutektičkog otapala sastava kolin-klorid i urea (1:2) iznosi 12°C dok je ona za ureu 133°C te za kolin-klorid 302°C (Alonso i sur. 2016). Vodikove veze među komponentama koje uzrokuju delokalizaciju naboja tomu najviše pridonose. Uz to, općenito simetrija kationa te svojstva njegova bočnog lanca, kao i izbor aniona, također su važni. Primjerice, temperatura tališta eutektičkih otapala dobivenih iz derivata kolinskih soli i uree opada prema redosljedu $F^- \rightarrow NO_3^- \rightarrow Cl^- \rightarrow BF_4^-$, što je u korelaciji s mogućnošću stvaranja vodikovih veza (Bubalo i sur. 2016).

*Viskoznost eutektičkih otapala*

Viskoznost je važno svojstvo svih otapala. Eutektička otapala, osim otapala sastava kolin-klorid/etilen glikol, su obično viskoznija u odnosu na organska pri sobnoj temperaturi. Uzrok tomu je mreža vodikovih veza između komponenti koja umanjuje slobodan volumen otapala a time i pokretljivost slobodnih molekula. Viskoznost eutektičkih otapala ovisi i o molarnom omjeru kao i o temperaturi pri čemu prati Arrheniusov model – porastom temperature opada viskoznost (Zhang i sur. 2012).

### 1.2.4. Priprema eutektičkih otapala

Najčešće korištena metoda priprave eutektičkih otapala u literaturi je metoda zagrijavanjem koja se temelji na miješanju dviju komponenti određenih molarnih omjera na određenoj temperaturi do nastanka homogene, bistre tekućine. Pritom, ukoliko se temperature tališta komponenti značajno razlikuju, prvo se tali komponenta niže temperature tališta, nakon čega se tekućini dodaje komponenta s višom temperaturom tališta. Ukoliko komponente imaju slične temperature tališta, miješaju se istovremeno (Tomé i sur. 2018). Vrijeme potrebno za pripremu eutektičkog otapala na ovaj način je od 30 do 240 minuta, ovisno o izboru početnih komponenti te o udjelu vode koja umanjuje vrijeme priprave. Vrijeme priprave je moguće dodatno umanjiti uporabom ultrazvučnih valova ili mikrovalnog zračenja (Bubalo i sur. 2016). Eutektička otapala se također mogu dobiti i vakuum uparavanjem gdje se komponente prvotno otapaju u vodi nakon čega se voda uparava pri 50°C rotacijskim vakuum uparivačem. Dobivena tekućina se do konstantne mase suši u eksikatoru sa silikagelom (Dai i sur. 2013). Eutektička se otapala mogu pripremiti i metodom usitnjavanja koja se temelji na miješanju dviju komponenti i njihovim usitnjavanjem u tarioniku pomoću tučka na sobnoj temperaturi do oblikovanja bistre, homogene tekućine (Florindo i sur. 2014). Općenito, priprema eutektičkih otapala je jednostavna te ih je moguće izravno upotrijebiti, bez dodatnog pročišćavanja, što je značajno i s ekonomskog i s ekološkog aspekta (Bubalo i sur. 2016; Sirviö i sur. 2015).

### 1.2.5. Eutektičko otapalo kolin-klorid/urea

Među eutektičkim otapalima, ono sastava kolin-klorid/urea (1:2) najbolje je istraženo. Kolin-klorid (prema IUPAC-u: *2-hidroksietil-trimetilamonijev kation*) je esencijalni nutrijent i dio kompleksa vitamina B. Budući da je biokompatibilan, biorazgradiv, netoksičan i ekonomski pristupačan, jedna je od najčešćih komponenti eutektičkih otapala. Pri tome, može se kombinirati s različitim donorima vodikovih veza kao što su ugljikohidrati, amini, alkoholi te amidi, među kojima je i urea (Florindo i sur. 2014).

Urea (prema IUPAC-u: *diamid ugljične kiseline*, zadržano urea) je organski spoj koji nastaje metaboličkim putevima u organizmima sisavaca. Također je biorazgradiva i ekološki prihvatljiva (Fischer 2015). Značajnu ulogu u strukturiranju eutektičkog otapala kolin-klorid/urea imaju snažne vodikove veze donora – uree, i kloridnog aniona te vodikove veze kolina i kloridnog aniona. Ova struktura se dodatno stabilizira slabijim vodikovim vezama koje postoje i između drugih molekula u otapalu. Sve ove interakcije uzrok su nastanka „sendvič-strukture“ u kojoj se kolin i urea sinergistički vežu s kloridnim ionom istovremeno maksimizirajući međusobne, slabije interakcije. Konačno, ravnoteža interakcija među svim sastavnicama sprječava kristalizaciju otapala na sobnoj temperaturi omogućavajući istovremeno da se ovo otapalo nazove eutektičkim (Hammond i sur. 2016).

## 1.3. Antioksidativna aktivnost

### 1.3.1. Oksidativni stres i antioksidansi

Visoka reaktivnost kisika uvjetuje nastanak reaktivnih kisikovih jedinki (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) (Tablica 2) koje u standardnim fiziološkim koncentracijama imaju važne uloge u staničnim procesima, ali u povišenim koncentracijama, posebno u obliku slobodnih radikala, postaju štetne za stanicu (Kumar 2014; Kosanić i sur. 2011). Slobodni radikali su električki nabijene, nestabilne čestice s nesparenim elektronom koji uzrokuje uključivanje radikala u lančane reakcije izmjene elektrona kojima se destabiliziraju druge molekule i nastaju novi slobodni radikali (Kumar 2014).

Tablica 2: Reaktivne kisikove jedinke (Manisha i sur. 2017)

| **SLOBODNI RADIKALI** | **MOLEKULE SPARENIH ELEKTRONA** |
|---|---|
| HO• (hidroksil radikal) | $O_2$ (singletni kisik) |
| $O_2^-$• (superoksid radikal) | $H_2O_2$ (vodikov peroksid) |
| $RO_2$• (peroksil radikal) | HOCl (hipoklorasta kiselina) |
| RO• (alkoksi radikal) | $O_3$ (ozon) |

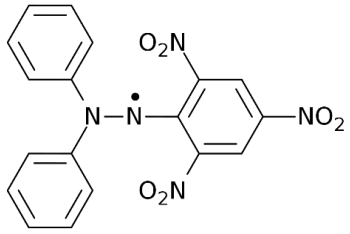
Slobodni radikali mogu promijeniti strukturu i propusnost stanične membrane, inaktivirati enzime i modificirati molekulu DNA, što su uzroci različitih patoloških stanja te starenja organizma (Manisha i sur. 2017; Birben i sur. 2012). Kako bi stanice zaštitili od oksidativnog stresa organizmi su razvili visoko sofisticiran i složen antioksidacijski sustav koji uključuje različite komponente endogenog i egzogenog porijekla koje interaktivno i sinergistički ublažavaju djelovanje slobodnih radikala (Kumar 2014).

Pritom, antioksidansi se mogu definirati kao tvari koje u vrlo niskim koncentracijama značajno odgađaju oksidativno oštećenje ciljanih molekula sprječavanjem nastanka slobodnih radikala, deaktiviranjem istih ili promoviranjem njihova raspadanja (Yadav i sur. 2016; Young i Woodside 2001).

### 1.3.2. Metode određivanja antioksidativne aktivnosti

#### 1.3.2.1. DPPH metoda

DPPH metoda pripada skupini spektrometrijskih metoda koje se temelje na reakciji radikala, radikalnog kationa ili kompleksa s antioksidacijskom molekulom koja može donirati atom vodika. DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) (Slika 5) je stabilan slobodni radikal pri čemu je uzrok stabilnosti delokalizirani elektron zbog kojeg ne dimerizira (Pisoschi i Negulescu 2011). Zbog nesparenog elektrona otopina DPPH• je tamno ljubičaste boje s apsorpcijskim maksimumom pri 517 nm. Međutim, u reakciji s antioksidansom DPPH• prelazi u reducirani oblik što rezultira stehiometrijskim obezbojenjem koje ovisi o broju primljenih elektrona. Obezbojenjem se smanjuje apsorbancija otopine, što je temelj DPPH metode kojom se određuje ukupni antioksidativni kapacitet uzorka (Khare i Kapoor 2016; Kedare i Singh 2011). Ukupni antioksidativni kapacitet je značajan prilikom analiziranja promjena antioksidativne aktivnosti u krvnoj plazmi, analiziranja antioksidativnog doprinosa specifičnih prehrambenih komponenti te u proučavanju povezanosti strukture i aktivnosti čistih antioksidansa (Prieto i sur. 1999).




Slika 5: Struktura DPPH radikala
(preuzeto i prilagođeno prema Liang i Kitts 2014)

#### 1.3.2.2. Fosfomolibden metoda

Fosfomolibden metoda također pripada skupini spektrometrijskih metoda. Temelji se na redukciji molibdena (VI) u molibden (V) u reakciji s antioksidansom pri čemu nastaje zeleni fosfat/molibden (V) kompleks čiji je apsorpcijski maksimum pri 695 nm (pH<7). Zbog jednostavnosti i reagensa niskih cijena, fosfomolibden metoda je alternativa već dostupnim metodama za određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta uzoraka (Prieto i sur. 1999).

## 1.4. Antibakterijska aktivnost

### 1.4.1. Opće značajke bakterija

Prokariotski bakterijski organizmi dolaze u tri oblika: kuglaste ili koki, štapićaste ili bacili i zavojite ili spirili pri čemu bakterijska stanična stjenka ima važnu ulogu u održavanju staničnog oblika (Giddings i Newman 2015). S obzirom na strukturu stanične stjenke bakterije se mogu podijeliti na Gram-pozitivne i Gram-negativne. Staničnu stjenku Gram-pozitivnih bakterija čini višeslojni peptidoglikan murein (70-80%) građen od glikanske okosnice višestruko unakrsno povezane s oligopeptidima. U staničnoj stjenki Gram-negativnih bakterija jednoslojni murein (10-20%) je tanak i smješten između citoplazmatske i vanjske lipopolisaharidne membrane. Upravo nedostatak ove vanjske membrane čini u pravilu Gram-pozitivne bakterije osjetljivijima na antibiotike (Salton 1996). U skupini Gram-pozitivnih bakterija među najvažnijim predstavnicima su vrste *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis. S. aureus* je uobičajeni kolonizator sisavaca i ptica. Međutim, ovaj fakultativni anaerob je također i invazivni patogen koji se, ušavši u krvotok, brzo replicira uzrokujući infekcije sa značajnom stopom smrtnosti (Thomer i sur. 2016; Masalha i sur. 2001). Uz to, soj MRSA (engl. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) je rezistentan na antibiotske učinke semisintetskih penicilina kao i na ostale *β*-laktamske antibiotike (Chambers 2001). Nasuprot tomu, vrsta *Bacillus subtilis* je izvor industrijskih enzima (proteaza i amilaza) te probiotik čija je primjena u porastu. Ova aerobna vrsta se može izolirati iz različitih terestričkih i akvatičkih ekosustava gdje, u slučaju nedostatka hranjivih tvari ili okolišnog stresa, tvori vrlo otporne endospore (Shahcheraghi i sur. 2018; Earl i sur. 2008). *Escherichia coli* je štapićasta, fakultativno anaerobna poliflagelatna Gram-negativna bakterija. Neki serotipovi ove vrste su simbionti gastrointestinalnog sustava ljudi i životinja dok su drugi patogeni. *E. coli* je rezistentna na više vrsta lijekova među kojima se ističu ampicilin, fluorokinoloni te cefalosporini (Vila i sur. 2016). *Pseudomonas aeruginosa* je štapićasta, obligatno aerobna monoflagelatna Gram-negativna bakterija. S obzirom na metaboličku svestranost i složene regulacijske mehanizme, *Pseudomonas* je vrlo često modelni organizam (Moradali i sur. 2017; Gellatly i Hancock 2013). Ova vrsta je i oportunistički humani patogen (Bhawsar i Singh 2014).

### 1.4.2. Metode određivanja antibakterijske aktivnosti

Metode razrjeđivanja agara ili bujona te disk difuzijska metoda su dobro proučene i uobičajeno korištene metode za određivanje antibakterijske aktivnosti (Balouiri i sur. 2016).

Pritom, neovisno o izboru metode, neophodno je uzeti u obzir čimbenike koji imaju izravan utjecaj na rezultate istraživanja poput izbora mikroorganizama koji će se testirati, svojstava ispitivanih uzoraka te izbora odgovarajućeg medija (Wiegand i sur. 2008).

1.4.2.1. Metoda razrjeđivanja bujona (engl. *Broth dilution method*)

Metode razrjeđivanja su najprikladnije za određivanje vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije (engl. *Minimum Inhibitory Concentration,* MIC) ispitivanog uzorka u agaru (engl. *Agar dilution*) ili bujonu (engl. *Broth dilution*) pri čemu se MIC vrijednost definira kao najmanja koncentracija ispitivanog uzorka koja inhibira rast testiranog mikroorganizma vidljiv okom. Obje metode se mogu koristit za kvantitativno određivanje antimikrobne aktivnosti uzoraka u odnosu na bakterije i gljivice *in vitro*.

Metoda razrjeđivanja bujona, s obzirom na način izvođenja postupka (u epruveti minimalnog volumena 2 ml ili pomoću mikrotitarskih pločica s jažicama manjeg volumena) može biti makro- ili mikrorazrjeđivanje. Standardizirana je od CLSI-a (engl. *The Clinical & Laboratory Standards Institute*) za aerobne bakterije, kvasce i gljivice što povećava kliničku relevantnost rezultata (Balouiri i sur. 2016). Vrijednost MIC parametra se u kliničkoj praksi koristi za razvrstavanje testiranih organizama kao osjetljivih, srednje osjetljivih ili otpornih u odnosu na testirana antimikrobna sredstva (Wiegand i sur. 2008).

1.4.2.2. Disk difuzijska metoda (engl. *Agar disk-diffusion method*)

Disk difuzijska metoda se koristi u mnogim kliničkim mikrobiološkim laboratorijima za rutinsko ispitivanje antimikrobne osjetljivosti. Prednosti ove metode su jednostavnost izvedbe, ekonomska pristupačnost te mogućnost ispitivanja mnoštva mikroorganizama i uzoraka. Rezultati metode su kvalitativni i svrstavaju bakterije kao osjetljive, srednje osjetljive ili otporne u odnosu na antimikrobno sredstvo (Balouiri i sur. 2016).

## 1.5. Cilj rada

Cilj ovog diplomskog rada bio je sintetizirati seriju derivata rodanina za što je odabrana reakcija Knoevenagelove kondenzacije s različitim aromatskim aldehidima u *zelenom,* eutektičkom otapalu na bazi kolin-klorida. Nadalje, s obzirom da različiti derivati rodanina prema dosadašnjim istraživanjima pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti, cilj je bio istražiti i potencijalnu antioksidativnu i antibakterijsku aktivnost uspješno sintetiziranih spojeva.

# 2. MATERIJALI I METODE

# 2. Materijali i metode

## 2.1. Opći podatci

Sve kemikalije korištene u eksperimentalnom radu su nabavljene od komercijalnih dobavljača te su korištene u reakcijama bez daljenjeg pročišćavanja.

Za održavanje stalnih uvjeta tijekom reakcija sinteze korištena je magnetna miješalica s pločom za zagrijavanje (VWR, Radnor, Pennsylvania, USA). Tijek reakcija, kontrola čistoće spojeva te preliminarna identifikacija produkata su praćeni tankoslojnom kromatografijom (engl. *thin-layer chromatography;* TLC) pri čemu su kao stacionarna faza korištene fluorescentne silikagel ploče za tankoslojnu kromatografiju (Alugram SIL G/$UV_{254}$) dok je mobilnu fazu činio sustav otapala benzen:aceton:octena kiselina (8:1:1). Za detekciju rezultata tankoslojne kromatografije korištena je HP-UVISR lampa (Biostep GmbH, Burkhardtsdorf, Germany) pri valnim duljinama 254 nm te 365 nm. Temperature tališta sintetiziranih spojeva određene su pomoću uređaja *Electrothermal* (Rochford, UK). Snimanje masenih spektara provedeno je na spektrometru masa LC-MS/MS *(*API 2000, Applied Biosystems, Redwood City, USA). Apsorbancije prilikom ispitivanja antioksidativih aktivnosti sintetiziranih spojeva mjerene su spektrofotometrom *HACH* DR/2010 Spectrophotometer (Colorado, USA). Bakterijske kulture i antibiotik amikacin sulfat su dobavljeni od Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u Osijeku. Vrste *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli* su odabrane kao modelni organizmi koji predstavljaju Gram–pozitivne i Gram–negativne bakterije. *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* su odabrane jer su ljudski patogeni. Također predstavljaju Gram–pozitivne i Gram–negativne bakterije. Optička gustoća bakterijskih suspenzija mjerena je u sterilnoj fiziološkoj otopini pri valnoj duljini 600 nm spektrofotometrom *HACH* DR/2010 Spectrophotometer (Colorado, USA) pri čemu je metoda standardizirana uporabom McFarland standarda. Inkubacija nasađenih bakterijskih kultura, kao i mikrotitarskih pločica korištenih prilikom određivanja antibakterijske aktivnosti sintetiziranih spojeva, provedena je u inkubatoru proizvođača *Sutjeska* (Beograd, Srbija). Za sterilizaciju kemijskog posuđa i pribora korišten je autoklav proizvođača INAKO 1935 (Zagreb, Hrvatska).

## 2.2. Sinteza spojeva na bazi rodanina

Sinteza spojeva na bazi rodanina provedena je reakcijom Knoevenagelove kondenzacije između rodanina i različitih aromatskih aldehida prema Jawale i sur. (2012) pri čemu je konvencionalno otapalo zamijenjeno eutektičkim otapalom na bazi kolin-klorida. Sintezi je prethodila priprema eutektičkog otapala kao medija u kojemu se reakcija odvijala.

### 2.2.1. Priprema eutektičkog otapala

Eutektičko otapalo se pripremalo neposredno prije reakcije kondenzacije, miješanjem 5 g kolin-klorida (0,0035 mol) i 4,2 g uree (0,007 mol). Miješanje se provodilo na 80°C pomoću magnetne miješalice s pločom za zagrijavanje dok se nije dobila homogena bistra smjesa. Otapalo se hladilo na sobnu temperaturu te se bez daljnjeg pročišćavanja koristilo u reakcijama sinteze.

### 2.2.2. Sinteza spojeva na bazi rodanina reakcijom Knoevenagelove kondenzacije

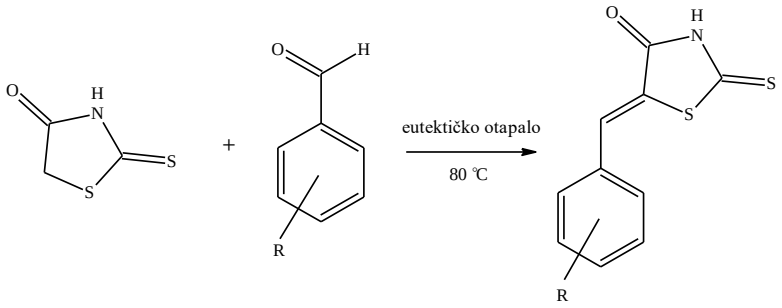
Za reakciju Knoevenagelove kondenzacije u pripravljeno eutektičko otapalo su dodani rodanin (0,2 g; 1,5 mmol) i supstituirani aromatski aldehid (1,5 mmol). Reakcija je praćena pomoću TLC-a, a po završetku reakcije reakcijska smjesa je ohlađena, dodana je demineralizirana voda te su nastali kristali filtrirani i osušeni. Sintetiziranim spojevima su određene temperature tališta te su snimljeni spektri masa, pri čemu su dobiveni rezultati za poznate spojeve uspoređeni s literaturnim podatcima. Sintetiziranim spojevima je određena i $R_f$-vrijednost koja se računa na sljedeći način:

$$R_f = \frac{d(spoj)}{d\ (otapalo)}$$

pri čemu je:

*d(spoj)* – duljina puta koji prijeđe spoj na ploči tankoslojne kromatografije u određenom sustavu otapala (cm); *d(otapala)* – duljina puta koji prijeđe otapalo na ploči tankoslojne kromatografije (cm).

2.2.3. Shematski prikaz zadatka




Slika 6: Reakcija Knoevenagelove kondenzacije između rodanina i aromatskog aldehida

**2.3. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti sintetiziranih spojeva**

Ispitivanje antioksidativne aktivnosti sintetiziranih spojeva provedeno je DPPH metodom prema Shih i sur. (2007). Budući da su spojevi slabo topljivi u organskim otapalima poput metanola ili etanola u eksperimentalnom radu je korišten DMSO (dimetil-sulfoksid).

*Postupak:*

0,75 ml 0,2 mM DMSO otopine sintetiziranog spoja je pomiješano s 0,75 ml 0,2 mM DMSO otopine DPPH radikala. Potom je uslijedila inkubacija u tami na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta. Po završetku vremena inkubacije mjerena je apsorbancija uzoraka pri 517 nm. Uređaj je podešavan prema otapalu (DMSO), kao kontrola je korištena 0,1 mM otopina DPPH radikala, dok je kao standard korištena askorbinska kiselina. Mjerenje se provodilo u tri ponavljanja. Rezultati su izvedeni prema formuli za određivanje sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala:

$$\%\ hvatanja\ DPPH\ radikala = \frac{Ab + As - Am}{Ab} \times 100$$

pri čemu je:

*Ab* – apsorbancija 0,1 mM DMSO otopine DPPH radikala pri $\lambda$ = 517 nm; *As* – apsorbancija 0,1 mM DMSO otopine čistog testiranog spoja pri $\lambda$ = 517 nm; *Am* – apsorbancija 0,1 mM DMSO otopine smjese testiranog spoja i DPPH radikala pri 517 nm.

## 2.4. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti sintetiziranih spojeva

### 2.4.1. Pripremanje hranjive podloge za nasađivanje bakterija

U ovom eksperimentalnom radu korišten je krumpirov glukozni agar kao hranjiva podloga. Za pripremu 100 ml krumpirova glukoznog agara prema uputi proizvođača je pomiješano 2,2 g Mueller Hinton bujona, 0,5 g ekstrakta kvasca, 4 g glukoze i 2 g krumpirova brašna u 100 ml 0,25 M otopini PBS-a (fosfatni pufer, engl. *Phosphate Buffer Saline*) (pH=7,4). Navedena smjesa je kuhana 20 minuta u vodenoj kupelji i potom hlađena na 25°C-27°C. Nakon kalibriranja pH vrijednosti na 5,55±0,10 dodano je 1,5 g agara te je smjesa tindalizirana. Proces tindaliziranja se sastojao od izmjenjivanja kuhanja u trajanju 15 minuta (3×) i izlaganja UV svjetlu u trajanju 10 minuta (2×). Nakon toga pripremljena hranjiva podloga je izlivena u Petrijeve zdjelice te još jednom izložena UV svjetlu na 10 minuta. Tako pripremljena hranjiva podloga je čuvana u hladnjaku na temperaturi +4°C.

### 2.4.2. Pripremanje tekuće hranjive podloge

Tekuća hranjiva podloga korištena u mikrotitarskim pločicama je Mueller Hinton bujon. Za pripremu bujona dodano je 22 g Mueller Hintona u 1 l destilirane vode. Smjesa je zagrijana do potpunog otapanja i potom autoklavirana na temperaturi 121°C tijekom 10 minuta. Pripremljena sterilna tekuća podloga se ohlađena čuvala u hladnjaku i koristila.

### 2.4.3. Nasađivanje, uzgajanje i čuvanje bakterijskih kultura

Bakterijske kulture su nasađene na prethodno pripremljeni krumpirov glukozni agar pri čemu je korišten sterilan pribor. Inokulacija bakterijskih kultura provedena je spiralnim potezima vrha eze po hranjivoj podlozi nakon čega je uslijedila inkubacija na 37°C tijekom 16 sati. Bakterijske kulture su prije nasađivanja čuvane u hladnjaku u dubokom agaru.

### 2.4.4. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije

Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije provedno je metodom razrjeđivanja bujona prema Gu i Wang (2010).

*Postupak:*

U svaku jažicu mikrotitarske pločice (pločice s 96 jažica) pipetirano je 100 µl Mueller Hinton bujona. Potom su u prve jažice u nizu dodani ispitivani uzorci (100 µl). Otopine su promiješane multikanalnom pipetom te je iz prve jažice u sljedeću i dalje redom na isti način prenešeno 100 µl otopine radi dvostrukih i serijskih razrjeđenja uzoraka (0,5 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,125 mg/ml; 0,0625 mg/ml; 0,03125 mg/ml; 0,012526 mg/ml).

Nakon šeste jažice u nizu postupak je ponavljan. Nakon razrjeđenja ispitivanih uzoraka, u svaku jažicu je dodano 20 µl bakterijske suspenzije gustoće 0,5 prema McFarland skali (Tablica 3). Potom su pločice inkubirane na 37°C tijekom 18-24 sata. Nakon inkubacije je u svaku jažicu dodano 50 µl TTC otopine ($\gamma$=0,5 mg/ml sterilne fiziološke otopine) (engl. *triphenyl tetrazolium chloride*, TTC). Rezultati su očitani golim okom nakon dodatne inkubacije od 3 sata (37°C). Pritom, promjena boje u ružičastuje bila znak rasta bakterija te minimalna inhibitorna koncentracija pojedinog uzorka najveće razrjeđenje uzorka pri kojem nije došlo do pojave obojenja. Rezultati su dodatno uspoređeni i s kontrolnim jažicama pri čemu su pozitivnu kontrolu činile jažice sa serijskim razrjeđenjima antibiotika, a negativnu one sa serijskim razrjeđenjima otapala (DMSO). Mjerenje je provedeno u tri ponavljanja.

Tablica 3: Vrijednost standarda na McFarland skali (McFarland 1907)

| **STANDARD** | **KONCENTRACIJA BAKTERIJA[(1)]×10$^6$/ml** | **TEORETSKA OPTIČKA GUSTOĆA[2] na 550 nm** |
|---|---|---|
| 0,5 | 150 | 0,125 |
| 1 | 300 | 0,25 |
| 2 | 600 | 0,50 |
| 3 | 900 | 0,75 |
| 4 | 1200 | 1,00 |
| 5 | 1500 | 1,25 |

[1] Koncentracija bakterija ovisi o njihovoj veličini, a brojevi prikazuju prosječnu vrijednost.

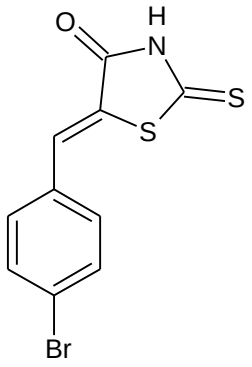
[2] Vrijednosti odgovaraju optičkoj gustoći bakterijske suspenzije.

# 3. REZULTATI

# 3. Rezultati

## 3.1. Sintetizirani spojevi

Spoj 1: (5*Z*)-5-(4-brombenziliden)-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-on



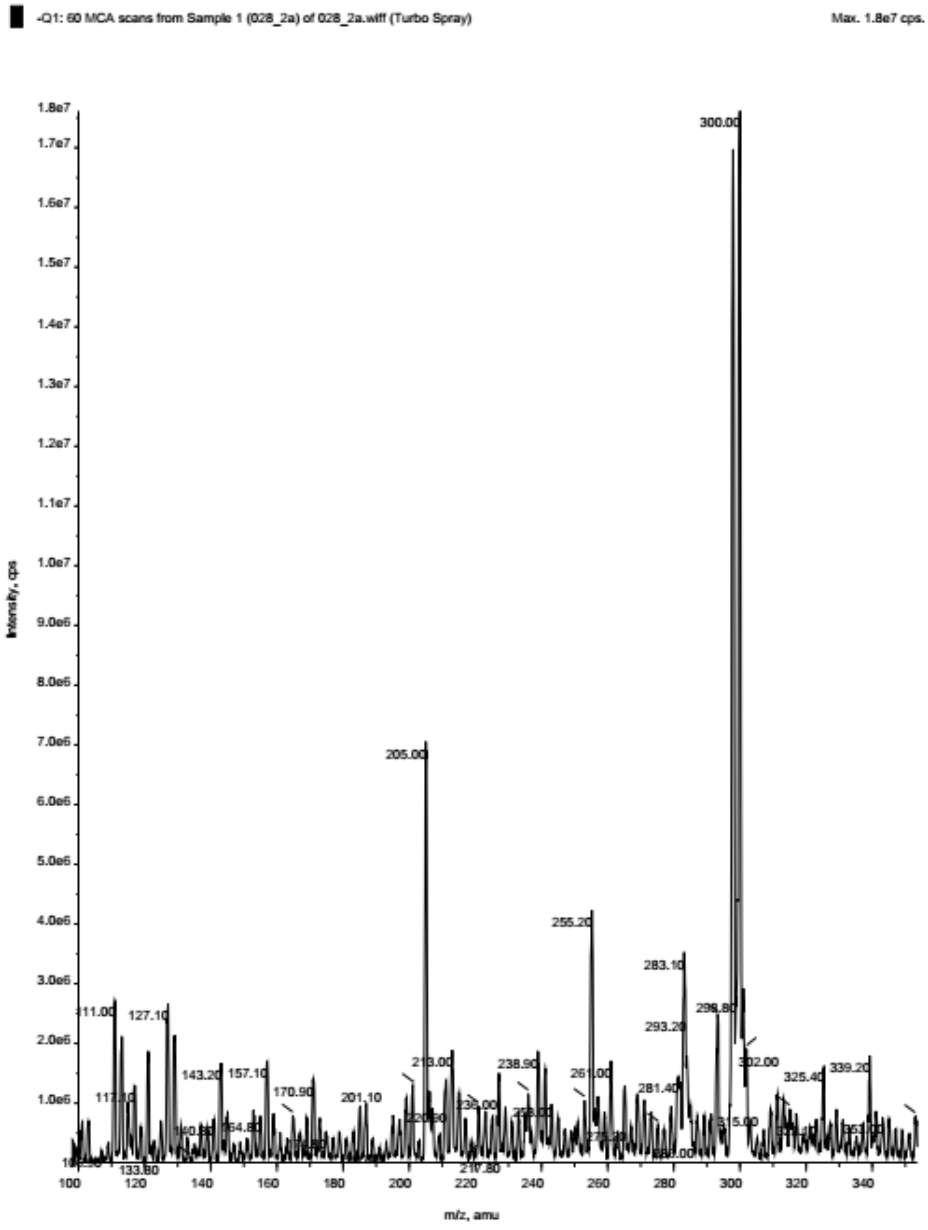

Tt=221°C (228-230°C, Han i sur. 2013)

η=9,69%

Rf=0,761

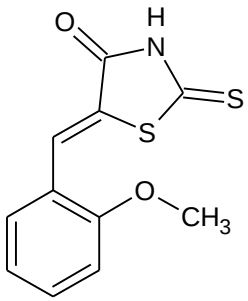
M=300,194 g/mol

boja uzorka: svijetlo smeđa




Slika 7: Maseni spektar (5*Z*)-5-(4-brombenziliden)-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-ona

Spoj 2: (5*Z*)-5-(2-metoksibenziliden)-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-on



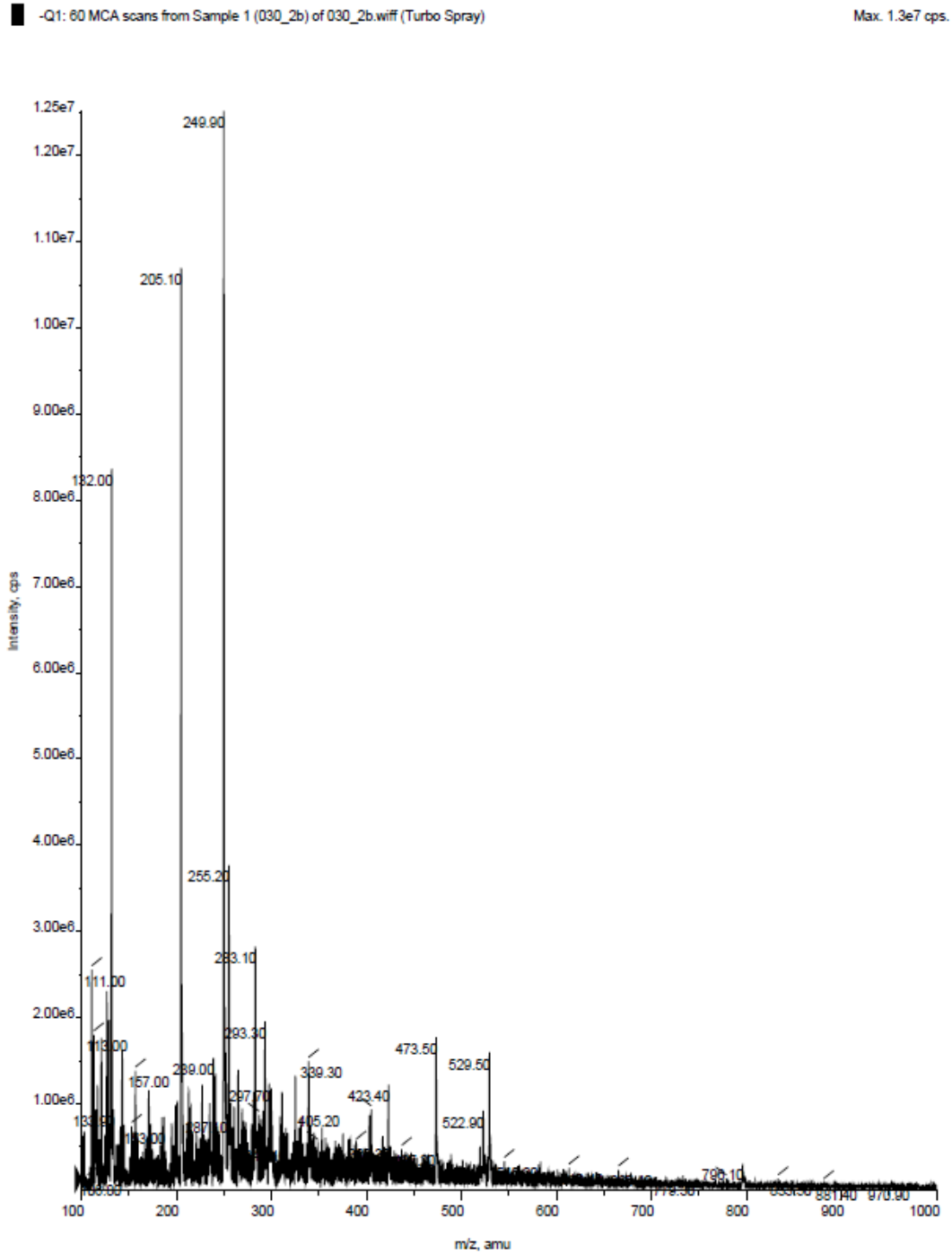

Tt=251-258°C (258°C, Majd 2007)

η=37,39%

Rf=0,735

M=251,325 g/mol

boja uzorka: žuta




Slika 8: Maseni spektar (5*Z*)-5-(2-metoksibenziliden)-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-ona

Spoj 3: (5Z)-5-[4-(dimetilamino)benziliden]-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-on

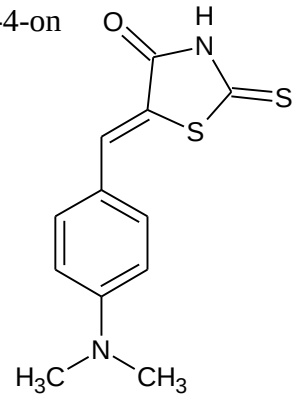
Tt=280°C (284-286°C, Subhedar i sur. 2016)

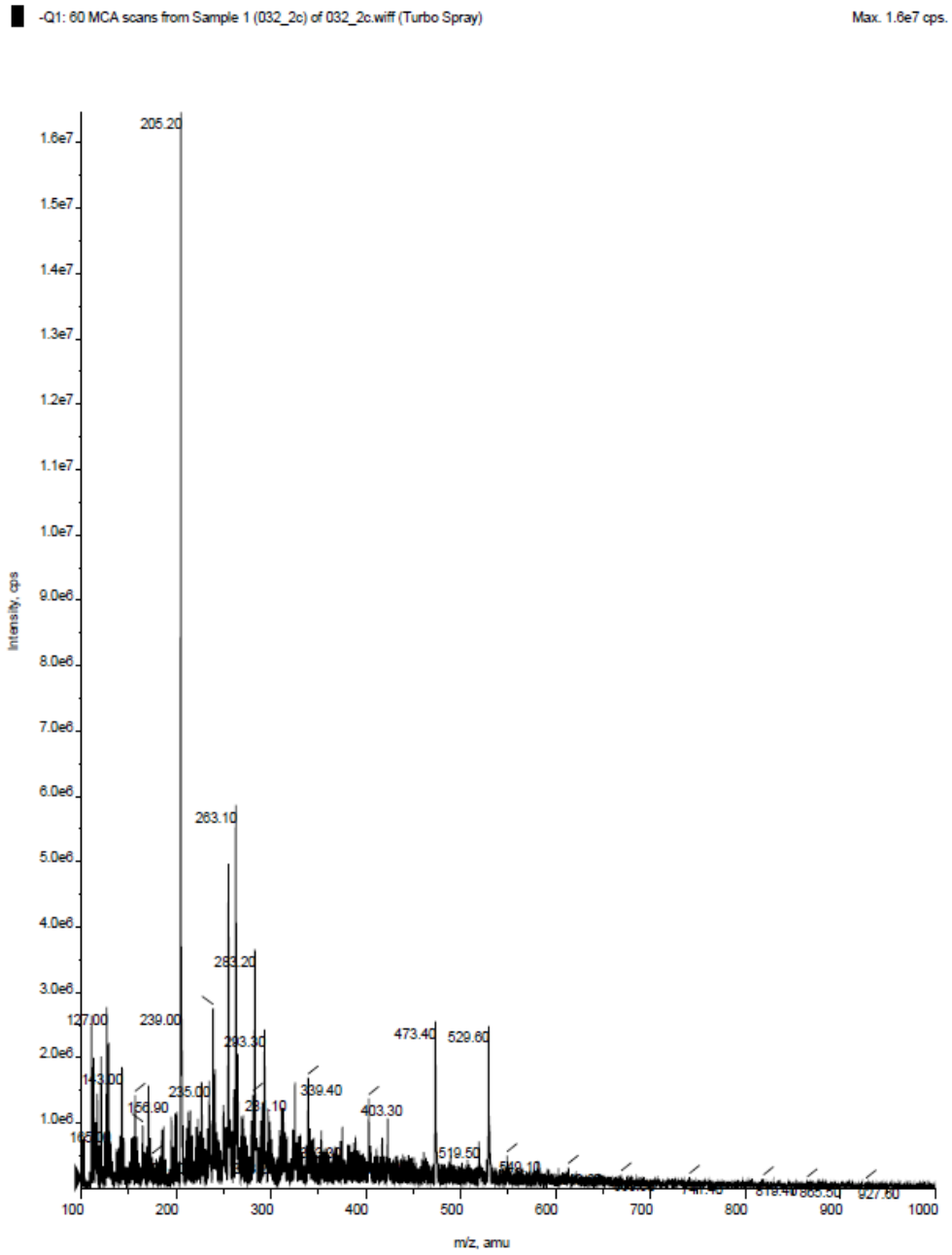
η=50,47%

Rf=0,684

M=264,37 g/mol

boja uzorka: narančasto-crvena




Slika 9: Maseni spektar (5Z)-5-[4-(dimetilamino)benziliden]-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-ona

Spoj 4: (5Z)-5-(3-metoksibenziliden)-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-on

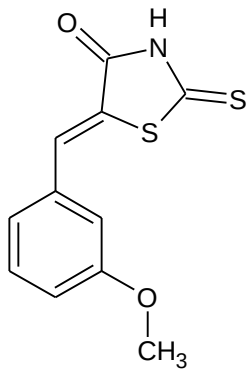
Tt=229-233°C (235°C, Majd 2007)

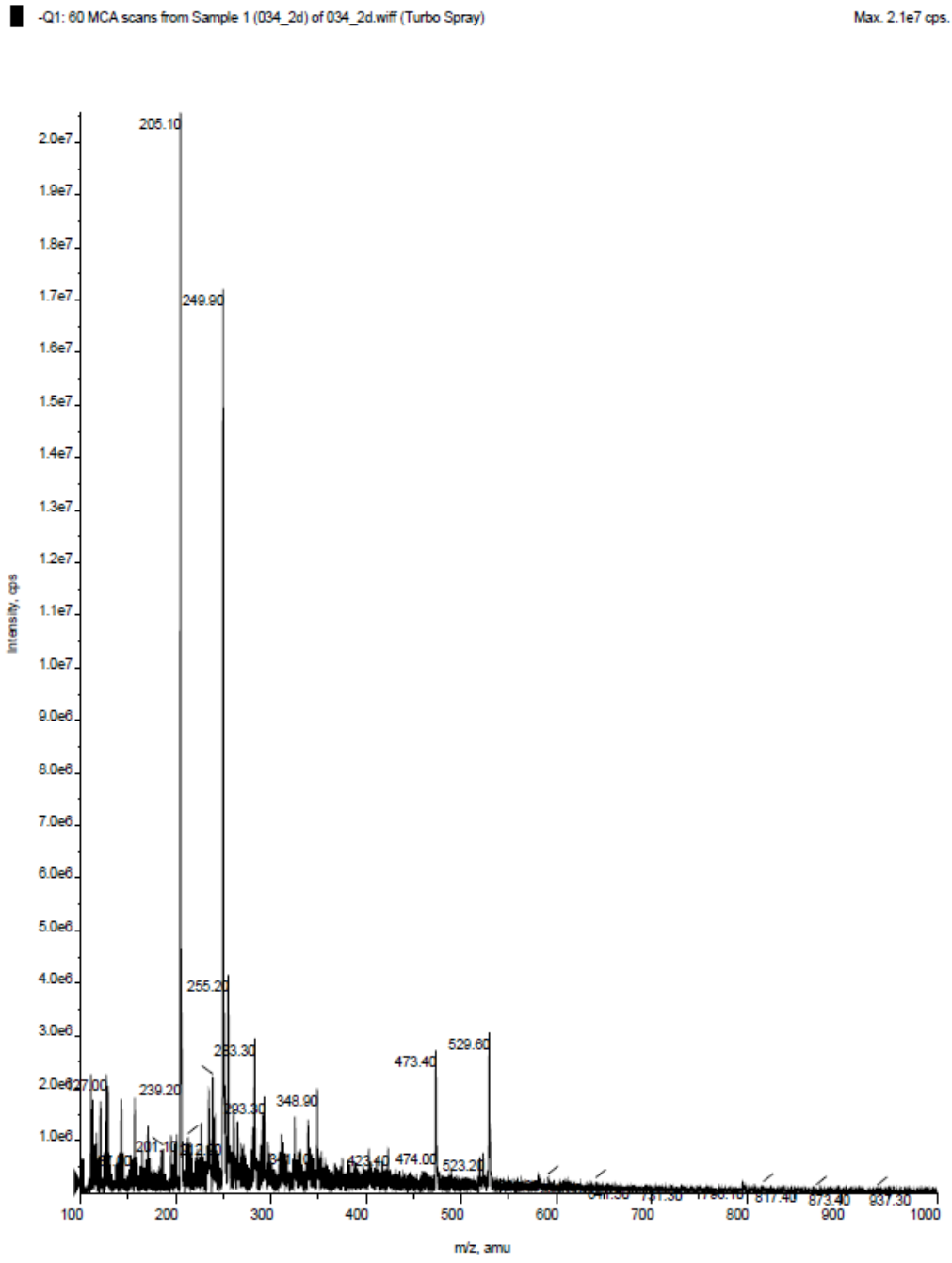
η=33,84%

Rf=0,722

M=251,325 g/mol

boja uzorka: žuta




Slika 10: Maseni spektar (5Z)-5-(3-metoksibenziliden)-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-ona

Spoj 5: (5*Z*)-5-(2,3-dihidroksibenziliden)-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-on

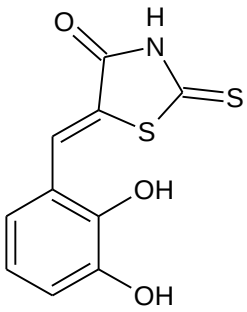
Tt=220-222°C (225-227°C, Pinson i sur. 2011)

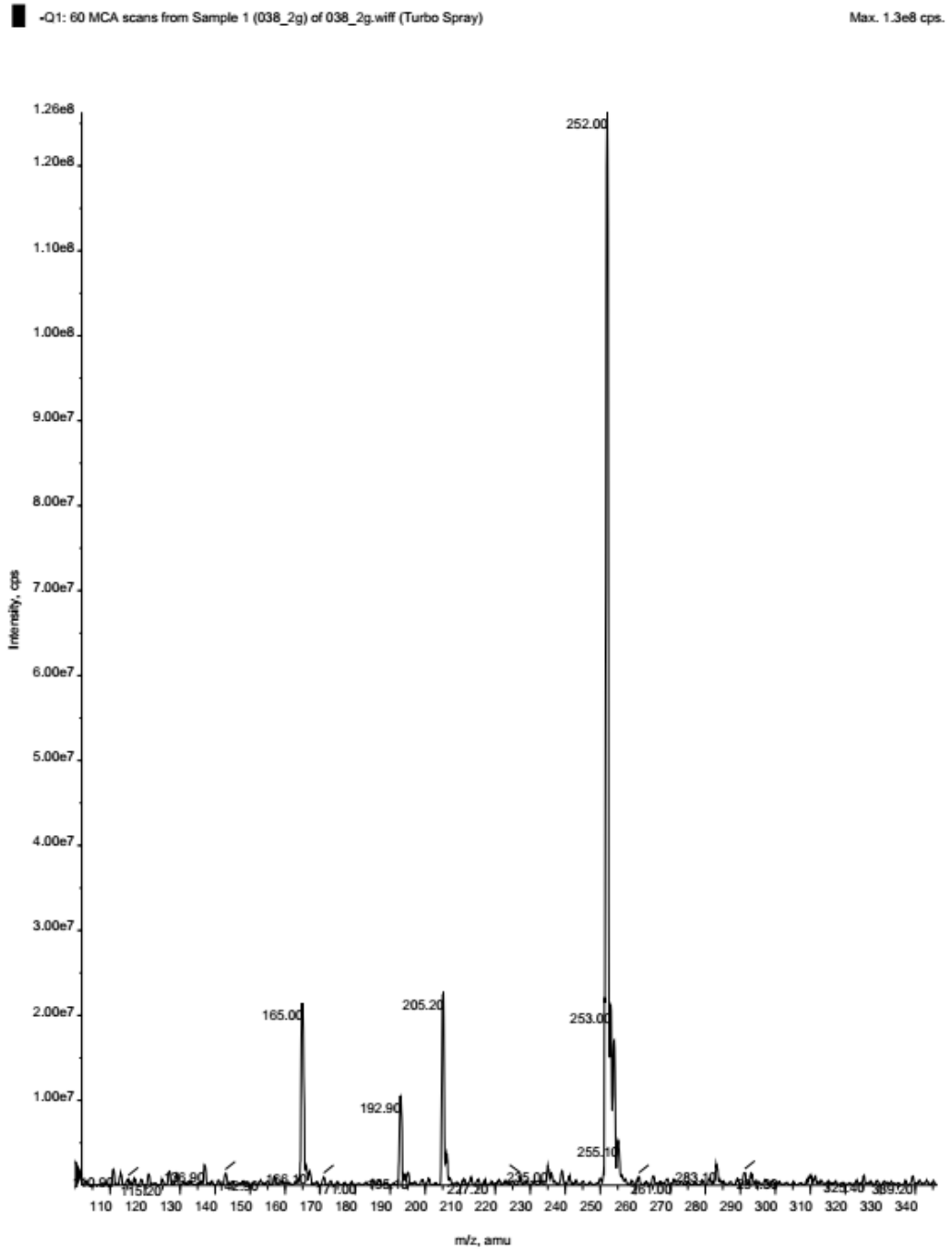
η=29,35%

Rf=0,564

M=253,297 g/mol

boja uzorka: tamno smeđa




Slika 11: Maseni spektar (5*Z*)-5-(2,3-dihidroksibenziliden)-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-ona

Spoj 6: (5Z)-2-tiokso-5-(3,4,5-trimetoksibenziliden)-1,3-tiazolidin-4-on

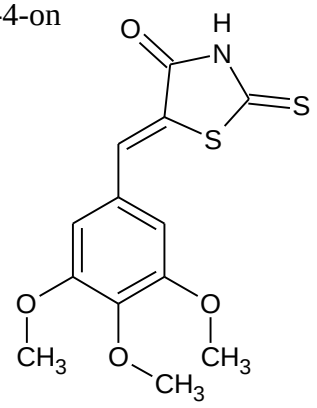
Tt=189-193°C

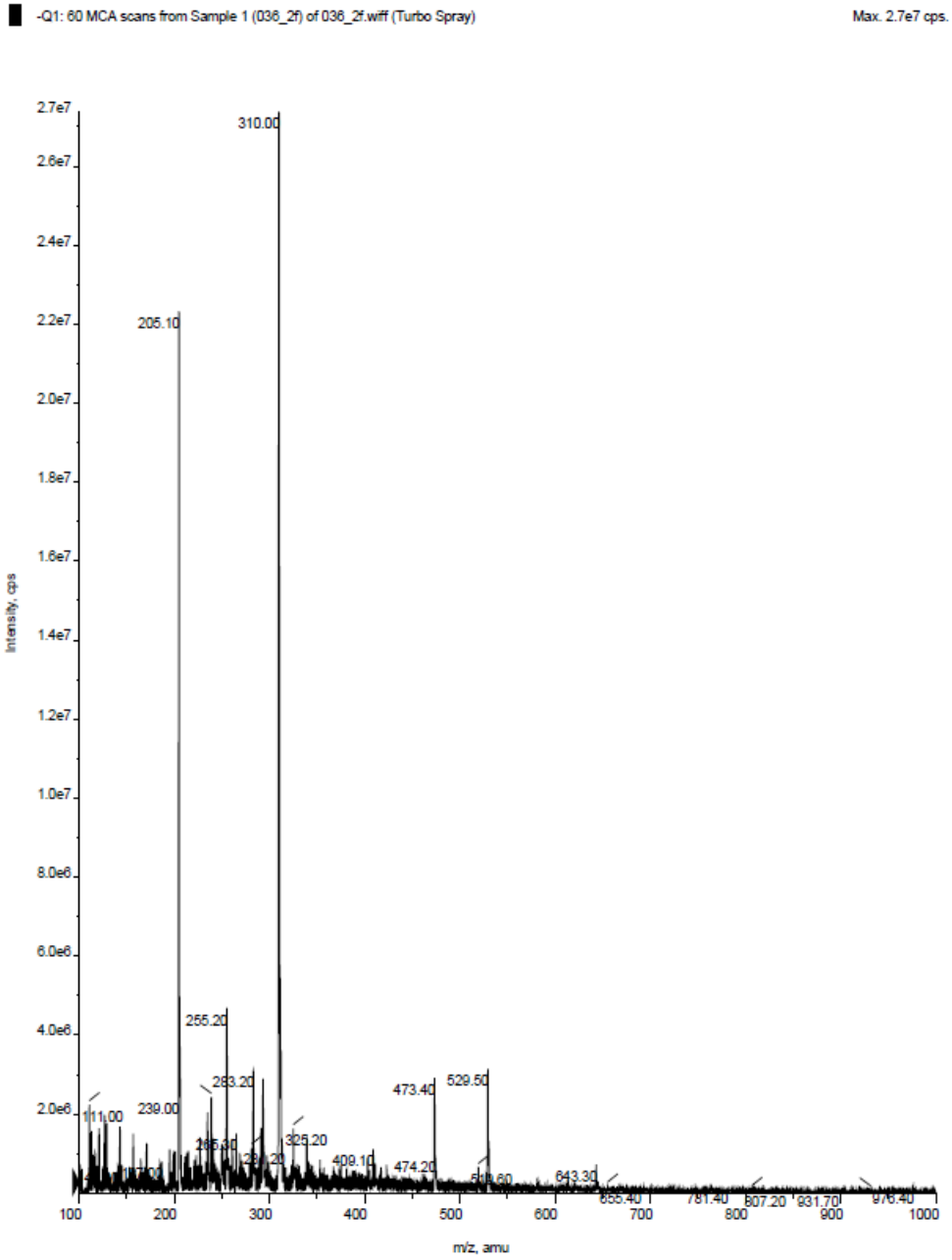
η=19,34%

Rf=0,702

M=311,37 g/mol

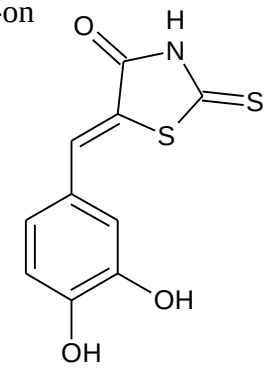
boja uzorka: žuta




Slika 12: Maseni spektar (5Z)-2-tiokso-5-(3,4,5-trimetoksibenziliden)-1,3-tiazolidin-4-ona

Spoj 7: (5*Z*)-5-(3,4-dihidroksibenziliden)-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-on



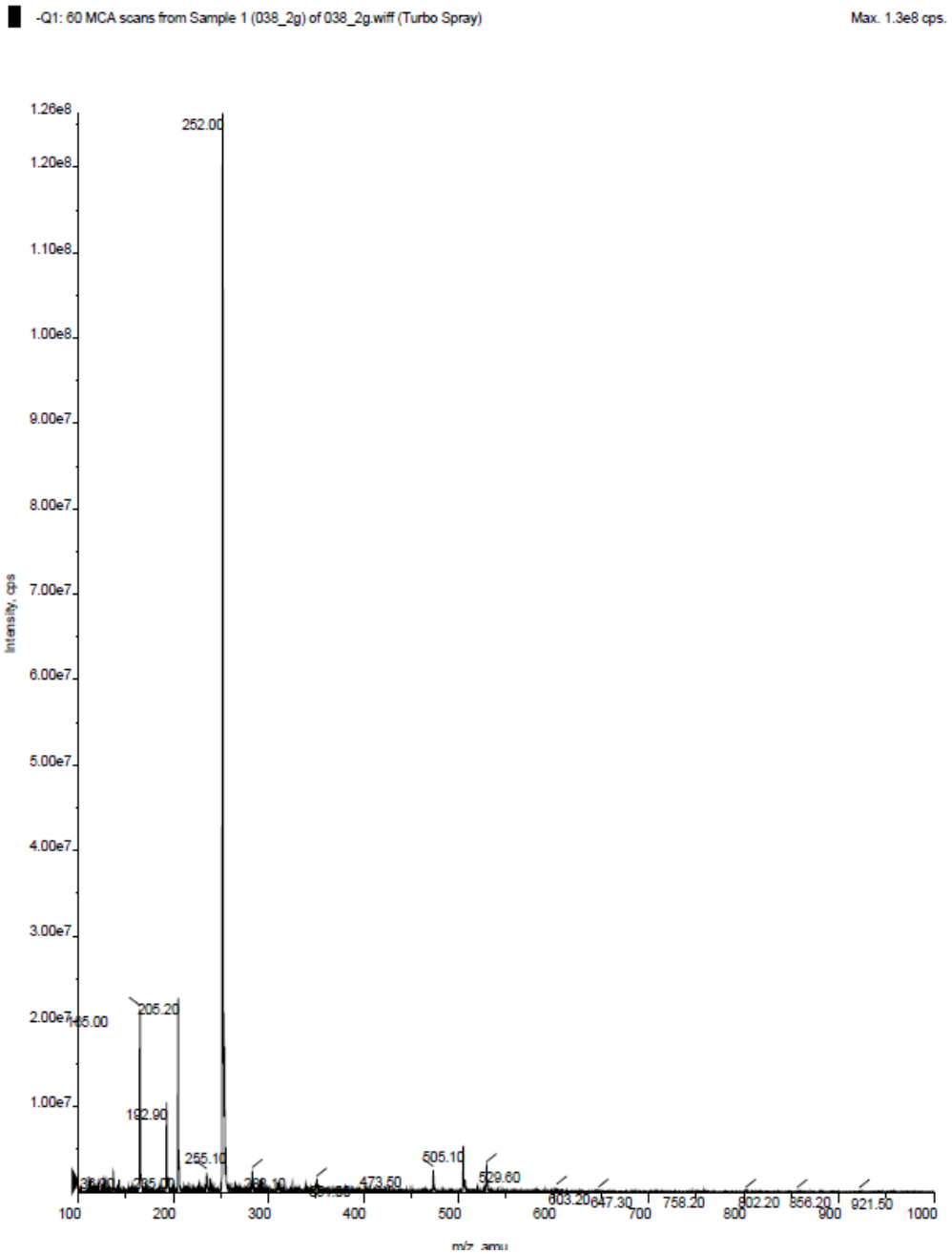

Tt=287-289°C

η=25,89%

Rf=0,417

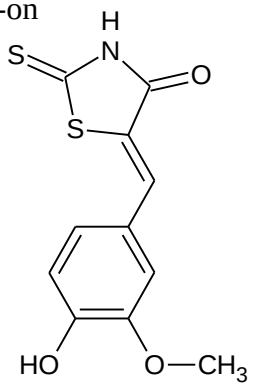
M=253,297 g/mol

boja uzorka: crveno-smeđa




Slika 13: Maseni spektar (5*Z*)-5-(3,4-dihidroksibenziliden)-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-ona

Spoj 8: (5Z)-5-(4-hidroksi-3-metoksibenziliden)-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-on



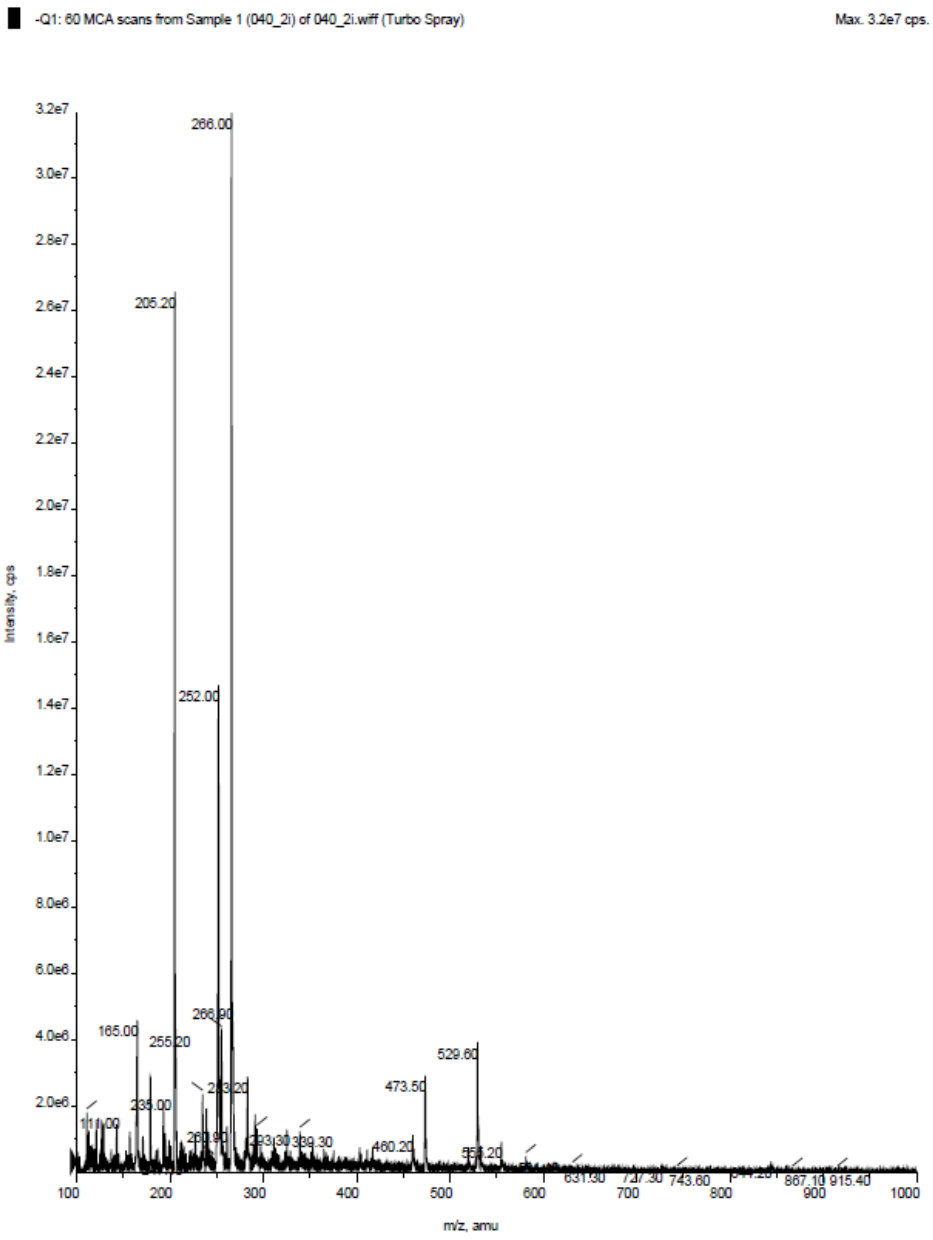

Tt=220°C (231-232°C, Han i sur. 2013)

η=42,86%

Rf=0,667

M=267,35 g/mol

boja uzorka: žuto-smeđa




Slika 14: Maseni spektar

(5Z)-5-(4-hidroksi-3-metoksibenziliden)-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-ona

Spoj 9: (5*Z*)-5-(3-hidroksibenziliden)-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-on

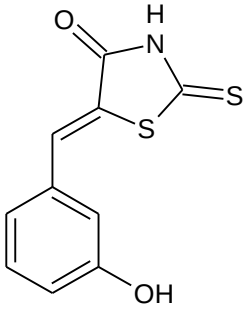
Tt=247°C (244-251°C, Španingerová 2006)

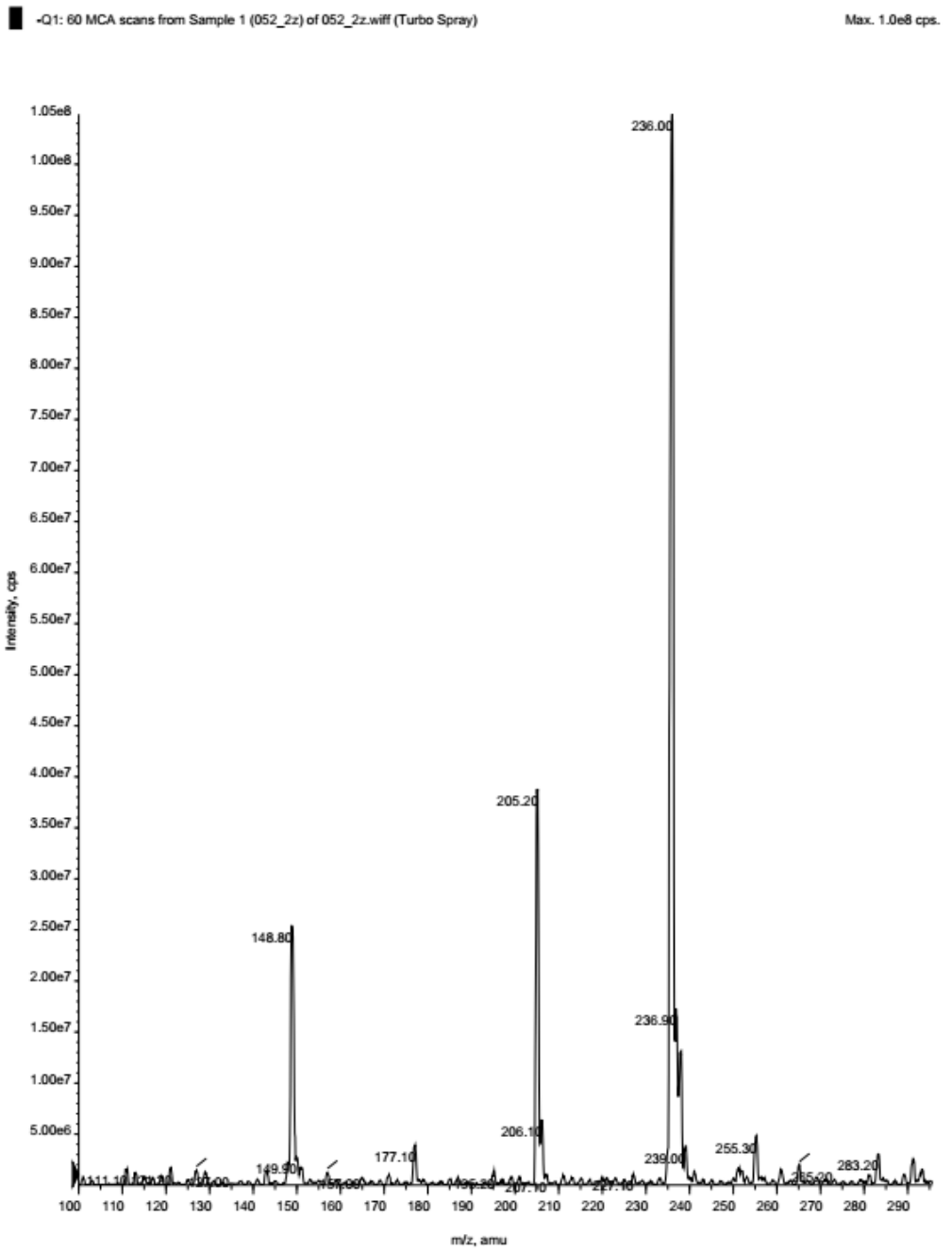
η=5,19%

Rf=0,669

M=237,29 g/mol

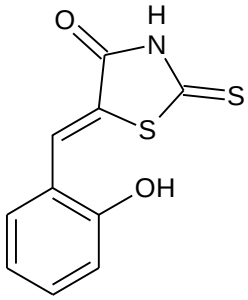
boja uzorka: žuta




Slika 15: Maseni spektar (5*Z*)-5-(3-hidroksibenziliden)-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-ona

Spoj 10: (5*Z*)-5-(2-hidroksibenziliden)-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-on



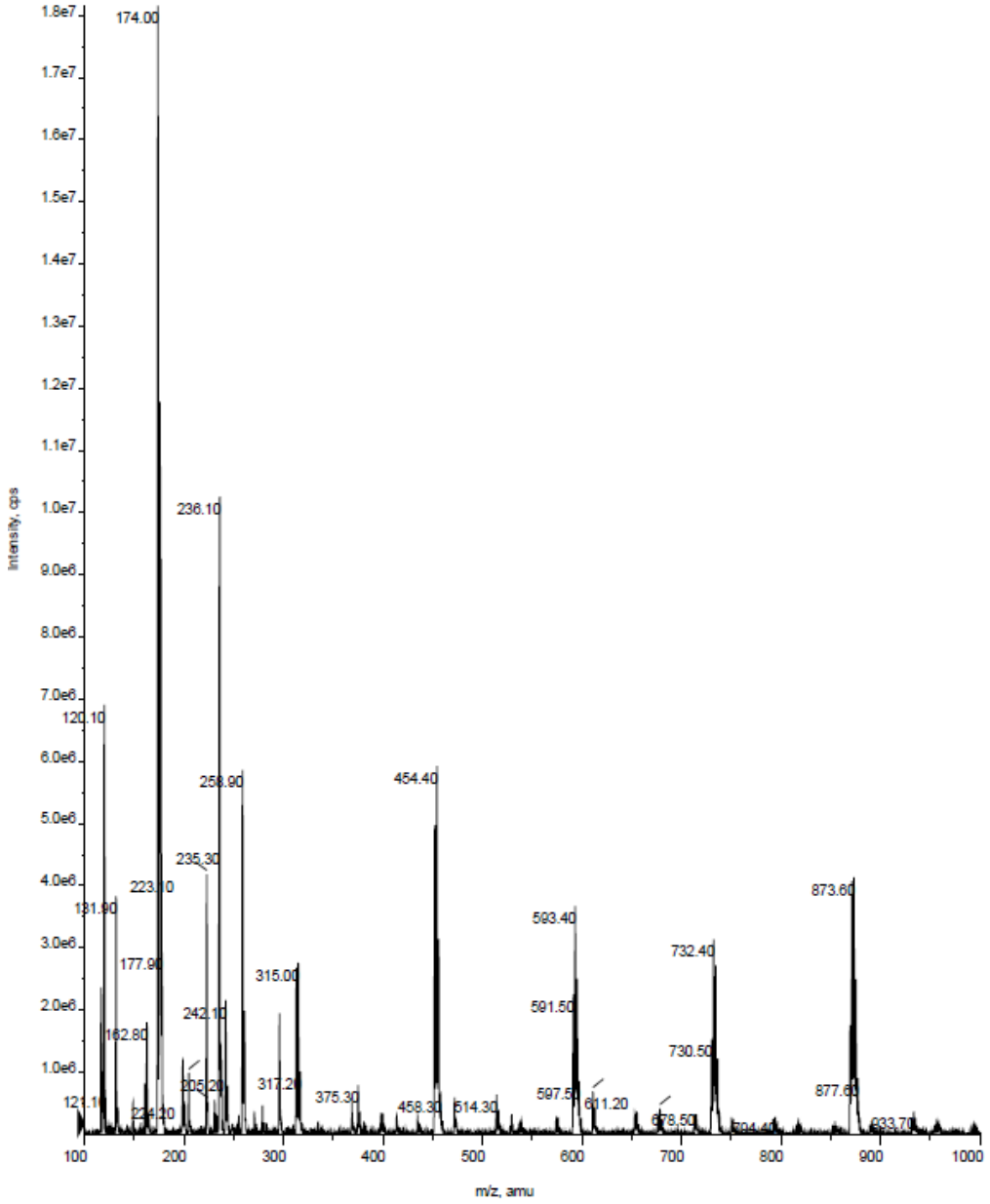

Tt=201-204°C (200-202°C, Varghese i sur. 2003)

η=21,59%

Rf=0,786

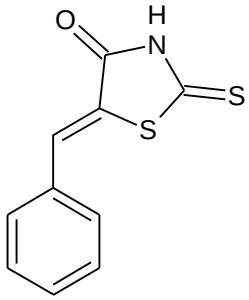
M=237,29 g/mol

boja uzorka: žuta




Slika 16: Maseni spektar (5*Z*)-5-(2-hidroksibenziliden)-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-ona

Spoj 11: (5*Z*)-5-benziliden-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-on



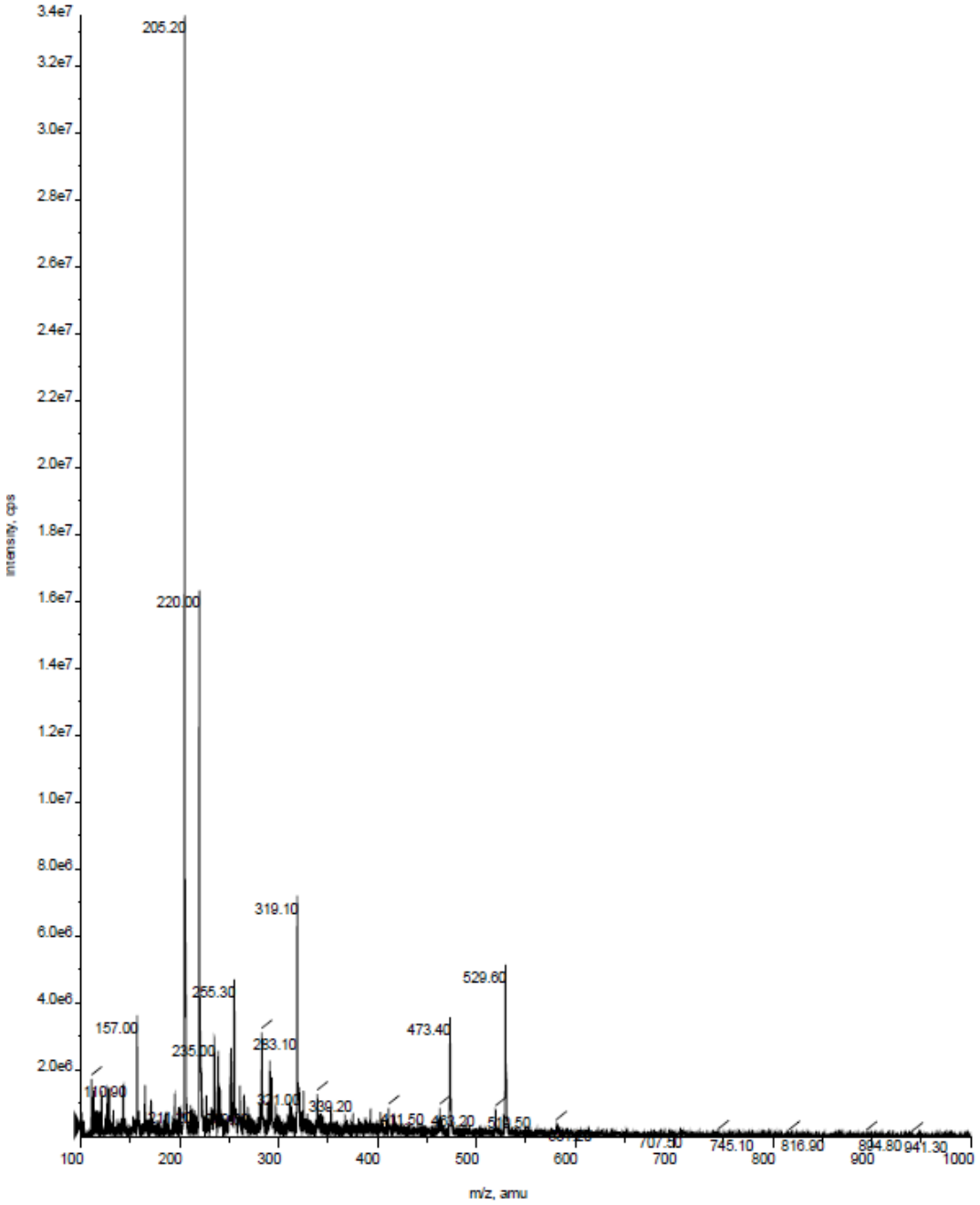

Tt=194-199°C (203-204°C, Gong i sur. 2008)

η=15,54%

Rf=0,673

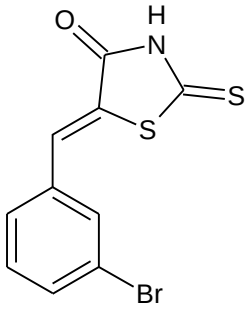
M=221,29 g/mol

boja uzorka: crveno-smeđa




Slika 17: Maseni spektar (5*Z*)-5-benziliden-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-ona

Spoj 12: (5*Z*)-5-(3-brombenziliden)-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-on



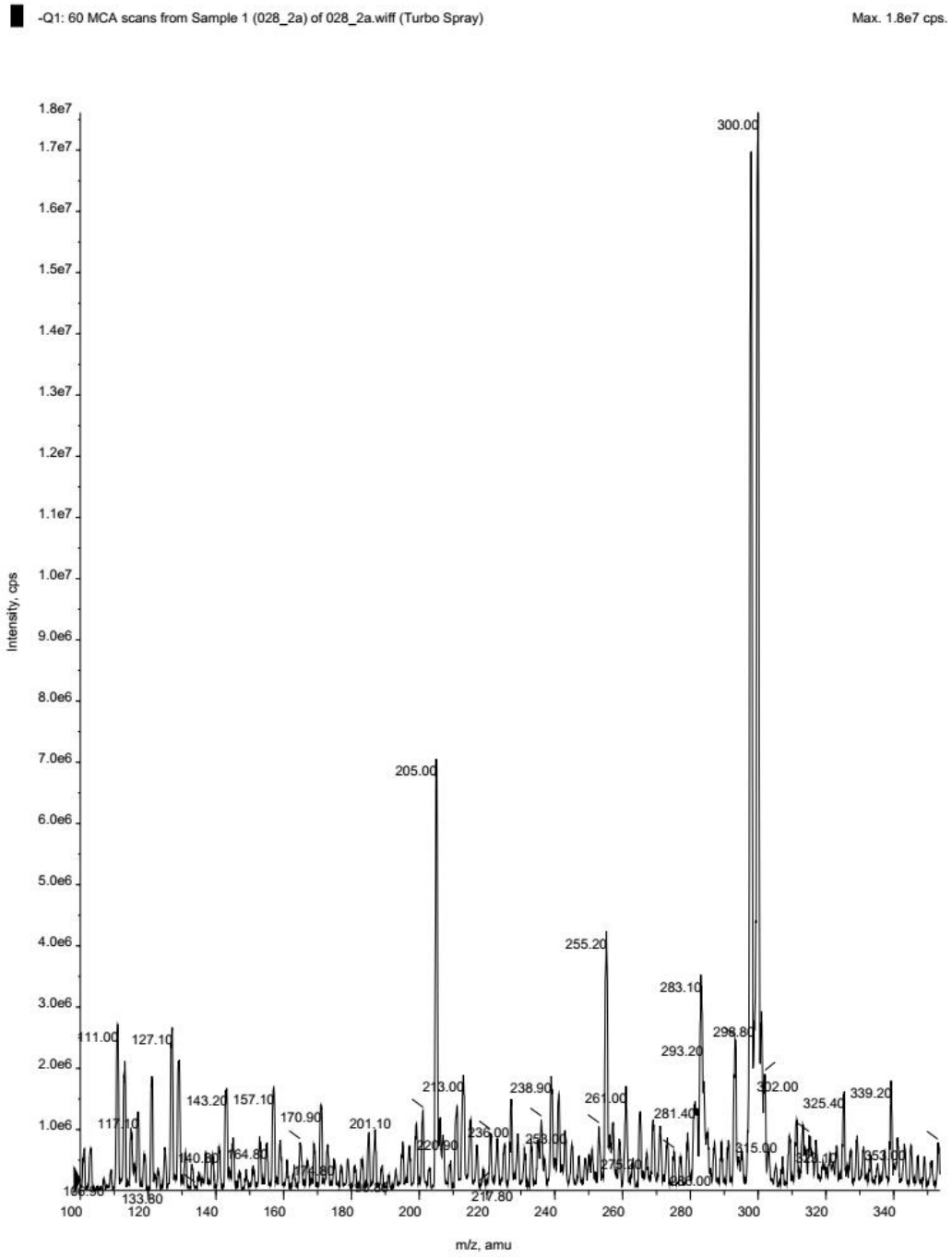

Tt=240°C (244-246°C, Kalafutova 2009)

η=15,29%

Rf=0,602

M=300,195 g/mol

boja uzorka: žuto-smeđa




Slika 18: Maseni spektar (5*Z*)-5-(3-brombenziliden)-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-ona

Spoj 13: (5*Z*)-5-(4-nitrobenziliden)-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-on

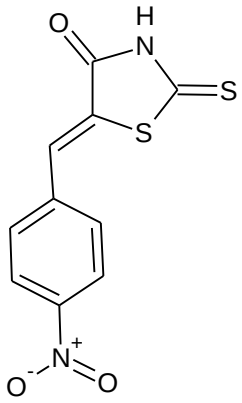
Tt=253°C (255-256°C, Gong i sur. 2008)

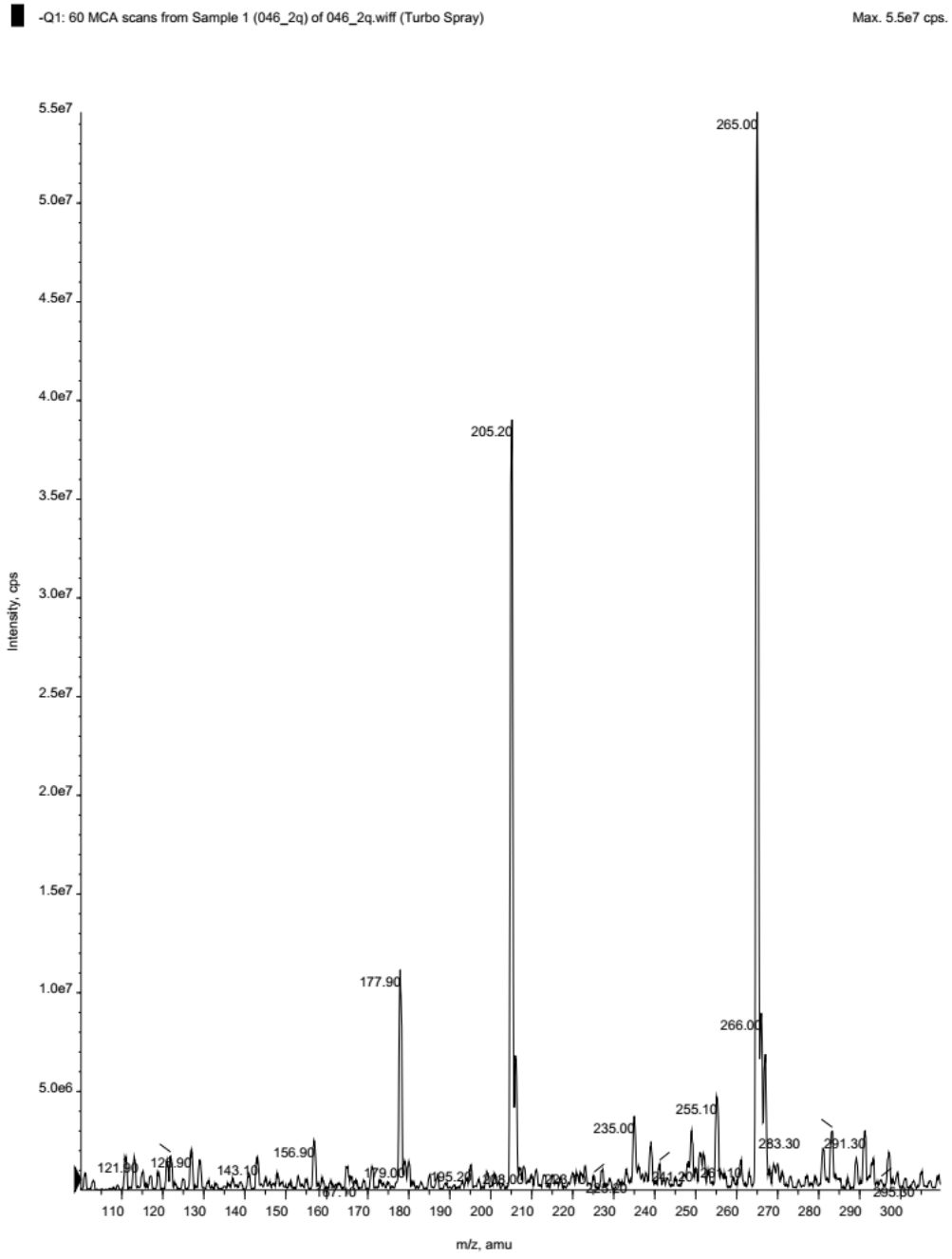
η=49,69%

Rf=0,786

M=266,296 g/mol

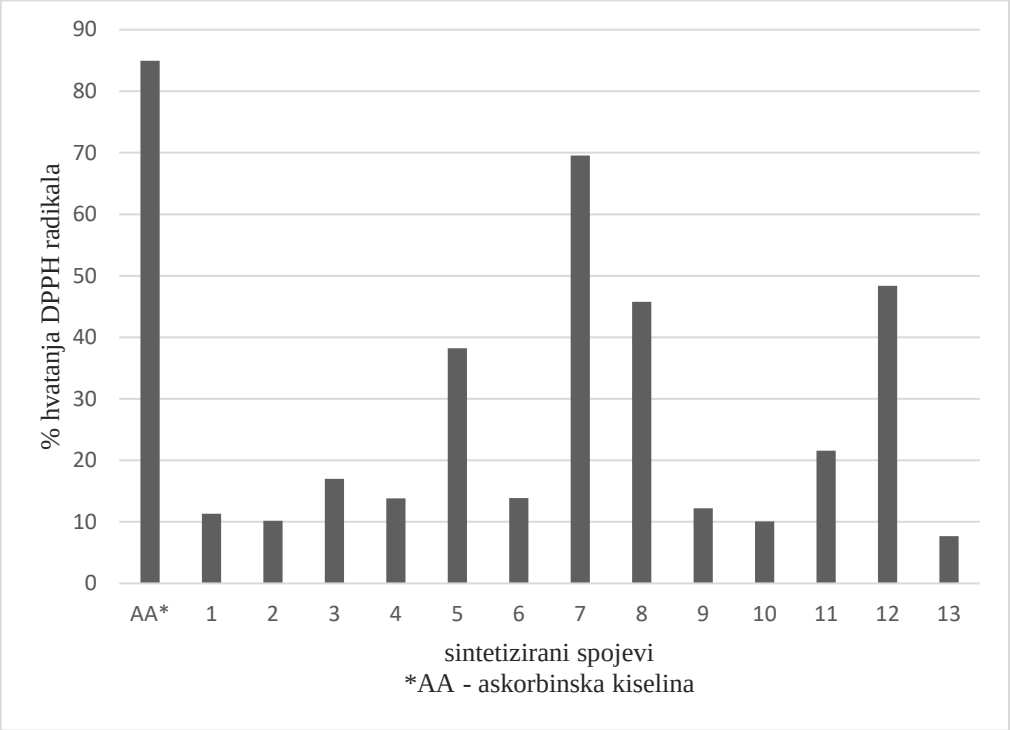
boja uzorka: crna




Slika 19: Maseni spektar (5*Z*)-5-(4-nitrobenziliden)-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-ona

### 3.2. Antioksidativna aktivnost sintetiziranih spojeva




Slika 20: Antioksidativna aktivnost derivata rodanina izražena kao % hvatanja DPPH radikala

### 3.3. Antibakterijska aktivnost sintetiziranih spojeva

Tablica 4: Antibakterijska aktivnost sintetiziranih spojeva

| **oznaka sintetiziranog spoja** | **minimalna inhibitorna koncentracija u µg/ml** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Gram-pozitivne bakterije | | Gram-negativne bakterije | |
| | *S. aureus* | *B. subtilis* | *E. coli* | *P. aeruginosa* |
| antibiotik (amikacin sulfat) | 4,000 | 1,950 | 1,953 | 1,950 |
| 1 | 125 | 125 | 125 | 125 |
| 2 | 250 | 125 | 250 | 250 |
| 3 | 125 | 125 | 125 | 125 |
| 4 | 125 | 125 | 125 | 125 |
| 5 | 125 | 62,5 | 125 | 125 |
| 6 | 125 | 62,5 | 125 | 125 |
| 7 | 125 | 125 | 125 | 125 |
| 8 | 125 | 62,5 | 125 | 125 |
| 9* | - | - | - | - |
| 10 | 125 | 125 | 125 | 125 |
| 11 | 125 | 125 | 125 | 125 |
| 12 | 125 | 125 | 125 | 125 |
| 13 | 125 | 12,526 | 125 | 125 |

*9 – spoj nije ispitivan zbog nedostatne količine uzorka

# 4. RASPRAVA

# 4. Rasprava

## 4.1. Sinteza derivata rodanina

Serija derivata rodanina je sintetizirana reakcijom Knoevenagelove kondenzacije s različitim aromatskim aldehidima *zelenom* metodom u eutektičkom otapalu na bazi kolin-klorida. Reakcijskim smjesama nisu dodavani nikakvi katalizatori koji se obično koriste u konvencionalnim sintezama ovih spojeva (Han i Zhou 2016). Sintetizirani spojevi su po potrebi pročišćeni, a čistoća spojeva je provjerena na TLC-u. Spojevi su okarakterizirani *Rf*-vrijednostima te su im određene temperature tališta i spektri masa. Dobiveni eksperimentalni podatci su uspoređeni s postojećim literaturnim podatcima pri čemu se temperature tališta spojeva 2, 3, 4, 10, 11 i 13 podudaraju s navedenima u literaturi. Nadalje, spektrometrijom masa su dobiveni podatci o molekularnim masama analiziranih spojeva pri čemu su rezultati izraženi u obliku *m/z* (za većinu iona z = 1 *m/z* predstavlja masu određenog iona). Iz spektara masa (Slika 7 – Slika 19) je vidljivo da se za svaki pojedini spoj dobiveni molekularni ioni potpuno podudaraju s teoretski pretpostavljenima. Na temelju temperatura tališta i dobivenih spektara masa može se sa sigurnošću zaključiti da su strukture sintetiziranih spojeva potvrđene. Strukture sintetiziranih derivata rodanina s pripadajućim eksperimentalnim podatcima su prikazane u  Rezultatima (3.1.1. – 3.1.13.).

Derivati rodanina zbog svojih specifičnih svojstava već desetljećima privlače pažnju znanstvenika (Tejchman i sur. 2017). To također uključuje optimizaciju metoda sinteze što pospješuje daljnja istraživanja. Primjerice, Anbarasan i sur. (2015) su također sintetizirali spoj 11, ali uz natrijev acetat/octenu kiselinu i etanol pri čemu je reakcijsko vrijeme bilo 3 sata, što nije značajna razlika u odnosu na reakcijska vremena u ovom radu (2-4 sata). Međutim, reakcijsko iskorištenje je značajno više – 80% u odnosu na 15,54% u ovom radu. Na nisko reakcijsko iskorištenje izravan utjecaj mogu imati fizikalno-kemijska svojstva otapala, primjerice relativno visoka viskoznost eutektičkog otapala kolin-klorid/urea. Na reakcijsko iskorištenje, uz izbor otapala, značajan utjecaj može imati i uporaba mikrovalnog zračenja. Metoda se temelji na mogućnosti polarnih molekula da apsorbiraju i emitiraju mikrovalno zračenje. Polarizacija i ionska kondukcija uvjetuju izravno zagrijavanje uzorka koji se potom tretira mikrovalovima (Bubalo i sur. 2016). Mikrovalno zračenje je u značajnoj uporabi u kemijskim sintezama čemu su razlozi, uz visoka reakcijska iskorištenja, i nastajanje čišćih produkta te jednostavnost eksperimentalne izvedbe (Zhou i sur. 2006).

Primjerice, Zhou i sur. (2006) su sintetizirali seriju kemijskih spojeva Knoevenagelovom kondenzacijom između rodanina i različitih aromatskih aldehida uz tetrabutilamonijev bromid (TBAB) u vodenom mediju uz mikrovalno zračenje. Uz izvođenje reakcije u *zelenim* uvjetima, reakcijska iskorištenja su bila 71%-96% te reakcijska vremena 8-10 minuta. Zhou i sur. (2006) su također utvrdili na primjeru sinteze 5-(3-nitrobenziliden)-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-ona da množina korištenog katalizatora također ima značajnu ulogu u uspješnosti kemijskih reakcija (Tablica 5).

Tablica 5: Utjecaj količine katalizatora na reakcijsko vrijeme i iskorištenje u sintezi 5-(3-nitrobenziliden)-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-ona (Zhou i sur. 2006)

| **katalizator** | ***n*(mol)** | **reakcijsko vrijeme (min)** | **reakcijsko iskorištenje (%)** |
|---|---|---|---|
| TBAB | 0 | 20 | 0 |
| TBAB | 0,3 | 8 | 96 |
| TBAB | 0,6 | 8 | 77 |
| TBAB | 0,9 | 8 | 55 |
| TBAB | 0,3 | 240* | 65 |

*reakcija provedena uz konvencionalno zagrijavanje

*n*(rodanin) : *n*(3-$NO_2C_6H_4$) = 1:1

Osim količine katalizatora, na reakcijsko vrijeme i iskorištenje reakcije Knoevenagelove kondenzacije uječe i temperatura (Tablica 6).

Tablica 6: Utjecaj temperature na reakcijsko vrijeme i reakcijsko iskorištenje u sintezi 5-(2,4-diklorbenziliden)-2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-on (Han i Zhou 2016)

| ***katalizator (%mol)** | **temperatura (°C)** | **reakcijsko vrijeme (min)** | **reakcijsko iskorištenje (%)** |
|---|---|---|---|
| 10 | 70 | 60 | 62 |
| 10 | 80 | 14 | 81 |
| 10 | 90 | 11 | 84 |
| 10 | 100 | 11 | 84 |

*katalizator je 2-hidroksietil amonijev acetat

*n*(rodanin): *n*(aldehid) = 1:1

Uz to, sinteza derivata prema Han i Zhou (2016) je provedena u uvjetima bez otapala uz katalizator 2-hidroksietil amonijev acetat. Pritom, reakcijska iskorištenja za reakcije dobivanja spojeva 1 i 10 pri 90°C su 85% i 82%, što je značajno više u odnosu na reakcijska iskorištenja analognih reakcija u ovom radu (9,69% te 21,59%) pri 80°C.

U konačnici, obzirom da su u ovom eksperimentalnom radu očekivani produkti izolirani, eutektičko otapalo kolin-klorid/urea se može smatrati pogodnim medijem za provođenje reakcije Knoevenagelove kondenzacije između rodanina i aldehida. Međutim, s ciljem povećanja reakcijskih iskorištenja moglo bi se dodatno istražiti čimbenike kao što su promjena omjera reaktanata i eutektičkog otapala, promjena temperature i uporaba katalizatora u različitim množinskim udjelima.

### 4.2. Antioksidativna aktivnost sintetiziranih derivata rodanina

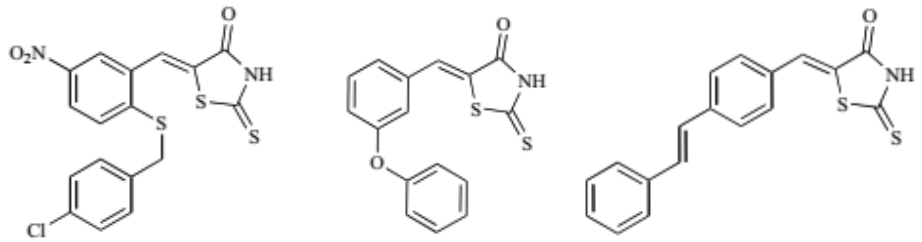
Specifična struktura rodanina je uzrok širokom spektru bioloških aktivnosti derivata rodanina (Sojitra i sur. 2013; Mendgen i sur. 2012). Pri tome, antioksidativnoj aktivnosti derivata rodanina značajno doprinose sferičnost molekula te 3D raspodjela atoma visoke elektronegativnosti (O, N i S) (Molnar i sur. 2018).

U ovom radu je *in vitro* antioksidativna aktivnost sintetiziranih spojeva ispitana DPPH metodom pri čemu su rezultati izraženi u obliku % hvatanja DPPH radikala (Slika 21). Svi sintetizirani spojevi pokazuju manju antioksidativnu aktivnost u odnosu na askorbinsku kiselinu koja je korištena kao standard. Spoj 7, produkt reakcije rodanina i 3,4-dihidroksibenzaldehida, pokazuje najbolju antioksidativnu aktivnost (69,54% DPPH). Ovaj rezultat je očekivan s obzirom da je utvrđeno da su flavonoidi (Amić i sur. 2007), kumarini i fenoli (Molnar 2011) s kateholnom skupinom (3,4-$(OH)_2$) potentni antioksidansi. Promjenom položaja hidroksilnih skupina antioksidativna aktivnost značajno opada i ona za spoj 5 sa 2,3-dihidroksibenzilidenskom skupinom u položaju 5 rodaninskog prstena iznosi 38,22% DPPH. Da položaj supstituenta na fenilnom prstenu benzilidenske skupine utječe na antioksidativnu aktivnost potvrđuju i veće antioksidativne aktivnosti spojeva 4 i 9 (supstituenti na fenilnom prstenu benzilidenske skupine u položaju 3) u odnosu na spojeve 2 i 10 (isti supstituenti na fenilnom prstenu benzilidenske skupine u položaju 2). Nadalje, zamjeni li se jedna hidoksilna skupina metoksi skupinom antioksidativna aktivnost također opada (spoj 8; 45,75% DPPH). Na antioksidativnu aktivnost utječe također i broj hidroksilnih skupina prisutnih u strukturi. Tako su spojevi 9 i 10 s 3-hidroksibenzilidenskom i 2-hidroksibenzilidenskom skupinom u položaju 5 rodaninskog prstena pokazali značajno manje antioksidativne aktivnosti (12,19% DPPH, 10,5% DPPH).

S ozirom da sintetizirani derivati rodanina prema rezultatima pokazuju antioksidativnu aktivnost, značajno bi bilo utvrditi rezultate i drugim, srodnim metodama poput fosfomolibden metode. Nadalje, potrebno je i dodatno istražiti i obrazložiti uzroke i mehanizme antioksidativne aktivnosti sintetiziranih derivata rodanina napose ukoliko se žele implementirati u farmaceutskoj ili prehrambenoj industriji. Pri tome, budući da su rezultati DPPH metode usporedivi jedino u ponovljenim identičnim uvjetima, ovise o vremenu izvođenja reakcija te ne pružaju informacije o stvarnoj aktivnosti ispitivanih uzoraka, spojevi koji su pokazali značajnu aktivnost (5, 7, 8, 12) bi se mogli ispitati i kromatografskim ili elektrokemijskim metodama (Amorati i Valgimigli 2015).

### 4.3. Antibakterijska aktivnost sintetiziranih derivata rodanina

Prema dosadašnjim istraživanjima, benzilidenski derivati rodanina (Slika 21) inhibiraju aktivnost bakterijskog enzima MurC sintetaze, NADPH ovisne reduktaze koja sudjeluje u biosintezi peptidoglikana koji je osnovna komponenta staničnih stjenki i Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija. Nadalje, nitrobenzilidenski rodanini inhibirajui hidrolitički enzim *β*-laktamazu. Raznolikost pojavnosti ovog enzima uzrok je bakterijske rezistentnosti u odnosu na *β*-laktamske antibiotike (Tomašić i Mašič 2009).




Slika 21: Primjeri benzilidenskih rodanina koji inhibiraju MurC sintetazu
(preuzeto i prilagođeno prema Tomašić i Mašič 2009)

Ispitivanje *in vitro* antibakterijske aktivnosti sintetiziranih spojeva provedeno je metodom razrjeđivanja bujona uz određivanje MIC vrijednosti. Rezultati su izraženi u μg/ml (Tablica 4). Antimikrobna aktivnost sintetiziranih spojeva je ispitivana u odnosu na 2 Gram-pozitivne (*Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis*) i 2 Gram-negativne bakterijske vrste (*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa*). Kao standard je korišten antibiotik amikacin sulfat pri čemu svi ispitivani uzorci pokazuju manju antibakterijsku aktivnost u odnosu na standard. Među ispitivanim spojevima, spoj 13 je pokazao značajnu antibakterijsku aktivnost u odnosu na vrstu *B. subtilis* (MIC<32 μg/ml) što potvrđuje da su derivati rodanina koji sadrže u strukturi nitro-funkcionalnu skupinu potencijalna antimikrobna sredstva (Tomašić i Mašič 2009).

Nadalje, spojevi 5, 6 i 8 su pokazali umjerenu antibakterijsku aktivnost (32<MIC<64 μg/ml) također u odnosu na istu bakterijsku vrstu. Preostale bakterijske vrste su pokazale najveću rezistentnost prema spoju 2 (MIC>128 μg/ml), međutim vrsta *B. subtilis* je i u slučaju ovog spoja najosjetljivija (MIC<128 μg/ml).

5-supstituirani derivati rodanin-3-karboksilnih kiselina (Tejchman i sur. 2017), derivati rodanina s kinolinskom jezgrom (Guo i sur. 2013), fenil-furanil-rodanini (Gualtieri i sur. 2006), sukladno rezultatima ovog istraživanja, također pokazuju izraženiju antibakterijsku aktivnost spram Gram-pozitivnih u odnosu na Gram-negativne bakterije. Nadalje, istraživanja koja su proveli Zvarec i sur. (2012) upućuju na veću osjetljivost vrste *B. subtilis* na derivate rodanina u odnosu na druge Gram-pozitivne vrste poput *Staphylococcus aureus i Staphylococcus epidermidis,* što je utvrđeno i u ovom radu. Preostali spojevi ispitivani u ovom radu su pokazali blagu antibakterijsku aktivnost u odnosu na sve ispitivane bakterijske vrste (64<MIC<128 μg/ml).

Različiti čimbenici utječu na rezultate MIC-a stoga bi se istražvanje moglo nastaviti ispitivanjem različitih vremena inkubacije te s različitim metodama priprave ili različitih veličina inokuluma (Balouiri i sur. 2016). Također, s obzirom da rezultati upućuju na veću osjetljivost Gram-pozitivnih vrsta na derivate rodanina, u istraživanja bi bilo poželjno uključiti i dadatan broj istih.

Uz to, iako MIC metoda svrstava testirane organizme kao osjetljive, srednje osjetljive ili otporne u odnosu na testirana antimikrobna sredstva, vrijednosti MIC-a ne daju nikakve naznake je li mehanizam djelovanja antimikrobnog sredstva baktericidan ili bakteriostatičan. Čak i uz poznat mehanizam djelovanja, vrlo je teško ili nemoguće predvidjeti učinkovitost ispitivanog spoja *in vivo* s obzirom na čimbenike koji također utječu na liječenje poput mehanizama obrane bolesnika, same bolesti ili drugih lijekova (Balouiri i sur. 2016; Wiegand i sur. 2008).

# 5. ZAKLJUČCI

# 5. Zaključci

Nakon provedenog istraživanja, u okviru ovog diplomskog rada mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Primijenjeno eutektičko otapalo kolin-klorid/urea (1:2) je pogodno za sintezu derivata rodanina Knoevenagelovom kondenzacijom s različito supstituiranim aromatskim aldehidima.
- Uspješno je sintetizirano 13 spojeva u relativno kratkom vremenu i bez uporabe katalizatora u ekološki prihvatljivim uvjetima.
- Spojevi 5, 7, 8 i 12 prema rezultatima pokazuju značajnu antioksidativnu aktivnost.
- Vrsta, položaj i broj vezanihsupstituenata na fenilnom prstenu benzilidenske skupine utječu na antioksidativnu aktivnosti sintetiziranih derivata.
- Spojevi 5, 6, 8 i 13 pokazuju značajnu antibakterijsku aktivnost.
- Među ispitivanim bakterijskim vrstama, vrsta *B. subtilis* pokazuje najveću osjetljivost u odnosu na sintetizirane kemijske spojeve.

# 6. METODIČKI DIO

# 6. Metodički dio

## 6.1. Priprema za nastavni sat za 1. razred srednje škole (gimnazijski program)

| **Ime i prezime nastavnika** | **Škola** | **Datum** |
|---|---|---|
| Marijana Ivkić | Srednja škola (gimnazijski program) | |

| **Nastavna jedinica /tema** | | **Razred** |
|---|---|---|
| Prokariotske stanice – genetika, fiziologija, značenje | | 1. razred |
| **Temeljni koncepti** | **Ključni pojmovi** | |
| genetička rekombinacija, pohrana i pretvorbe energije, znanstvena metodologija | konjugacija, transdukcija, endospora, bakterioklorofil, bakteriologija | |
| **Cilj nastavnog sata (nastavne teme)** | | |
| Objasniti kako se karakteristični bakterijski mehanizmi genetičke rekombinacije i raznolike mogućnosti metaboliziranja tvari uporabljuju u mikrobiološke svrhe te u svakodnevnom životu. | | |

| **Ishodi učenja** | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **1. Objasniti različite načine izmjene gena u bakterija**<br>**2. Navesti različite načine sinteze i metaboliziranja tvari u bakterija**<br>**3. Objasniti značaj razvoja bakteriologije za svakodnevni život** | | | | |
| **Br.** | **Razrada ishoda nastavne jedinice** | **Zadatak/ primjer ključnih pitanja za provjeru ostvarenosti ishoda** | **KR** | **PU** |
| **1.** | 1.1. Navesti konjugaciju, transformaciju i transdukciju kao mehanizme genetičke rekombinacije.<br>1.2. Objasniti ulogu bakterijskih endospora u nepovoljnim životnim uvjetima. | Zašto se konjugacija ne može smatrati spolnim oblikom razmnožavanja?<br>Koji organizmi mogu sudjelovati u genetičkoj rekombinaciji bakterija?<br>Navedi 3 vrste nepovoljnih uvjeta koje bakterija u endospori može preživjeti! | I.<br>I.<br>I. | |
| **2.** | 2.1. Objasniti razliku između foto- i kemoautotrofije.<br>2.2. Navesti bakterioklorofil kao fotosintetski pigmet u bakterija.<br>2.3. Navesti saprofitske, parazitske i simbiontske bakterije kao primjere heterotrofnih organizama.<br>2.4. Navesti aerobno disanje i vrenje kao mehanizme metaboliziranja organske tvari. | Odakle dolazi energija koju koriste kemoautotrofi za sintezu organskih spojeva?<br>Koji organizmi mogu provoditi proces fotosinteze i koji su produkti tih procesa?<br>Objasni razliku između parazitskih i simbiontskih bakterija.<br>Što će se dogoditi ukoliko se *E. coli* nađe izvan probavnog sustava u ljudskom tijelu?<br>Što sve može nastati kao produkt bakterijskog metabolizma i kako ti produkti mogu djelovati na domadare bakterija? | I.<br>I.<br>I.<br>I.<br>I. | |
| **3.** | 3.1. Navesti kako su Leeuwenhoek, Pasteur i Koch doprinijeli razvoju bakteriologije.<br>3.2. Objasniti kako čovjek koristi genetičku rekombinaciju za liječenje bolesti. | Zašto svaka hranjiva podloga nije pogodna za rast i razvoj svake bakterijske vrste?<br>Zašto su prilikom nasađivanja bakterija u laboratoriju potrebni sterilni uvjeti?<br>Objasni pojam „programiranja“ bakterija i navedi jedan primjer njegove uporabe u medicini. | I.<br>I.<br>I. | |
| **Kognitivna razina (KR):** I. reprodukcija, II. konceptualno razumijevanje i primjena znanja, III. rješavanje problema<br>**Procjena uspješnosti učenja (PU): –** odgovara manje od 5 učenika, +/- odgovara otprilike polovina učenika, + odgovara većina učenika | | | | |

| **Tijek nastavnog sata** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Tip sata** | Sat obrade novih nastavnih sadržaja | **Trajanje** | 45 minuta | | | |
| **STRUKTURNI ELEMENT NASTAVNOG SATA** | **DOMINANTNA AKTIVNOST** | **BR. ISHODA** | **KORISTITI U IZVEDBI** | **METODA** | **SOCIOLOŠKI OBLIK RADA** | **TRAJANJE** (min) |
| **Uvodni dio** | N ⇨ Uvodi u temu kroz poticanje razgovora o cijepljenju u osnovnoj školi te prilaže fotografiju iskaznice cijepljenja (Prilog 1).<br>U ⇨ Razgovaraju s nastavnikom. | | PP | R | F | 3 |
| **Središnji dio** | N ⇨ Povezuje „druženje“ bakterija s čovjekom s „druženjem“ bakterija međusobno te objašnjava mehanizme konjugacije, transformacije i transdukcije.<br>N ⇨ Provjerava jesu li učenici usvojili nove pojmove postavljanjem pitanja za provjeru ostvarenosti ishoda (Zašto se konjugacija ne može smatrati spolnim oblikom razmnožavanja?).<br>N ⇨ Pomoću računala projicira video (Web 3) i ispituje učenike što video prikazuje.<br>U ⇨ Odgovaraju na pitanja, prate animaciju (Web 3) i zapisuju najvažnije informacije. | 1 | P<br>A | R | F | 7 |
| | N ⇨ Razgovorom o povoljnim i nepovoljnim uvjetima objašnjava ulogu bakterijske endospore.<br>U ⇨ Odgovaraju na postavljena pitanja (Koje nepovoljne uvjete poznaju?) i zapisuju najvažnije. | 1 | P | R | F | 2 |
| | N ⇨ Pitanjima potiče razgovor o prethodno stečenim znanjima o autotrofnim i heterotrofnim organizmima (Navedi primjer organizma i navedi na koji se način hrani. Koji organizmi mogu provoditi proces fotosinteze i navedi produkte tih procesa? Odakle dolazi energija koju koriste kemoautotrofi zasintezu organskih spojeva?)<br>U ⇨ Razgovaraju s nastavnikom.<br>N ⇨ Objašnjava nove pojmove (bakterioklorofil, saprofitske, parazitske i simbiontske bakterije) i provjerava usvojenost sadržaja pitanjima (Što će se dogoditi ukoliko se *E. coli* nađe izvan probavnog sustava u ljudskom tijelu? Objasni razliku između parazitskih i simbiontskih bakterija.).<br>U ⇨ Odgovaraju na pitanja te međusobno uspoređuju odgovore. Zapisuju najvažnije. | 2 | P | R | F | 8 |
| | N ⇨ Razgovorom s učenicima povezuje oblike „prehrane“ u bakterija s uzgojem na hranjivim podlogama. Dijeli učenike u 3 grupe i dijeli radne listiće sa zadatcima (Prilog 2).<br>U ⇨ Razgovaraju s nastavnikom i izvršavaju zadani zadatak: izlijevaju hranjivu podlogu u Petrijeve zdjelice (2 u svakoj grupi) i, ovisno kojoj grupi pripadaju, „nasađuju“ kosu, slinu i stanice kože. (Kvalitativno očitanje rezultata sljedeći nastavni sat.)<br>U ⇨ Ispunjavaju radne listiće. | 2<br>3 | RL<br>E | PR<br>C<br>R | F<br>G | 9 |
| | U ⇨ Objašnjava zadatak - svaka grupa će uz pomoć udžbenika navesti doprinos Leeuwenhoeka(1), Pasteura i Kocha (2) te Fleminga (3) razvoju bakteriologije. | 3 | UD<br>Ž | T | G | 4 |
| **Završni dio** | U ⇨ Svaka grupa izlaže svoje uratke. Zatvaraju knjige i bilježnice.<br>N ⇨ Slučajnim odabirom bira učenike koji će na ploču napisati najvažnije informacije iz izloženog grupnog rada. | 3 | UD<br>ŽP | I | G<br>I | 8 |
| | N ⇨ Navodi dosege i uloge današnje bakteriologije i kao primjer navodi korištenja bakterija u sintezi inzulina. Provjerava usvojenost sadržaja postavljanjem pitanja (Što je to „programiranje“ bakterija? Znaš li još neki primjer osim sinteze inzulina?). | 3 | | R | F | 4 |

**Nositelji aktivnosti:** N – nastavnik, U - učenici (dodati i mijenjati uloge ukoliko je potrebno uz svaku aktivnost)
**Koristiti u izvedbi:** RL – radni listić za učenike, UDŽ – udžbenik, RB – radna bilježnica, P – ploča, PM – prirodni materijal, E – pokus/eksperiment, MD – model, AP – aplikacija, PP – projekcija prezentacije, V – video zapis, A – animacija, I – igra, IU – igranje uloga, RS – računalna simulacija, M – mikroskop, L – lupa, F – fleks kamera, T – tablet, MO – mobitel, OP – organizator pažnje, AL - anketni listić TM - tekstualni materijali (dodati prema potrebi)
**Metode:** PR – praktični radovi, D – demonstracija, C – crtanje, I – usmeno izlaganje, R – razgovor, T – rad na tekstu i pisanje
**Oblici rada**: I – individualno, P – rad u paru, G – grupni rad, F – frontalno

## Materijalna priprema

LCD projektor, računalo, udžbenik, Petrijeve zdjelice, hranjive podloge, 70%-tni alkohol, ubrusi, radni listići

## Plan učeničkog zapisa

PROKARIOTSKE STANICE – GENETIKA, FIZIOLOGIJA, ZNAČENJE

- genetička rekombinacija
  - konjugacija
  - transformacija
  - transdukcija
- endospora (nekim bakterijama omogućava preživljavanje nepovoljnih uvjeta)
- osiguravanje energije (prehrana)
  - autotrofija (foto- i kemo-)
    *bakterioklorofil
  - heterotrofija (saprofiti, paraziti, simbionti)
- bakteriologija (Leeuwenhoek, Pasteur, Koch, Fleming)
- „programiranje“ bakterija – sinteza inzulina

## Prilozi

Prilog 1. Fotografija iskaznice cijepljenja

Prilog 2. Radni listić „Nasađivanje bakterijskih kultura“

## Literatura

Matekalo Draganović, J. (ur) (2006) Od molekule do organizma. Školska knjiga, Zagreb.

Web 3 - https://www.youtube.com/watch?v=JcU_icricBU

# 7. POPIS LITERATURE

## 7. Popis literature


Allan, F.J., Allan, G.G., Thomson, J.B. (1958) The condensation of rhodanine with aromatic dialdehydes and some related compounds. Canadian Journal of Chemistry 36: 1579-1583.

Alonso, D.A., Baeza, A., Chinchilla, R., Guillena, G., Pastor, I.M., Ramón, D.J. (2016) Deep eutectic solvents: the organic reaction medium of the century. European Journal of Organic Chemistry 2016: 612-632.

Al-Sehemi, A.G., El-Gogary, T.M. (2009) Geometry and thermodynamic stabilities of rhodanine tautomers and rotamers: Quantum chemical study. Journal of Molecular Structure 907: 66-73.

Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D., Rastija, V., Lučić, B., Trinajstić, N. (2007) SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. Current Medicinal Chemistry 14: 827-845.

Amorati, R., Valgimigli, L. (2015) Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. Free Radical Research 49: 633-649.

Anbarasan, R., Dhandapani, A., Manivarman, S., Subashchandrabose, S., Saleem, H. (2015) Synthesis and spectroscopical study of rhodanine derivative using DFT approaches. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 5: 261-272.

Balouiri, M., Sadiki, M., Ibnsouda, S.K. (2016) Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis 6: 71-79.

Bhawsar, N.A., Singh, M. (2014) Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* from waste soybean oil as biosurfactants which enhances biodegradation of industrial waste with special. International Journal of Advanced Research 2: 778-783.

Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. World Allergy Organization Journal 5: 9-19.

Chambers, H.F. (2001) The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*?. Emerging Infectious diseases 7: 178-182.

Cvjetko Bubalo, M., Panić, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I. (2016) Metode priprave eutektičkih otapala. Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition 11: 164-168.

Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G-J., Verpoorte, R., Choi, Y.H. (2013) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. Analytica Chimica Acta 766: 61-68.

Dixit, R.B., Bulsara, A.P., Mehta, H.B., Dixit, C.B. (2012) Synthesis, characterization and antimicrobial activities of new bis-hydrazonothioxothiazolidinone derivatives. Journal of Saudi Chemical Society 16: 193-197.

Earl, A.M., Richard Losick, R., Kolter, R. (2008) Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. Trends in Microbiology 16: 269-275.

Fischer, V. (2015) Properties and applications of deep eutectic solvents and low-melting mixtures. Dissertation. Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg, Regensburg.

Florindo, C., Oliveira, F.S., Rebelo, L.P.N., Fernandes, A.M., Marrucho, I.M. (2014) Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvents based on cholinium chloride and carboxylic acids. ACS Sustainable Chemistry & Engineering 2: 2416-2425.

Gellatly, S.L., Hancock, R.E.W. (2013) *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. Pathogens and Disease 67: 159-173.

Giddings, L-A., Newman, D.J. (2015) Bioactive compounds from marine extremophiles. Extremophilic bacteria. Switzerland, Springer International Publishing.

Gong, K., He, Z-W., Xu, Y., Fang, D., Liu, Z. (2008) Green synthesis of 5-benzylidene rhodanine derivatives catalyzed by 1-butyl-3-methyl imidazolium hydroxide in water. Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly 139: 913-915.

Gu, W., Wang, S. (2010) Synthesis and antimicrobial activities of novel 1H-dibenzo[a,c]carbazoles from dehydroabietic acid. European Journal of Medicinal Chemistry 45: 4692-4696.

Gualtieri, M., Bastide, L., Villain-Guillot, P., Leonetii, J-P. (2006) In vitro activity of a new antibacterial rhodanine derivative against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 58: 778-783.

Guo, M., Zheng, C.J., Song, M.X., Wu, Y., Sun, L.P., Li, Y.J., Liu, Y., Piao, H.R. (2013) Synthesis and biological evaluation of rhodanine derivatives bearing a quinoline moiety as potent antimicrobial agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 23: 4358-4361.

Hammond, O.S., Bowron, D.T., Edler, K.J. (2016) Liquid structure of the choline chloride-urea deep eutectic solvent (reline) from neutron diffraction and atomistic modelling. Green Chemistry 18: 2736-2744.

Han, L., Wu, T., Zhou, Z. (2013) A simple and green procedure for the synthesis of 5-arylidenerhodanines catalyzed by diammonium hydrogen phosphate in water. The Scientific World Journal 2013: 1-5.

Han, L., Zhou, Z. (2016) A rapid and green procedure for the synthesis of 5-arylidene rhodanine derivatives. Modern Organic Chemistry Research 1: 30-34.

Hardej, D., Ashby Jr., C.R., Khadtare, N.S., Kulkarni, S.S., Singh, S., Talele, T-T. (2010) The synthesis of phenylalanine-derived C5-substituted rhodanines and their activity against selected methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. European Journal of Medicinal Chemistry 45: 5827-5832.

Hotta, N., Akanuma, Y., Kawamori, R., Matsuoka, K., Oka, Y., Shichiri, M., Toyota, T., Nakashima, M., Yoshimura, I., Sakamoto, N., Shigeta, Y. (2006) Long-term clinical effects of epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on diabetic peripheral neuropathy: the 3-year, multicenter, comparative aldose reductase inhibitor-diabetes complications trial. Diabetes Care 29: 1538-44.

Irvine, M.W., Patrick, G.L., Kewney, J., Hastings, S.F., MacKenzie, S.J. (2008) Rhodanine derivatives as novel inhibitors of PDE4. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 18: 2032-2037.

Jawale, D.V., Pratap, U.R., Mane, R.A. (2011) An alternative synthetic route for an antidiabetic drug, rosiglitazone. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter 22: 924-928.

Kalafutova, S. (2009) Derivaty rhodaninu jako potencialni lečiva III. Diplomova prace. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Praze.

Kedare, S.B., Singh, R.P. (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. Journal of Food Science and Technology 48: 412-422.

Khandelwal, S., Tailor, Y.K., Kumar, M. (2016) Deep eutectic solvents (DESs) as eco-friendly and sustainable solvent/catalyst systems in organic transformations. Journal of Molecular Liquids 215: 345-386.

Khare, N., Kapoor, A. (2016) Antioxidant evaluation of 2,4-thiazolidinedione and rhodanine derivatives. Der Pharmacia Lettre 8: 38-46.

Knoevenagel, E. (1898) Condensation von Malondiure mit Aromatiachen Aldehyden durch Ammoniak und Amine. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 31: 2596-2619.

Kosanić, M., Ranković, B., Vukojević, J. (2011) Antioxidant properties of some lichen species. Journal of Food Science and Technology 48: 584-590.

Kumar, G., Parasuraman, P., Sharma, S.K., Banerjee, T., Karmodiya, K., Surolia, N., Surolia, A. (2007) Discovery of a rhodanine class of compounds as inhibitors of *Plasmodium falciparum* enoyl-acyl carrier protein reductase. Journal of Medicinal Chemistry 50: 2665-2675.

Kumar, S. (2014) The importance od antioxidant and their role in pharmaceutical science – a rewiev. Asian Journal of Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences 1: 27-44.

Liang, N., Kitts, D.D. (2014) Antioxidant property of coffee components: Assessment of methods that define mechanisms of action. Molecules 19: 19180-19208.

Liu, P., Hao, J-W., Mo, L-P., Zhang, Z-H. (2015) Recent advances in the application of deep eutectic solvents as sustainable media as well as catalysts in organic reactions. RSC Advances 5: 48675-48704.

Majd, M.M. (2007) Derivatives of rhodanine as potentialantifungal and antimycobacterial drugs. Diploma thesis. Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Prague.

Manisha, Whidul Hasan, W., Rajak, R., Jat, D. (2017) Oxidative stress and antioxidants: an overview. International Journal of Advanced Research and Review 2: 110-119.

March, J., Smith, M.B. (2007) March's advanced organic chemistry. Reactions, mechanisms and structure. 6th ed., New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.

Masalha, M., Borovok, I., Schreiber, R., Aharonowitz, Y., Cohen, G. (2001) Analysis of transcription of the *Staphylococcus aureus* aerobic class Ib and anaerobic class III ribonucleotide reductase genes in response to oxygen. Journal of Bacteriology 183: 7260-7272.

Matekalo Draganović, J. (ur) (2006) Od molekule do organizma. Školska knjiga, Zagreb

McGuire, W.C., O'Neill, R.C., Brody, G. (1966) Anthelmintic activity of 3-methyl-5-[(p-nitrophenyl)azo]rhodanine. The Journal of Parasitology 52: 528-537.

McFarland, J. (1907) Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. Journal of the American Medical Association 14: 1176-1178.

Mendgen, T., Steuer, C., Klein, C.D. (2012) Privileged scaffolds or promiscuous binders: A comparative study on rhodanines and related heterocycles in medicinal chemistry. Journal od Medicinal Chemistry 55: 743-753.

Molnar, M. (2011) Antioksidacijska svojstva derivata kumarina i njihovo antifungalno djelovanje prema najvažnijim mikotoksigenim plijesnima iz hrane. Doktorski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet u Osijeku, Osijek.

Molnar, M., Brahmbhatt, H., Rastija, V., Pavić, V., Komar, M., Karnaš, M., Babić, J. (2018) Environmentally friendly approach to Knoevenagel condensation of rhodanine in choline chloride: urea deep eutectic solvent and QSAR studies on their antioxidant activity. Molecules 23: 1-15.

Moradali, M.F., Ghods, S., Rehm, B.H.A. (2017) *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival and persistance. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 7: 1-29.

Nencki, M. (1877) Ueber die Einwirkung der Monochloressigsäure auf Sulfocyansäure und ihre Salze. Journal für praktische Chemie 16: 1-17.

Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., Beebek, D., Oatesk, P.J., Hammes, H-P., Giardino, I., Brownlee, M. (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. Nature 404: 787-790.

Patel, A.B., Kumari, P. (2016) Recent advances in the biological importance of rhodanine derivatives. U: Varala, R. (ur.) Scope of selective heterocycles from organic and pharmaceutical perspective. IntechOpen, Croatia, str. 49-64.

Pinson, J-A., Schmidt-Kittler, O., Zhu, J., Jennings, I.G., Kinzler, K.W., Vogelstein, B.,Chalmers, D.K., Thompson, P.E. (2011) Thiazolidinedione-based PI3Ka inhibitors: ananalysis of biochemical and virtual screening methods. ChemMedChem 6: 514-522.

Pisoschi, A.M., Negulescu, G.P. (2011) Methods for total antioxidant activity determination: A Review. Biochemistry & Analytical Biochemistry 1: 1-10.

Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. (1999) Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry 269: 337-341.

Radi, M., Botta, L., Casaluce, G., Bernardini, M., Botta, M. (2010) Practical one-pot two-step protocol for the microwave-assisted synthesis of highly functionalized rhodanine derivatives. Journal of combinatorial chemistry 12: 200-205.

Ramesh, V., Rao, B.A., Sharma, P., Swarna, B., Thummuri, D., Srinivas, K., Naidu, V.G.M., Rao, V.J. (2014) Synthesis and biological evaluation of new rhodanine analogues bearing 2-chloroquinoline and benzo[h]quinoline scaffolds as anticancer agents. European Journal of Medicinal Chemistry 83: 569-80.

Redemann, C.E., Icke, R.N., Alles, G.A. (1947) Rhodanine. Organic Syntheses 27: 73-74.

Salton, M.R.J. (1996) Structure. U: Baron, S. (ur.) Medical Microbiology. University of Texas Medical Branch, Galveston, 277-282.

Sax, N.I. (1984) Dangerous properties of industrial materials. 6th ed., New York, NY: Van Nostrand Reinhold.

Shahcheraghi, S.H., Ayatollahi, J., Lotf, M. (2018) Applications of *Bacillus subtilis* as an important bacterium in medical sciences and human life. Tropical Journal of Medical Research 18: 1-4.

Shih, M-H., Su, Y-S., Wu, C-L. (2007) Synthesis of aromatic substituted hydrazinothiazole derivates to clarify structural characterization and antioxidant activity between 3-arylsydnonyl and aryl substituted hydrazino-thiazoles. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 55: 1126-1135.

Sirviö, J.A., Visanko, M., Liimatainen, H. (2015) Deep eutectic solvent system based on choline chloride-urea as a pre-treatment for nanofibrillation of wood cellulose. Green Chemistry 17: 3401-3406.

Sojitra, N.A., Patel, T.S., Dixit, R.B., Dixit, B.C. (2013) Synthesis of rhodanine substituted 4(3*H*)-quinazolinone derivatives and their antimicrobial evaluation. Journal of Chemica Acta 2: 46-52.

Sortino, M., Delgado, P., Juarez, S., Quiroga, J., Abonia, R., Insuasty, B., Nogueras, M., Rodero, L., Garibotto, F.M., Enrize, R.D., Zacchino, S.A. (2007) Synthesis and antifungal activity of (*Z*)-5-arylidenerhodanines. Bioorganic & Medicinal Chemistry 15: 484-494.

Subhedar, D.D.; Shaikh, M.H.; Nawale, L.; Yeware, A.; Sarkar, D.; Shingate, B.B. (2016) [Et3NH][HSO4] catalyzedefficient synthesis of 5-arylidene-rhodanine conjugates and their antitubercular activity. Research on Chemical Intermediates 42: 6607‑6626.

Španingerová, E. (2006) Kondenzačni produkty aldehydu s rhodaninem jako potencialni lečiva. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Praze.

Tejchman, W., Korona-Glowniak, I., Malm, A., Zylewski, M., Suder, P. (2017) Antibacterial properties of 5-substituted derivatives of rhodanine-3-carboxyalkyl acids. Medicinal Chemistry Research 26: 1316-1324.

Thomer, L., Schneewind, O., Missiakas, D. (2016) Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bloodstream Infections. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 11: 343-364.

Tomašić, T., Mašič, L.P. (2009) Rhodanine as a privileged scaffold in drug discovery. Current Medicinal Chemistry 16: 1596-1629.

Tomašić, T., Mašič, L.P. (2012) Rhodanine as a scaffold in drug discovery: a critical review of its biological activities and mechanisms of target modulation. Expert Opinion on Drug Discovery 7:549-560.

Tomé, L.I.N., Baião, V., da Silva, W., Brett, C.M.A. (2018) Deep eutectic solvents for the production and application of new materials. Applied Materials Today 10: 30-50.

Varghese, S., Tiwari, S., Tiwari, B.M.L. (2003) Electronic absorption and mass spectral studies on some 5-substituted rhodanine derivatives. Asian Journal of Chemistry 15: 439-444.

Vila, J., Saez-Lopez, E., Johnson, J.R., Romling, U., Dobrindt, U., Canton, R., Giske, C.G., Naas, T., Carattoli, A., Martinez-Medina, M., Bosch, J., Retamar, P., Rodriguez-Bano, J., Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R.E.W. (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature Protocols 3: 163-175.

Weng Ng, S. (2007) Redetermination of rhodanine at 173 K. Acta Crystallographica 63: 1363-1364.

Wiegand, I., Hipert, K., Hancock, R.E. (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature Protocols 3: 163-175.

Windholz, M. (ur.) (1983) The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Rahway, N.J.: Merck & Co., United States.

Yadav, A., Kumari, R., Yadav, A., Mishra, J.P., Srivatva, S., Prabha, S. (2016) Antioxidants and its functions in human body - A Review. Research in Environment and Life Sciences 9: 1328-1331.

Young, I.S., Woodside, J.V. (2001) Antioxidants in health and disease. Journal of Clinical Pathology 54: 176-186.

Zhang, Q., Vigier, K., Royer, S., Jerome, F. (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. Chemical Society Reviews 41: 7108-46.

Zhou, J-F., Zhu, F-X., Song, Y-Z., Zhu, Y-L. (2006) Synthesis of 5-arylalkylidene rhodanines catalyzed by tetrabutylammonium bromine in water under microwave irradiation. Archive for Organic Chemistry 14: 175-180.

Zvarec, O., Polyak, S.W., Tieu, W., Kuan, K., Dai, H., Pedersen, D.S., Morona, R., Zhang, L., Booker, G.W., Abell, A.D. (2012) 5-Benzylidenerhodanine and 5-benzylidene-2-4-thiazolidinedione based antibacterials. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 22: 2720-2722.

### 7.1. Internetski izvori

Web 1. PubChem: Rhodanine. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/rhodanine#section=Stability-and-Reactivity (24.10.2018.)

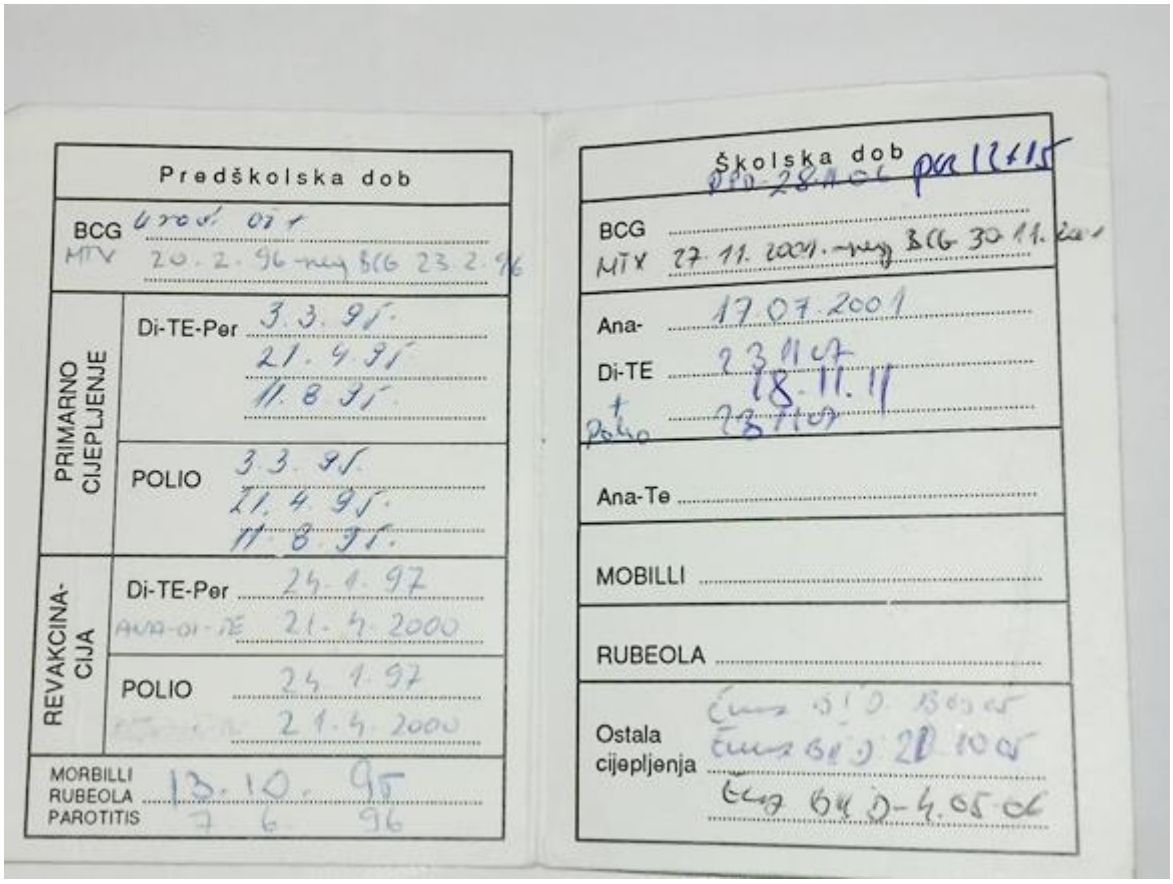
Web 2. FOCUS BIOSCIENCE: EPALRESTAT. https://focusbio.com.au/wp-content/uploads/2016/02/hy-66009.gif (24.10.2018.)

Web 3. YouTube: Transdukcija bakterija – animacija. https://www.youtube.com/watch?v=JcU_icricBU (24.10.2018.)

# PRILOZI

Prilog 1

Fotografija iskaznice cijepljenja



Predškolska dob

BCG
MTV

PRIMARNO CIJEPLJENJE
Di-TE-Per
POLIO

REVAKCINACIJA
Di-TE-Per
POLIO

MORBILLI
RUBEOLA
PAROTITIS

Školska dob

BCG
MTV

Ana-
Di-TE
t
Polio

Ana-Te

MOBILLI

RUBEOLA

Ostala cijepljenja

Prilog 2

Radni listić „Nasađivanje bakterijskih kultura“

RADNI LISTIĆ

# NASAĐIVANJE BAKTERIJSKIH KULTURA

naziv grupe _____

ime i prezime učenika _____

Bakteriološka podloga je hranjivi medij koji svojim sastavom omogućuje rast bakterija. Njihova osnovna namjena je uzgoj bakterija u laboratorijskim uvjetima, a radi upoznavanja biokemijskih osobina, dijagnosticiranja bolesti, izrade antigena, antibiograma i slično.

## 1. Odgovori na pitanja!

1.1. Zašto svaka hranjiva podloga nije pogodna za rast i razvoj svake bakterijske vrste?

_____ .

1.2. Zašto su prilikom nasađivanja bakterija u laboratoriju potrebni sterilni uvjeti?

_____ .

1.3. Bakterije se mogu „hraniti“ na različite načine. Što sve može nastati kao produkt bakterijskog metabolizma i kako ti produkti mogu djelovati na domadare bakterija?

_____ .

## 2. Nasađivanje „kultura“

*Zadatak:* Nasadite uzorak prema nazivu grupe.
Očitajte rezultate kvalitativno sljedeći nastavni sat te nacrtajte dobiveni uzorak bakterija.

*Postupak:*

1. Prebrišite radnu površinu ubrusom natopljenim 70%-tnim etanolom.
2. Označite Petrijeve zdjelice na vanjskoj strani dna s oznakom grupe i inicijalima. U sterilne Petrijeve zdjelice ulijte pripremljenu hranjivu podlogu. Poklopite. Ostavite da se podloga skrutne.
3. Pripremljenu čvrstu hranjivu podlogu u Petrijevoj zdjelici nasadite.

4. Nacrtaj dobiveni uzorak bakterija!